

## Evaluation of Some Cultural Characteristics in the Diagnosis of *Leucostoma* spp. Isolates Collected from Cherries in the Aegean Region, Turkey

Ethem YILMAZ<sup>1</sup> Ömer ERİNCİK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Aydın, 09100, Türkiye  
Corresponding author: Ö.Erincik, E-mail address: oerincik@adu.edu.tr

Received: 23 March 2018

Accepted for publication 18 July 2018.

### ABSTRACT

*Leucostoma* canker is one of the important diseases of cherry that causes widespread tree death. The disease is caused by different *Leucostoma* species, each of which has its own certain distinctive cultural characteristics. The objective of this study is to evaluate some cultural characteristics of *Leucostoma* spp. isolates collected from cherries in different provinces of the Aegean Region on the behalf of the diagnosis at the species level. Under this objective, a total of 150 *Leucostoma* isolates which were collected from the cherry orchards in İzmir, Manisa, Afyon, Denizli and Aydın Provinces were evaluated for their mycelial growth, colony color and shape, pycnidia size and ability to grow at 33°C and 37°C. Considering the overall results for cultural characteristics, the isolates were divided in to four groups. Some of the cultural characteristics of the isolates corresponded with *L. cincta* while some others matched with *L. persoonii* so that the diagnosis at the species level cannot be accomplished. It has been suggested that molecular diagnosis methods should be considered to obtain more reliable for species identification.

**Keywords:** Fungal colony, mycelial colony diameter, pycnidium temperature

### Ege Bölgesinde Kirazlardan Elde Edilen *Leucostoma* spp. İzolatlarının Bazı Kültürel Özelliklerinin Tanı Amaçlı Değerlendirilmesi

#### ÖZ

*Leucostoma* Kanseri hastalığı kiraz ağaçlarında kurumalara neden olan önemli hastalıklardan biridir. Hastalığa *Leucostoma* cinsinden birden fazla türün neden olduğu bilinmekte ve bu türlerin kendilerine özgü kültürel özelliklere sahip olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmanın amacı; Ege Bölgesinin farklı illerinden kiraz ağaçlarından elde edilen *Leucostoma* spp. izolatların bazı kültürel özelliklerinin tür düzeyinde tanı amacıyla değerlendirilmesidir. Bu amaçla İzmir, Manisa, Afyon, Denizli ve Aydın illerinde kiraz alanlarından elde edilmiş patojenik 150 adet *Leucostoma* spp. izolatu, besi ortamında miselyal gelişimi, koloni rengi, piknidyum büyüklüğü ve 33°C ile 37°C'lerde miselyal gelişimleri yönünden incelenmiştir. Tüm kültürel özellikler dikkate alındığında izolatlar dört farklı grupta sınıflandırılmıştır. İzolatların kültürel özelliklerinin bir kısmı *L. cincta* bir kısmı da *L. persoonii* ile uyumlu bulunması nedeniyle izolatların tür düzeyinde tanısı yapılamamıştır. Kesin tanı için moleküler tanı yöntemlerinin kullanılması gerektiği kanısına varılmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Fungal koloni, miselyal koloni çapı, piknidyum, sıcaklık

## GİRİŞ

Türkiye yaklaşık 85 bin hektarlık üretim alanı ve 600 bin tonluk meyve üretimi ile dünya kiraz üretiminde ilk sırada yer almaktadır (Anonim, 2016a). Ülkemizde bölgelere göre kiraz üretiminde ise Ege Bölgesi %34'lik kiraz üretim payı ile birinci sırada bulunmaktadır (Anonim, 2016b). Ege Bölgesinde kiraz neredeyse tüm illerde yetişmekte olup en yoğun yetiştiricilik İzmir, Manisa, Denizli, Afyon ve Kütahya illerinde yapılmaktadır (Anonim, 2016b).

Tüm ürün gruplarında olduğu gibi kiraz üretiminde de bazı hastalık ve zararlılar nedeniyle önemli ürün kayıpları meydana gelebilmektedir (Karaca et al., 1972; Spotts et al., 1990; Gökçe et al., 2011). Dünyada kirazlarda gövde, dal ve sürgünlerde ölümlere yol açan faktörlerin başında *Leucostoma* Kanseri (*Cytospora* Kanseri) gelmektedir (Biggs, 1989). Bu hastalık birçok kıtada, aralarında Türkiye'nin de olduğu birçok ülkede kiraz dışında, nektarin, kayısı, erik ve şeftalilerde de yaygın olarak görülmektedir (Hayova and Minter, 1998; Biggs and Grove, 2005; Çeliker and Kural, 2007). ABD'nin Oregon Eyaleti'nin Orta Kolombiya Bölgesinde kiraz ağaçlarında yapılan sörveylerde *Leucostoma* Kanseri nedeniyle ağaç ölüm oranı %16 olarak belirlenmiştir (Spotts et al., 1990). Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise Gökçe vd. 1998 yılında Doğu Anadolu Bölgesinde *Leucostoma* Kanserinin yayılış oranını Erzincan'da %38,1 ve Gümüşhane'de %13,3 olarak belirlemişlerdir (Gökçe et al., 2011). *Leucostoma* Kanseri tek yıllık sürgünlerde genellikle yaprak izleri ve gözlerin etrafında koyulaşmış çökük alanlar şeklinde ortaya çıkar ve geriye doğru ölüm ile tüm sürgünü öldürebilir. Kalın dallarda ve gövdede ise enfekteli dokuların tahrip olması sonucu kabuğun çöküp çatlaması ile derin yaralar şeklinde görülen kanserler oluşur. Kanser, dal veya gövdeyi çepeçevre sardığında bu kısmın üstünü öldürür (Biggs, 1995).

Taş çekirdekli meyve ağaçlarında *Leucostoma* Kanseri *Leucostoma personii*, *L. cincta* ve *L. parapersoonii* isimli üç farklı fungus türü tarafından oluşturulmaktadır (Adams et al., 2002). Bu türlerin besi ortamında kültürel özellikleri arasında benzerliklerinin yanında önemli farklılıklarının da olduğu ve bu farklılıkların türlerin ayırımında kullanılabilmesi bildirilmiştir (Adams et al., 1989; Surve-Iyer et al., 1995; Adams et al., 2002). *L. personii* petriyi tam doldurmayan sınırlı gelişme göstermekte ve kenarları loplu olan zeytini yeşil ve koyu renkli miselyal koloniler ve 1 mm'den küçük piknidyumlar oluşturmaktadır (Adams et al., 1989). *L. cincta* izolatları ise çoğunlukla petriyi tamamen dolduran, lopsuz, uniform, zeytin yeşili ve kadifemsi görünümde miselyal koloniler ile çapı 1 mm'den büyük piknidyumlar meydana getirmektedir. Ancak her iki türde de sözü edilen özelliklerden sapma gösteren kültürel özelliklere sahip izolatların da varlığı rapor edilmiştir. Örneğin, Surve-Iyer et al. (1995) üniform koloni gelişimine sahip petriyi tam olarak doldurabilen *L. personii* izolatların varlığını bildirmiştir. Ayrıca elmadan elde edilen *L. cincta* izolatlarının kırmızı- kahverengi tonlarında ya da bal, devetüyü ve ela renkleri arasında değişen kolonilere sahip oldukları bildirilmiştir. Üçüncü patojen tür olan *L. parapersoonii* izolatları PDA' da petriyi tam dolduran ve lob oluşturmeyen zeytini yeşil ya da gri renkte miselyal koloniler ile 1-3 mm büyüklüğünde piknidyumlar oluşturmuştur (Adams et al., 2002).

*L. cincta* ve *L. personii* türlerinin in vitro koşullarda farklı sıcaklıklara karşı verdikleri reaksiyonlar arasında varyasyonlar olduğu *L. personii* yüksek sıcaklıkları (25-30) severken *L. cincta*'nın düşük sıcaklıklarda daha iyi geliştiği öne sürülmüştür (Adams et al., 1989). Hatta bu farklılık bu iki türün ayırımında bir kriter olarak kullanılabilmesi bazı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Dhanvantari, 1969). Ancak etmenler üzerinde yürütülen çalışmalarda birbiriyle çelişen sonuçlar da elde edilmiş her iki etmen için farklı minimum, optimum ve maksimum sıcaklık değerleri bildirilmiştir (Regner et al., 1990; Surve-Iyer et al., 1995 Adams et al., 2002).

Bu çalışmanın amacı; Ege Bölgesinde kiraz üretiminin yaygın olarak yapıldığı ve her birinin farklı iklim ve ekolojik koşullara sahip olduğu bilinen İzmir, Manisa, Denizli, Afyon ve Aydın illerinin kiraz alanlarından elde edilmiş patojen *Leucostoma* spp. izolatlarının kültürde gelişme özellikleri yönünden incelenmesidir.

## MATERYAL ve METOD

### İzolatlar

Çalışmada, 2011-2012 yıllarında Ege Bölgesi'nde İzmir, Manisa, Afyon, Denizli ve Aydın illerinin kiraz alanlarında yapılan bir sörvey çalışmasında elde edilmiş 318 adet *Leucostoma* spp. izolatu arasında seçilmiş kirazda patojenik olan 150 adet izolat kullanılmıştır.

### İzolatların kültürel özelliklerinin belirlenmesi

Stok kültürden çıkarılan izolatlar patates dekstroz agar (PDA) besiyerinde gençleştirilmelerinin 3. gününde miselyal kolonilerin kenarlarından, mantar delici ile 4 mm çapında diskler kesilmiş ve bu diskler miselin bulunduğu yüzey alta gelecek şekilde içerisinde PDA besiyerinin bulunduğu 9 cm'lik petrilere orta kısmına yerleştirilmiştir. Her bir izolat için 3 petri kullanılmış ve her petri bir tekerrür olarak kabul edilmiştir. Petrilere, sıcaklığı 24°C ve günlük aydınlanma koşulları 14 saat aydınlık ve 10 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmış bir iklim odasına yerleştirilmiştir. İnokulasyonun 30'uncu gününde izolatlar, koloni rengi, koloni morfolojisi ve koloni çapları yönünden değerlendirilmiştir. Koloni rengi ve morfolojisi değerlendirmeleri görsel olarak yapılmış, koloni çapı ise kolonilerin uzun ve kısa kenar çapları ölçülerek belirlenmiştir. Koloni çapı bu iki değer toplamının ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Yine 30. günün sonunda piknidyum oluşumu gözlemlenen izolatlarda en az 10 piknidyum tesadüfen seçilerek çap uzunlukları Leica MZ 12,5 Model stereo mikroskopta oküler metre kullanılarak ölçülmüştür.

### İzolatların LMA besiyerinde 33°C'de koloni gelişimi

*L. personii* ve *L. cincta*'nın ayırımında bazı araştırmacıların önerdiği Leonian's Malt Extract Agar (LMA) besiyerinde 33°C gelişme testi, bu çalışmada 150 izolata uygulanmıştır (Surve-Iyer et al., 1995). LMA besiyeri 0.625 g peptone, 6.25 g maltose, 6.25 g malt extract, 1.25 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.625 g MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 20.0 g agar 1 L saf su kullanılarak hazırlanmıştır. Deneme kurulumu ve deseni yukarıda kültürel özelliklerin belirlenmesi çalışmalarında bahsedildiği gibi gerçekleştirilmiştir. Petrilere sıcaklığı 33°C ayarlanmış inkübatöre (Memert IPP-500) yerleştirilmiştir. İnkübasyonun 15. gününde izolatlar koloni gelişimi gösteren ve göstermeyen şekilde kategorik olarak ayrılmış, gelişme gösterenlerin koloni çap uzunlukları ölçülerek kaydedilmiştir.

### İzolatların PDA besiyerinde 37 °C'de koloni gelişimi

*L. personii* ve *L. cincta*'nın ayırımında bazı araştırmacıların önerdiği besiyerinde 37°C gelişme testi, PDA besiyeri kullanılarak 150 izolata uygulanmıştır. Deneme kurulumu, deseni ve sonuçların değerlendirilmesi 33°C gelişme testinde ki gibi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca sözü edilen inkübasyon döneminin ardından izolatların canlılık durumlarını tespit etmek amacıyla petrilere 15 °C gelişme sıcaklığında 10 günlük ilave inkübasyonda bırakılmışlardır. Bu sürenin sonunda, izolatlar koloni gelişimi gösteren ve göstermeyen şekilde kategorik olarak ayrılmış, gelişme gösterenlerin koloni çapları cetvelle ölçülerek kaydedilmiştir.

### İzolatların tüm kültürel özelliklere göre sınıflandırılması

Toplam 150 izolat Adams et al. (2002)'e göre aşağıdaki kriterler göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir.

1. Koloni morfolojisi: Koloninin loblu ve sınırlı gelişme göstermesi (*L. personii*), koloninin üniform ve havai misel olarak gelişme göstermesi (*L. cincta*, *L. parapersonii*)
2. Piknidyum boyutu: Küçük (<1 mm) (*L. personii*), büyük (1-3 mm) (*L. cincta*, *L. parapersonii*)
3. Koloni rengi: Zeytin yeşili ve siyaha yakın (*L. personii*, *L. parapersonii*), zeytin yeşili ve açık kahverengi (*L. cincta*)
4. 37°C'de gelişme durumu: Gelişme var (*L. personii*, *L. parapersonii*), gelişme yok (*L. cincta*)

## BULGULAR ve TARTIŞMA

### İzolatların PDA besi ortamında kültürel özellikleri

Toplam 150 izolat PDA besi ortamında 24°C floresan ışık altında 30 günlük inkübasyonlarının ardından ortalama çapları 8-90 mm arasında değişen farklı büyüklüklerde miselyal koloniler geliştirmişlerdir (Çizelge 1). İzmir izolatlarından Ki-283 kodlu izolat en büyük koloni gelişimini göstererek petrinin tamamını kaplayan tek izolat olmuştur. İzolatların büyük bir çoğunluğunu temsil eden 82 izolat ise koloni gelişimi açısından 41-60 mm koloni çapı aralığında yer almıştır. Aydın, İzmir ve Denizli izolatları ağırlıklı olarak bu grupta bulunmuştur. Tüm illerin hep birlikte yüksek sayıda temsil edildiği ikinci grup ise 21-40 mm aralığında miselyal koloni çapı geliştiren 43 izolatın yer aldığı grup olmuştur. Bunun dışında çoğunluğu Afyon ve Manisa'dan elde edilmiş 20 izolat ise meydana getirdikleri 61-80 mm arasındaki miselyal koloniler ile Ki-283 kodlu izolattan sonra en büyük miselyal koloni gelişimi gösteren grubu oluşturmuşlardır. Geri kalan 4 izolat ise 20 mm altında miselyal koloniler meydana getirmişlerdir.

Denemede kullanılan 150 adet *Leucostoma* spp. izolatının PDA ortamında 24°C' de floresan ışık altında 45 gün inkübasyonu sonrasında, 17'sinin haricinde diğer tüm izolatların piknidyum oluşturduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 2). Piknidyum oluşturmayan en fazla sayıda izolat Denizli ilinden elde edilmiştir. Piknidyum oluşturan izolatlardan 24'ü büyüklüğü 1 mm altında kalan piknidyumlar meydana getirmişlerdir. Bu izolatlara tüm illerde rastlanmıştır. Geri kalan 109 izolat 1-3 mm arasında büyüklüğü olan piknidyumlar oluşturmuşlardır. Bu grupta yer alan izolatlardan 72'si olmak üzere büyük bir kısmı büyüklüğü 1,1-1,5 mm arasında değişen piknidyumlar meydana getirmişlerdir. Tüm iller en yüksek izolat sayıları ile bu grupta temsil edilmişlerdir. Bunun dışında; 33 izolatın piknidyum büyüklükleri 1,6-2,0 mm arasında değişirken 4 izolatın piknidyum büyüklüğü 2 mm üzerinde bulunmuştur.

### İzolatların LMA Besiyerinde 33°C'de Koloni Gelişimleri

LMA besi ortamında 33°C'de 15 günlük inkübasyon sonrasında, *Leucostoma* spp. izolatları miselyal koloni gelişimi yönünden farklı reaksiyonlar vermişlerdir (Çizelge 3). Toplam 150 izolattan 32'si hiçbir gelişme göstermezken kalan 118 izolat ortalama çapları 6-80 mm arasında değişen miselyal koloniler meydana getirmişlerdir. Gelişme göstermeyen izolatlara tüm illerde rastlanmıştır. Gelişme gösteren izolatların 102'si oldukça sınırlı gelişme göstermiş ve ortalama koloni büyüklükleri 30 mm'nin altında kalmıştır. Örneklemeye yapılan illerin hepsi bu grupta yüksek izolat sayıları ile temsil edilmiştir. Çoğunlukla içerisinde İzmir izolatlarının yer aldığı toplam 16 izolatın ise ortalama misel çapları 31 mm'nin üzerinde bulunmuştur.

### İzolatların PDA Besiyerinde 37°C'de Koloni Gelişimleri

PDA besi ortamında 37°C'de 15 günlük inkübasyon sonrasında, toplam 150 adet *Leucostoma* ssp. izolatından hiç birisi gelişme göstermemiştir. PDA besi ortamında 37 °C 15 günlük inkübasyonlarını takiben 15°C 10 gün süre ile inkübasyonları sonrasında ise izolatların farklı reaksiyonlar verdikleri gözlemlenmiştir (Çizelge 4). Toplam 150 izolattan 84'ü herhangi bir gelişme göstermemiştir. Bu durum izolatların yarıdan fazlasının 37 °C de 15 günlük inkübasyon sonrasında canlılıklarını yitirdiğini ortaya koymuştur. Gelişme göstermeyen izolatlara tüm illerde rastlanmış ancak bu durum en fazla Aydın ilinden elde edilen izolatlarda görülmüştür.

**Çizelge 1.** Ege Bölgesi'nde farklı illerden toplanan *Leucostoma* spp. izolatlarının 24°C'de PDA ortamında oluşturdukları miselyal koloni büyüklüklerine göre gruplandırılması.

Miselyal Koloni Çapı Aralığı (mm)	İzolat Sayısı	Afyon İzolatları	İzmir İzolatları	Aydın İzolatları	Manisa İzolatları	Denizli İzolatları
6 -20	4	-	Ki-134-B,Ki-137	Ki-238	-	Ki-93-B
21-40	43	Ki-497, Ki-477, Ki-422 Ki-464, Ki-492, Ki-493, Ki-431, Ki-468, Ki-460, Ki-440, Ki-463	Ki-398, Ki-157, Ki-400, Ki-401, Ki-407, Ki-394	Ki-778Pik, Ki-776, Ki-786, Ki-220B, Ki-189B, Ki-222-A	Ki-387, Ki-318, Ki-336,Ki-176, Ki-342, Ki-343, Ki-374a, Ki-166-B, Ki-360, Ki-322	Ki-112, Ki-125,Ki-44,Ki-16, Ki-6, Ki-93-A, Ki-2, Ki-49-B, Ki-90, Ki-61
41-60	82	Ki-475, Ki-427, Ki-454, Ki-451, Ki-425, Ki-453, Ki-471, Ki-466, Ki-439, Ki-487, Ki-459, Ki-438, Ki-445	Ki-310, Ki-141, Ki-275, Ki-164, Ki-284, Ki-134, Ki-279, Ki-280, Ki-150, Ki-159, Ki-411, Ki-156, Ki-404, Ki-419, Ki-287, Ki-296, Ki-293, Ki-415 Ki-301-A,	Ki-266, Ki-241, Ki-213, Ki-785, Ki-199, Ki-249, Ki-214, Ki-220-A, Ki-205, Ki-239, Ki-247, Ki-250, Ki-270, Ki-271, Ki-229, Ki-236, Ki-793, Ki-777, Ki-194, Ki-788, Ki-777Pik, Ki-219, Ki-263	Ki-359, Ki-358, Ki-329, Ki-165, Ki-352, Ki-173, Ki-316, Ki-325, Ki-178, Ki-337	Ki-49-A,Ki-1, Ki-52, Ki-5, Ki-14, Ki-1A, Ki-30, Ki-42, Ki-110-B, Ki-39, Ki-121, Ki-45, Ki-87, Ki-119, Ki-4, Ki-60, Ki-78
61-80	20	Ki-447, Ki-488, Ki-500, Ki-452, Ki-476, Ki-435, Ki-480, Ki-457, Ki-456, Ki-461	Ki-162	Ki-253	Ki-376, Ki-169, Ki-338, Ki-335, Ki-384, Ki-166-A	Ki-85, Ki-8
81-90	1	Ki-283	-	-	-	-

**Çizelge 2.** Ege Bölgesi'nde farklı illerden toplanan *Leucostoma* spp. izolatlarının PDA besi ortamında oluşturdukları piknidyumların büyüklüklerine gruplandırılması.

Piknidyum Çapı Aralığı (mm)	İzolat Sayısı	Afyon İzolatları	İzmir İzolatları	Aydın İzolatları	Manisa İzolatları	Denizli İzolatları
PY*	17	Ki-487	Ki-141, Ki-287, Ki-398	Ki-189-B,Ki-253, Ki-777	Ki-374a	Ki-1A, Ki-8, Ki-16, Ki-49-B, Ki-60, Ki-93-B, Ki-110-B, Ki-112, Ki-125
<1	24	Ki-440, Ki-422, Ki-466, Ki-445	Ki-283, Ki-400, Ki-162	Ki-266, Ki-229, Ki-194, Ki-786, Ki-785, Ki-213	Ki-335, Ki-336, Ki-342, Ki-166-B, Ki-316	Ki-2, Ki-4, Ki-39, Ki-30, Ki-90, Ki-52
1,1-1,5	72	Ki-463, Ki-460, Ki-492, Ki-497, Ki-453, Ki-427, Ki-454, Ki-475, Ki-451, Ki-431, Ki-425, Ki-435, Ki-439, Ki-438, Ki-459, Ki-464, Ki-493, Ki-480	Ki-134, Ki-284, Ki-137, Ki-293, Ki-156, Ki-404, Ki-164, Ki-401, Ki-280, Ki-415, Ki-279, Ki-407, Ki-411, Ki-310, Ki-157, Ki-419, Ki-275, Ki-134B	Ki-205, Ki-793, Ki-236, Ki-776, Ki-220-B, Ki-214, Ki-778Pik., Ki-241, Ki-222-A, Ki-238, Ki-777Pik., Ki-250, Ki-788, Ki-249	Ki-329, Ki-169, Ki-178, Ki-360, Ki-376, Ki-165, Ki-325, Ki-322, Ki-352, Ki-387, Ki-338, Ki-337, Ki-359	Ki-1, Ki-6, Ki-45, Ki-14, Ki-85, Ki-44, Ki-93-A, Ki-78
1,6-2	33	Ki-500, Ki-447, Ki-471, Ki-468, Ki-477, Ki-461, Ki-488, Ki-476, Ki-456	Ki-296, Ki-159, Ki-150, Ki-394	Ki-263, Ki-270, Ki-247, Ki-271, Ki-220-A, Ki-199, Ki-219, Ki-239	Ki-176, Ki-173, Ki-166-A, Ki-318, Ki-358, Ki-343, Ki-384	Ki-49-A, Ki-121, Ki-42, Ki-87, Ki-61, Ki-5
2,1-3	4	Ki-452, Ki-457	Ki-301-A	-	-	Ki-119

\*PY:Piknidyum oluşturmayan izolatlar

EGE BÖLGESİNDE KİRAZLARDAN ELDE EDİLEN *LEUCOSTOMA* SPP. İZOLATLARININ  
BAZI KÜLTÜREL ÖZELLİKLERİNİN TANI AMAÇLI DEĞERLENDİRİLMESİ

**Çizelge 3.** Ege Bölgesi'nde farklı illerden toplanan *Leucostoma* spp. izolatlarının 33°C'de LMA besiyerinde oluşturdukları miselyal kolonilerin büyüklüklerine göre gruplandırılması.

Miselyal Koloni Çapı Aralığı (mm)	İzolot Sayısı	Afyon İzolatları	İzmir İzolatları	Aydın İzolatları	Manisa İzolatları	Denizli İzolatları
GY*	32	Ki-425, Ki-440, Ki-451, Ki-452, Ki-459, Ki-461, Ki-468, Ki-471, Ki-475, Ki-477	Ki-280, Ki-398	Ki-189-B, Ki-236, Ki-250, Ki-253, Ki-263, Ki-776, Ki-793	Ki-166-A, Ki-166-B, Ki-318, Ki-374a, Ki-384	Ki-14, Ki-16, Ki-30, Ki-45, Ki-85, Ki-87, Ki-93-A, Ki-119
1 – 5	1		-	-	-	Ki-78
6 -10	38	Ki-422, Ki-492, Ki-487, Ki-488, Ki-466, Ki-500, Ki-439, Ki-497, Ki-438, Ki-493	Ki-134-B, Ki-287	Ki-213, Ki-222-A, Ki-271, Ki-220-B, Ki-241, Ki-786, Ki-785, Ki-199, Ki-270	Ki-358, Ki-376, Ki-342, Ki-338, Ki-176, Ki-352,	Ki-2, Ki-4, Ki-5, Ki-42, Ki-90, Ki-49-A, Ki-44, Ki-121, Ki-1, Ki-110-B, Ki-125
11-30	63	Ki-463, Ki-453, Ki-445, Ki-460, Ki-464, Ki-435, Ki-431, Ki-447, Ki-427, Ki-454	Ki-164, Ki-415, Ki-275, Ki-137, Ki-279, Ki-394, Ki-141, Ki-419, Ki-404, Ki-401, Ki-310, Ki-150, Ki-301-A, Ki-156, Ki-293	Ki-777Pik, Ki-205, Ki-788, Ki-229, Ki-266, Ki-249, Ki-219, Ki-194, Ki-220-A, Ki-778Pik, Ki-214, Ki-247, Ki-777, Ki-239	Ki-335, Ki-316, Ki-178, Ki-337, Ki-387, Ki-336, Ki-169, Ki-343, Ki-329, Ki-322, Ki-359, Ki-165, Ki-360, Ki-173	Ki-49-B, Ki-6, Ki-8, Ki-112, Ki-52, Ki-61, Ki-39, Ki-1A, Ki-93-B, Ki-60
31-50	10	Ki-457	Ki-157, Ki-284, Ki-134, Ki-164, Ki-296, Ki-400, Ki-407, Ki-159	-	Ki-325	-
51-80	6	Ki-480, Ki-476, Ki-456	Ki-283, Ki-411	Ki-238	-	-

\*GY:Gelişmeyen izolatlar

**Çizelge 4.** Ege Bölgesi'nde farklı illerden toplanan *Leucostoma* spp. izolatlarının 37°C'de inkübasyonun ardından 15°C'de PDA besiyerinde miselyal gelişimleri.

İzolat Çapı Aralığı (mm)	İzolat Sayısı	Afyon İzolatları	İzmir İzolatları	Aydın İzolatları	Manisa İzolatları	Denizli İzolatları
0*	84	Ki-435, Ki-487, Ki-463, Ki-439, Ki-452, Ki-460, Ki-427, Ki-425, Ki-422, Ki-440, Ki-438, Ki-461, Ki-493, Ki-477, Ki-475, Ki-471, Ki-459, Ki-468	Ki-280, Ki-157, Ki-394, Ki-296, Ki-283, Ki-134, Ki-287, Ki-415, Ki-293, Ki-310, Ki-162, Ki-404, Ki-419, Ki-275, Ki-411, Ki-134-B, Ki-164, Ki-401, Ki-398	Ki-249, Ki-247, Ki-219, Ki-229, Ki-253, Ki-189-B, Ki-786, Ki-793, Ki-222-A, Ki-270, Ki-250, Ki-199, Ki-241, Ki-194, Ki-220-A, Ki-220-B, Ki-263, Ki-785, Ki-205, Ki-236, Ki-776, Ki-788, Ki-777, Ki-213	Ki-343, Ki-384, Ki-387, Ki-352, Ki-176, Ki-359, Ki-169, Ki-166-B, Ki-374a, Ki-318, Ki-165	Ki-45, Ki-110-B, Ki-93-A, Ki-49-A, Ki-42, Ki-93-B, Ki-6, Ki-119, Ki-52, Ki-2, Ki-30, Ki-87
1 -20	3	Ki-497, Ki-492	Ki-407	-	-	-
21-40	14	Ki-451, Ki-488	Ki-150, Ki-279, Ki-284, Ki-141, Ki-159	Ki-239, Ki-214, Ki-266, Ki-778Pik.	Ki-325, Ki-329	Ki-125
41-60	26	Ki-500	Ki-400, Ki-156, Ki-301-A, Ki-137	Ki-271, Ki-777Pik., Ki-238	Ki-316, Ki-342, Ki-360, Ki-322, Ki-338, Ki-358, Ki-337	Ki-14, Ki-49-B, Ki-39, Ki-112, Ki-90, Ki-121, Ki-1, Ki-5, Ki-60, Ki-4, Ki-85
61-80	18	Ki-431, Ki-453, Ki-454, Ki-464, Ki-476, Ki-447	-	-	Ki-178, Ki-376, Ki-336, Ki-335, Ki-166-A, Ki-173	Ki-16, Ki-78, Ki-8, Ki-61, Ki-1A, Ki-44
81-90	5	Ki-445, Ki-480, Ki-456, Ki-466, Ki-457	-	-	-	-

\*PDA besiyerinde 15°C'de gelişmeyen izolatlar.

### İzolatların Tüm Kültürel Özelliklere Göre Sınıflandırılması

Test edilen bütün kültürel özellikler dikkate alınarak yapılan değerlendirmelerde izolatlar farklı gruplar altında toplanarak sınıflandırılmıştır. Toplam 150 izolattan hiçbirininin 37°C'de gelişme göstermemesi nedeniyle izolatların hepsi bir grup (37°C gelişmeyen) içerisinde yer almıştır. Bu özellikleri nedeniyle tüm izolatlar *L. cincta* türü ile uyum göstermiştir. Bu grup içerisinde izolatlar koloni şekillerinin loplulu ve lopsuz özellik göstermesine göre ikiye ayrılmıştır. İzolatların büyük bir çoğunluğu (142 izolat) loplulu koloni oluşturan grupta yer alırken sadece 8'i lopsuz koloni oluşturan grubu oluşturmuşlardır. Loplulu özellikleri nedeniyle 142 izolat *L. personii* türü ile uyumlu bulunmuştur. Her iki grupta da havai misel oluşturan ve oluşturmayan izolatlar yer almıştır. Loplulu koloni oluşturan izolatlar arasında havai misel oluşturmayan izolatların sayısı daha fazla bulunurken lopsuz koloni oluşturan izolatlar arasında havai misel oluşturan izolatların sayısı daha fazla bulunmuştur. Koloni şekli (loplulu, lopsuz), misel tipi (havai misel oluşumu) ve 37°C gelişme özelliklerinin kombinasyonu sonrasında izolatlar dört ana gruba ayrılmıştır (Şekil 1, 2 ve 3).

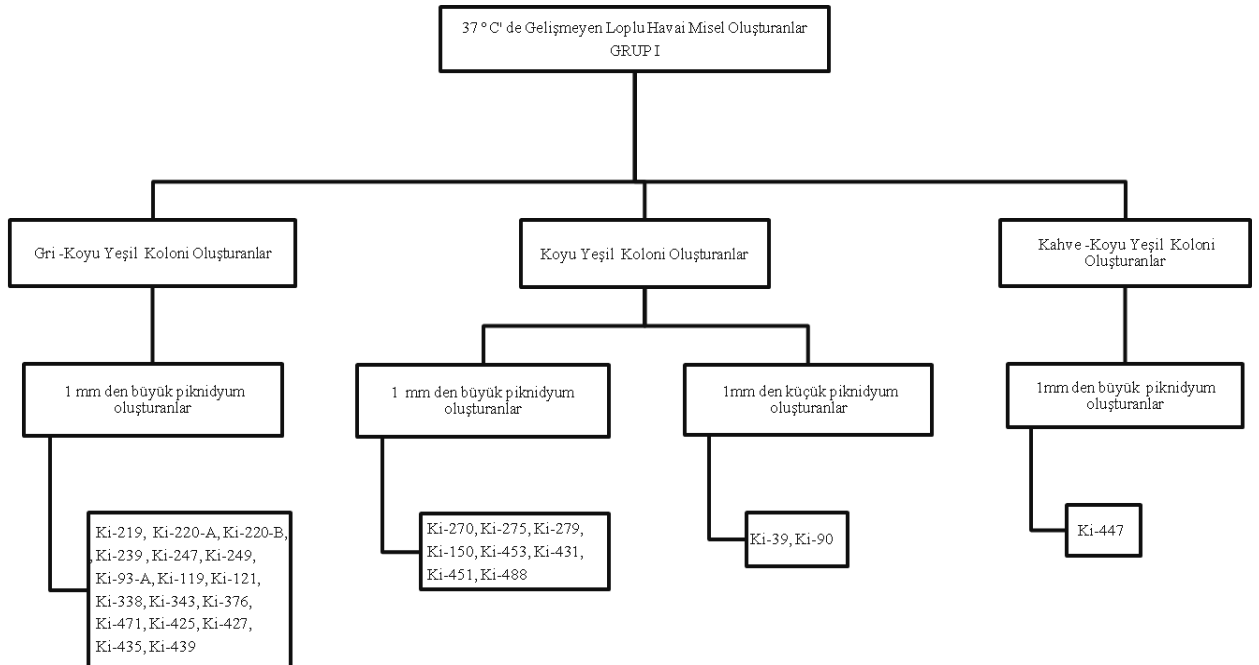
- I. Grup: 37°C'de gelişmeyen loplulu koloni ve havai misel oluşturanlar.
- II. Grup: 37°C'de gelişmeyen loplulu koloni ve havai misel oluşturmayanlar
- III. Grup: 37°C'de gelişmeyen lopsuz koloni ve havai misel oluşturanlar
- IV. Grup: 37°C'de gelişmeyen lopsuz koloni ve havai misel oluşturmayanlar

EGE BÖLGESİNDE KİRAZLARDAN ELDE EDİLEN *LEUCOSTOMA* SPP. İZOLATLARININ  
BAZI KÜLTÜREL ÖZELLİKLERİNİN TANI AMAÇLI DEĞERLENDİRİLMESİ

I. Grupta yer alan izolatlardan 17'si gri-zeytin yeşili, 10'u zeytin yeşili, 1'i kahverengi-zeytin yeşili renkte koloniler oluşturmuşlardır. Zeytin yeşili koloni oluşturan izolatlardan 2'si hariç bu grupta bulunan 25 izolat çapı 1 mm den büyük piknidyumlar oluşturmuştur (Şekil 1). Bu grupta yer alan izolatların loplu koloni özellikleri göz ardı edildiğinde 28 izolattan 26'sı *L. cincta* ile uyumlu bulunmuştur. Geri kalan 2 izolatın piknidyum büyüklüğü ve loplu koloni özelliği dikkate alındığında *L. personii* ile uyumlu olmaktadır ancak bu izolatların 37°C'de gelişme göstermemeleri ve 1 mm'den büyük piknidyum oluşturmaları *L. personii* türüne ait olmalarını şüpheli hale getirmektedir.

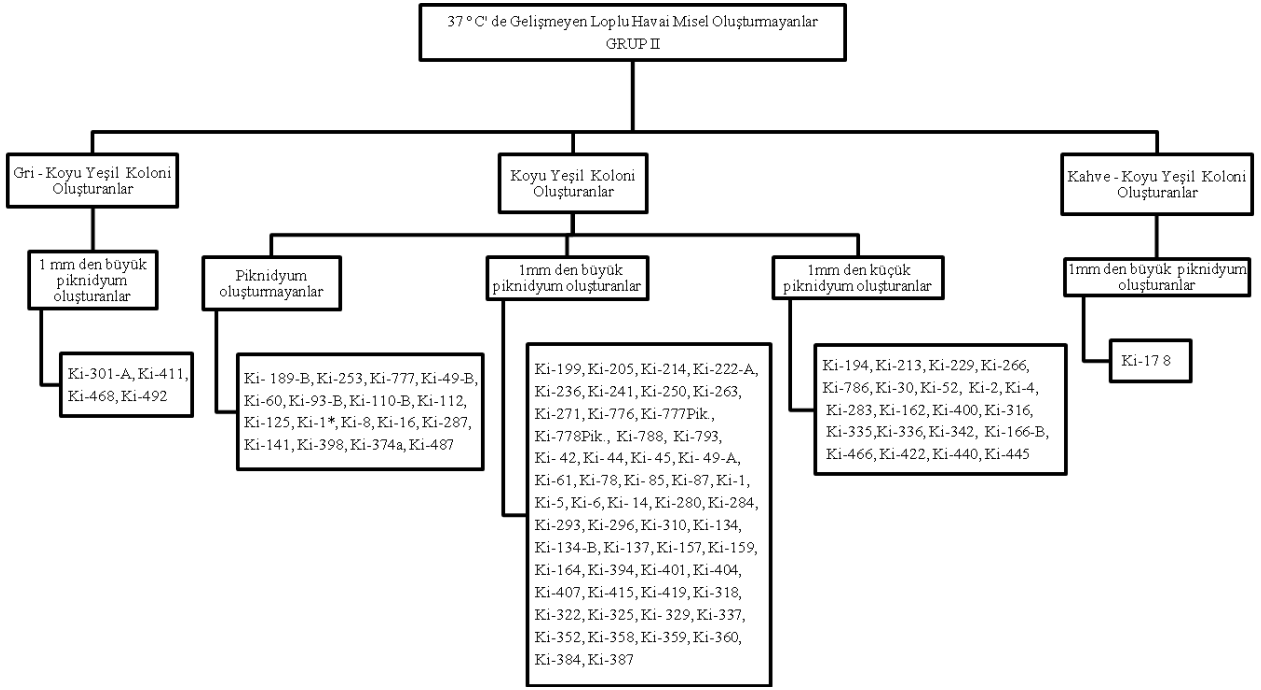
II. Grupta yer alan izolatlardan 92'si zeytin yeşili, 4'ü gri-zeytin yeşili ve 1'i kahverengi-zeytin yeşili renkte koloni oluşturmuşlardır. Zeytin yeşili koloni oluşturan izolatlardan 54'ü, gri-zeytin yeşili ve kahverengi-zeytin yeşili koloni oluşturan izolatların hepsi 1 mm'den büyük çapa sahip piknidyumlar oluşturmuşlardır. Zeytin yeşili koloni oluşturan izolatlardan 21'i çapı 1 mm altında kalan piknidyum oluştururken 17'si besi ortamında piknidyum oluşturmamıştır (Şekil 2). Bu özelliklere göre loplu koloni özelliği dikkate alınmadan yapılan değerlendirmede toplam 59 izolat 37°C gelişmemeleri ve 1 mm'den büyük piknidyum oluşturma özellikleri gözönünde bulundurulduğunda *L. cincta* ile uyumlu oldukları görülmüştür. Piknidyum büyüklüğü 1 mm'nin altında kalan 21 izolat loplu koloni özelliği dikkate alındığında *L. personii* ile uyumlu olmuşlar ancak yine 37°C gelişmemeleri nedeniyle bu uyum şüpheli olarak değerlendirilmiştir. Piknidyum oluşturmayan 17 izolat için 37°C gelişmeme durumları dışında net bir özelliklerinin bulunmaması nedeniyle kesin bir değerlendirme yapmak mümkün olamamıştır.

III. Grupta yer alan izolatlardan 3'ü gri-zeytin yeşili, 1'i zeytin yeşili ve 3'ü kahverengi-zeytin yeşili renkte koloni oluşturmuştur. Bu grupta yer alan izolatların hepsi çapı 1 mm'nin üstünde olan piknidyum oluşturmuştur. IV. Grupta yer alan bir izolat ise zeytin yeşili renkte koloni ve çapı 1 mm üzerinde olan piknidyumlar oluşturmuştur (Şekil 3). III. Grup ve IV. Grupta yer alan bu 8 izolat 37°C gelişmemeleri, lopsuz koloni gelişimi ve 1 mm den büyük piknidyum oluşturmaları gibi özellikleri ile *L. cincta* ya en fazla uyum gösteren izolatlar olmuşlardır.

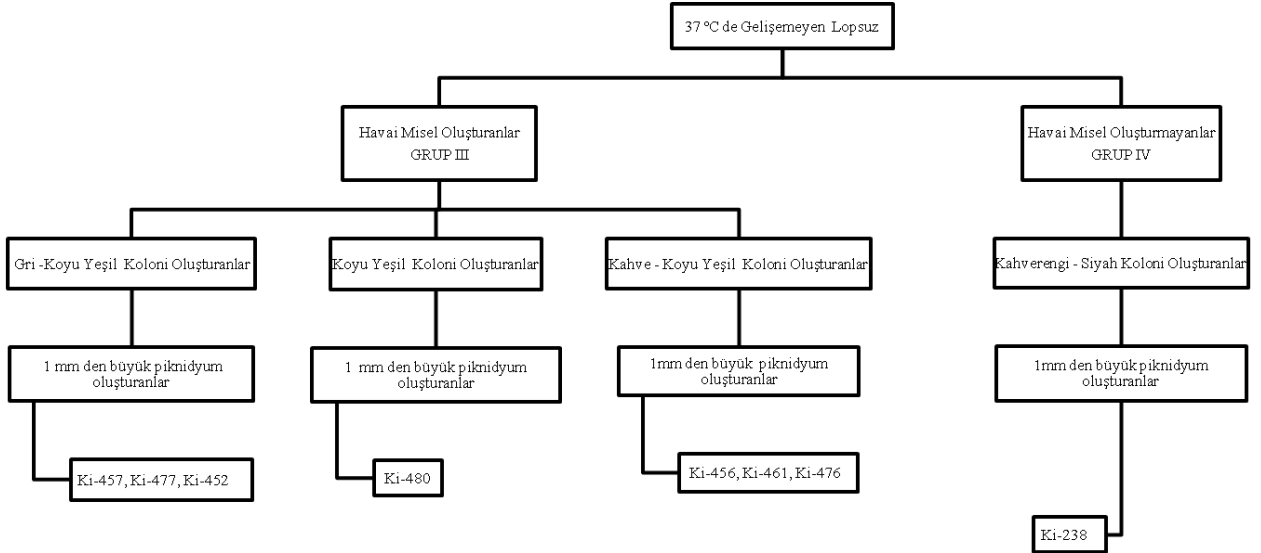


Şekil 1. Kültürel özelliklere göre I. Grupta yer alan *Leucostoma* spp. izolatlarının ek kültürel özellikleri dikkate alınarak sınıflandırılması.





Şekil 2. Kültürel özelliklere göre II. Grupta yer alan *Leucostoma* spp. izolatlarının ek bazı kültürel özellikleri dikkate alınarak sınıflandırılması.



Şekil 3. Kültürel özelliklere göre III. Grup ve IV. Grupta yer alan *Leucostoma* spp. izolatlarının ek bazı kültürel özellikleri dikkate alınarak sınıflandırılması

Çalışmada test edilen *Leucostoma* spp. izolatları arasında besi ortamında koloni morfolojileri, koloni rengi, piknidyum büyüklükleri ve koloni büyüklükleri gibi kültürel özellikleri yönünden farklılıkların olduğu görülmüştür. Koloni şekli *Leucostoma* türlerini ayırt etmede kullanılan kriterlerden biri olarak çok sayıda araştırmacı tarafından önerilmiştir (Willison, 1936; Adams et al., 1989; Surve-Iyer et al., 1995). Ancak besi ortamında koloni morfolojisinin pekte güvenilir olmadığı tek başına bir kriter olamayacağı diğer bazı araştırmacılar tarafından da

EGE BÖLGESİNDE KİRAZLARDAN ELDE EDİLEN *LEUCOSTOMA* SPP. İZOLATLARININ  
BAZI KÜLTÜREL ÖZELLİKLERİNİN TANI AMAÇLI DEĞERLENDİRİLMESİ

belirtilmiştir (Tekauz and Patrick, 1974; Adams et al., 1989; Surve-Iyer et al., 1995; Adams et al., 2002). Bir çalışmada *L. personii* izolatları ve *L. cincta* izolatlarının Patates Dektroz Agar besisi ortamında benzer morfolojik özellikler oluşturduğu bildirilmiştir (Tekauz and Patrick, 1974). Oatmeal Agar besiyerinde ise *L. personii* izolatları birbirine daha benzer morfolojik özellikler oluştururken, *L. cincta* izolatları arasında koloni rengi, havai misel oluşumu, piknidyum boyutu ve rengi yönünden farklılıklar gözlemlenmiştir (Tekauz and Patrick, 1974). ABD’de yürütülen bir çalışmada ise LMA besisi ortamında *L. personii* petriyi tam doldurmayan sınırlı gelişme göstermiş ve kenarları loplu olan zeytini yeşil ve koyu renkli miselyal koloniler ve 1 mm’den küçük piknidyumlar oluşturduğu gözlemlenmiştir (Adams et al., 1989). Aynı çalışmada 9 adet *L. cincta* izolatından 7’si petriyi tamamen dolduran, lopsuz, uniform, zeytin yeşili veya açık kahverengi görünümde miselyal koloniler ve tüylü görünümlü ve çapı 1 mm’den büyük piknidyumlar oluşturmuşlardır. Geri kalan iki izolat ise diğerleri gibi uniform koloni oluştursa da biri çapı 1 mm’den küçük piknidyumlar meydana getirirken bir diğeri hiçbir şekilde piknidyum oluşturmamıştır (Adams et al., 1989). İki türün piknidyum boyutları hakkında benzer bulgular ABD’de Washington Eyaleti’nde kirazlardan toplanan izolatlardan da elde edilmiştir (Regner et al., 1990).

*Leucostoma* türleri arasında bildirilen bu morfolojik farklılıkların nedeninin tür teşhisinin doğru olarak yapılamamasından da kaynaklanmış olabileceğini düşünmek mümkündür. Nitekim, ABD’de başka bir çalışmada ise yine Michigan ve Kaliforniya’dan elde edilen *L. personii* olarak tanımlanan izolatların LMA ortamında üniform gelişme gösterdiği ve petriyi tam olarak doldurabildikleri saptanmıştır (Surve-Iyer et al., 1995). Ancak daha sonra bu izolatların ribosomal RNA parça dizilimlerinin elde edilmesinin ardından bu izolatların başka bir *Leucostoma* türü olduğu ortaya konmuş ve *L. parapersonii* olarak adlandırılmıştır (Adams et al., 2002). Aynı çalışmada bu izolatların *L. personii*’de olduğu gibi zeytini yeşil ya da gri renkte miselyal koloniler ve *L. cincta*’da olduğu gibi 1-3 mm büyüklüğünde piknidyumlar oluşturdukları bildirilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan 150 adet *Leucostoma* spp. izolatının test edilen sıcaklık değerlerinde farklı reaksiyonlar verdikleri gözlemlenmiştir. İzolatların tümü 37°C’de gelişme göstermeyerek aynı şekilde davranmıştır. Birçok araştırmacının bildirdiğine göre *L. cincta* 37°C’de gelişmemekte bu özellik bu tür için ayırt edici bir özellik olarak önerilmektedir. Geçmişte hastalık üzerinde yürütülen ilk çalışmalarda *L. personii*’nin 15°C’nin üzerinde, *L. cincta*’nın ise 15°C’nin altında daha virulent olduğu rapor edilmiştir (Wensley, 1964). Nitekim Dhanvantari (1969) 30°C’nin üzerindeki ortamlarda *L. personii* izolatlarının gelişebildiğini *L. cincta*’nın çoğunlukla gelişmediğini bildirmiştir. Bertrand’ın 1974 yılında yaptığı çalışmada *L. cincta* için maximum gelişme sıcaklığını 30-36°C olarak bulmuştur. ABD’de Michigan Eyaleti’nde yürütülen bir çalışmada ise *L. personii* olarak tanımlanan izolatların hepsi 37°C gelişme gösterirken 9 *L. cincta* izolatından 8’i gelişme göstermemiştir (Adams et al., 1989). Aynı çalışmada 32°C’de ise *L. cincta*’nın gelişme gösterdiği bildirilmiştir. Ancak daha sonra yapılan başka bir çalışmada da 33°C’de *L. cincta* izolatlarının gelişme göstermediği rapor edilmiştir (Surve-Iyer et al., 1995). Bizim çalışmamızda ise yukarıda belirtildiği gibi 37°C’de izolatların tümü, 33°C’de ise 150 izolattan sadece 32’si gelişme göstermemiştir. Geri kalan 118 izolat 33°C’de değişen büyüklüklerde koloniler meydana getirmişlerdir. Ancak gelişme gösteren izolatların büyük bir kısmı (102 adeti) çapları 30 mm’yi geçmeyen oldukça küçük koloniler oluşturmuşlardır. Ayrıca çalışmamızda 37°C’nin fungus için öldürücü olabileceği de ortaya konmuştur. Nitekim bu sıcaklıkta 15 gün inkübasyon sonrasında 15°C’de 10 gün süreyle inkübasyona alınan 150 izolattan 82’sinde miselyal gelişme olmamıştır. Geri kalan 58 izolat 15°C’de çapları 10-80 mm arasında değişen koloniler meydana getirmişlerdir. Bu test sonuçlarına göre 37°C’de hayatta kalma yönünden farklı davranan iki izolat grubu ortaya çıkmıştır. Bu durumun neden kaynaklandığını anlamak eldeki bilgiler ile mümkün olmamıştır. Gelecekte bu konuda yapılacak çalışmalarla bunun bir tür özelliği olup olmadığının ortaya konması gerekmektedir. Bunun dışında literatürde yukarıda bahsedilen bulgular ile çelişen raporlar da bulunmaktadır. Örneğin Almanya’da yapılan bir çalışmada kirazlardan elde edilen *L. personii* ile şeftali ve eriklerden elde edilen *L. cincta* izolatlarının optimum ve maksimum sıcaklık isteklerinin birbirine çok yakın olduğu bildirilmiştir (Schmidle et al., 1979). Söz konusu çalışmada *L. personii* için optimum ve maksimum sıcaklıklar sırasıyla 21°C ve 32°C olarak bildirilirken, *L. cincta* için bu sıcaklıklar 23°C ve 30-32°C olarak rapor edilmiştir. Yine ABD’de yapılan başka bir çalışmada ise Washington Eyaleti’nde kirazlardan elde edilen *L. cincta* izolatlarının 30°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda gelişmediği bildirilmiştir (Regner et al., 1990).

Çalışmamızda izolatların besi ortamlarında gösterdiği kültürel özellikler ve sıcaklıklara verdikleri reaksiyonlar değerlendirildiğinde, izolatların büyük bir çoğunluğunun *L. cincta* olabileceği düşünülmüş ancak kesin tanı yapılamamıştır. Bu izolatların 37°C de gelişmemeleri, 33°C sınırlı gelişme göstermeleri ve 1 mm büyük piknidyum oluşturmaları *L.cincta*'nın literatürde bildirilen özelliklerine uymuştur. Ancak bu izolatların çoğunun besi ortamında loplular miselyal koloni oluşturmaları ise *L. personii*'nin literatürde bildirilen özelliği ile uyum göstermiştir. Bunun yanında 1 mm den küçük piknidyum oluşturan ve loplular koloni geliştiren izolatlar ise *L. personii* ile uyumlu bulunmuş ancak bu izolatların 37°C de gelişme göstermemeleri bunların tanısını da şüpheli hale getirmiştir. Çalışmamızda ise elde edilen bulgular Ege Bölgesinde kirazlarda kansere neden olan *Leucostoma* spp. izolatları tür düzeyinde belirlenmesi için yeterli olamamıştır. Bu çalışma ile kültürel özellikler ile *Leucostoma* türlerinin birbirinden ayrılmasının çok sağlıklı olmayacağı ve kesin tanı moleküler yöntemlerin kullanılmasının gerekli olduğu kanısına varılmıştır.

### TEŞEKKÜR

Bu araştırma, ZRF-12044 proje kodu ile Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından maddi olarak desteklenmiştir. Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine katkılarından dolayı teşekkür ederiz

### LİTERATÜR LİSTESİ

- Adams, G. C., Hammar, S. A., and Iezzoni, A.1989. Optimum Sample Size for Detecting Virulence Differences in *Leucostoma* Isolates from Peach. *Plant Disease*, 73: 754-759.
- Adams, G. C., Surve-Iyer, R. S. and Iezzoni, A. 2002. Ribosomal DNA Sequence Divergence and Group I Introns with in *Leucostoma* species, *L. cinctum*, *L. personii* and *L. parapersoonii* sp. nov., Ascomycetes that Cause *Cytospora* Canker of Fruit Trees. *Mycologia*, 94: 947-967.
- Anonim, 2016a. www.Foostat.org. Erişim Tarihi: 10.02.2016
- Anonim, 2016b.www.tuik.gov.tr Erişim Tarihi: 10.02.2016
- Biggs, A. R. 1989. Temporal Changes in the Infection Court after Wounding of Peach Bark and their Association with Cultivar Variation in Infection by *Leucostoma personii*. *Phytopathology*, 79: 627-630.
- Biggs A. R. 1995. *Leucostoma* canker. In: Compendium of Stone Fruit Diseases. Pages: 28-29. Eds: Ogawa, J. M., E. I. Zehr, G.W., Bird, D. F. , Ritchie, K., Uriu and J. K., Uyemoto.. APS Press, St. Paul, MN., pp.98.
- Biggs, A. R. and Grove, G. G. 2005. *Leucostoma* canker of Stone Fruits. The Plant Health Instructor, [Web page:[http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/Leucostoma\\_Canker.aspx](http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/Leucostoma_Canker.aspx)], Erişim Tarihi: 09.08.2013.
- Çeliker, N. M., and Kural, İ. 2007. Ege Bölgesinde Özellikle Kiraz ve Diğer Meyve Ağaçlarında Kurumaya Neden Olan *Sitospora* Kanseri. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 27-29 Ağustos 2007, Isparta p.275.
- Dhanvantari, B. N. 1969. Comparative Physiology and Pathogenicity of *Leucostoma* spp. on Peach. (Abstr.) *Phytopathology*, 59:1023.
- Gökçe, A.Y., Turak, S., Albayrak, S., and Akbağ, R. 2011. Doğu Anadolu Bölgesinde Meyve Ağaçlarında Sorun Olan Fungal Etmenlerin Tespiti. *Bitki Koruma Bülteni*, 51(1): 33-44.
- Hayova, V. P. and Minter, D. W. 1998. *Leucostoma niveum*. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria (137): Sheet 1362.
- Karaca, İ, Bora, T., and Özçağırın, R. 1972. Kemalpaşa Bölgesinde Kiraz Ağaçlarının Kuruma Sebepleri Üzerine Araştırmalar. Türkiye Bilimsel Araştırmalar Kurumu, Tarım Ormancılık Araştırma Grubu Yayınları, Sayı 13.
- Regner, K. M., Johnson, D. A., and Gross, D. C. 1990. Etiology of Canker and Dieback of Sweet Cherry in Washington State. *Plant Disease*,74: 430-433.
- Schmidle, A., Krähmer, H., and Brenner, H. 1979. Ein Beitrag zur taxonomischen Abgrenzung von *Leucostoma personii* (Nits.) Höhnel und *Leucostoma cincta* (Fr.) Höhnel. *Journal of Phytopathology*, 96 (4):294-301.

EGE BÖLGESİNDE KİRAZLARDAN ELDE EDİLEN *LEUCOSTOMA* SPP. İZOLATLARININ  
BAZI KÜLTÜREL ÖZELLİKLERİNİN TANI AMAÇLI DEĞERLENDİRİLMESİ

- Surve-Iyver R. S., Adams, G. C., Iezzoni, A. F. and Jones, A. L. 1995. Isozyme Detection and Variation in *Leucostoma* species from *Prunus* and *Malus*. *Mycologia*, 87: 471-482.
- Spotts, R. A., Facticeau, T. J., Cervantes L. A., and Chestnut, N. E. 1990. Incidence and Control of *Cytospora* Canker and Bacterial Canker in a Young Sweet Cherry Orchard in Oregon. *Plant Disease*, 74: 577-580.
- Tekauz, A. and Patrick, Z.A. 1974. The Role of Twig Infections on the Incidence of Perennial Canker of Peach. *Phytopathology*, 64: 683-688.
- Wensley, R. N. 1964. Occurrence and Pathogenicity of *Valsa* species and other Fungi Associated with Peach Canker in Southern Ontario. *Canadian Journal of Botany*, 42: 841-857.
- Willison, R. S. 1936. Peach Canker Investigations. II. Infection studies. *Canadian Journal of Research*, 14: 27-44.