

## Türkiye’de Çınar Kanser Lekesi Etmeni *Ceratocystis platani* İçin Yeni Bir Lokalite Kaydı

### A New Locality Record for Cancer Stain of Plane Agent *Ceratocystis platani* in Türkiye

 Refika Ceyda BERAM<sup>1</sup>,  Sultan AKYOL<sup>1</sup>

#### Özet

*Ceratocystis platani*, “çınar kanser lekesi” hastalığına neden olan yabancı istilacı bir fungustur. Patojenin senep olduğu hastalık, “çınar kanseri” ya da çınar solgunluğu olarak da adlandırılmaktadır. Yerel olmayan bu patojenik organizma uluslararası ticaret ve insan faaliyetleri gibi nedenlerle coğrafi engelleri aşarak yeni ortamlara ulaşmakta ve ekosistem sağlığı üzerinde ciddi tehdit oluşturmaktadır. Bu etmen *Platanus* türlerine özelleşmiş agresif bir yara patojenidir. Ksilemden büyüyen iletim demetlerinin tıkanmasına, böylece kısa bir sürede ağacın ölümüne neden olmaktadır. Bu fungus aynı zamanda ciddi karantina tedbirlerine tabidir. Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Örgütü (EPPO) karantina organizması olarak kabul edilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri’nin doğusunda, Kaliforniya’da ve güney Avrupa’da hem kentsel hem de kırsal alanlarda on binlerce ağaç bu iletim demeti hastalığı nedeniyle ölmüştür. Bugüne kadar Avrupa’da; Arnavutluk, Ermenistan, Fransa, Yunanistan, İtalya, İsviçre ve Türkiye-İstanbul’da rapor edilmiştir. Bu çalışmada, *C. platani*’nin varlığı Türkiye’de Denizli ilinde *Platanus orientalis* türünde ilk kez kayıt altına alınmıştır. Kent merkezinde rüzgâr nedeniyle devrilen çınar ağacından alınan odun örneklerinde Taqman prob bazlı Real-time PCR kullanılarak fungusun varlığı tanımlanmıştır. Havuç inokulasyon metodu ve akvaryum tuzak metotları kullanılarak fungusun izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen izolatlar morfolojik olarak karakterize edildikten sonra, ITS bölgesi (internal transcribed spacer) kullanılarak moleküler karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. ITS dizisinin BLAST analizi, daha önce bildirilen *C. platani* dizilerine %99-100 benzerlik göstererek izolat tanımlanmasını doğrulamıştır.

**Anahtar kelimeler:** Çınar kanseri, *Ceratocystis platani*, Yabancı istilacı patojen, Yeni lokalite, Denizli.

#### Abstract

*Ceratocystis platani* is an invasive fungus that causes the disease known as “canker stain of plane”. The disease, caused by the pathogen, is also known as “plane tree cancer” or plane tree wilting. This non-native pathogenic organism is able to overcome geographical barriers due to factors such as international trade and human activities, posing a serious threat to ecosystem health by reaching new environments. This agent is an aggressive wound pathogen specialized in *Platanus* species. Growing in the xylem, it leads to the blockage of vascular bundles, thereby causing the tree to die rapidly. This fungus is also subject to serious quarantine measures and has been recognized as a quarantine organism by the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). In the eastern United States, California, and southern Europe, tens of thousands of trees have died due to this vascular wilt disease in both urban and rural areas. To date, it has been reported in Europe in Albania, Armenia, France, Greece, Italy, Switzerland, and Türkiye-Istanbul. In this study, the presence of *C. platani* was recorded for the first time in the *Platanus orientalis* in Denizli province, Türkiye. The presence of the fungus was identified using Taqman probe-based Real-time PCR on wood samples obtained from a fallen plane tree in the city center due to wind. Subsequently, isolations of the fungus were performed using the carrot inoculation method and aquarium trap methods. After the isolates were morphologically characterized, molecular characterization studies were carried out using the ITS region (internal transcribed spacer). BLAST analysis of the ITS sequence confirmed the identification of the isolates by showing 99-100% similarity to previously reported *C. platani* sequences.

**Keywords:** Canker stain of plane, *Ceratocystis platani*, Invasive alien pathogen, New locality, Denizli.

## 1. Giriş

*Ceratocystis platani* (Walter) Engelbrecht & Harrington (Sinonim: *Ceratocystis fimbriata* f. *platani* C. May & J.G. Palmer), funguslar alemi, *Ascomycota* şubesi, *Pezizomycotina* alt şubesi, *Sordariomycetes* sınıfı: *Hypocreomycetidae* familyası: *Microascales* takımı: *Ceratocystidaceae* alt takımına ait bir türdür. Literatürde, *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* Walter, *Endoconidiophora fimbriata* f. *platani* Walter olarak da bulunmaktadır. Bu fungal etmenin neden olduğu hastalık “çınar kanser lekesi” olarak adlandırılmaktadır (CABI, 2022; EPPO, 2023). Hastalık, “çınar kanseri”, “çınar solgunluğu” adları ile de bilinmektedir. *Platanus* türlerinde meydana getirdiği ölümler nedeniyle Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Örgütüncü (EPPO) karantina organizması olarak kabul edilmiştir. Avrupa Birliği kategorizasyonunda (Annex II B) A2 karantina patojeni olarak yer almaktadır. Türkiye’de de “İthale Mâni Teşkil Eden Karantinaya Tabi Zararlı Organizmalar” (03.12.2011 tarihli, 28131 sayılı; Bitki Karantinası Yönetmeliği) listesinde yer almaktadır.

Bu etmen agresif bir yara patojenidir. Konukçu ağaçlara yalnızca sekonder olarak kalınlaşmış dokulardaki yaralardan girmektedir. Bir yara enfekte olduğunda, iç kabuğun (sekonder floem), vasküler kambiyumun ve diri odunun kolonizasyonu hızla gerçekleşmektedir. Ksilemde büyüyerek iletim demetlerinin tıkanmasına, böylece kısa bir sürede ağacın ölümüne neden olmaktadır (Accordi, 1989).

*C. platani*'nin bugüne kadar bilinen tüm konukçuları *Platanus* cinsine ait türlerdir. Bu konukçular arasında *P. occidentalis*, *P. orientalis*, *P. racemosa*, *P. x hispanica* yer almaktadır. *P. x hispanica* (= *P. x acerifolia*) ve doğu ebeveyni *P. orientalis*, fungusun zararından en ciddi şekilde etkilenen türlerdir (Panconesi, 1981). *Platanus x hispanica*'nın Kuzey Amerikalı ebeveyni olan *P. occidentalis*, bu fungusun neden olduğu enfeksiyona karşı daha az duyarlıdır (McCracken ve Burkhard, 1977).

Hastalık nedeniyle ortaya çıkan ilk belirtiler, enfekteli dalların taşıdığı yaprakların solması ve sararması şeklinde görülmektedir. Dal ve gövde kabuğundaki çatlaklardan özsu sızıntısı meydana gelebilmektedir. Enfekteli alanlar üzerindeki ölü kabuk zamanla soluk kahverengiye dönerek çatlak bir görünüm almaktadır. Lezyonlu kabuk kaldırıldığında, kambiyum dokusunun isli koyu bir leke halini aldığı bilinmektedir. Fungus, ağacın yaşı ve enfeksiyonun şiddetine bağlı olarak enfekte ettiği ağacı birkaç aydan 2-5 yıla kadar varan bir zaman sürecinde öldürebilmektedir (Walter, 1946; Panconesi, 1981; Tsopelas ve ark., 2017).

Antropojenik etkinin daha zayıf olduğu geniş doğal meşcerelerde hastalık etmeni daha az görülmektedir. Kent ağaçlarında hastalık etmeninin yayılışından çoğunlukla budama ve hastalıklı ağaçların üzerinde ve çevresinde gerçekleştirilen insan faaliyetleri sorumludur. Hastalıklı ağaçlardan çıkan talaş oldukça bulaşıcı olup, bu enfekteli talaşların özellikle düzenli budamanın yapıldığı alanlardaki çınarlarda muhtemelen ana bulaş kaynağı olduğu düşünülmektedir (Jeger ve ark., 2016; Tsopelas ve ark., 2017). Teraslama makineleri gibi kullanılan araçlar fungus tarafından istila edilmiş toprağın taşınmasına sebep olmakta ve sağlıklı alanlara bu mikroorganizmanın hızla taşınımını kolaylaştırmaktadır.

Kök teması yoluyla ağaçtan ağaca doğal yayılış gerçekleşebilmektedir. Fakat kök kaynaşması diğer yayılış yollarına nazaran daha yavaş gerçekleşmektedir. Bu yolla uzun mesafelerde fungusun taşınması çok mümkün değildir (Accordi, 1986). Nehir kıyısı ekosistemlerinde ağaçlar arasında bulaşma su taşınımı ile olmaktadır (Grosclaude ve ark., 1991; Vigouroux ve Stojadinovic, 1990). Yunanistan'da ve Fransa'da bulunan bazı nehirler boyunca binlerce çınar ağacının ölümü bu taşınmanın en büyük örneğidir. Ayrıca vektör böceklerin de fungusu taşıyabildiğine dair bulgular mevcuttur (Crone, 1962; Soulioti ve ark., 2015). Uluslararası yayılışın en önemli sebebi ise enfekte konukçu bitkilerin ticaretidir (Lehtijarvi ve ark., 2018).

Fungusun, İkinci Dünya Savaşı'nın sonunda ABD'den enfekte ahşap ambalaj malzemeleriyle birkaç Güney Avrupa limanına geçiş yapmış olabileceği düşünülmektedir. Daha sonra İtalya'da hızla yayıldığı bilinmektedir (Panconesi, 1981). Fransa'da İtalya'ya nazaran daha yavaş bir yayılış göstermiştir (Vigouroux, 1979). Hastalık etmeninin varlığı Avrupa'da Arnavutluk (Tsopelas ve ark., 2015), Ermenistan (Simonyan ve Mamikonyan, 1982), Fransa (Anselmi ve ark., 1994; Ferrari ve Pichenot, 1974; 1976), Yunanistan (Tsopelas ve Angelopoulos, 2004; Elena ve ark., 2008), İtalya (Panconesi, 1981;1999; 2003), İsviçre (Gessler ve Mauri, 1987) ve Türkiye-İstanbul (Severoğlu ve Özyiğit, 2011; Lehtijarvi ve ark., 2018)'da rapor edilmiştir.

Bu çalışmanın amacı Türkiye'de Denizli ili kent merkezinde fırtına sonrası devrilen bir çınar ağacında (*Platanus orientalis* L.) çınar kanseri etmeni *C. platani*'nin varlığını morfolojik ve moleküler olarak doğrulamak ve bu yeni lokaliteyi kayıt altına almaktır.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Çalışma Alanı ve Örneklem

Bu araştırmada, Kasım 2023 tarihinde Türkiye'nin güneybatısındaki Denizli ili kent merkezinde rüzgâr sonrası gövdesinden koparak devrilen (Şekil 1) (37.7643403, 29.0822931) bir çınar ağacından alınan enfekteli odun örnekleri kullanılmıştır. Çınar ağacının devrilmesi sonucu sahaya gidilerek semptomatik örnekler toplanmış ve uygun koşullar altında laboratuvara taşınmıştır. Ayrıca Real-Time PCR yöntemi ile karşılaştırma yapabilmek amacıyla sağlıklı bir çınar ağacından alınan ve sağlıklı görünen odun dokuları toplanarak laboratuvara getirilmiştir.



**Şekil 1.** Denizli kent merkezinde enfekteli odun örneklerinin alındığı çınar ağacı.

### 2.2. *Ceratocystis platani*'nin İzolasyonu

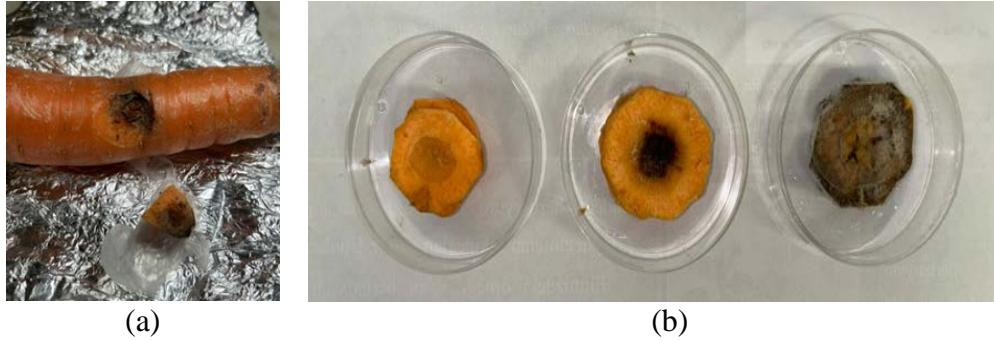
#### 2.2.1. Havuç Metodu

##### *Havuç inokulasyon metodu*

Araziden getirilen enfekteli odun örnekleri steril bir bistüri yardımı ile küçük parçalara ayrılmıştır. Temizlenmiş havuçlara steril mantar delici kullanılarak 5 mm'lik yaralar açılmıştır. Enfekteli odun parçaları bu yaralara yerleştirilmiş ve parafilm ile sarılmıştır. Enfekteli odun parçaları ile inokule edilen havuç örnekleri alüminyum folyo ile tamamen sarılarak 22°C'de 1 haftalık inkubasyona bırakılmıştır (Şekil 2) (Pilotti ve ark., 2009; 2012).

### ***Havuç disk metodu***

*Ceratocystis platani*'yi izole etmek için küçük parçalara ayrılan enfekteli odun örnekleri 5 mm kalınlığında kesilen havuç dilimlerinin arasına yerleştirilmiştir. Havuç sandviçleri nemlendirilmiş filtre kağıdı bulunan petri kaplarına yerleştirilmiştir ve 22°C'de 1 haftalık inkubasyona bırakılmıştır (Şekil 2; Moller ve De Vay, 1968).



**Şekil 2.** *Ceratocystis platani*'nin izolasyonu (a) havuç inokulasyon metodu; (b) havuç disk metodu.

Her iki havuç metodunda da inkubasyon süresi sonucunda inokulasyon alanı çevresinde oluşan *C. platani*'ye özgü peritesyumlar diseksiyon mikroskobu altında incelenmiş ve steril iğne yardımı ile içinde 0,5 mg/ml streptomisin sülfat bulunan %2'lik Patates Dekstroz Agar (PDA; Merck, Almanya) besi ortamına aktarılmıştır. Petri kapları 20-25°C 'de 1 hafta süre ile inkube edilmiştir

### **2.2.2. Akvaryum Tuzak Metodu**

Arazi çalışmalarında alınan odun örnekleri, akvaryum pompası kullanılarak hazırlanan bir düzenek ile tuzaklama yapılarak izolasyon işlemine tabi tutulmuştur (Grosclaude ve ark., 1988). Bunun için enfekteli kısımlardan alınan odun parçaları, içerisinde 100-150 ml distile su bulunan 250 ml'lik erlenmayerlere yerleştirilmiş ve her bir örneğin bulunduğu erlene kabukları soyulmuş sağlıklı çınar dalları koyulmuştur. Erlenmayerler akvaryum pompası ile havalandırılarak 1 hafta oda sıcaklığında inkübe edilmiştir (Pilotti ve ark., 2009) (Şekil 3). İnkubasyon süresi sonunda çınar dalları diseksiyon mikroskop altında incelenerek, dallar üzerinde görülen peritesyumlar steril iğne yardımıyla alınıp içinde PDA bulunan petri kaplarına aktarılmıştır (Grosclaude ve ark., 1988).



**Şekil 3.** *Ceratocystis platani*'nin izolasyonu; akvaryum tuzak metodu.

### 2.3. *Ceratocystis platani*'nin Karakterizasyonu

#### 2.3.1. *Ceratocystis platani*'nin Morfolojik Karakterizasyonu

İzolasyonlar sonucu elde edilen izolatların koloni morfolojileri kaydedilmiştir. Kolonilerin günlük ortalama gelişme hızı 3 tekerrürlü olarak kayıt altına alınmıştır. Peritesyumlar ışık mikroskobu (Olympus) kullanılarak Olympus DP-Soft programı ile 40x'te ölçülmüştür. Elde edilen izolatlar Pamukkale Üniversitesi (Denizli/Türkiye) Fungal Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda saklanmaktadır.

#### 2.3.2. *Ceratocystis platani*'nin Moleküler Karakterizasyonu

##### *Real-time PCR kullanılarak Ceratocystis platani*'nin hızlı tanınması

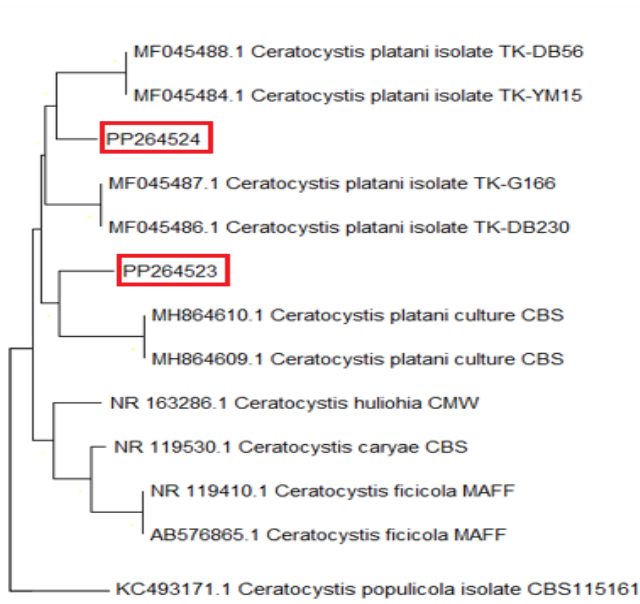
Hızlı tanılama için TaqMan probe yöntemi kullanılmıştır (Pilotti ve ark., 2012; Luchi ve ark., 2013; Lumia ve ark., 2018). Öncelikle odun dokusundan direk DNA ekstraksiyonu için High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) kullanılarak üretici firmanın talimatları uygulanmıştır. *C. platani*'nin tespiti için qPCR, Applied Biosystems™ StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo, USA) kullanılmıştır. *C. platani*'nin amplifikasyonu için tasarlanmış C.P.Sn. For.I (5'-CGTACCTATCTTG TAGTGAGATGAATGC-3'), C.P.Sn. Rev.I (5'-GAGTTTACAGTGGCGAGACTATACTG-3') primer çifti ve C.P.TM.Pr. (5'CGGTGCCCTTCAGAAGGGCCCTAC CACC-3') probu kullanılmıştır (Pilotti ark., 2012). TaqMan Prob olarak Roche-LightCycler® 480 Probes Master kullanılmıştır. Tüm örneklerin son hacmi 25 µl olarak belirlenmiştir. Real-time PCR koşulları; 10 ml Prob master mix; 1 ml forward primer, 1 ml reverse primer, 0.4 ml prob ve 2.6 ml grade water ve 10 ml template DNA şeklindedir. Tüm DNA örnekleri, SSI-Bio 0.1 mL PCR Plate, FAST®-Type, Low-Profile 96 kuyulu plakalarda analiz edilmiştir. Her örnek iki kopya halinde test edilmiştir. Negatif kontrol (NC) olarak her biri 5 ul steril su içeren iki kopya kullanılmıştır.

PCR protokolü; 95°C (10 dk), [40 döngü; 95°C (10 sn), 55°C (1 dk)], 40°C (10 sn) şeklinde uygulanmıştır.

***DNA sekans analizi ile Ceratocystis platani'nin tanınması***

Morfolojik tanımlamayı doğrulamak için, ribozomal DNA (ITS rDNA) bölgesinin dahili kopyalanmış aralayıcı dizisi 2 temsili izolat kullanılarak analiz edilmiştir. Genomik DNA, High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) kullanılarak üreticinin talimatları doğrultusunda taze miselyumdan ekstre edilmiştir. PCR amplifikasyonu, ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ve ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White vd., 1990) primer seti kullanılarak Xpert Fast Hotstart Mastermix (Grisp, Portekiz) ile gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon, her bir 10 pmol/µL primerden 1 µL, 12,5 µL Xpert Fast Hotstart Mastermix (2X), 7,5 µL PCR grade water ve 3 µL template DNA içeren 25 µL reaksiyon karışımı olmak üzere hazırlanmıştır. Amplifikasyon reaksiyonları, PCR thermocycler (Kyratec, SuperCycler Thermal Cycler, Australia) cihazında 95 °C'de 3 dakikalık başlangıç döngüsü (enzim aktivasyonu, template DNA'nın denatürasyonu), ardından 95 °C 15 s, 58 °C 15 s ve 72 °C 15 s, son uzama 72 °C'de 3 dakika olarak 40 döngü şeklinde gerçekleştirilmiştir. PCR ürünü BMLabosis (ANKARA) tarafından dizilenmiştir. Elde edilen nükleotid dizileri, benzer dizileri bulmak için bir GenBank (NCBI—Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) araştırmasında incelenmiştir. NCBI veritabanından seçilen en benzer outgrup sekanslar BioEdit sürüm 7.2.6 software kullanılarak hizalanmıştır.

Genetik akrabalık Neighbor-Joining (NJ) yöntemi kullanılarak hesaplanmış ve dalların güvenilirliği 1000 bootstrap çoğaltması ile değerlendirilmiştir (Şekil 4) (Tamura ve ark., 2004). Filogenetik ağaç, dış grup dahil toplam 13 nükleotid dizisini içermektedir. Analizler için MEGA11 yazılımı kullanılmıştır (Tamura ve ark., 2021).



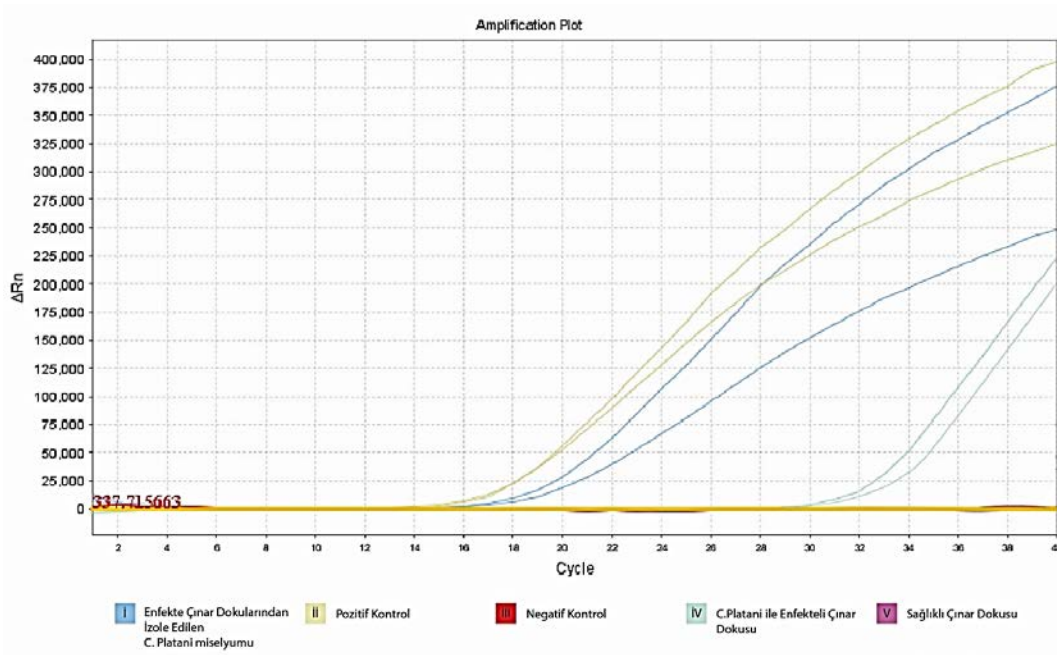
**Şekil 4.** *Ceratocystis platani*' ye ait ITS gen bölgesi için Neighbor-Joining (NJ) yöntemi ile oluşturulan moleküler filogenetik ağaç.

### 3. Bulgular ve Tartışma

Bu çalışmada uygulanan izolasyon ve tanılama yöntemleri Denizli kent merkezinde kuvvetli rüzgar nedeniyle gövdesinden ayrılarak devrilen bir çınar ağacında *C. platani* varlığını kanıtlamıştır. Her ne kadar *C. platani* bu ağacın devrilmesinde katkıda bulunan önemli bir faktör olsa da, örneklenen ağacın devrilmesi çoklu biyotik (çürüklük fungusları vb.) ve abiyotik faktörler arasındaki etkileşimlerin bir araya gelmesinden kaynaklanabilir. *C. platani*'nin iletim demetlerini tıkayarak ağacı zayıf düşürdüğü ve hızla ağacın ölümüne neden olduğu bilinmektedir (Accordi, 1989).

Devrilen çınar ağacından alınan enfekteli odun örnekleri ve sağlıklı bir çınar ağacından alınan odun örnekleri Real-time PCR ile analiz edilmiştir. Spesifik primer ve prob (Pilotti vd., 2012) kullanılarak elde edilen sonuçlar (Şekil 4) enfekteli odun örneğinde *C. platani* varlığını kanıtlamıştır. Sağlıklı çınar ağacından alınan odun örneğinde *C. platani*'ye rastlanmamıştır.





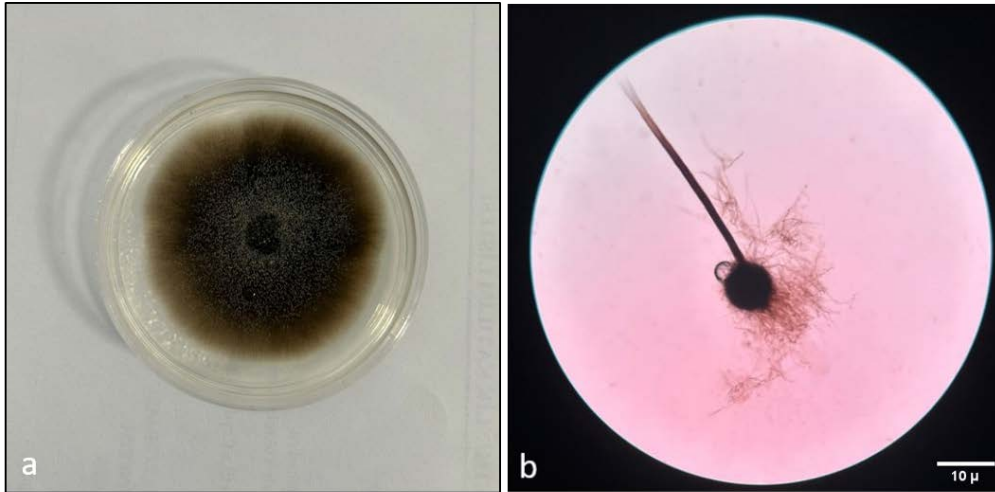
**Şekil 5.** ITS bölgesi TaqMan probu ile *Ceratocystis platani*'nin tespiti: (i) enfekte çınar dokularından izole edilen *C. platani* miselyumu, (ii) pozitif kontrol (iii) negatif kontrol (iv) *C. platani* ile enfekte çınar dokusu (v) sağlıklı çınar dokusu.

Son yıllarda, çınar kanseri nedeniyle çınar ağaçlarında meydana gelen ölümler Real-time PCR gibi hızlı tanı tekniklerinin kritik önemini bir kere daha göstermektedir (Panconesi 1999; Ocasio-Morales ve ark., 2007). Bu çalışmada, *C. platani*'nin odunda hızlı, duyarlı, güçlü, tekrarlanabilir ve özgün bir şekilde tespit yaptığı bilinen Taqman tabanlı Real-time PCR testi uygulanmıştır (Pilotti ve ark., 2012). Taqman testinde bir probun kullanılması nedeniyle hedeflenen primerlere ek olarak üçüncü bir genomik bölgenin kullanılabilmesi bu yöntemde özgünlük kazandırmaktadır (Hayden ve ark., 2006). *Ceratocystis* spp.'nin ITS bölgeleri üzerine yapılan araştırmalar, primerlerin ve probunun *C. platani*'yi *Ceratocystis* türlerinden ayırt etme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra *C. platani*, *Platanus* spp.'yi enfekte eden tek *Ceratocystis* türüdür ve bu testler *Platanus* türlerine doğrudan uygulanmak üzere geliştirilmiştir. (Pilotti ve ark., 2012).

Taqman metoduna göre, enfekteli odun dokusundan izole edilen *C. platani* miselyumu fungal gDNA için Ct değerleri kontrol 1 ve 2 için sırasıyla 14.4 ve 11.53'tür. *C. platani* ile enfekteli çınar dokusundan elde edilen fungal gDNA için Ct değerleri kontrol 1 ve 2 için sırasıyla 27.59 ve 28.13'tür. *C. platani* ile enfekteli odun dokusunda fungusun yoğunluğunun saf miselyum kültürüne göre daha düşük olduğu görülmüştür. Öte yandan, testler sağlıklı *Platanus* odununun kolonizatörü olan hedef dışı fungal türlere uygulandığında varsayılan arka plan eşliğinin üzerinde hiçbir floresans sinyali üretmedikleri görülmüştür.

Bu çalışmada fungal izolasyonlarda havuç inokulasyon metodu (Pilotti ve ark., 2009), havuç disk metodu (Moller ve De Vay, 1968) ve akvaryum tuzak metodu (Grosclaude ve ark., 1988) uygulanmıştır. Her üç yöntem de fungusun izolasyonunda başarılı sonuç vermiştir ve elde edilen peritesyumlar PDA besi ortamında gelişme göstermiştir. İzolasyonlar sonucunda, fungusun PDA besi ortamında büyüme hızı günde ortalama 0.4 cm olarak tespit edilmiştir. Ayrıca her üç yöntem de fungusun patojenik olduğu kanıtlamıştır (Grosclaude ve ark., 1988).

Fungal izolatların makroskobik özellikleri kolonilerin rengi ve şekli kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 5a). İlk birkaç gün miselyumlar şeffaf şekilde görünmektedir. Zamanla kolonilerin alt yüzeyleri grimsi yeşilden kahverengimsi yeşil bir renk almaktadır. Kolonilerin üst yüzeyleri oluşturduğu askospor üreten koyu kahve peritesyumları nedeniyle koyu benekler şeklinde görülmektedir. Bu benekler dokuya kısmen gömülü şekilde bulunmaktadır. Peritesyumlar (Şekil 5b) uzun, koyu bronz ile siyah, düz boyunlu, 400-1000 µm uzunluğunda, farklı ostiolar hiflerle çevrilidir (EPPO, 2003).



**Şekil 6.** *Ceratocystis platani*'nin makroskobik özellikleri; a. *Ceratocystis platani*'nin 25 °C karanlıkta 10 günlük koloni görüntüsü, b. *Ceratocystis platani*'nin peritesyumu.

Moleküler tanılama için seçilen 2 temsili izolat dizilenmiştir. ITS dizisinin BLAST analizi, izolatların *C. platani*'nin daha önce bildirilen dizileriyle (NCBI—Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi) %99-100 benzerlikle tanımlandığını doğrulamıştır. Elde edilen izolatlara ait nükleotid sekansları için Genbankasından alınan erişim numaraları PP264523 ve PP264524'tür. Bu sekanslar, referans olarak alınan *C. platani* dizileri ile aynı grupta yer almaktadır.

Çınar ağaçları kentsel alan ağaçlandırmalarında sıklıkla kullanılan önemli bir türdür. Türkiye'de, İstanbul'da bulunan çınar ağaçlarının geriye doğru ölümleri ve ağaçların ölüm

oranı 2011 yılında ilk kez bildirilmiştir (Severoğlu ve Özyiğit, 2011) ve patojenin ağaç üzerindeki belirtilerine istinaden *Ceratocystis fimbriata* ssp. *platani* olduğu rapor edilmiştir. Lehtijärvi ve arkadaşları 2018 yılında İstanbul'un Avrupa yakasındaki çeşitli lokasyonlarda, yaklaşık 160 yıl önce İtalya'dan ithal edilen *P. × acerifolia* (Londra çınarı) ve *Platanus orientalis* (Doğu çınarı)'te *C. platani*'yi moleküler olarak tanımlayarak rapor etmiştir. Hastalığın Türkiye'deki yayılışın en önemli sebebi enfekte konukçu bitkilerin ithalatı olarak bildirilmiştir (Lehtijärvi ve ark., 2018). Türkiye'de bugüne kadar sadece İstanbul'da tespit edilen bu patojenin, bu çalışma ile ilk kez Denizli'de rapor edilmiş olması, patojenin yayılışının endişe verici düzeyde olabileceğinin bir işareti olabilir. Bu kayıt Türkiye'de gelecekte çınarların ne denli büyük bir tehdit altında olabileceğinin önemli bir göstergesidir.

Günümüzde *C. platani* için etkili bir kimyasal veya biyolojik kontrol yöntemi bulunmamaktadır (Jeger ve ark., 2016). Bu nedenle, patojenin kontrolü kültürel uygulamalara ve sıhhi yöntemlere dayanmaktadır. Özellikle doğu çınarı ve londra çınarı'nın *C. platani* enfeksiyonlarına karşı oldukça hassas olduğu bilinmektedir. Patojen tarafından enfekte edilen ağaçların mevcut durumda tedavi edilmesi mümkün olmamakla birlikte, bu ağaçlar yaş ve duyarlılık durumlarına göre 2-6 yıl içinde ölmektedirler (Panconesi, 1999).

Hastalık etmeni, enfekteli ağaçların köklerinden sağlıklı ağaçların köklerine bulaşabildiği gibi, enfekteli ağaç üzerinde oluşturulan fungal yapılar (sporlar, misel parçaları vb.) sayesinde etraftaki sağlıklı ağaçlara taşınabilmektedir. *C. platani* tarafından üretilen sporların doğal koşullar altında havada taşınmadığı bilinmektedir (Panconesi, 1999). Bu nedenle patojenin bitki ticareti gibi çeşitli yollarla ülkeye veya şehire bir kez giriş yaptıktan sonra, yapılan budama ve sanitasyon kesimleri sırasında etrafa yayılan enfekteli talaşlar aracılığıyla yerel olarak yayılabildiği söylenebilir. Hastalığın yayılışı sağlıklı bitki üreme materyallerinin kullanılmasıyla azaltılabilir. Bunun yanı sıra kesim aletlerinin enfekteli ağaçta kullanıldıktan sonra steril edilmeden sağlıklı ağaçlarda kullanılması da patojenin yayılımında oldukça etkilidir. Ayrıca enfekteli ağaçlara komşu kökleri bulunan ağaçlar da kök kaynaşması nedeniyle enfekte olabilir (Accordi, 1986). Bu ağaçlara komşu olan diğer ağaçların ortamdan kaldırılması ve yok edilmesi (Panconesi, 1999) gereklidir. Enfekteli ağaç alandan uzaklaştırılsa ve imha edilse bile ağaca komşu olarak bulunan diğer ağaçlar da hızlı tanı yöntemleri ile fungusun varlığı açısından analiz edilmeli ve etmenin bulunduğu tespit edilen ağaçlar imha edilmelidir.

Enfekteli ağacın bulunduğu toprakta fungus uzun bir süre yaşamaya devam edebilir. Toprakta bulunan odun materyalleri (talaş vb.) fungusun yaşam döngüsünü orada devam ettirmesine ve böylece dikilen yeni ağaç için bir inokulum kaynağı oluşturmasına sebep

olabilir. Bu nedenle enfekteli ağacın çıkarıldığı alanda ağaç kökü kesimin hemen ardından etkili bir kimyasal kullanılarak öldürülmelidir, toprağa sterilizasyon işlemi uygulamadan dikim yapılmamalıdır ve aynı alanda enfeksiyon riskinin devam etmesi nedeniyle alana yeniden aynı tür dikilmemelidir.

Nehir kıyısı ekosistemlerinde ağaçlar arasında bulaşma su taşınımı ile gerçekleşebilmektedir. Yunanistan'da ve Fransa'da bulunan bazı nehirler boyunca binlerce çınar ağacının ölümü bu taşınmanın en büyük örneğidir. Ayrıca vektör böceklerin de fungusu taşıyabildiğine dair bulgular mevcuttur (Soulioti ve ark., 2015). Dikim materyali, hastalığın bulunmadığı bölgelerden temin edilmeli ve bitkiler, *C. platani*'ye maruz kalmamış bir ortamda yetiştirilmelidir. Hastalıkla mücadelede, dayanıklı bitki ırklarının belirlenmesi ve kullanılması son derece önemlidir.

Devrilen bu gibi ağaçlar maddi hasara neden olmasının yanı sıra can kayıplarına da sebep olabilmektedir. Erken tanı her alanda olduğu gibi bitki hastalıklarının tespitinde de çok önemli bir rol üstlenmektedir. Dışardan sağlıklı gibi görünen birçok ağaçta bu gibi önemli problemler bulunabilmektedir. Böylece henüz belirti göstermeyen fakat hastalık etmenini taşıyan bitkiler erkenden tespit edilebilir ve hastalıkların aynı alanda bulunan diğer ağaçlara yayılması engellenebilir. Erken uyarı ve hızlı yanıt için etkili bir çerçeve, bitki patojenlerinin biyolojik istilalarının etkilerini azaltmak veya önlemek için çok önemli bir unsurdur. Bu nedenlerden dolayı LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification), Real-time PCR gibi teşhis süresini kısaltan hızlı tespit araçları, bitki sağlığının izlenmesinde, gözetiminde ve kantitatif patojen risk değerlendirmesinde önemli bir rol oynamaktadır. *Platanus* türlerini bu hastalıktan korumak için en iyi strateji, onlara hastalığın bulaşmasını önlemektir. Konukçuda semptomlar ortaya çıkmadan önce, hastalık gelişiminin erken aşamasında neden olan patojen hızlı ve güvenilir moleküler yöntemlerle tespit edilmelidir.

#### 4. Sonuç

*Platanus* türleri, ılıman iklimlerde kentsel alanlarda yaygın olarak kullanılan ağaç türleri arasında yer almaktadır. *C. platani*'nin neden olduğu hastalık, genellikle ağaçlarda ölüme yol açması ve hızla yayılması sebebiyle Türkiye dahil birçok Avrupa ülkesi için önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Bu hastalığa karşı bitki sağlığı önlemleri dışında şu anda başka kontrol yöntemleri bulunmamaktadır. *Platanus* türlerinin bu patojene karşı gösterdiği belirgin duyarlılık göz önüne alındığında, çeşitli dirençli genotipler elde etmek için daha fazla ıslah çalışmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, hastalığın görüldüğü ülkelerde

biyogüvenlik önlemlerinin ulusal düzeyde alınması kaçınılmazdır. Bu konuda deneyimli orman patoloğları ve yöneticilerden destek alınarak daha etkili önlemler geliştirilmelidir.

## Kaynaklar

- Accordi, M.S. (1986). Diffusione di *Ceratocystis fimbriata* attraverso le anastomosi radicali. *Informatore Fitopatologico*, 36(11), 53– 58.
- Accordi, S. M. (1989). The survival of *C. fimbriata* f. sp. *platani* in the soil. *Informatore Fitopatologico*, 39(5), 57-62.
- Anselmi, N., Cardin, L. & Nicolotti, G. (1994). Plane decline in European and Mediterranean countries: associated pests and their interactions. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 24(1), 159-171.
- CABI, (2022). Compendium, *Ceratocystis platani* (canker stain of plane). doi:10.1079/cabicompendium.12144, CABI International, Erişim Tarihi: 05.06.2023.
- Crone, L.J. (1962). *Symptoms, spread, and control of canker stain of plane trees*. Ph.D. Thesis, Rutgers University, New Brunswick, NJ.
- Elena, K., Alivizatos, A. S., & Varveri, C. (2008). New plant pathogens reported in Greece, 1990-2007. *Hellenic Plant Protection Journal*, 1(1), 1-25.
- EPPO, (2003). Standards: Diagnostic protocols for regulated pests: PM7/14 (1): *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. EPPO Bulletin, 33, 245– 247. Erişim Tarihi: 05.06.2023.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.
- Ferrari, J. P., & Pichenot, M. (1974). *Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halsted f. *platani* (Walter), responsable d'une grave maladie du platane en France. La tache chancreuse. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, D*, 278, 2787-2789.
- Gessler, C. & Mauri, G. (1987). Le malattie e i parassiti del platano, situazione nel Ticino. *Botanica Helvetica*, 97(2), 349-356.
- Grosclaude, C., Olivier, R., Pizzuto, J. C., Romiti, C., & Madec, S. (1988). Detection par piégeage du *Ceratocystis fimbriata* f. *platani*. Application a l'étude de la persistance du parasite dans du bois infecté. *European Journal of Forest Pathology*, 18(7), 385-390.
- Grosclaude, C., Olivier, R., Pizzuto, J. C., & Romiti, C. (1991). Etude expérimentale du transport de l'inoculum de *Ceratocystis fimbriata* f. *platani* par l'eau d'une rivière. *European Journal of Forest Pathology*, 21(3), 168– 171.

- Hayden, K., Ivors, K., Wilkinson, C., & Garbelotto, M. (2006). TaqMan Chemistry for *Phytophthora ramorum* detection and quantification, with a comparison of diagnostic methods. *Phytopathology*, *96*(8), 846–854.
- Jeger, M., Bragard, C., Chatzivassiliou, E., Dehnen-Schmutz, K., Gilioli, G., Jaques Miret, J. A. & Rossi, V. (2016). Scientific opinion on the risk assessment and reduction options for *Ceratocystis platani* in the EU. *EFSA Journal*, *14*(12), 4640– 4665.
- Lehtijärvi, A., Oskay, F., Doğmuş Lehtijärvi, H. T., Aday Kaya, A. G., Pecori, F., Santini, A., & Woodward, S. (2018). *Ceratocystis platani* is killing plane trees in Istanbul (Turkey). *Forest Pathology*, *48*(1), e12375.
- Luchi, N., Ghelardini, L., Belbahri, L., Quartier, M., & Santini, A. (2013). Rapid detection of *Ceratocystis platani* inoculum by quantitative Real-Time PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(17), 5394-5404.
- Lumia, V., Modesti, V., Brunetti, A., Wilkinson, C.L., Di Lernia, G., Harrington, T.C. & Pilotti, M. (2018). Real-Time PCR for *Ceratocystis platani* detection: in-depth validation to assess the diagnostic potential and include additional technical options. *iForest-Biogeosciences and Forestry*, *11*(4), 499-509.
- McCracken, F. I. & Burkhard, E. C. (1977). Destruction of sycamores by canker stain in the midsouth. *Plant Disease Reporter* *61*, 984-986.
- Moller, W. J., & De Vay, J. E. (1968). Carrot as a species-selective isolation medium for *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology*, *58*(1), 123-124.
- Ocasio-Morales, R. G., Tsopeles, P., & Harrington, T. C. (2007). Origin of *Ceratocystis platani* on native *Platanus orientalis* in Greece and its impact on natural forests. *Plant Disease*, *91*(7), 901–904.
- Panconesi, A. (1981). *Ceratocystis fimbriata* of plane trees in Italy; biological aspects and control possibility. *European Journal of Forest Pathology*, *11*(7), 383–395.
- Panconesi, A. (1999). Canker stain of plane trees: A serious danger to urban plantings. *Journal of Plant Pathology*, *81*, 3–15.
- Panconesi, A., Moricca, S., Dellavalle, I., & Torraca, G. (2003). *The epidemiology of canker stain of Plane tree and its spread from urban plantings to spontaneous groves and natural forests*. In: Second International Symposium on plant health in urban horticulture, Berlin, Germany, 27-29 August, 2003 [ed. by Balder, H.\Strauch, K. H.\Backhaus, G. F.]. Berlin, Germany: Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, 84-91.

- Pilotti, M., Brunetti, A., Tizzani, L., & Marani, O. (2009). *Platanus x acerifolia* genotypes surviving to inoculation with *Ceratocystis platani* (the agent of canker stain): first screening and molecular characterization. *Euphytica*, *169*, 1-17.
- Pilotti, M., Lumia, V., Di Lernia, G., & Brunetti, A. (2012). Development of Real-Time PCR for in wood-detection of *Ceratocystis platani*, the agent of canker stain of *Platanus* spp. *European Journal of Plant Pathology*, *134*, 61-79.
- Saitou N. & Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, *4*(4), 406-425.
- Severoğlu, Z., & Özyiğit, İ.İ. (2011). *İstanbul'da çınarlarda görülen mantar kökenli hastalıklar*. Özet [Fungal related diseases observed on plane trees in Istanbul. Abstract] Türkiye 1. Orman Entomolojisi ve Patolojisi Sempozyumu, *188*, 23-25 Kasım, 2011, Antalya, Türkiye.
- Simonyan, S. A. & Mamikonyan, T. O. (1982). Diseases of plane tree. *Zashchita Rastenii*, *8*, 23-24.
- Soulioti, N., Tsopelas, P., & Woodward, S. (2015). *Platypus cylindrus*, a vector of *Ceratocystis platani* in *Platanus orientalis* stands in Greece. *Forest Pathology*, *45*(5), 367– 372.
- Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(30), 11030-11035.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, *38*(7), 3022-3027.
- Tsopelas, P., & Angelopoulos, A. (2004). First report of canker stain disease of plane trees, caused by *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* in Greece. *Plant Pathology*, *53*(4), 531.
- Tsopelas, P., Palavouzis, S., Tzima, A. K., Tsopelas, M. A., Soulioti, N., & Paplomatas, E. J. (2015). First report of *Ceratocystis platani* in Albania. *Forest Pathology*, *45*(5), 433-436.
- Tsopelas, P., Santini, A., Wingfield, M. J., & Wilhelm de Beer, Z. (2017). Canker stain: a lethal disease destroying iconic plane trees. *Plant Disease*, *101*(5), 645-658.
- Vigouroux, A. (1979). Les 'dépérissements' des platanes: causes, importance, mesures envisageables. *Revue Forestière Française*, *31*, 28-39.
- Vigouroux, A., & Stojadinovic, B. (1990). Possibilité d'infection du platane par *Ceratocystis fimbriata* f. *platani* après contamination de l'eau où se développent des racines blessées. *European Journal of Forest Pathology*, *20*, 118– 121.

Walter, J. M. (1946). *Canker stain of plane trees*. US Department of Agriculture Circular No. 742.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, 18(1), 315-322.