



CYTOSPORA CHRYSOSPERMA “PERS” FR.’NİN İN-VİTRO KOŞULLARINDA MORFOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN VE EN UYGUN İNOKULASYON YÖNTEMİNİN BELİRLENMESİ*

Hüseyin AKTAŞ¹, Ziya ŞİMŞEK*¹

¹ Çankırı Karatekin Üniversitesi Orman Fakültesi 18200 ÇANKIRI

ÖZET

Cytospora chrysosperma “Pers” Fr.’nin PDA (Patates dekstroz-Agar) besi ortamında 24 ±1°C’de ve %80 orantılı nemde en iyi geliştiği saptanmıştır. Gelişme hızının 14 mm/gün olduğu, bu koşullar altında, inkubasyondan 3 gün sonra piknit oluşturduğu ve 24 gün sonra da bu piknitlerden spor salgılandığı görülmüştür. Enfekteli kavak kabuklarında multilokullar formda pikniti içeren stroma oluşturduğu ve bu piknitlerden de çok miktarlarda sarı – pembe ya da kiremit kırmızısı renginde belirgin spor salgıladığı belirlenmiştir. Etmen, iklim koşullarına bağlı olarak çok değişik virulanslı izolatlar oluşturmaktadır. Çalışma bölgesinde 25 nolu izolata (Ankara – Kırıkkale Kızılırmak İzolatu) en virulent izolat olduğu bulunmuştur. Etmenin kavakta patojen olduğu bir kez daha belirlenmiş ve konukçuları arasında söğüt de yer almıştır.

Anahtar Sözcükler: İn-vitro, *Cytospora chrysosperma*, Kavak, Patojenisite

DETERMINATION OF MORPHOLOGICAL FEATURES AND THE BEST INOCULATION METHOD OF CYTOSPORA CHRYSOSPERMA “PERS” FR. AT IN-VITRO CONDITIONS

ABSTRACT

It was determined that *Cytospora chrysosperma* “Pers” Fr. developed best at PDA (Potato Dextrose Agar) nourishment media and at 24±1°C and 80% relative humidity conditions. Development rate of the pathogen was found to be 14 mm/day and under these conditions, pycnidia production occurred 3 days after incubation and spores secreted from these pycnidia after 24 days after incubation. It was also determined that the disease agent produces multiocular form pycnidia on infected poplar barks and yellowish-pink or dark red colored deterministic spores were secreted from these pycnidia. The disease agent may produce various virulence isolates depending on climatic conditions. It was determined that the isolate 25 (Ankara-Kırıkkale isolate) was the most virulent isolate in the study area. It was once more determined that the disease agent to be a pathogen of poplars and willows were found to be hosts of the disease.

Keywords: In-vitro, *Cytospora chrysosperma*, Poplar, Pathogenicity

1. GİRİŞ

Orman ürünleri arz açığı sadece yurdumuz için söz konusu olamayıp, tüm dünya için de bir sorundur. Bu bakımdan hızlı gelişen türlerle ağaç plantasyonları yapılarak odun üretimini artırmak, odun arz açığının kapatılmasına yardımcı olacak çarelerden birisidir. Bilindiği gibi Kavak, hızlı gelişen önemli bir ağaç cinsidir. İğne yapraklı orman alanları üzerindeki baskının azaltılması bakımından kavak yetiştiriciliğine önem

* TÜBİTAK TOGTAĞ-3140 No’lu projenin bir bölümüdür

* Yazışma yapılacak yazar: ziyasimsek@karatekin.edu.tr

Makale metni 02.12.2009 tarihinde dergiye ulaştırılmış, 13.05.2010 tarihinde basım kararı alınmıştır.

verilmelidir (Koçer, 1999). Fakat kavak yetiştiriciliğinde de biyotik ve abiyotik faktörler, bir engel olarak karşımıza çıkmaktadır. Yetiştiricilerin de söylediği gibi “ağaçlar birden bire kurudu” sözleri daha çok biyotik ve abiyotik faktörlere dayanmaktadır. Biyotik faktörlerden fungal hastalıklar ve vektörleri, günümüzde dahi, Ülkemizde hala çözüm bekleyen bir problemdir. Bu problem çözüldüğü takdirde kavak odun hammaddesinde gerek kalitatif ve gerekse kantitatif olarak bir artış olacağı gibi yetiştiriciye ve milli ekonomiye de büyük bir katkı sağlayacaktır.

Çevre ve Orman Bakanlığı'na bağlı Çankırı Orman Fidanlık Müdürlüğü'nün Kenbağ Orman Fidanlık alanındaki kavak fidanlarının 2001 yılından itibaren kurudukları ve bu yüzden de büyük kayıplara neden oldukları görülmüştür. Ayrıca Orta Anadolu Bölgesi'nde yetiştirilen kavakların da yer yer kurudukları bilinmektedir. Bu kuruma nedenlerinin araştırılması ve sorunun çözümünün gerekliliği ortaya çıkmıştır. Yapılan bir araştırmada kurumaya, fungal bir patojen olan *Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr.'nin neden olduğu saptanmıştır (Aktaş ve Şimşek, 2005). *Cytospora* kanseri adı da verilen patojene karşı önlem alınmadığı takdirde, yani bu hastalık sorunu çözümediği sürece başta, zaten geçim kaynağı az olan üreticiler ile Çankırı Orman Fidanlık Müdürlüğü büyük zarar göreceklidir. Hastalığın kavak fidan üretim alanlarında özellikle üretim aşamasında ve 1–2 yaşlı fidanlara bulaştığı, bulaşıklılığın delici böceklerle yayıldığı, bulaşık fidanların üreticilere ulaşmasıyla hastalığın bölge genelinde yayıldığı, bulaşık fidanların fidanlıkta veya üreticinin diktiği alanlarda tamamen kuruduğu göz önüne alındığında çalışmanın önemi ve ülke ekonomisine önemli parasal katkılarının olacağı kendiliğinden anlaşılmaktadır. *Cytospora* kanseri adı da verilen *C.chrysosperma* hastalık etmenine bir çözüm bulunursa Çankırı Orman Fidanlık Müdürlüğü'nün ve yöre kavak üreticilerinin, yeni çıkan ve hızlı bir yayılma gösteren bu hastalıkla ilgili sorunları da çözülmüş olacaktır.

Yapılan literatür taramasında konuyla ilgili sınırlı sayıda çalışma olduğu görülmüştür. Colorado'da *Populus tremuloides* Michx. meşceresinde % 90'dan fazla sürgün kurumaları saptanmıştır. Bu kurumlardan yapılan izolasyonlardan *C. chrysosperma* ve *Dothiora polyspora* Shear & R.W. Davidson elde edilmiş, patojenisite testinde ise *C. chrysosperma*'nın asıl patojen olduğu belirlenmiştir (Jacobi ve Shepperd, 1991). Uluer ve ark. (1998), Ülkemizde kavak fidanı yetiştiren fidanlıkların hiç birinde *C. chrysosperma*'ya rastlanılmamasına karşın, yetişkin kavak ağaçlandırmalarında önemli zararlara sebep olduğunu, gözlem yapılan 10 sahada 5 yıl (1993–1997) içinde 287 adet kavak ağacının bu patojenden dolayı kuruduğunu, buna göre %5.63 oranında zarar oluştuğunu saptamışlardır. Keca (2000), Macaristan ve Yugoslavya'da yaptığı çalışmada kavak kabukları üzerinde saptadığı beş fungustan birinin *C. chrysosperma* olduğunu kaydetmiştir. Kepley and Jacobi (2000) patojenisite çalışmalarında *C. chrysosperma*'nın sadece kavak türlerine özgü olduğunu belirtmiştir. Aktaş ve Şimşek (2005) *C. chrysosperma* 'nın kavak ağaçlarının en önemli hastalığı olduğunu, Çankırı yöresinde etmene söğüt ağaçlarında da rastlandığını kaydetmiştir. Aynı araştırmacılar, enfekteli kavakların mutlaka kuruduklarını, nekrotik alanların bulunduğu yerlerde multilokullar formda piknit oluşturduğunu ve bu piknitlerden nisan – mayıs aylarında çok miktarda sarımtırak – pembe ya da kiremit kırmızısı renginde spor salgıladığının tespit edildiğini belirterek, kavak gövdelerindeki semptomlarını tarif edip patojenin ılıman iklim bölgelerinde daima imperfekt devrede yaşadığını saptamışlardır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Patojenin En İyi Geliştiği Besi Ortamının ve Kültürel Özelliklerinin Belirlenmesi

C. chrysosperma 'nın en iyi geliştiği ve sporulasyon oluşturduğu besi ortamını belirlemek için 9 farklı besi ortamı kullanılmıştır. Kullanılan besi ortamlarının içerikleri aşağıda belirtilmiştir.

Çalışmada her bir besi ortamı için 90 mm çapındaki steril cam petripler kullanılmıştır. Deneme, tesadüf parselleri deneme desenine göre kurulmuş ve 5 petri, 5 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Her petri bir parsel olarak kabul edilmiştir (Karman, 1971). Etmen 24±1°C de, 12 saat aydınlık periyotta, 30 günlük inkübasyonda tutulmuştur. Deneme laboratuvarında iklim dolabında yürütülmüştür. Denemenin ilk 1. gününden sonra her gün fungusun petrideki gelişme sınırları cetvelle ölçülmüş ve her petri için ortalama alınmıştır. Ayrıca 30 günlük inkübasyon sonunda her bir besi ortamı için her petrideki piknit oluşumu ve fungusun spor salgıları makroskopik olarak izlenmiştir.

1.PDA (Patates dekstroz-Agar)

Merck standart Potato Dextrose-Agar
No: M.0130

3.KEA (Kavak Kabuk ekstraktı-Agar)

Kavak Kabuk Ekstraktı 200 ml
Dekstroz 20 g
Agar (standart) 20 g
Destile su 800 ml

5.PHA (Patates Havuç Ekstrakt-Agar)

Patates ekstraktı 250 ml
Havuç ekstraktı 250 ml
Agar 15 g
Destile su 500 ml

7.PA (Patates-Agar)

Patates ekstraktı 200 ml
Agar 20 g
Destile su 800 ml

9.Su-Agar: Water Agar %2

Agar 20 g
Destile su 1000 ml

2.MEA (Malt ekstrakt-Agar)

Merck standart Malzextrakt-Agar Art.Nr.5398

4.HA (Havuç ekstrakt-Agar)

Havuç ekstraktı 250 ml
Agar (Standart) 15 g
Destile su 750 ml

6. V-8 Agar

V-8 juisse (vegetable juisse) 200 ml
Agar (Merck) 20 g
Destile su 800 ml

8. SNA: Synthetischer Nährstoff-Agar

KH₂PO₄ 1 g
KNO₃ 1 g
MgSO₄.7H₂O 0,5 g
KCl 0,5 g
Glikoz 0,2 g
Sakkaroz 0,2 g
Agar 20 g
Destile su 1000 ml

Çalışma yöresinde toplam 104 hastalıklı kavak örnekleri toplanmıştır. Bu örneklerden elde edilen tek spor izolatlarının in-vitro çalışmaları ile Aktaş vd. (2008) tarafından yapılan çalışmalar da esas alınarak en virulent izolat seçilmiştir. Her bir izolat bir petriye aşılanmış ve 24±1°C'de 21 gün inkübe edilmiştir. Bu kültürlerden birbirine benzeyen izolatlar aynı gruba sokulmuştur. İzolatların miselyal gelişme şekilleri, renkleri, piknit yoğunlukları ile piknit büyüklükleri dikkate alınarak gruplandırma yapılmıştır. Daha sonra ise her grup içinden tesadüfen bir izolat seçilmiştir. Bu 8 izolat ile deneme kurulmuştur. Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre 8 parsel, 5 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Her petri bir parsel olarak kabul edilmiştir (Karman, 1971). Burada her petri farklı bir izolatu içermektedir. 21 günlük her izolattan 1 cm çapındaki mantar delici ile alınan *C. chrysosperma* kültürleri, PDA (Patates dekstroz-Agar) besi ortamı bulunan petrilere aşılanarak deneme kurulmuştur. Deneme 24±1°C de 12 saatlik aydınlık periyotta yürütülmüştür. Denemenin 1. gününden sonra her petrideki kültürün miselyal gelişmesi cetvelle ölçülmüştür. Burada etmenin miselyal gelişme hızı, petrideki piknit sayısı ve piknit büyüklüğü esas alınmıştır.

2.2. En Uygun İnokulasyon Yönteminin ve Etmenin Patojenisitesinin Saptanması

Etmenin konukçusuna bulaşma durumları ve hastalandırma yetisinin olup olmadığı bu çalışma ile aydınlatılmıştır. Kullanılan inokulasyon yöntemleri ise:

1. 25 cm. lik Karakavak kalemlerinde mantar delicisi ile açılan yara yerlerine,
2. Kavak kalemlerinde bıçak ile kabukta çizilen yara yerlerine,
3. Kavak kalemlerinin orta kısımlarındaki kabuk üzerinde, % 72'lik alkolle dezenfeksiyon edildikten sonra steril toplu iğne ile yaralanan yerlerine,
4. Yara açılmadan direkt kavak kalemleri üzerine inokulasyonlar yapılmıştır.

Birinci inokulasyon yöntemi dışında diğer inokulasyon yöntemlerinde, *C. chrysosperma*'nın 5.10⁸ spor/ml'lik inokulumu kullanılmıştır. Yöntemlerdeki her bir kavak kalemlerine 2 ml inokulum, bir pipet yardımı ile alınarak, inokulasyonlar yapılmıştır. İnokulum ise etmenin spor kümelerinden elde edilmiştir.

Birinci inokulasyon yöntemi için ise, 28 günlük besi ortamında gelişen kültürden 1 cm çapındaki mantar delici ile kültür alınmıştır. Aynı çaplı mantar delici ile 25 cm uzunluğunda 2 yaşındaki kavak fidanlarından alınan kalemlerden açılan yerlere kültürler ters olarak yerleştirilmiştir. Daha sonra bu kültürlerin üzeri, kavaktan açılan yerden çıkan kavak kabuğu ile örtülmüş ve üzerleri 2 cm genişliğindeki yapışkan bir bantla kapatılmıştır.

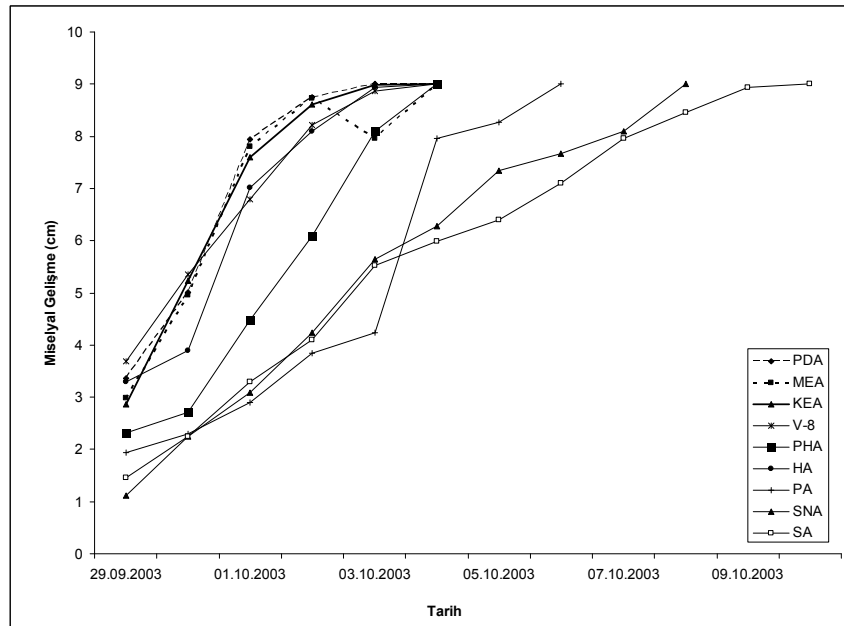
Deneme, tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 parsel, 1 kontrol ve 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Her parselde 3 kavak kalemi yer almıştır (Karman, 1971). Deneme $24 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta ve %80 orantılı neme ayarlı iklim dolabında, 12 saatlik aydınlık periyotta yürütülmüştür. İnkübasyonda 21 gün tutulmuştur. İnkübasyon sonunda inokulasyon yerinin üstünde ve altındaki kabuk bıçakla sıyrılmış ve enfeksiyon olup olmadığı kontrol edilmiştir. *C. chrysosperma* ile inokule edilen kavak kalemlerinin kabuk altındaki kahverengi nekrotik belirtilerine bakılarak, uygulanan 4 inokulasyon yönteminde, hastalığın çıkıp çıkmadığı, hastalık görülmüş ise en iyi hangi yöntemin olduğu belirlenmiştir. Aynı denemede etmenin patojenisitesi ve virulensi ortaya konulmuştur.

3. BULGULAR

3.1. Patojenin En İyi Geliştiği Besi Ortamının ve Virulent İzolatın Saptanması

Etmenin en iyi geliştiği ve sporulasyon oluşturduğu besi ortamının saptanması için materyal ve metotta belirtilen 9 farklı besi ortamı kullanılmıştır.

Hastalık etmeni *C. chrysosperma*, bu besi ortamlarına 27.09.2003 tarihinde alınmıştır. Denemeye, iklim dolabında $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de bir ay devam edilmiştir. Besi ortamlarındaki etmenin miselyal gelişmesi, piknit oluşturma başlangıcı, petrideki piknit yoğunluğu ve piknitlerden spor salınım başlangıcı dikkate alınarak en iyi gelişme ortamları belirlenmiştir. Patojenin en iyi miselyal olarak geliştiği besi ortamı Şekil 1'de, patojenin miselyal gelişmesi ve piknit oluşum başlangıç tarihleri ise Tablo 1'de ve görülmektedir. *C. chrysosperma*, 27.09.2003 tarihinde PDA, MEA, KEA, V-8, PHA, HA, PA, SNA ve SA besi ortamlarına sözü edilen deneme koşullarında, inokulasyonları yapılmış ve inkübasyona alınmıştır. Kültürler PDA'da 6 gün sonra (03.10.2003), diğerlerinde 7 gün sonra (04.10.2003 tarihinde) 9.00 cm'lik petrileri, Tablo 1'de de görüldüğü gibi, miselyal olarak tamamen kaplamıştır. Etmen, PA besi ortamını 8, SNA besi ortamını 10 ve SA besi ortamını ise aşılmasından 13 gün sonra denemelerdeki petrileri tamamen miselyal olarak kaplamışlardır.



Şekil 1. *Cytospora chrysosperma* "Pers" Fr.'nin $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de iklim dolabında değişik besi ortamlarındaki ortalama miselyal gelişmesi (cm)

Tablo 1. *Cytospora chrysosperma* "Pers" Fr.'nin 24±1°C'de iklim dolabında değişik besi ortamlarındaki ortalama miselyal gelişmesi (cm), piknit oluşumu ve spor salınımı başlangıçları ile petrillerdeki ortalama piknit yoğunluğu (piknit adedi/petri)

Gün	Tarih	PDA	MEA	KEA	V-8	PHA	HA	PA	SNA	SA
1	27.09.2003									
2	29.09.2003	3,36	2,99	2,87	3,69	2,32	3,29	1,93	1,12	1,46
3	30.09.2003	5,01*	4,96*	5,23	5,35	2,71	3,89	2,30	2,24	2,24
4	01.10.2003	7,95	7,81	7,60	6,80	4,48	7,01	2,90	3,08	3,30
5	02.10.2003	8,75	8,73	8,61	8,21	6,09	8,10	3,84	4,23	4,10
6	03.10.2003	9,00	8,96	8,98*	8,86	8,10	8,93	4,23	5,64	5,52
7	04.10.2003	9,00	9,00	9,00	9,00*	9,00*	9,00	7,96	6,27	5,98
8	05.10.2003	-	-	-	-	-	*	8,27	7,34	6,40
9	06.10.2003	-	-	-	-	-	-	9,00	7,66	7,10
10	07.10.2003	-	-	-	-	-	-	*	8,10	7,96
11	08.10.2003	-	-	-	-	-	-	-	9,00*	8,45
12	09.10.2003	-	-	-	-	-	-	-	-	8,93
13	10.10.2003	-	-	-	-	-	-	-	-	9,00
14	11.10.2003									
15	12.10.2003									
16	13.10.2003									
17	14.10.2003									
18	15.10.2003									
19	16.10.2003									
20	17.10.2003									
21	18.10.2003									
22	19.10.2003									
23	20.10.2003									
24	21.10.2003	**								
25	22.10.2003									
26	23.10.2003									
27	24.10.2003									
28	25.10.2003	***								
29	26.10.2003									
30	27.10.2003									
Ort. Piknit Sayısı/ Petri (adet/petri)		196,16	194,01	143,08	56,00	29,01	23,11	23,00	13,09	-

* Piknit oluşumu saptanan tarih

** Spor salınımı başlangıcı

*** Spor salınımı

PDA ve MEA besi ortamlarında ise 30.09.2003 tarihinde piknit oluşturmuşlardır. Diğer besi ortamlarında ise değişik inkubasyon tarihlerinden sonra ancak piknit oluşumu görülmüştür. Etmenin denemeye alınan besi ortamlarından ancak PDA ve MEA besi ortamlarında, aşılmasından 3 gün sonra (30.09.2003) bol miktarda toplu iğne başı büyüklüğünde grimsi-siyah renkli sklerotik yapıda sert piknit oluşumu başlangıcı saptanmıştır. KEA besi ortamında 6, V-8 ve PHA besi ortamında 7, HA besi ortamında 8, PA besi ortamında 10 ve SNA besi ortamında ise 11 gün sonra piknit oluşum başlangıcı görülmüştür. SA besi ortamında ise piknit oluşumuna deneme süresince hiç rastlanılmamıştır.

Patojenin petrillerdeki çeşitli besi ortamlarından sadece PDA besi ortamındaki kültürlerde oluşan piknitlerde denemenin başlangıcından 24 gün sonra (21.10.2003) 3 petrideki piknitlerde pembe-kırmızı renkte spor akımları başlamıştır. Etmenin petrillerdeki PDA besi ortamında aşılmasından 28 gün sonra (25.10.2003) ise tüm PDA besi ortamındaki petrilde, piknitlerin büyük çoğunluğunda spor akımı görülmüştür. Diğer besi ortamlarında ise bu tarihte, etmenin spor oluşturmasına ve spor akımına rastlanmamıştır. SA besi ortamı dışında diğer besi ortamlarında ise oluşan piknitlerin boş ve steril piknit olarak görülmüştür. 27.10.2003 Tarihinde, denemenin kuruluşundan 30 gün sonra her bir besi ortamındaki petrilde piknit sayıları sayılmış ve ortalamaları alınmıştır. Buna göre: PDA besi ortamında 199.16, MEA besi ortamında 194.01, KEA besi ortamında 143.08, V-8 besi ortamında 56.00, PHA besi ortamında 29.01, HA besi ortamında 23.11, PA besi ortamında 23.00 ve SNA besi ortamında ise 13.09 adet piknit/petri saptanmıştır (Tablo 1).

Çalışma yöresinde toplanan 104 *C. chrysosperma* içeren kavak örneklerinden elde edilen izolatlar aynı anda PDA besi ortamına, her biri bir petriye aşılanmıştır. Eğik ağardan alınan bu kültürlerden aynı miktardan, özeve alınarak petrilere aşılama yapılmıştır. Kültürler 1.10.2003 tarihinden, $24\pm 1^\circ\text{C}$ 'de 12 saatlik aydınlık periyotta 22.10.2003 tarihine kadar 21 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürlerin hepsi laboratuvar tezgahının üzerine konulmuş, miselyal gelişmeler ve piknit büyüklükleri de dikkate alınarak gruplandırılmıştır. İzolatlar 8 farklı grup altında toplanmıştır. Her grubu temsil eden birer izolat seçilerek, 27.10.2003 tarihinde izolatların kültürel özelliklerini belirlemek için deneme kurulmuştur. 10 gün (6.11.2003 tarihine) kadar inkübe edilmiştir. 8 izolatın ortalama miselyal gelişmesi, piknit büyüklüğü ve petrideki piknit yoğunluğu Tablo 2'de görülmektedir. Etmenin petrideki miselyal gelişmesinde petrilere arka görüntülerinde herhangi bir renk farklılığı görülmemiştir.

Tablo 2. Virulensi farklı 8 adet *Cytospora chrysosperma* "Pers." Fr.'nin $24\pm 1^\circ\text{C}$ de iklim dolabında PDA besi ortamında 10 günlük ortalama miselyal gelişmesi (cm) ve piknit sayısı

Sıra No.	Tarih	İzolatların Ortalama Miselyal Gelişmeleri (cm)							
		1 (2)	2 (17)	3 (25)	4 (64)	5 (77)	6 (106)	7 (106)	8 (127)
1	27.10.2003								
2	28.10.2003	2,90	2,80	3,03	2,99	3,00	3,01	2,60	3,00
3	29.10.2003	4,96	3,71	5,00	4,01	4,85	5,09	4,71	5,10
4	30.10.2003	6,60	6,10	6,94	6,11	5,91	6,90	5,90	6,80
5	31.10.2003	7,81	7,15	8,31	6,90	7,00	8,10	7,01	8,01
6	1.11.2003	8,61	7,90	9,00	7,95	8,10	9,00	8,40	9,00
7	2.11.2003	9,00	8,80		8,90	8,90		9,00	
8	3.11.2003		9,00		9,00	9,00			
9	4.11.2003								
10	5.11.2003								
11	6.11.2003 Ort.piknit say. (Adet/Petri)	193,45	196,10	200,10 (Çok iri piknit)	181,00	176,85	191,20	190,40	198,10 İri piknit

Tablo 2 incelendiğinde, 3 nolu izolat (25 nolu izolat), inkübasyonun 2 nci gününden itibaren (28.10.2003) diğer izolatlarla karşı farklı miselyal gelişme gösterdiği saptanmıştır. İnkübasyonun 3 ncü gününden (29.10.2003) 6 ncü gününe kadar (01.11.2003) 3, 6 ve 8 nolu izolatlarla, çok az bir farkla birlikte diğerlerine karşı daha iyi gelişmişlerdir. 01.11.2003 tarihinde, yani inkübasyonun 6. gününde 3, 6 ve 8 nolu izolatlar 9 cm lik petrilere tamamen miselyal olarak kaplamışlardır. Diğer izolatlar ise 7. ve 8. gün ancak miselyal olarak petrilere tamamen kaplamışlardır. İnkübasyondan 11 gün sonra her izolatın petrideki piknit sayıları ve piknit irilikleri ise görüldüğü gibi farklı olmuştur. 3 (25) ve 8 (127) nolu izolatlar ise birbirine çok benzemektedir. Ele alınan kriterler yönünden de aralarında çok az bir farklılık vardır. Tercihimiz ise 3 (25) nolu izolatın olmuştur. Yani denebilir ki: Yapılan gözlemlerde etmenin gerek miselyal gelişme hızı ile gerekse piknit sayısı ve piknit iriliği bakımından 3 (25) nolu izolat, İn-vivo çalışmaları da dikkate alınarak (Aktaş vd., 2008) en virulent izolat olarak seçilmiştir. Bundan sonraki tüm çalışmalarda ise Ankara-Kalecik ilçesinin Kızıllırmak nehri kenarındaki karakavak plantasyonundan alınan ve o yörede bulunan kavak ağaçlarının *C. chrysosperma* hastalığından dolayı %100'ünün kurumasına neden olan bu 25 nolu izolat kullanılmıştır.

3.2. İnkübasyon Yöntemleri ve Etmenin Patojenitesinin Saptanması

En iyi inkübasyon yöntemini bulmak amacıyla 25 cm'lik Karakavak kalemleri alınmıştır. Bu kalemlerin, mantar delicisi ile açılan yara yerlerine yapılan inkübasyonlar diğer üç inkübasyon yöntemlerinden (kavak kalemlerinde bıçak ile kabukta çizilen yara yerlerine, steril toplu iğne ile yaralanan yerlerine ve yara açılmadan direkt kavak kalemleri üzerine yapılan inkübasyonlardan) farklı olduğu, 21 günlük inkübasyon süresi sonunda görülmüştür (Şekil 2). Kavak kalemlerinde bıçak ile kabukta açılan yara yerlerinde, steril toplu iğne ile yaralanan karakavak üzerindeki yara yerlerinde yer yer çok az bazı nekrotik alanlara rastlanmış olmasına karşın, direkt kalemler üzerine yapılan inkübasyon yönteminde ise hiç bir nekrotik alana rastlanmamıştır. Mantar delicisi ile

açılan yara yerlerine yapılan inokulasyon yönteminin, en iyi inokulasyon yöntemi olduğu saptanmıştır. Çalışmalarda bundan sonra bu yöntem kullanılmıştır.



Şekil 2. *Cytospora chrysosperma* "Pers" Fr. ile enfekteli ve kontrol olarak bırakılan kavak kalemlerindeki nekrotik alan



Şekil 3. *Cytospora chrysosperma* "Pers" Fr.'nin kavak kalemlerine aşılmasından 21 gün sonraki nekrotik leke alanı

Patojenisite çalışmalarına 10.05.2004 tarihinde başlanmıştır. Bu çalışma, 2 yaşındaki Kara Kavak fidanlarından alınan, 25 cm uzunluğundaki kavak kalemleri ile yürütülmüştür. Kavak kalemleri Çevre ve Orman Bakanlığı Kenbağ Orman Fidanlığı'ndan temin edilmiştir. Deneme 26.05.2004 tarihinde değerlendirilmiştir. Çalışmada 1 aylık kültürler kullanılmıştır. Enfekte edilen yerin alt, üst ve yanlarına doğru kahverengi nekrotik bir renk vererek ilerleyen hastalık belirtilerinin görülmesi; etmenin patojen olduğunun bir kanıtıdır (Şekil 2 ve 3). Sözü edilen kavak kalemlerinde ölçülen nekrotik leke boyutları ile istatistik değerlendirmesi Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. *Cytospora chrysosperma* "Pers" Fr. ile patojenisite çalışmalarında kullanılan kavak kalemlerine aşılmasından 16 gün sonraki nekrotik lekelerin ölçütleri (cm)

Tekerrür	En		Boy		En		Boy		Kontrol	
	En	Boy	En	Boy	En	Boy	En	Boy	En	Boy
1	4,6	9,4	5,3	9,2	5,1	8,9	1,0	1,1	1,0	1,0
	4,0	8,9	5,9	8,5	5,0	7,9	1,1	1,0	1,0	1,0
	3,5	9,9	6,0	9,6	3,7	9,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Ort.	4,03	9,40	5,73	9,10	4,60	8,60	1,03	1,03	1,03	1,03
2	2,3	2,7	3,5	6,0	3,7	6,8	1,0	1,1	1,0	1,1
	4,7	5,8	4,0	5,9	4,2	6,0	1,1	1,0	1,1	1,0
	5,7	5,8	5,0	6,3	4,7	6,7	1,0	1,0	1,0	1,0
Ort.	4,23	4,76	4,16	6,06	4,20	6,50	1,03	1,03	1,03	1,03
3	4,4	6,9	4,3	9,0	4,0	8,4	1,0	1,1	1,0	1,1
	4,6	8,1	4,5	8,9	4,7	8,1	1,1	1,0	1,1	1,0
	5,1	8,1	5,6	9,0	4,9	8,1	1,0	1,0	1,0	1,0
Ort.	4,70	7,70	4,80	8,96	4,53	8,20	1,03	1,03	1,03	1,03
Genel Ort.	4,32 (a) $F_{En}=46,8666$ $P<0,001$	7,29 (a)	4,91 (a) $F_{Boy}=12,3858$ $P=0,002$	7,07 (a)	4,44 (b)	7,76 (b)	1,03	1,03	1,03 (a)	1,03 (b)

Tablo 3 incelendiğinde, *C. chrysosperma*'nın kavak kalemlerine aşılmasından 16 gün sonra kavak kalemlerindeki nekrotik lekelerin en ve boy değerlerinin (a), kontrol parsellerindeki (b) kavak kalemlerinden önemli oranda farklı olmasına karşın, uygulama grupları arasında önemli bir farklılığın bulunmadığı anlaşılmaktadır ($F_{En}=46,8666$; $P_{En}<0,001$ ve $F_{Boy}=12,3858$; $P_{Boy}=0,0002$).

4. TARTIŞMA VE KANI

C. chrysosperma'nın miselyal olarak en iyi geliştiği besi ortamını saptamak amacıyla Tablo 1'de görüldüğü gibi değişik 9 besi ortamı kullanılmıştır. Etmenin gerek miselyal gelişimi ve gerekse bu besi ortamlarında piknit oluşturması ile piknitlerden spor salınımı dikkate alındığında en uygun besi ortamının PDA olduğu saptanmıştır (Şekil 1 ve Tablo 1). Nitekim Kepley and Jacobi'de (2000) patojenin en iyi geliştiği besi ortamının PDA olduğunu ve çalışmalarını bu besi ortamında yürüttüklerini vurgulamaktadır. Mader et al. (2004) etmenin en iyi geliştiği besi ortamının PDA olduğunu, 25°C'de günlük gelişme hızının 7,1 mm olduğunu belirtmektedirler. Hâlbuki çalışmada 24±1°C'de ve PDA besi ortamının da, etmenin günlük gelişme hızı 1,41 cm olarak saptanmıştır. Bu farklılık, etmenin gelişme koşullarından, özellikle aydınlık periyottan ileri geldiği düşünülmektedir.

Çalışma yöresinden alınan 104 izolattan seçilen 8 izolatın içerisinde, gerek miselyal gelişme hızı, gerekse petrideki piknit sayısı ve piknit büyüklüğü ile Aktaş vd.'nin (2008) in-vivo çalışmalarının da değerlendirilmesi sonucu; 25 nolu izolat, en virulent (agresif) izolat olarak seçilmiştir. Bu izolat Ankara-Kalecik ilçesi Kızıllırmak nehri kıyısından alınan 25 nolu izolatdır. Bu izolatın alındığı yerdeki kavak ağaçları *C. chrysosperma* hastalığından dolayı tamamı kurumuştur (Aktaş vd., 2008). Miselyal olarak seçilen bu izolatın piknitleri de diğer izolatlara nazaran daha iri yapılıdır. Bilindiği gibi *C. chrysosperma*'nın stroma oluşturan bir patojendir. Stromadaki piknitleri multilokular bir sisteme sahiptir ve ikiden fazla lokusludur. Nitekim Kepley and Jacobi (2000) ile Agrios (1997) *C. chrysosperma*'nın piknitlerinin multilokular olduğunu bildirmektedir. Bu bildirişler, bulgularımızla tam olarak örtüşmektedir. Etmenin sporlarının çokluğu ise piknitlerdeki lokusların sayısına bağlı olduğu kanısındayız. Piknitlerde ne kadar fazla lokus varsa, o kadar fazla spor üretilmekte ve hastalandırma yetisi (virulensi) de o ölçüde fazla ve şiddetli oluyor denilebilir. Bu durumda piknitlerdeki lokusların hepside fertil ise çok miktarda spor oluştuğu sonucuna varılabilir. Piknitlerden salgılanan spordan yapılan spor sayımlarında ise ortalama 3.2×10^8 spor/ml olduğu anlaşılmıştır. Piknitlerden salgılanan sporlar portakal sarısından kiremit kırmızısı renge kadar değişen renklerde ve 2 - 5 cm uzunluğunda olup helezoni kıvrımlı spor iplikçikleri, ya da spor kümecikleri halinde piknitlerin ağız kısmından dışarı salgılanır. Peace (1962) ve Butin (1995) ise kavak kabukları yüzeyinde bol miktarda siyah renkli fruktifikasyon organı olan piknit (picnidium)'lerin oluştuğunu, bu piknitlerden ilkbaharda çok miktarda 3 - 4 cm uzunluğunda helezoni ve kıvrımlı, önceleri sarımsı, daha sonra portakal sarısı renge dönüşen karakteristik sporların salgılandığını, hastalığın ise bu sporlarla yayıldığını belirtmektedirler. Bu çalışma sonucunda elde edilen bulgular, sözü edilen araştırmacıların bulguları ile aynı paraleldedir. Etmenin sporları hiyalin, hafif kamburumsu yay şeklinde tek hücreli olup, spor ölçümleri 2,5 - 5,0 x 0,5 - 1,5 µm (3,92 x 1,09 µm) olarak bulunmuştur. Mader et al. (2004) etmenin spor boyutlarını 5,5 x 1,1 µm. olarak belirtmektedirler. Anonymous (2002) ise etmenin spor boyutlarının 3,0 - 5,0 x 1,0 - 1,5 µm olduğunu saptanmıştır. Bu araştırmacıların bulguları ile bulgularımızın aynı ölçütte olduğu görülmektedir. Long (1918) etmenin, inokülasyondan birkaç hafta geçtikten sonra kabukta piknit verdiğini, bu piknitlerde çok miktarda spor oluştuğunu, sporun renksiz, bir hücreli ve çubuk şeklinde olduğunu belirtmektedir. Bu çalışma sonuçları da, bu araştırma sonuçlarıyla paralellik içindedir.

Patojenisite çalışmalarında hastalık semptomlarının, enfekte edilen yerin alt, üst ve yanlarına doğru kahverengi-siyahımsı bir renk vererek ilerlediği saptanmıştır (Şekil 2 ve 3). Keca'da (2000) kavaklarda yaptığı patojenisite çalışmalarında hastalık semptomlarının, enfekte edilen yerin alt, üst ve yanlarına doğru kahverengi - siyahımsı bir renkte ilerlediğini, bu durumun ise etmenin hastalandırma yetisinde olduğunu gösterdiğini vurgulamıştır. Nitekim Filler and Randall (1977) *Populus deltoides* Bartram ex Marsh'in değişik 25 klonu ile temmuz ayında yaptıkları inokülasyon denemelerinde %60'a kadar başarı elde etmişlerdir. Domanski (1973) *P. tremulus* mesceresinde 1975 - 1981 yılları arasında 20 yaşındaki 80 ağaç üzerinde her yıl yapılmış olduğu gözlemlere göre ağaçların %41'inin *C. chrysosperma* ile bulaşık olduğunu ortaya koymuştur. Ülkemizde de kavak alanlarında görülen bozulma ve kurumaların, bu hastalıktan kaynaklandığı kanısındayız. Bu durum ise etmenin hastalandırma yetisinde olduğunu göstermektedir.

Laboratuvar koşullarında yapılan çalışmalarda 21 günlük inkübasyondan sonra nekrotik lekeler görülmesine karşın, bu lekeler üzerinde piknit oluşumu saptanmamıştır. Hâlbuki doğada enfekteli kavakların kabuk altındaki çok yıllık lekelerinde, etmenin fruktifikasyon organları çok açık olarak görülmektedir. Enfekteli kavak kabuk altı ise koyu kahverengi-siyah lekeli alan, beyaz olarak görülen sağlam dokudan belirgin olarak ayrılmıştır. Kontrol olarak bırakılan kavak kalemlerinde hastalık semptomlarına hiç rastlanılmamıştır. Sadece inokülasyon

yerine kapatılan kavak kabuk parçasının ve enfeksiyon yerinin etrafındaki kavak kabuk kenarlarının kuruduğu görülmüştür. Lekeli alanlardan reizolasyon yapılmış ve *C. chrysosperma*'nın kendisi izole edilmiştir. Leke boyutları ortalama olarak 4,03 – 9,40 cm arasında bulunmuştur. Hâlbuki Mader et al. (2004) ise bir yaşındaki beyaz Kavaklarda yapmış olduğu patojenisite çalışmalarında inokulasyondan 28 gün sonra nekrotik lekelerin büyüklüğünü ortalama 28,0 – 14,5 cm olarak bulmuşlardır. Bu farklılığın; hem kavak çeşidinin hem de yetiştirme koşulları ile inkübasyon süresinin değişik olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Yapılan literatür araştırmalarında Keca (2000) ile Jacobi and Shepperd'ın (1991) yaptıkları patojenisite çalışmalarında *C. chrysosperma*'nın *Populus tremuloides* Michx.'in asıl patojeni olduğunu vurgulamaktadır. Buna göre, elde edilen araştırma sonuçları literatür bildirişleriyle uyumluluk göstermektedir. Long (1918) ise patojenin enfeksiyonundan ancak birkaç hafta sonra piknitlerin oluşmaya başladığını belirtmektedir. Bu çalışmada ise inokulasyondan 21 gün sonra bile inokulasyon yerinde hiçbir piknit yapısına rastlanılmaması; iklimin, ya da yöntemin farklı oluşundan kaynaklanabilir.

KAYNAKLAR

- Agrios 1997. Plant Pathology. Fourth Edition, Academic press. USA, 634p.
- Aktaş, H., Şimşek, Z. 2005. Çankırı Kenbağ Orman Fidanlığındaki Kavak Fidanlarında *Cytospora* Kanseri (*Cytospora chrysosperma* "Pers." Fr.)'nin Morfolojisi, Zararı Ve Alınabilecek Önlemler, İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi Seri A, Cilt 55, Sayı 2, 47-57.
- Aktaş, H., Şimşek, Z., Kondur, Y. 2008. Türkiye'de Orta Anadolu Bölgesi'nde Kavak Kanseri (*Cytospora chrysosperma* "Pers." Fr.)'nin Morfolojik Özellikleri, Zarar Durumu ve Sarı Lekeli Kavak Süslüböceği (*Melanophila picta* Pall. (Coleoptera: Buprestidae) Arasındaki İlişkiler. Bitki Koruma Bülteni 48(3): 1-14.
- Anonymous 2002. www.pfc.forestry.ca/diseases/CTD/Group/Canker/canker2_e.html
- Butin, H. 1995. Tree Diseases and Disorders. Oxford University Pres, 252p.
- Domanski, S. 1983. Fungi That Destroyed A Populus Tremula Stand in Lagow Lubuski. European Journal of Forest Pathology, 166-173.
- Filler, T., Randall, W.K. 1991. Variation Among Cottonwood Clones in Susceptibility to *Cytospora*, *Phomopsis* and *Fusarium*. Proceedings Of The American Phytopathological Society, 4: 83p.
- Jacobi, W.R., Shepperd, W.D. 1991. Fungi Associated With Sprout Mortality İn Apsen Clearcuts in Colaroda And Arizona. Usda Forest Service, No. Rm. 513, 5p.
- Karman, M. 1971. Bitki Koruma Araştırmalarında Genel Bilgiler, Denemelerin Kuruluşu ve Değerlendirme Esasları. T.C. Tarım Bak. Zir. Müc. Ve Karantina Gn. Md. Yayınları, Mesleki Kitaplar Serisi, 279 S.
- Keca, N. 2000. The Most Frequent Diseases in Poplar Plantations in The Region of R.J. Potisje. Glasnik Sumarskog Fakulteta. Univerzitet U Beogradu., No.82, 81-91.
- Kepley, J.B., Jacobi, W.R. 2000. Pathogenicity of *Cytospora* Fungi on Six Hardwood Species. Journal of Arboriculture., 26: 6, 326-333.
- Koçer, S. 1999. Ülkemizde Kavakçılığın Geliştirilmesinde Yeni Finansman Olanakları, Orman Bakanlığı Kavak ve Hızlı Gelişen Ağaçlar Araştırma Enstitüsü Teknik Bülten No:170, İzmit.
- Long, W.H. 1918. An Undescribed Canker of Poplars and Willows Caused by *Cytospora chrysosperma*. Journal of Agricultural Research, 13:331-343.
- Mader, Z, Solel, Z., Kimchi, M. 2004. First Report of *Cytospora* Canker caused by *Cytospora chrysosperma* on white poplar in İsrail. Plant Dis., 88: 220
- Peace, T.R. 1962. Parthology of Trees and Shrubs, Oxford Univ. Press, London, 753p.
- Uluer, K., Güner, M., Güler, N. 1998. Kavaklarda *C. chrysosperma* (Pers.) Fr. Zararını Önleme Üzerine Araştırmalar. Orm. Bak. Yayını, Issn 1300 - 395 X. İzmit, (1998/3), 25 s.