

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BEYAĞAÇ (DENİZLİ) KIZILÇAM MEŞCERELERİNDE *Sydowia polyspora* Bref. & Tavel'NİN TESPİTİ, HASTALIK ŞİDDETİ ve PATOJENİSİTESİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATMA DEMİRÖZ

DENİZLİ, NİSAN - 2023

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



BEYAĞAÇ (DENİZLİ) KIZILÇAM MEŞCERELERİNDE *Sydowia polyspora* Bref. & Tavel'NİN TESPİTİ, HASTALIK ŞİDDETİ ve PATOJENİSİTESİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FATMA DEMİRÖZ

DENİZLİ, NİSAN - 2023

Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2022FEBE013 nolu proje ile desteklenmiştir.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

FATMA DEMİRÖZ

ÖZET

**BEYAĞAÇ (DENİZLİ) KIZILÇAM MEŞCERELERİNDE
Sydowia polyspora Bref. & Tavel’NİN TESPİTİ, HASTALIK ŞİDDETİ
ve PATOJENİSİTESİNİN BELİRLENMESİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
FATMA DEMİRÖZ
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. Ü. REFİKA CEYDA BERAM)

DENİZLİ, NİSAN- 2023

Sydowia polyspora kozalaklı ağaçlarda yaşayan yaygın bir fungus türüdür ve genellikle asemptomatik bitkilerde ve tohumlarda epifit veya endofitik olarak ortaya çıkmaktadır. Bu fungus abiyotik veya biyotik stres koşulları altında kolonize olduğu konukçuda patojenik hale gelebilmektedir. Avrupa ve Kuzey Amerika’da özellikle *Abies* spp. ve *Pinus* spp. gibi kozalaklı türlerde mevsimsel ibre nekrozu ve sürgün ölümleri ile ilişkilendirilmektedir. Bu tez çalışmasının amacı, Denizli Orman Bölge Müdürlüğü’ne bağlı Eskere Orman İşletme Müdürlüğü sınırları içinde yer alan beş farklı *Pinus brutia* meşceresinde ibre nekrozları ve sürgün ölümleri ile ilişkili fungal etmenin araştırılması, hastalık şiddetinin belirlenmesi ve *P. brutia* fidanlarında bu etmenin patojenitesinin ortaya çıkarılmasıdır. Bu amaçla 5 farklı örnek alanda yayılış gösteren semptomatik *P. brutia* ibre ve sürgünlerinden fungal izolasyonlar gerçekleştirilerek 68 adet fungal izolat elde edilmiştir. Elde edilen izolatların makroskobik-mikroskobik morfolojik karakterizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra moleküler karakterizasyonlar için rDNA’nın ITS gen bölgesinin dizi bilgisi kullanılmıştır. ITS bölgesinin çoğaltılmasında ITS1-ITS4 primer çiftlerinden yararlanılmıştır. Örnek alanlarda ortalama hastalık şiddeti %38 ile %62 (ortalama = %47) arasında belirlenmiştir. Ayrıca, örnek alanlardan elde edilen izolatların 2 yaşlı *P. brutia* fidanları üzerinde patojenite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İnokulasyon yapılan sürgünlerde enfeksiyon sıklığı %90 olarak tespit edilmiştir. Patojenite testlerinin sonuçları ve fungusun semptomatik sürgünlerden yeniden izolasyonu, *S. polyspora*’nın *P. brutia* meşcerelerindeki mevsimsel ibre nekrozu ve sürgün ölümlerinin gelişiminde rol oynadığını açıkça göstermiştir. Bildiğimiz kadarıyla bu tez çalışması, Türkiye’de *S. polyspora*’nın *P. brutia*’da neden olduğu mevsimsel ibre nekrozu ve sürgün ölümünün tespit edildiği ilk çalışmadır.

ANAHTAR KELİMELER: *Sydowia polyspora*, *Pinus brutia*, Türkiye, sürgün nekrozu, ibre nekrozu, sürgün ölümü

ABSTRACT

**DETECTION, DISEASE SEVERITY, and PATHOGENICITY
of *Sydowia polyspora* Bref.& Tavel in BRUTIAN PINE STANDS
of BEYAĞAÇ (DENİZLİ)
MSC THESIS
FATMA DEMIROZ
PAMUKKALE UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY**

(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. REFIKA CEYDA BERAM)

DENİZLİ, NİSAN-2023

Sydowia polyspora is a common fungal species living on conifers and often emerges as an epiphyte or endophytic on asymptomatic plants and in seeds. The fungus may become pathogenic under abiotic or biotic stress conditions. It is often associated with current season needle necrosis and shoot dieback on conifer species, especially *Abies* spp. and *Pinus* spp. throughout Europe and North America. The aim of this thesis is to investigate the fungal agent associated with needle necrosis and shoot dieback in five different *Pinus brutia* stands located within the boundaries of the Eskere Forestry Management Directorate affiliated to Denizli Regional Directorate of Forestry, to determine the severity of the disease and to reveal the pathogenicity of this agent in *P. brutia* seedlings. For this purpose, fungal isolations from symptomatic *P. brutia* needles and shoots were carried out in 5 different stands and totally 68 fungal isolates were obtained. After performing macroscopic-microscopic morphological characterization studies of the isolates, the sequence information of the ITS gene region of the rDNA was used for molecular characterizations. ITS1-ITS4 primer pairs were used for the amplification of the ITS region. The mean disease severity in the sample areas was between 38% and 62% (mean = 47%). In addition, pathogenicity studies were carried out on 2-year-old *P. brutia* seedlings of the isolates. Infection frequency in inoculated shoots was determined as 90%. Results of pathogenicity tests and re-isolation of the fungus from symptomatic shoots clearly demonstrated that *S. polyspora* plays a role in the development of needle necrosis and shoot dieback in *P. brutia* stands. To the best of our knowledge, this thesis is the first study in Turkey to detect needle necrosis and shoot dieback caused by *S. polyspora* in *P. brutia*.

KEYWORDS: *Sydowia polyspora*, *Pinus brutia*, Türkiye, shoot necrosis, needle necrosis, shoot dieback

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. <i>Sydowia polyspora</i> 'nın Fungal Taksonomideki yeri.....	6
2.2. <i>Sydowia polyspora</i> 'nın Biyolojisi	6
2.3. <i>Sydowia polyspora</i> 'nın Yayılışı ve Ana Konukçuları.....	7
2.4. Hastalık Belirtileri	8
2.5. <i>Pinus brutia</i> hakkında Genel Bilgiler	9
3. LİTERATÜR ÖZETİ	11
4. MATERYAL ve YÖNTEM	16
4.1. Materyal	16
4.1.1. Araştırma alanı	16
4.1.2. Sörvey çalışmaları	17
4.1.2.1. Örnek Alanların Belirlenmesi	17
4.1.2.2. Verilerin toplanması ve örnekleme	17
4.1.2.3. Örnek alanlarda hastalık şiddetinin belirlenmesi	18
4.2. Yöntem	19
4.2.1. Laboratuvar çalışmaları.....	19
4.2.1.1. Fungal İzolasyonlar	20
4.2.1.2. Fungal Teşhis çalışmaları.....	21
4.2.1.2.1. Morfolojik karakterizasyon çalışmaları	21
4.2.1.2.2. Moleküler karakterizasyon çalışmaları	21
4.2.1.3. Patojenisite çalışmaları.....	24
4.2.2. İstatistiksel değerlendirme	25
5. BULGULAR	26
6. TARTIŞMA	32
7. SONUÇ VE ÖNERİLER	36
8. KAYNAKLAR	38

9. ÖZGEÇMİŞ.....	43
-------------------------	-----------

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. <i>Pinus brutia</i> 'nın Türkiye'deki yayılış alanları	10
Şekil 4.1. Araştırma Aşamaları	16
Şekil 4.2. Araştırma alanı yer bulduru haritası	18
Şekil 4.3. Moleküler çalışmalarda kullanılan cihazlar	20
Şekil 4.4. Patojenisite çalışmasına ait aşamalar	25
Şekil 5.1. Mevsimsel ibre nekrozu ve sürgün ölümü gösteren kızılçam bireyleri.....	26
Şekil 5.2. Fungusun izolasyonu	27
Şekil 5.3. <i>Sydowia polyspora</i> 'nın %2'lik PDA besi ortamında 20 °C'de karanlıkta inkube edilmiş 4 farklı morfortipte 10 günlük koloni görüntüsü.....	28
Şekil 5.4. <i>Sydowia polyspora</i> 'nın ışık mikroskobu altında lactophenol cotton blue ile hazırlanmış hyaline konidiaları.	28
Şekil 5.5. Türe özgü ITS1-ITS4 primer çifti ile gerçekleştirilen PCR amplifikasyon ürünleri.	29
Şekil 5.6. Patojenisite çalışması.....	32

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2. 1. <i>Sydowia polyspora</i> 'nın Taksonomideki yeri.....	6
Tablo 4. 1. Örnek alanlarda bulunan <i>Pinus brutia</i> meşcerelerine ait veriler.....	18
Tablo 4. 2. <i>P. brutia</i> meşcerelerinde kullanılan hastalık şiddeti skorlaması.....	19
Tablo 4. 3. Çalışmada kullanılan primer çifti.....	22
Tablo 4. 4. PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları	22
Tablo 4. 5. PCR sıcaklık ve döngü koşulları	22
Tablo 4. 6. Patojenisite çalışmalarında kullanılan izolatlar.....	24
Tablo 5. 1. Örnek alanlara ait hastalık şiddeti verileri	27
Tablo 5. 2. Total genomik DNA'ların saflık ve konsantrasyonları.....	29
Tablo 5. 3. Konukçularda meydana gelen patojenisite değerleri	31

SEMBOL ve KISALTMALAR LİSTESİ

MEA	:	Malt Extract Agar
PDA	:	Patates Dekstroz Agar
OGM	:	Orman Genel Müdürlüğü
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
ml	:	Mililitre
mm	:	milimetre
m	:	metre
NCBI	:	National Center for Biotechnology Information
ITS	:	Internal Transcribed Spacer
OTU	:	Operational Taxonomic Units
SNC	:	Spring Needle Cast
μ L	:	MikroLitre
ng	:	Nanogram
TBE	:	Tris Borate EDTA Buffer
GRISP	:	Green DNA Stain
rDNA	:	Ribozomal Deoksiribo Nükleik Asit
H'	:	Tür Çeşitlilik İndeksi
CO ₂	:	Karbondioksit
NaOCl	:	Sodyum Klorür
°C	:	Santigrad Derece
WPND	:	White Pine Needle Damage

ÖNSÖZ

Yüksek lisans sürecimde her türlü yol göstericim olan, olumlu tavrıyla beni cesaretlendiren, bilgi birikimiyle çalışmama farklı açılardan bakmamı sağlayan, beraber çalışmaktan ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli danışman hocam Dr. Öğr. Ü. Refika Ceyda BERAM'a teşekkürü borç bilirim.

Tezimin her aşamasında büyük bir özveriyle bana yardımcı olan arkadaşlarım Sultan AKYOL, Nurzhan TASHİGUL ve Muhammed Rahim BİKZAD'a teşekkür ederim.

Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2022FEBE013 numaralı proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Projemizin sörvey çalışmalarında göstermiş olduğu özverili desteğinden dolayı, Denizli Orman Bölge Müdürlüğünde görev yapan Orman Zararlıları ile Mücadele Şube Müdürü Sayın İbrahim KARAŞAHİN'e teşekkür ederim.

Çalışmalarımızı gerçekleştirdiğimiz Eskere Orman İşletme Müdürlüğünde görev yapan tüm idari ve teknik personele ve ayrıca Çiçekli Orman İşletme Şefi Sayın Ömer ÖZDEMİR'e teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak hayatım boyunca maddi manevi desteğini esirgemeyen, aldığım kararlara saygı duyan sevgili aile bireylerime teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Ormanlar; insanlık için gıda, yakıt, barınak, temiz hava ve su gibi maddi-manevi birçok fayda sunan tabii bir kaynaktır, içerdikleri biyolojik çeşitlilik ve hizmet ettikleri ekolojik işlevler açısından kritik öneme sahip habitatlar olarak bilinmektedir. Yaşadığımız gezegende birçok orman türü vardır ve her orman hassas bir dengeye sahiptir. Sadece bir ağaç topluluğundan ibaret olmayan ormanlar ağaçlarla birlikte diğer bitkiler, hayvanlar, funguslar, toprak, su, iklim gibi biyotik ve abiyotik varlıkların birlikte oluşturduğu ekosistem topluluklarıdır. Orman ekosistemleri yerel ve küresel iklimi düzenlemekte, hava olaylarını iyileştirmekte, hidrolojik döngüyü düzenlemekte, havzaları ve bitki örtüsünü, su akışlarını ve toprağı korumakta ve çoğu henüz ortaya çıkarılmamış olan genetik çeşitliliği sağlamaktadırlar (Mooney ve diğ. 1995; Holling ve diğ. 1995).

Ülkemiz ormanlarında oldukça geniş bir yayılış alanına sahip olan kızılçam ormanları, çeşitli biyotik ve abiyotik faktörlerin olumsuz etkisi altında kalmaktadır (Dingiloğlu 2019). Biyotik faktörler, bir ekosistemin canlı bileşenlerini içermektedir. Bunlar, bitkiler, hayvanlar, funguslar ve bakteriler olarak gruplandırılmaktadır. Abiyotik faktörler ise ışık, su, hava, sıcaklık, toprak, yağmur gibi cansız bileşenler olarak ekosistemler üzerinde etkili olmaktadır (Sayın ve diğ. 2015). Söz konusu faktörler genel anlamda ağaçların idare sürelerini, meşcere sağlığını ve eta artımını etkilemekle birlikte ciddi ekonomik değer kayıplarına da sebep olmaktadır. Orman ekosisteminde ki ağaçları olumsuz etkileyen en önemli biyotik faktörlerden biri de fungus zararları olmaktadır. Funguslar ağaçların yaprak, dal, gövde, kök gibi çeşitli kısımlarında yer alarak orman ekosistemlerinde ki meşcerelerde şiddetli zararlara sebep olmaktadır (Çanakçioğlu ve Mol 1998).

Ökaryotik canlılar olan funguslar, ekosistem süreçlerini düzenlemede temel roller oynamaktadır (Větrovský ve diğ. 2019). Organik maddenin ana ayrıştırıcıları ve bitkilerin ortakları veya patojenleri olan funguslar, bitkilerin birincil üretimini, karbon mineralizasyonunu ve tutulmasını önemli ölçüde etkilemekte ve insan güvenliğinin en büyük konularından biri olan toprak karbon dengesinin önemli

düzenleyicileri olarak görev yapmaktadırlar (Peay ve diğ. 2016). Devam eden küresel değişimin büyüklüğü göz önüne alındığında, iklim ve diğer çevresel faktörlerin fungus topluluklarının çeşitliliğini ve dağılımını nasıl etkilediğini belirlemek büyük önem taşımaktadır (Hillebrand 2004). Funguslar, ısı ve kuraklık gibi iklim değişikliğiyle ilişkili abiyotik stresörleri iyileştirerek bitkilere fayda sağlayabildikleri gibi (Kivlin ve diğ. 2013; Redman ve diğ. 2002) bitkileri stres altına sokarak şiddetli kurumalara da neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca, fungus çeşitliliğinin kurak alanlardaki iklim faktörlerinden etkilendiği bildirilmiştir (Maestre ve diğ. 2015). Fungus toplulukları çok çeşitli ekolojik nişleri işgal etmekte, çeşitli temel işlevleri yerine getirmekte ve bu nedenle birçok orman ekosistemi işlevinde hayati bir rol oynamaktadırlar (Balami ve diğ. 2020).

Saprotrofik funguslar esas olarak organik madde ve bitki artıklarının ayrışmasından sorumludur ve bu nedenle besin döngüsünü önemli ölçüde etkilemektedir (Ruiz-Almenara ve diğ. 2019). Parazit funguslar diğer tüm parazit formlarda olduğu gibi konukçu bitkinin besin maddesine ortak olmaktadır ve bitki hücrelerinin metabolizmasını etkileyerek bitkide oksijen, fosfor ve nitrojen dengesinde bozulmalar meydana getirmektedirler. Metabolizmadaki bu bozulmalar kısa zamanda bitkide dokulara, organlara ve bazen tüm bitkiye yayılmaktadır. Bitki köklerinde, gövdelerinde, yapraklarında, çiçeklerinde, meyvelerinde ve tohumlarında gördüğümüz lekeler, solgunluklar, buruşmalar, tümörler, fistüller ve nekrozların çoğu parazit fungusların neden olduğu semptomlardır (Bahçecioglu 1995).

Endofitik funguslar, konukçu bitkilerin yaprakları ve gövdeleri gibi dokularda yaşayan patojenik olmayan funguslardır (Carroll 1988). Esas olarak Ascomycota ve Basidiomycota Şubesinde yer almaktadırlar (Arnold 2007). Endofitik funguslar, gezegendeki tüm bitkilerde bulunmakta ve konukçu bitkilerin büyümesi ve bakımı üzerinde olumlu bir etkiye sahip olmaktadır. Bununla birlikte, endofitik funguslar mutlaka simbiyotik ilişkiler oluşturmamaktadır, bunun yerine konukçu bitkiyi ne olumlu ne de olumsuz yönde etkileyen nötr ilişkiler de oluşturabilmektedirler (Eo ve diğ. 2022). Ancak bazıları konukçu bitkinin sağlığına bağlı olarak fırsatçı bir şekilde patojenlere veya saprofitlere dönüşmektedir. Birlikte ele alındığında, endofitik funguslar tüm sağlıklı bitkilerde bulunmakta ve konukçu bitkilerle nötralite, simbiyoz, parazitlik ve patojenite dahil olmak üzere çeşitli ilişkiler

oluşturmaktadırlar. Ayrıca konukçu bitkilerin büyümesini ve bakımını da etkilemektedirler (Schulz 2005).

Bitki köklerini saran bir rizom oluşturan mikorizal fungusların aksine, endofitik funguslar tamamen bitki dokularında bulunmakta ve konukçu bitkinin hücreler arası alanında da miselyum geliştirmektedirler (Bacon 2000). Konukçu bitkiler, çeşitli biyotik ve abiyotik stres etkenlerine maruz kalmakta ve endofitik funguslar, konukçu bitki büyümesini ve stres toleransını desteklemek için ekosistemde önemli ve çeşitli roller oynamaktadırlar (Eo ve diğ. 2022).

Dünya nüfusunun çok hızlı şekilde artması atmosfere CO₂'in daha fazla salınımına yol açmaktadır. Sera gazları içinde CO₂ gazı, küresel ısınmanın en önemli nedeni olarak gösterilmektedir. Bu sorunun çözümü olarak atmosfere CO₂ gazı salınımının azaltılması veya atmosferde bulunan söz konusu gazın karbon olarak biriktirilmesini sağlamaktadır (Yeşil ve Asan 2007). Türkiye, küresel iklim değişikliğinin etkileri bakımından risk grubu teşkil eden ülkeler arasında yer almaktadır (Tüfekçioğlu 2008). Küresel iklim değişimi sonucunda özellikle yağışın azalması, su kaynaklarının zayıflaması, hava sıcaklığının yükselmesi, orman yangınlarının artması, yanlış arazi kullanımı, kuraklık ve çölleşme, hastalık ve böcek salgınları ile bunlara bağlı ekolojik bozulmaları beraberinde getirmektedir (Baltacı ve Kalkancı 2021). Ormanlar, hem diğer ekosistemlere oranla daha fazla CO₂ tüketmeleri hem de bağladıkları karbonu daha uzun süre bünyelerinde tutmalarından dolayı, karasal ekosistemler içinde küresel iklim değişikliğini ve dolayısıyla kuraklığı önlemede etkili araçtır (Şimşek ve diğ. 2010).

Kuraklık gibi ekolojik sebeplerin ağaç sağlığını doğrudan ve dolaylı olarak tehdit ettiği bilinmektedir. İklim değişikliğinin bir sonucu olarak stres faktörleri altında yeni enfeksiyonlar ve yeni patojen türleri ortaya çıkabilmektedir. Özellikle bazı fungusların enfeksiyon yapma potansiyellerinin arttığı bilinen bir gerçektir.

Ascomycete şubesinin üyesi olan *Sydowia polyspora* (Bref. & Tavel) E. Müll. asemptomatik bitkilerde ve tohumlarda yaşayan yaygın bir fungus türüdür ve genellikle epifit (Kowalski ve Kehr 1996; Kowalski ve Pozdzik 1993) veya endofitik olarak ortaya çıkmaktadır (Sieber-Canavesi ve Sieber 1993). Bununla birlikte, araştırmacılar, fungusun kolonize bir konukçuda, belirli abiyotik ve biyotik

faktörlerin etkisi altında patojenik hale gelebildiğini bildirmişlerdir (Ridout ve Newcombe 2018; Talgø ve diğ. 2010; Silva ve diğ. 2020).

Fungus Avrupa ve Kuzey Amerika'da bulunan kozalaklı türlerde, özellikle *Abies* spp. ve *Pinus* spp. türlerinde, sıklıkla mevsimsel ibre nekrozu ile ilişkilidir (Talgø ve diğ. 2010; Tinivella ve diğ. 2014). *Abies* spp.'deki ana semptomlar, yaz aylarında kırmızımsı kahverengiye dönüşen ten rengi ile sarı renkli şeritler veya benekleri içerir. Tüm ibreler nekrotik ve apsisli hale gelebilir (Talgø ve diğ. 2010). Benzer semptomlar *Pinus* spp.'de Pan ve diğ. (2018) tarafından *Pinus yunnanensis* Franch'l üzerinde bildirilmiştir. Çam ibrelerinde klorotik ve kırmızımsı kahverengi lezyonlara neden olduğu, sağlıklı ibreler arasında rastgele dağılım gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca Tinivella ve diğ. (2014) tarafından yapılan çalışmada *Pinus halepensis* Mill'de yoğun yaprak sararması ve kavrulmalar rapor edilmiştir.

Ekonomik kayıplar nedeniyle başta Akdeniz bölgesi olmak üzere birçok bölgede önemli fungus türlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Silva ve diğ. 2020). *Pinus* spp'de başlıca semptomları arasında ibreler üzerinde yaz aylarında kırmızımsı kahverengiye dönüşen ten rengi ile sarı renkli şeritler veya benekler bulunmaktadır (Tinivella ve diğ. 2014; Pan ve diğ. 2018; Silva ve diğ. 2020). İbrelerde klorotik lezyonlara neden olan fungus, sağlıklı ibreler arasında rastgele dağılmaktadır (Pan ve diğ. 2018).

S. polyspora bulunduğu konukçuda hastalık belirtisi göstermeden latent olarak bulunabilmektedir (Flowers ve diğ. 2001; Stanosz ve diğ. 2001; Stanosz ve diğ. 1997, Stanosz ve diğ. 2007). Bunun yanı sıra ağaç fizyolojisinde meydana gelen değişimlerin hastalık semptomlarının ortaya çıkışını teşvik ettiği rapor edilmiştir (Desprez-Loustau ve diğ. 2006). Genel olarak bu fırsatçı patojen bitkilerin gövde, dal, ibre, çiçek, kozalak ya da tohumlarını enfekte ettikten sonra bu dokular içerisinde uzun yıllar belirti göstermeden bekleyerek konukçusunun strese girmesiyle belirtileri ortaya çıkmaktadır (Bihon ve diğ. 2011; Bikzad 2022). Bu fungus ile bulaşık ağaçlarda ilk aşamada tepede deformasyonlar oluşmaya başlarken, uzun yıllar süren enfeksiyonlarda ağaçlar zayıf düşmekte ve herhangi bir stres faktörüne maruz kaldıklarında bu ağaçlar tek bir vejetasyon döneminde hayati fonksiyonlarını kaybetmektedirler (Blumenstein ve diğ. 2020; Capretti ve diğ. 2013; Bikzad 2022).

Bu tez çalışmasının amacı, Denizli Orman Bölge Müdürlüğü, Eskere Orman İşletme Müdürlüğü, Eskere Orman İşletme Şefliği ve Eşenler Orman İşletme Şefliği sınırları içinde bulunan beş farklı orman plantasyonu alanındaki *Pinus brutia* Ten. meşcerelerinde sürgün ölümlerine neden olan fungal etmenin araştırılması, hastalık şiddetinin belirlenmesi ve *P. brutia* sürgünlerinde bu etmenin patojenitesinin ortaya çıkarılmasıdır. Bu amaçla Eskere Orman İşletme Müdürlüğü Mülki sınırları içerisindeki kızılçam bireylerinde semptomatik ibre ve sürgünlerden fungal izolasyonlar gerçekleştirilerek elde edilen izolatların morfolojik ve moleküler karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca bu alanlarda mevsimsel ibre nekrozuna neden olduğu kanısına varılan *S. polyspora*'nın 2 yaşlı *P. brutia* fidanları üzerinde patojenite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bildiğimiz kadarıyla bu tez çalışması, Türkiye'de *S. polyspora*'nın neden olduğu *P. brutia*'da mevsimsel ibre nekrozu ve sürgün ölümüyle ilgili ilk çalışmadır (Farr ve Rossman 2022).

2. GENEL BİLGİLER

S. polyspora'nın fungal taksonomideki yeri, biyolojisi, yayılışı ana konukçuları ve neden olduğu hastalık belirtilerine ilişkin genel bilgiler bu kısımda alt başlıklar halinde verilmiştir.

2.1. *Sydowia polyspora*'nın Fungal Taksonomideki yeri

S. polyspora, National Center for Biotechnology Information (NCBI) sisteminde güncel olarak Fungi Alemi, Ascomycota Şubesi, Dothideomycetes sınıfında (Tablo 2.1.) yer almaktadır.

Tablo 2. 1. *Sydowia polyspora*'nın Taksonomideki yeri

Alem	Fungi
Şube	Ascomycota
Sınıf	Dothideomycetes
Takım	Dothideales
Aile	Dothioraceae
Cins	<i>Sydowia</i>
Tür	<i>Sydowia polyspora</i>

2.2. *Sydowia polyspora*'nın Biyolojisi

S. polyspora izolatının kolonilerinin tümünde, başlangıçta %2 Malt Extract Agar (MEA) ve Patates Dekstroz Agar (PDA) besi ortamlarında beyaz kenarlı, krem renkli, spor kütleleri ile kaplı spor kolonileri bulunmaktadır (Pan ve diğ. 2018). Bu koloniler daha sonra kahverengi, grimsi siyah hale gelerek septat olmayan, elipsoid, hiyalin ve multigutulate sporlar oluşturmaktadır (Talgø ve diğ. 2010). İzolatların büyüme hızı, 20°C'de %2 MEA'da 10 gün içinde 75-85 mm olarak bildirilmiştir (Pan ve diğ. 2018). Miselyumu, bazen dallanan ve enteroblastik konidia üreten koniojen hücreler gibidir. Aservulustan çıkan konidioforlar dikdörtgen şeklinde ve konidiaları hiyalin, tek hücreli, septat olmayan, esas olarak elipsoiddir ve 6,8 (4,2 ila 10,7) x 2,8 (2,4 ila 4,25) µm olarak bildirilmiştir (Çakar ve diğ., 2022). Ayrıca Talgø ve diğ.

(2010), *S. polyspora* ile yaptıkları çalışmada kolonilerdeki konidiaları 4,8-(7,1)-12,5 x 2,3-(2,8)-5,3µm olarak bildirmişlerdir. *Hormonema merioides* Funk. ile çalışan Funk ve diğ. (1985), kolonilerdeki konidiaları 7-12 x 3-5µm olarak ölçerken, *Kabatina abietis* Butin & Pehl. ile çalışan Butin ve Pehl. (1993) konidiaları 6-12 x 3,5-6,5 µm olarak ölçtüklerini bildirmişlerdir. Konidia'nın tümü, kısa papillalı interkalar hifal segmentlerinden basipetal olarak üretilmiştir, konidiaların şekli ve boyutları değişiklik göstermektedir (Pan ve diğ. 2018).

2.3. *Sydowia polyspora*'nın Yayılışı ve Ana Konukçuları

Britanya Kolumbiyası'ndaki *Pseudotsuga menziesii* Mirb.'nde (Douglas göknarı) ve *Abies grandis* Lindl.'de (Büyük sahil göknarı) mevsimsel ibre nekrozu benzeri belirtiler rapor edilmiş ve *H. merioides* fungusu olarak tanımlanmıştır (Funk ve diğ. 1985). Almanya'da, bu fungus *K. abietis* mevsimsel ibre nekrozu semptomları olan *A. grandis* ibrelerinden izole edilmiştir (Butin ve Pehl 1993). Çin'de *Sclerophoma pithyophila* Corda. olarak bildirilen *S. polyspora*, *Abies* spp.'nin *Dothistroma* (ibre yanıklığı) şiddetini arttıran patojen olarak kaydedilmiştir (Shang 2003). *S. polyspora*, ABD, Danimarka, Avusturya, Almanya ve Norveç'te *Abies* türlerinde mevsimsel ibre nekrozu ile ilişkilidir (Talgø ve diğ. 2010). Ayrıca Talgø ve diğ. (2010) *S. polyspora*'yı Slovakya'da toplanan *Abies nordmanniana* Stev.'nin enfekte olmuş ibrelerinden izole etmişlerdir. Tinivella ve diğ. (2014), İtalya'da yoğun ibre sararması gözlemlenen *P. halepensis* meşcerelerindeki bireylerden *S. polyspora* fungusu izole etmişlerdir. Kuzeydoğu Amerika'da *Pinus ponderosa* Dougl.'da beyaz çam ibresi hasarı (White Pine Needle Damage, WPND) ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Broders ve diğ. 2015; Ridout ve Newcombe, 2018).

S. polyspora'nın Güneybatı Çin'de *P. yunnanensis*'in kök floemini ve çam ibrelerini kolonize ettiği bildirilmiştir (Pan ve diğ. 2018). Ayrıca, *Hormonema dematioides* Lagerb. & Melin. olarak bildirilen *S. polyspora*, Fransa, İsveç, Japonya ve Polonya gibi birçok ülkede *Tomicus piniperda* L., *Tomicus minor* Hartig. ve *Pityogenes bidentatus* Herbst. ile ilişkili yaygın bir fungus olarak tespit edilmiştir (Pan ve diğ. 2018). Idaho'nun kuzeyindeki karışık ormanlarda *P. ponderosa* ağaçlarının ibrelerinden elde edilen funguslar arasında *S. polyspora* en yaygın türdür (Ridout ve Newcombe, 2018). *S. polyspora*'nın, Portekiz meşcerelerinde *Pinus pinea* L.

ağaçlarının sürgünlerinde nekrozlara neden olduğu olduğu tespit edilmiştir (Silva ve diğ. 2020). Ayrıca Güneybatı Çin'de *P. yunnanensis*'te ibreler üzerinde klorotik ve kırmızımsı kahverengi renkli lezyonlara neden olduğu ve sağlıklı ibreler arasında rastgele dağıldığı gözlemlenmiştir (Silva ve diğ. 2020). Ayrıca Silva ve diğ. (2020) Portekiz'de *P. pinea* meşcerelerinde *S. polyspora*'nın hastalığa neden olduğunu bildirmiştir.

Türkiye'de, *S. polyspora* tarafından mevsimsel ibre nekrozunun ilk raporu *A. nordmanniana* subsp. *equi-trojani*'de bildirilmiştir (Çakar ve diğ. 2022). Ayrıca Cleary ve diğ. (2019), Türkiye'de *P. pinea*'nın asemptomatik tohumlarında *S. polyspora* tespit etmiştir.

2.4. Hastalık Belirtileri

S. polyspora bulunduğu konukçuda hastalık belirtisi göstermeden latent olarak bulunabilmektedir (Flowers ve diğ. 2001; Stanosz ve diğ. 2001; Stanosz ve diğ. 1997, Stanosz ve diğ. 2007). Bunun yanı sıra ağaç fizyolojisinde meydana gelen değişimlerin hastalık semptomlarının ortaya çıkışını teşvik ettiği rapor edilmiştir (Desprez-Loustau ve diğ. 2006). Genel olarak bu fırsatçı patojen bitkilerin gövde, dal, ibre, çiçek, kozalak ya da tohumlarını enfekte ettikten sonra bu dokular içerisinde uzun yıllar belirti göstermeden bekleyerek konukçusunun strese girmesiyle belirtileri ortaya çıkmaktadır (Bihon ve diğ. 2011; Bikzad 2022). Bu fungus ile bulaşık ağaçlarda ilk aşamada tepede deformasyonlar oluşmaya başlarken, uzun yıllar süren enfeksiyonlarda ağaçlar zayıf düşmekte ve herhangi bir stres faktörüne maruz kaldıklarında bu ağaçlar tek bir vejetasyon döneminde hayati fonksiyonlarını kaybetmektedirler (Blumenstein ve diğ. 2020; Capretti ve diğ. 2013; Bikzad 2022).

Abies spp.'deki ana semptomlar, yaz aylarında kırmızımsı kahverengiye dönüşen ten rengi ile sarı renkli şeritler veya benekleri içerir. Tüm ibreler nekrotik ve apsisli hale gelebilir (Talgø ve diğ. 2010). Benzer semptomlar *Pinus* spp.'de Pan ve diğ. (2018), tarafından *P. yunnanensis* üzerinde bildirilmiştir. Çam ibrelerinde klorotik ve kırmızımsı kahverengi lezyonlara neden olduğu, sağlıklı ibreler arasında rastgele dağılım gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca Tinivella ve diğ. (2014), tarafından yapılan çalışmada *P. halepensis*'de yoğun yaprak sararması ve kavrulmalar rapor edilmiştir.

S. polyspora, mevsimsel ibre nekrozu ile ilişkilidir, ayrıca *S. polyspora* semptomlarının ortaya çıkması birkaç biyotik ve abiyotik faktöre bağlı olduğu bildirilmiştir (Talgø ve diğ. 2010). *S. polyspora*, Avrupa ve Kuzey Amerika'da kozalaklı ağaç türlerinde, özellikle *Pinus* spp. ve *Abies* spp. üzerinde mevsimsel ibre nekrozu ile sıklıkla ilişkili olmakta ve tüm ibrelerde nekrozlara neden olmaktadır (Talgø ve diğ. 2010). Bu fungus Güneybatı Çin'de *P. yunnanensis*'te ibreler üzerinde klorotik ve kırmızımsı kahverengi renkli lezyonlara neden olmaktadır, aksi takdirde sağlıklı ibreler arasında rastgele dağıldığı gözlemlenmiştir (Silva ve diğ. 2020). Ayrıca İtalya'da da *P. halepensis*'de yoğun yaprak sararmaları gözlemlenmiştir (Tinivella ve diğ. 2014). Portekiz'de bu fungusun farklı yaşlardaki *P. pinea* meşcerelerinde özellikle ağaçların üst aksamalarında sürgün ölümlerine neden olduğu, ibrelerde ise krem-sarı lezyonlara sebep olduğu bildirilmiştir (Silva ve diğ. 2020).

Mevsimsel ibre nekrozu, 25 yıldan fazla bir süredir Avrupa ve Kuzey Amerika'da *Abies* spp. ağaçlarının dallarında ciddi bir renk bozukluğuna neden olmuştur. Semptomlar her iki kıtada *Abies procera* Rehd. *A. nordmanniana* ve *A. grandis* bireylerinde gözlemlenmiştir. Ayrıca tomurcuk kırılmasından yaklaşık 2-4 hafta sonra, ibrelerde nekrotik hale gelen klorotik lekeler ve bantlar geliştirmektedir (Talgø ve diğ. 2010).

2.5. *Pinus brutia* hakkında Genel Bilgiler

Ülkemizdeki doğal ormanlar ağaç türleri bakımından; iğne yapraklılar, geniş yapraklılar ve bunların karışımı şeklinde oluşmaktadır. Orman ekosistemi içerisinde beslenen, zamanla populasyon yükselmesine bağlı olarak zararlı durumuna geçen birçok fitofag böcek, fungus ve organizmayı bünyesinde bulundurmaktadır (OGM 2021). Türkiye 2020 yılı verilerine göre ormanlık alanlar, ülke alanının %29,4'ünü kaplamaktadır. *P. brutia* yaklaşık 5,2 milyon hektar alanı kaplayarak Türkiye'de en yaygın dağılışı bulunan iğne yapraklı tür olduğu bilinmektedir (OGM 2021). Bu ağacın doğal dağılımı, Batı Anadolu ve Orta Karadeniz Bölgelerinde de bulunmasına rağmen, Türkiye'nin Akdeniz ve Ege Bölgelerinin kıyı bölgelerindedir (Şekil 2.1) (Arbez 1974). Bu çam, Türkiye'nin güneyi ve batısında ağaçlandırmada kullanılan ana türlerden biridir. *P. brutia* rejenerasyonunun kolaylığı ve başarısı nedeniyle uzun yıllardır yönetim faaliyetlerinde yürütülmektedir. Bu nedenle *P. brutia*, Türkiye'de ormancılık ve ıslah programları için tercih edilen önemli bir türdür (Koski ve Antola

1993). Kızılcımın endüstriyel ağaçlandırmalar da dahil olmak üzere ağaçlandırmadaki önemi göz önüne alındığında, *P. brutia*'nın patojenlere karşı duyarlılığı hakkında bilgi, hastalıklar için uygun yönetim ve kontrol seçeneklerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir.



Şekil 2.1. *Pinus brutia*'nın Türkiye'deki yayılış alanları (OGM 2015)

Kızılcım Türkiye'de 1500 metreye kadar yayılış gösteren asli orman ağacıdır. 25 m boy ve 60 cm'e kadar çap yapabilen genç yaşlarda piramit görümlü, ilerleyen yaşlarda ise daha geniş tepe çapına sahiptir. Kabuk genç bireylerde düzgün boz renkte iken yaşlılarda derin yarıklar meydana getirmektedir, esmer kırmızımsı renkte ve kalın kabuk durumunda görülür. Kızılcım ismini ise bu morfolojik görünümünden almaktadır (OGM 2009).

Akdeniz ikliminin önemli türlerinden biri olan Kızılcım sıcaklık isteği fazla olan tipik bir ışık ağacıdır. Kışları ılıman, yazları sıcak ve kurak olan yerlerde toprak bakımından zayıf, kayalık, kireçli ya da kumsal yerlerde yetiştiği gibi elverişli iklim ve balçıklı topraklarda kaliteli gövdeye sahip olmakta ve çok derine giden kazık kök yapmaktadır. Ülkemizde doğal olarak yetişen ve en hızlı büyüyen asli ağaç türüdür. Yetiştirildiği bölgeler bakımından kar kırması ve devirmesi seyrek görülmektedir, sıg topraklarda fırtına zararı ve donlara karşı hassas bir yapıya sahiptir ayrıca rüzgar bu türün gövde ve tepe şekillenmesinde önemli rol oynamaktadır (OGM 2009).

3. LİTERATÜR ÖZETİ

EO ve diğ. (2022), Seorak Dağı'nda bulunan *Abies nephrolepis* Maxim., *Pinus pumila* Regel., *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. var. *nana* ve *Thuja koraiensis* Nakai. türlerinin endofit fungus varlığını araştırdıkları çalışmada toplam 108 endofitik fungus izole etmişlerdir. Bu funguslardan 35 endofitik fungus *A. nephrolepis*'ten 4 izolat, *P. pumila*'dan 11 izolat, *T. cuspidata* var. *nana* ve *T. koraiensis*'ten 12 izolat elde edilmiştir. Çalışmada elde edilen taksonlar; Agaricomycetes (%3,2), Dothideomycetes (%29,0), Leotiomycetes (%15,0), Sordariomycetes (%41,9) ve Orbiliomycetes (%1,6) Exobasidiomycetes (%3,1) olmak üzere 6 sınıfa ayrılmıştır. Çalışmadan elde edilen en yaygın fungus türleri *P. pumila*'da *S. polyspora* (%22,7) ve *Xylariaceae* spp. (%22,7), *T. cuspidata* var. *nana*'da *Phomopsis juglandina* Sacc. (%16,1) ve *T. koraiensis*'te *Thuja-endophytes* spp. (%70,0) olarak tespit edilmiştir. Tüm konukçu bitkilerden ortak bir endofitik fungus izole edilmemiştir, fakat *S. polyspora* üç kozalaklı ağaç türünde de yaygın olarak tespit edilmiştir. Her konukçu bitkiden izole edilen endofitik fungusların tür çeşitlilik indekslerinin karşılaştırılması sonucunda, endofitik fungusların tür çeşitlilik indeksi (H') *A. nephrolepis*'te 1,39, *P. pumila*'da 2,15, *T. cuspidata* var. *nana* ve *T. koraiensis* 'te 1,32 olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, konukçu bitkiler aynı bölgede olsa bile, farklı konukçu bitkiler arasında farklı endofitik fungus toplulukları olduğunu göstermiştir.

Steel ve diğ. (2022), düşük ve yüksek istila yoğunluklarında bulunan *P. menziesii* ve *Pinus contorta* Dougl. ibrelerinden yaprak funguslarını kültürlemişlerdir. Elde ettikleri fungusları Sanger sekanslaması kullanılarak sekanslamışlardır. Fungusları, *P. contorta* ibrelerinden daha büyük oranda *P. menziesii*'den izole etmişlerdir. *P. menziesii* ve *P. contorta* arasında veya düşük ve yüksek yoğunluklu istilalar arasında patojen zenginliğinde bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bununla birlikte, yüksek yoğunlukta düşük yoğunluktan daha fazla potansiyel olarak patojenik olan fungusların daha büyük bir oranı gözlemlenmiştir. Çalışmada, ana ve yaygın bir patojen (*Nothophaeocryptopus gaeumannii* T. Rohde) ve bir dizi fırsatçı potansiyel patojen (örn. *S. polyspora*, *L. pinastri* ve *Alternaria alternata*) belirlenmiş ve ticari meşcerelere bu fungusların yayılma olasılığına dikkat çekilmiştir.

Çakar ve diğ. (2022), Bolu yakınlarındaki Aladağ Yaylaları'nda bulunan *A. nordmanniana* subsp. *equi-trojani* ağaçlarında yaptıkları çalışmada şiddetli mevsimsel ibre nekrozu semptomları bildirmişlerdir. Araştırma yapılan 1000 hektarlık alanda 300 bitkinin %60'ında semptomlar olduğu tespit edilmiştir. Semptomatik ibrelerden izole ettikleri fungusların on gün içinde 45-75 mm çapında kahverengi ile koyu yeşil koloniler geliştirdiğini ve acervuli'den çıkan konidioforlar dikdörtgen şeklinde olduğunu bildirmişlerdir. Konidyumlar hiyalin, tek hücreli, septasız, çok guttat, çoğunlukla elips şeklinde ve 6,8 (4,2 ila 10,7) x 2,8 (2,4 ila 4,25) µm ölçülerinde rapor edilmiştir. Referans izolat ribozomal DNA'sının analizi için aralayıcı (ITS) bölgesi, ITS1F/ITS4 primerleri kullanılarak amplifiye edilmiş ve sekanslanmıştır. Dizinin BLAST araştırması, *S. polyspora* izolatu ile %100 nükleotid özdeşliği göstermiştir. Tüm bitkiler, 18 saatlik bir ışık fotoperiyodu ile 20 °C'de tutulmuştur. Toplam 18 gün sonra, aşılana tüm dokularda mevcut mevsime özgü tipik ibre nekrozu semptomları ve floem bölgelerinde nekroz gözlenmiştir. Patojen semptomatik dokulardan yeniden izole edilmiştir. Bu çalışma, Türkiye'de *S. polyspora*'nın neden olduğu *A. nordmanniana*'da mevsimsel ibre nekrozunun ilk raporudur.

Silva ve diğ. (2020), Portekiz'deki *P. pinea* meşcerelerinde sürgünlerde geriye doğru ölüm görülen, sürgün ölümleri bulunan ve ten rengi ile sarı renkli lezyonlara sahip ibreler bulunduran ağaçlardan örneklemeler gerçekleştirmişlerdir. Örneklenen izolatlardan krem renkli spor kütleleri ile kaplı fungus kolonileri elde edilmiştir. ITS rDNA bölgesinin morfolojik ve filogenetik analizleri, bu izolatların *S. polyspora* olarak tanımlanmasını sağlamıştır. Patojenisite testleri, fungusun kesilmiş *P. pinea* sürgünlerinde lezyonlara neden olduğunu göstermiştir. Gözlenen belirtilerin çam fıstığı üretimi üzerinde olumsuz etkilere neden olabileceğini ve bu hastalığın etkisinin değerlendirilmesinin gelecekteki araştırmalar için önemini belirtmişlerdir. Bu çalışma *P. pinea*'da hastalığa neden olan *S. polyspora*'yı bildiren ilk çalışmadır.

Cleary ve diğ. (2019), Avrupa ve Kuzey Amerika'da elde edilen birkaç *Pinus* türünün (Portekiz'den *P. pinaster*, *P. radiata*, *P. strobus*, *P. sylvestris*, *P. mugo* ve Türkiye'den *P. pinea* dahil olmak üzere) asemptomatik tohumlarında *S. polyspora*

tespit etmiştir. Bu bulgular, yayılma yollarının ve fungus ile konakçıları arasındaki etkileşimlerin daha iyi anlaşılması gerektiğini vurgulamaktadır.

Ridout ve diğ. (2018), Idaho'nun kuzeyindeki karışık meşcerelerde yaptıkları çalışmada *P. ponderosa* ağaçlarının ibrelerinden elde edilen funguslar arasında *S. polyspora* türünü en yaygın fungus olarak tespit etmişlerdir. Çalışmada, *P. ponderosa*'nın yaprak mikrobiyomunda yaygın olan bir endofitik fungusun, ortaya çıkışı geciktiren kriptomatik bir patojen gibi davrandığı görülmüştür. Bir dizi deneyde, *P. ponderosa* tohumları ekimden 12 saat önce bir *S. polyspora* süspansiyonu ile inokule edilmiştir. *S. polyspora*, konukçusu *P. ponderosa*'nın tohum çıkışını %30'a varan oranlarda azaltmıştır. Ayrıca, tetrazolyum klorür ile yapılan canlılık testleri *S. polyspora*'nın çimlenmeyi önleyerek çıkışı azalttığını göstermiştir.

Pan ve diğ. (2018), Güneybatı Çin'de ki çalışmalarında *P. yunnanensis*'i istila eden *Tomicus minor* Hartig. ve *Tomicus yunnanensis* Kirkendall & Faccoli.'in gövdelerinden ve galerilerinden toplanan 14 izolat, ITS sekans verileri ve morfolojik özelliklerine bakılarak *S. polyspora* olarak tanımlanmıştır. *S. polyspora*'nın *P. yunnanensis*'e karşı virülensini değerlendirmek için, fungus *P. yunnanensis*'in gövdelerine ve ibrelerine aşılansız patojenisite testleri yapılmıştır. Sonuçlar, 30 günün sonunda *S. polyspora* ile aşılansızdan sonra floemdeki lezyon uzunluklarının, kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha uzun olduğunu göstermiştir. Ayrıca fungus, aşılansızdan 14 gün sonra ibrelerde kısmen belirgin bir renk değişikliğine neden olmuştur. *S. polyspora*'nın *P. yunnanensis*'in kök floemini ve çam ibrelerini kolonize edebildiğini ve bu nedenle kabuk böcekleri ile yayıldıktan sonra bu konukçuya ikincil zararlar verebileceğini göstermiştir. Bu bulgu *S. polyspora*'nın kabuk böcekleri ile bir ilişkisi olduğunu, ancak spesifik olarak türlerle ilgili olmadığını göstermektedir. Çalışma, bu fungusun *P. yunnanensis*'in ibrelerini ve gövdelerini kolonize edebildiğini ve patojenik olduğunu doğrulanmıştır. *S. polyspora*'nın potansiyel olarak kotiledon nekrozuna yol açabileceği tespit edilerek konukçu direnci, patojen genotipi, inokulum verimliliği ve çevresel faktörler ile ilişkilendirilmektedir.

Muñoz-Adalia ve diğ. (2017), İspanya'nın Kuzeyi'ndeki Cantabria Bölgesindeki *Pinus radiata* D. Don. meşcerelerinde gerçekleştirdikleri çalışmada iki *Tomicus* türü

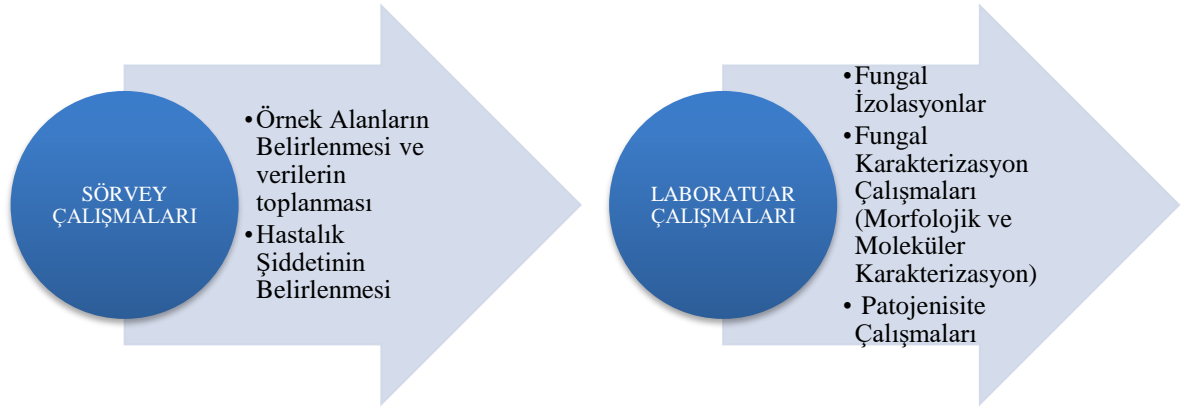
(*Tomicus piniperda* ve *Tomicus destruens* Woll.) tarafından taşınan mikobiyota taksonların morfolojik ve moleküler tanımlanmasını gerçekleştirmişlerdir. Yapılan bir dizi analiz sonucunda düşük düzgünlük ile orta düzeyde bir fungus çeşitliliği elde edilmiştir. Çalışmada, *S. polyspora* önemli ölçüde tespit edilmiş ve topluluğa hakim tür olduğu gözlemlenmiştir. Her iki böcek türü de (*T. piniperda* ve *T. destruens*), *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell. tarafından enfekte edilen *P. radiata* meşcerelerinden toplanmıştır. Topluluk ekolojisini yönlendirebilecek ekolojik faktörler ve funguslar ile kabuk böcekleri arasındaki foretik bağlantılar araştırılmıştır.

Prihatini ve diğ. (2015), Tazmanya meşcerelerindeki *P. radiata* bireylerinde yaptıkları çalışmada ibre fungusları çeşitliliklerini keşfetmek için kapsamlı bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışma, bahar ibresi dökümünün (Spring Needle Cast, SNC) genel olarak gözlemlendiği yaştan önceki bir yaşta çam ibrelerindeki fungus topluluklarının bileşimi üzerindeki yağış, yükseklik ve sıcaklık ile tanımlanan ortamın etkisini incelemek için yapılmıştır. Bu amaçla, Tazmanya'daki 12 farklı plantasyondan bahar dökümünden önce 5 yaşındaki *P. radiata* ağaçlarından ibre örnekleri toplanmıştır. Yağış ve sıcaklık için mevsimsel bileşenler de dahil olmak üzere iklim değişkenleri için enterpolasyonlu veriler gelişmiş bir iklim veri bankasından elde edilmiştir. Toplanan ibre örnekleri, klonlanmış polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ürünlerinin DNA dizilimi kullanılarak içerdikleri funguslar bakımında araştırılmıştır. Klonlar operasyonel taksonomik birimler (Operational Taxonomic Units, OTU'lar) halinde gruplanmış ve referans izolatlar ve halka açık DNA veritabanları ile karşılaştırılarak mümkün olan en düşük taksonomik seviyelerine göre tanımlanmıştır. DNA dizilimi, ibre fungusu topluluklarının, toplam yıllık yağış ve ibre yaşına bağlı olarak büyük farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. *Cyclaneusma minus* Butin, *Dothistroma septosporum* Dorog, *Lophodermium pinastri* Schrad, *Strasseria geniculata* Berk. & Br. ve *S. polyspora* gibi daha önce patojenik davranışla ilişkilendirilen ibre funguslarının tümünün ibrelerde bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca, DNA dizileri ile ayırt edilen 70 Ascomycetous OTU'dan 21'inin Teratosphaeriaceae'ye ait olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar, *P. radiata*'nın ibrelerinde bulunan endofitik funguslara genel bir bakış sağlamıştır. Teratosphaeriaceae'ye ait bir dizi tanımlanamayan OTU'ya ek olarak, ibre dökümü hastalıkları için bilinen tüm patojenik türlerin önceden ibrede mevcut olduğu tespit edilmiştir.

Talgø ve diğ. (2010), Norveç'te yaptıkları bir çalışmada mevsimsel ibre nekrozu semptomları olan ibrelerin *S. polyspora* ile ilişkili olup olmadığını belirlemek için Avusturya, Danimarka, Almanya, Norveç ve ABD'den toplanan semptomatik ibrelerden izolasyonlar yapmışlardır. Tomurcuk kırılmasından yaklaşık 2-4 hafta sonrasında, ibreler nekrotik hale gelen klorotik lekeler ve bantlar geliştirmiştir. Semptomlar her iki kıtada asil göknar (*A. procera*), Kazdağı göknarı (*A. nordmanniana*) ve büyük sahil göknarı (*A. grandis*) üzerinde gözlenmiştir. Mevsimsel ibre nekrozu ABD, Danimarka ve İrlanda'dan etiyojisi bilinmeyen fizyolojik bir bozukluk olarak rapor edilmiş, ancak Almanya, Avusturya ve Norveç'te *K. abietis* fungusu ile ilişkilendirilmiştir. Avusturya, Danimarka, Almanya, Norveç ve ABD'de ki *A. nordmanniana* meşcerelerinden 2007 yılında toplanan semptomatik ibre örnekleri morfolojik olarak incelenmiş ve *K. Abietis*'e benzeyen bir fungus izole edilmiştir. Bu kültürlerin ribozomal DNA'sının dahili kopyalanmış aralayıcı (ITS) bölgesinin ve ayrıca Almanya'dan bir *K. abietis* referans kültürünün sekanslanması, *S. polyspora*'nın imperfekti olan *H. dematioides* ile sonuçlanmıştır ve bu nedenle taksonomisi daha fazla tartışılmıştır. *A. nordmanniana* fideleri ve beş ülkenin tamamından *S. polyspora* izolatları ile yapılan aşılama testleri, mevsimsel ibre nekrozu semptomlarının gelişmesiyle sonuçlanmıştır. Ayrıca, 2009 yılında *S. polyspora*, Slovakya'da toplanan *A. nordmanniana*'nın semptomatik ibrelerinden de izole edilmiştir (Talgø ve diğ. 2010).

4. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu proje çalışmasına ait araştırmalar, aşağıda verilen temel aşamalar çerçevesinde gerçekteşirilmifitir. Bu aşamaların gerçekteştirilmesinde izlenen adımlar, kullanılan materyal ve yöntem ilgili bölümlerde (şekil 4.1.) açıklanmıştır.



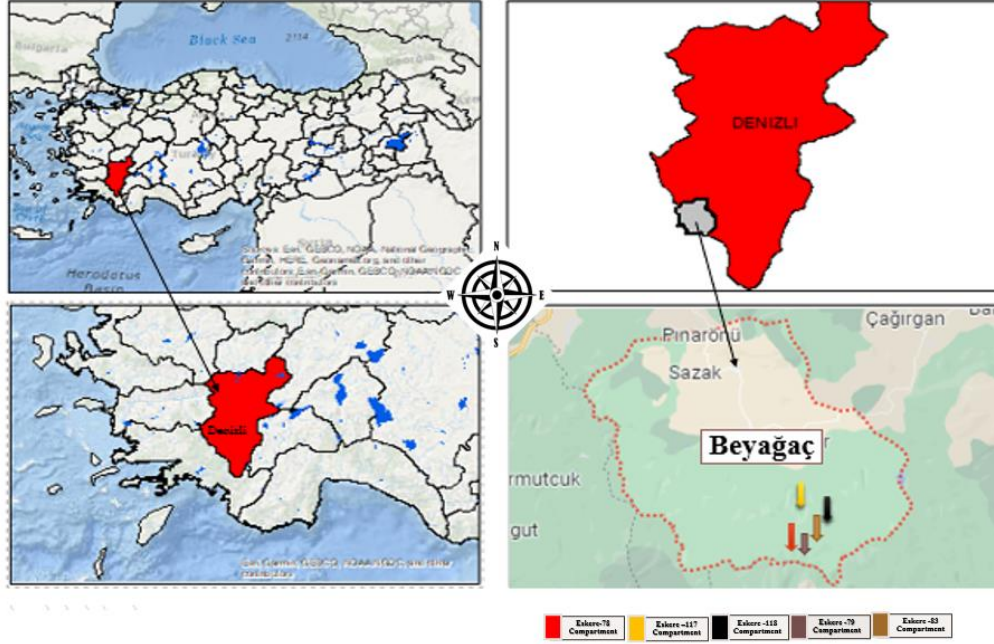
şekil 4.1. Araştırma Aşamaları

4.1. Materyal

Araştırmanın ana materyalini 5 farklı meşcerede bulunan kızılçam bireyleri ve bu ağaçlarda mevsimsel ibre nekrozuna neden olan fungal etmen oluşturmaktadır.

4.1.1. Araştırma alanı

Sörveylerin gerçekteştirildiği kızılçam meşcereleri, Denizli ili Beyağaç ilçesi mülki sınırları (şekil 4.2) içerisinde yer almaktadır.



Şekil 4.2. Araştırma alanı yer bulduru haritası

Araştırma alanları idari olarak Denizli Orman Bölge Müdürlüğü, Eskere Orman İşletme Müdürlüğü, Eskere Orman İşletme Şefliği ve Eşenler Orman İşletme Şefliği sınırları içinde yer almaktadır.

4.1.2. Sörvey çalışmaları

Sörvey çalışmaları 2022 yılının Haziran-Ağustos aylarında yürütülmüştür. Sörvey çalışmalarında izlenen adımlar ilgili bölümlerde açıklanmıştır.

4.1.2.1. Örnek Alanların Belirlenmesi

Araştırma alanında sürgünlerde geriye doğru ölüm, sürgün ölümleri ve lezyonlu ibreler gösteren semptomatik ağaçların bulunduğu 5 farklı kızılçam meşceresi tespit edilerek örnek alanlar belirlenmiştir.

4.1.2.2. Verilerin toplanması ve örnekleme

Meşcere ölçümleri ve örnekleme, 20 m uzunluğunda ve 20 m genişliğindeki transekt çizgi üzerinde yapılmıştır. Eşyükselti eğrilerine paralel olarak, 20 m uzunluğundaki şerit metre hastalık ocaklarındaki bireyleri içine alacak şekilde bir başlangıç noktası belirlenerek alana sabitlenmiştir (Ranta ve Saloniemi 2005; Oskay 2014; Aday Kaya ve diğ. 2019). Örnek alanlarda bulunan meşcerelerin konukçu

özellikleri (yaş, çap, boy), aktüel meşcere tipi ve hastalık şiddeti verileri (Tablo 4.1) arazi karnesine not edilmiştir. Örnek alanlarda bulunan kızılçam bireylerinden izolasyon için toplanan nekrozlu ibre ve sürgünler örneğin alındığı örnek alan numarası, örnek numarası ve örnekleme tarihinin yazıldığı etiketlerle birlikte kese kağıtları içerisinde uygun koşullarda saklanarak laboratuvara getirilmiştir. Örnekler incelemeye alınana kadar $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 4. 1. Örnek alanlarda bulunan *Pinus brutia* meşcerelerine ait veriler

Örnek alan no	Şeflik ve bölme no	Meşcere yaşı	Aktüel meşcere tipi	Toplam ağaç sayısı (20x20 m)	Belirti gösteren ağaç sayısı	Ort. Çap (cm)	Ort. Boy (m)	Koordinat
1	Eskere-78	15-20	Çza3	52	27	7,7±2,5	3,08±2,0	37.20787724°K 28.91676023°D
2	Eşenler-117	30-40	Çzb3	33	14	23,7±12,1	8,1±6,3	37.17944115°K 28.99843533°D
3	Eşenler-118	15-20	Çza0	22	13	12,3±4,5	5,6±3,7	37.17396085°K 28.99311831°D
4	Eskere-79	15-20	Çza3	49	23	8,6±2,4	4,0±1,5	37.21075263°K 28.92152289°D
5	Eskere-83	15-20	Çza0	25	16	15,3±3,5	7,6±3,3	37.21487916°K 28.93175065°D

4.1.2.3. Örnek alanlarda hastalık şiddetinin belirlenmesi

Hastalık etmeninin neden olduğu hastalık şiddetini belirlemek amacıyla her örnek alanda 1 ile 5 arasında bulunan hastalık şiddeti skorlaması (Tablo 4.2) gerçekleştirilmiş ve arazi karnesine kayıt edilmiştir. Hastalık şiddeti Townsend Heuberger formülü (Townsend-Heuberger 1943; Aday Kaya ve diğ. 2019) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Hastalık şiddeti (\%)} = [\Sigma(n.V)/Z.N] \times 100$$

n = farklı hastalık skalasında bulunan örnek sayısı

V = skala değeri,

Z = en büyük skala değeri,

N = toplam örnek sayısı

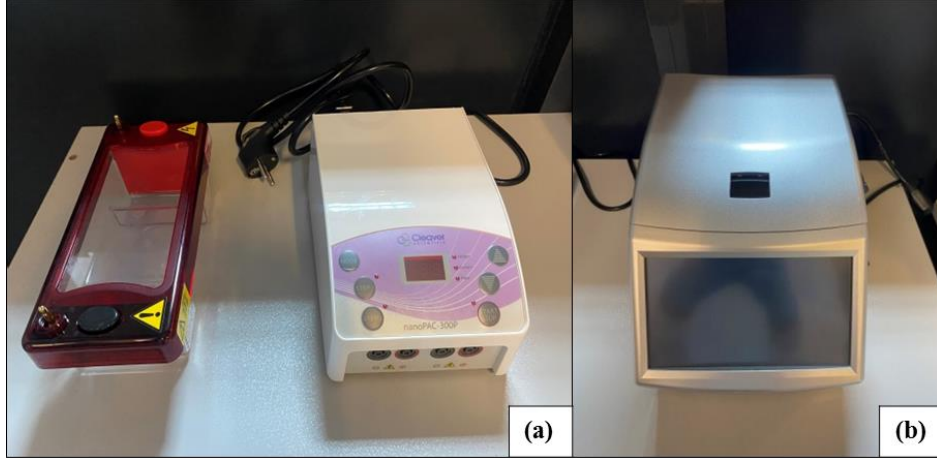
Tablo 4. 2. *P. brutia* meşcerelerinde kullanılan hastalık şiddeti skorlaması

Skor	Zarar sınıfı	Semptomlar
1	Hasar yok	-
2	Hafif hasar	≤ beş ana dalda gelişmiş yaprak dökümü
3	Orta hasar	Birkaç (≥beş) ana dal veya bir bütün taç, dal grupları ciddi şekilde zarar görmüş
4	Ciddi hasar	Ana dalların çoğu ciddi şekilde hasar görmüş
5	Ölü	-

4.2. Yöntem

4.2.1. Laboratuvar çalışmaları

Bu araştırmanın laboratuvar çalışmaları, Pamukkale Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fungal Biyoteknoloji Laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmada ağaç dokularında fungal konidi oluşumlarını gözlemek için stereo mikroskop, spor yapılarını gözlemek için ışık mikroskobu (Olympus, CX21), besi ortamlarının hazırlanmasında kullanılan sterilizasyon aletleri; etüv (Wiseven, Fuzzy Control System), otoklav (Nüve, NC 40M), terazi (Precisa, XB 220A ve Mettler Toledo, PB 602-L) ve aseptik koşullarda çalışma imkanı sağlayan mikrobiyolojik güvenlik kabini (Nüve, Class II, MN 120) kullanılmıştır. Laboratuvarında, fungusların istenilen sıcaklıklarda geliştirilmesi ve saklanması için inkubatörler ve buzdolapları da mevcuttur. Moleküler karakterizasyon işlemleri çeker ocak, PCR cihazı (Kyratech.) (Şekil 4.3b), Jel elektroforezi (Clever scientific nanoPAC-300P) (Şekil 4.3a), Jel Görüntüleme Cihazı (Clever scientific, gelLite), Microplate reader (Epoch, Biotek.), santrifüj (Alfagen, 15K), vorteks (Dragon Lab, MX-F), su banyosu (Nükleon Laboratory Equipment) gibi alet ve ekipmanlarla gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.3. Moleküler çalışmalarda kullanılan cihazlar; (a) Elektroforez, (b) PCR cihazı

4.2.1.1. Fungal İzolasyonlar

İzolasyon, fungusun tanısı için gerekli bir aşama olup, izolasyonlar sonucunda elde edilen izolatlar (funguslara ait saf koloniler), morfolojik ve moleküler teşhis çalışmalarında kullanılmaktadır. Fungal izolasyonlarda besi ortamı olarak %2'lik Patates Dekstroz Agar (PDA; Merck, Almanya) kullanılmıştır. Hazırlanan besi ortamları otoklavda 121 °C'de 20 dakika steril edildikten sonra, antibakteriyel madde olarak 0,5 mg/ml streptomisin sülfat eklenerek 9 mm çapındaki petri kaplarına dökülmüştür.

Makroskobik ve mikroskobik incelemeler sonrasında, her bir ağaçtan örneklenen semptomatik ibreler ve sürgünler yüzey sterilizasyonu işlemine tabi tutulmuşlardır. Yüzey sterilizasyonu için çeşme suyu ile yıkanan ibreler 2 dk. %70'lik ethanolde, 5 dk. %4'lük NaOCl'de, 30 sn. %70'lik ethanol'de, 1 dk steril su ile muamele edilerek kurumaya bırakılmıştır. Sterilizasyon işleminden sonra ibrelerde görülen lezyonlu kısımlar güvenlik kabini içerisinde küçük parçalara ayrılarak 0,5 mg/ml streptomisin sülfat içeren %2'lik PDA besi ortamına yerleştirilmiştir. Kültürler 7 gün boyunca $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ayarlı inkubatörde inkube edilmiştir. Bitki dokularında gelişen hifler tekrar PDA besi ortamına aktarılarak saflaştırılmış ve elde edilen tek spor kültürler $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de inkube edilmiştir (Silva ve diğ. 2020).

Ayrıca ibre ve sürgünler üzerinde üreme yapıları bulunması durumunda stereomikroskop altında iğne yardımıyla alınan sporlar yine 0,5 mg/ml streptomisin

sülfat içeren %2'lik PDA besi ortamına yerleştirilmiştir ve kültürler 7 gün boyunca $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ayarlı inkubatörde inkube edilmiştir.

4.2.1.2. Fungal Teşhis çalışmaları

4.2.1.2.1. Morfolojik karakterizasyon çalışmaları

Geleneksel yöntemlerle teşhiste fungusların morfolojik özellikleri esas alınmaktadır. Fungusun, makroskopik ve mikroskopik özellikleri esas alınarak teşhisi, konuyla ilişkili çeşitli kaynaklardan yararlanılarak gerçekleştirilmiştir (Ryvarden 1978; Bernicchia 2005). Fungus sporlarının makroskopik özellikleri kültür rengi ve şekli kullanılarak, mikroskopik özellikleri ise sporların rengi, şekli, çeperlerinin özellikleri ve spor büyüklükleri incelenerek belirlenmiştir. Fungal kültürere ait koloni ve konidial morfoloji yapıları fotoğraflanarak kayıt altına alınmıştır. Konidiler ışık mikroskobu altında incelenerek boyutları 100X'de Olympus DP-Soft programında ölçülmüştür. Elde edilen izolatlar Pamukkale Üniversitesi, Fungal Biyoteknoloji Laboratuvarında $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmaktadır.

4.2.1.2.2. Moleküler karakterizasyon çalışmaları

Genomik DNA izolasyonu

Morfolojik karakterizasyonları doğrulamak amacıyla moleküler karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen izolatlar DNA ekstraksiyonuna hazırlamak amacıyla üzerinde selofan membran bulunan PDA (%2) besi ortamında 24°C ' de ortalama 10 gün boyunca inkube edilmiştir. Bu sürenin sonunda besi ortamında gelişen miseller, selofan membran üzerinden dikkatli bir şekilde kazınarak, eppendorf tüpler içerisinde aktarılmış ve DNA izolasyonu yapılmaya kadar -20°C ' de muhafaza edilmiştir. Dondurularak kurutulan miseller, steril porselen havan içerisinde iyice ezilerek toz haline getirildikten sonra steril eppendorf tüpler içersine alınmıştır. Total genomik DNA, High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Almanya) kullanılarak, kit içerisinde bulunan protokole göre ekstrakte edilmiştir. İzole edilen DNA'lar yoğunluklarının ve saflıklarının belirlenmesi amacıyla Microplate reader kullanılarak ölçülmüştür. Yeterli konsantrasyon ve kaliteye sahip DNA'lar PCR amplifikasyonlarında kullanılmak üzere $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR amplifikasyonlarında rDNA'nın ITS gen bölgelerinin dizi bilgisi kullanılmıştır. ITS bölgesinin çoğaltılmasında ITS1-ITS4 primer çiftlerinden (Tablo 4.3) yararlanılmıştır (White ve diğ. 1990).

Tablo 4. 3. Çalışmada kullanılan primer çifti

Primer	Yön	Primer dizileri (5'-3')	Hedef gen bölgesi	Kaynak
ITS1	İleri	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS	White ve diğ. 1990
ITS4	Geri	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS	White ve diğ. 1990

PCR reaksiyonları Xpert Fast Hotstart Mastermix (Grisp, Portugal) ile gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları Tablo 4.4'te sunulmuştur.

Tablo 4. 4. PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları

Bileşen	Stok Kons. (25 µl)
Xpert Fast Hotstart Mastermix (2x)	12,5 µl
Forward primer (5 pmol/µl)	2 µl
Reverse Primer (5 pmol/µl)	2 µl
Template DNA	0,25-10 µl
PCR-grade water	25 µl'ye tamamlanır

Konvansiyonel PCR için kullanılan kit protokolü kullanılarak PCR cihazında protokol (Tablo 4.5) oluşturulmuştur. PCR için reaksiyon karışım işlemi tamamlandıktan sonra PCR tüpleri konvansiyonel PCR cihazının kuyucuklarına yerleştirilerek PCR protokolü uygulanmıştır.

Tablo 4. 5. PCR sıcaklık ve döngü koşulları

Safha	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95	3 dk	1
Denatürasyon	95	15 sn	40
Bağlanma	55	15 sn	
Uzama	72	15 sn	
Son uzama	72	3 dk	1

Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforez işlemi ile doğrulanması için %1'lik agaroz jel kullanılmıştır. Agaroz jel hazırlanırken 1 g agaroz (BIOMAX) tartılarak temiz bir erlen içerisine konulduktan sonra üzerine 100 mL 1x Tris Borate EDTA buffer (TBE) tamponu eklenmiştir. Daha sonra, agarozun TBE tamponu içerisinde homojen şekilde erimesi için mikrodalga fırında (600 Watt) polimer tamamen eriyinceye kadar kaynatılmıştır. Hazırlanan jel oda sıcaklığına geldikten sonra içine 3 µL Xpert Green DNA Stain (GRISP) eklenmiştir. Elektroforez tankında kullanılan tepsiye uygun bir tarak yerleştirildikten sonra, hazırlanan agaroz hava kabarcığı olmayacak şekilde dikkatli bir şekilde dökülmüştür. Dökülen jelin oda sıcaklığında donması sağlanmıştır. Jel donduktan sonra tepsi kenarındaki silikonlar dikkatli bir şekilde çıkarılmış ve tank içerisine yerleştirilmiştir. Ardından, daha önceden hazırlanan 1x TBE tamponu agaroz jel yüzeyinin üzerini kaplayacak şekilde ilave edildikten sonra tarak dikkatli bir şekilde jelden çıkarılmıştır.

Elde edilen PCR ürünleri için, jeldeki her bir kuyucuğa 5 µL DNA, 1 µL GRS DNA Loading dye karıştırılarak yüklenmiştir. DNA'nın boyutlandırmasını yapabilmek amacıyla belirteç olarak 100 bp'lık GRS DNA Ladder (GRISP) kullanılmıştır. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra güç kaynağına bağlanan elektroforez tankına 120 V güç uygulanarak, agaroz jele yüklenen örnekler 45 dakika boyunca karanlıkta yürütülmüştür. Süre sonunda agaroz jel görüntüleme sistemine dikkatli bir şekilde taşınmıştır. Jel görüntüleme sisteminde elektroforez işlemi süresince yürümüş olan DNA ladder ve karşılık gelen PCR ürün bantları karşılaştırılarak doğrulama yapılmıştır.

DNA dizileme çalışmaları ve tür tayini

PCR ürünlerinin dizileme işlemleri ticari bir firma aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA dizileri düzenleme işlemlerinin ardından NCBI (National Center for Biotechnology Information) Gen Bankasında (NCBI veri tabanı) yer alan diğer dizilerle nucleotide BLAST algoritması kullanılarak karşılaştırılmıştır.

4.2.1.3. Patojenisite çalışmaları

S. polyspora izolatlarının patojenisitesinin belirlenmesi amacıyla inokulasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Denemede kullanılan fidanlar

Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen patojenisite denemesinde Denizli Karahasanlı Orman Fidanlığı'ndan temin edilen 2 yaşlı, tüplü, 30 adet *P. brutia* fidanı kullanılmıştır. Kullanılan fidanların ortalama çapları 0,6 cm, ortalama boyları ise 28 cm olarak ölçülmüştür. Patojenisite çalışmalarında kullanılan izolatlar her örnek alan için PDA besi ortamındaki gelişme hızlarına göre seçilmiş ve inokulasyon yapılmıştır.

Denemede kullanılan fungal izolatlar

Denemede her bir örnek alandan 1 adet fungal izolat temsilen seçilerek toplam 5 izolat patojenisite çalışmalarında kullanılmıştır. Patojenisite çalışmalarında kullanılan izolatlar Tablo 4.6'da verilmiştir.

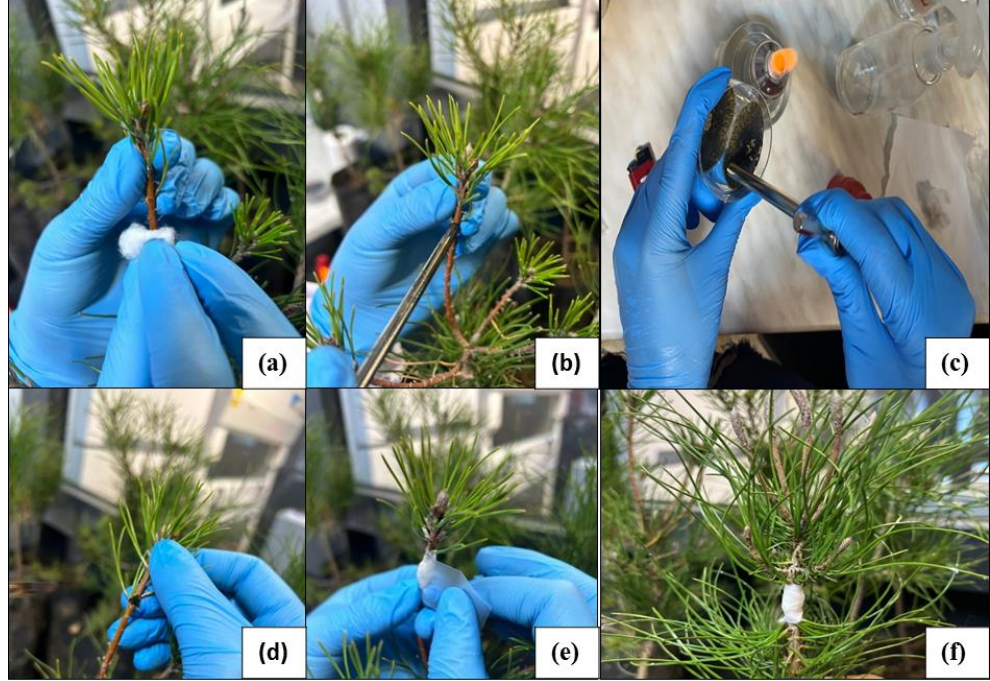
Tablo 4. 6. Patojenisite çalışmalarında kullanılan izolatlar

İzolat no				
Örnek alan 1	Örnek alan 2	Örnek alan 3	Örnek alan 4	Örnek alan 5
ES1CZ1	ES2CZ2	ES3CZ1	ES4CZ5	ES5CZ3

Patojenisite denemelerinin kurulması

S. polyspora inokulumlarının hazırlanması için izolatlar 2%'lik PDA besi ortamında yeniden kültüre alınarak 10 gün boyunca 25°C'de karanlıkta inkubatörde inkube edilmiştir. İn vivo denemelerde her bir izolat 5 tekerrürlü olacak şekilde *P. brutia* fidanlarının sürgünlerine aşılanmıştır. Denemede kullanılan deneme deseni; 1 konukçu tür x 5 fungal izolat x 5 tekerrür =25 + 5 (kontrol fidanı) şeklindedir. Toplamda 5 adet kontrol fidanı olmak üzere 30 adet fidan patojenisite çalışmalarında kullanılmıştır. Öncelikle sürgünler bir pamuk yardımıyla %70'lik etanol ile temizlenmiş (Şekil 4.4a), steril bir mantar delici ile floem tabakası uzaklaştırıldıktan sonra (Şekil 4.4b), açılan dairesel oyuğa *S. polyspora* ile bulaşık agar plakları (Şekil 4.4c, Şekil 4.4d) yerleştirilmiştir. Plaklar yerleştirildikten sonra steril pamuk

koyularak parafilm ile sıkıca sarılarak plağın sabitlenmesi (Şekil 4.4e) ve dış etkenlerden korunması sağlanmıştır. Her bir kontrol fidanının gövdesine ise fungus içermeyen steril agar plakları koyulmuş ve steril pamuk koyularak parafilm ile sarılmıştır (Şekil 4.4f). Çalışmada kullanılan odanın sıcaklığı 18-20 °C olarak ayarlanmış ve fidanlar gereksinimleri ölçüsünde sulanmıştır.



Şekil 4.4. Patojenisite çalışmasına ait aşamalar; (a) %70'lik ethanol ile inokule edilecek alanın temizlenmesi, (b) steril mantar delici ile sürgün üzerine yara açılması, (c) *S. polyspora* izolatından fungal plakların alınması, (d) fungal plakların bitkiye yerleştirilmesi, (e) inokule edilen alanın parafilm ile sarılması, (f) inokulasyon çalışması tamamlanmış *P. brutia* sürgünü.

4.2.2. İstatistiksel değerlendirme

Çalışmada elde edilen bulguların değerlendirilmesi MiniTab 16 istatistik programında gerçekleştirilmiştir. Öncelikle verilerin basit varyans analizi (Anova Testi) yapılmıştır. Anova testi sonucunda istatistiksel açıdan farklılığın ortaya çıkması durumunda, farklı grupların tespiti için Duncan testi kullanılmıştır.

5. BULGULAR

Sörvey çalışmaları 2022 yılının Haziran-Ağustos aylarında Denizli Eskere Orman İşletme Müdürlüğü sınırları içinde yer alan kızılçam meşcerelerinde yürütülmüştür. Araştırma alanında sürgün ölümleri, lezyonlu ibreler ve sürgünlerde geriye doğru ölüm gösteren semptomatik ağaçların (Şekil 5.1) bulunduğu 5 farklı meşcere tespit edilerek örnek alanlar belirlenmiştir. Meşcere ölçümleri ve örneklemeler 20 m uzunluğunda ve 20 m genişliğindeki transekt çizgi üzerinde yapılmıştır. Eşyüksekti eğrilerine paralel olarak, 20 m uzunluğundaki şerit metre hastalık ocaklarındaki bireyleri içine alacak şekilde bir başlangıç noktası belirlenerek alana sabitlenmiştir.



Şekil 5.1. Mevsimsel ibre nekrozu ve sürgün ölümü gösteren kızılçam bireyleri.

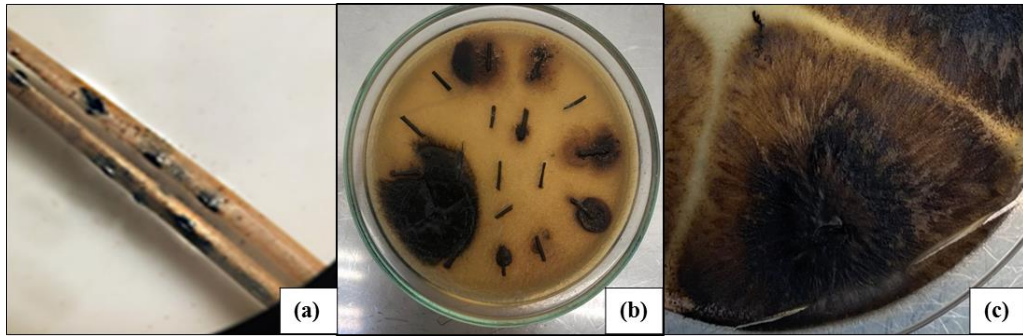
Beş örnek alanda olmak üzere toplam 156 kızılçam bireyinde hastalık şiddeti ölçümleri yapılmıştır. Arazide değerlendirilen 77 ağacın tümünde farklı seviyelerde mevsimsel ibre ve sürgün nekrozu tespit edilmiştir. Meşcerelerde ortalama hastalık şiddeti ve baskın hastalık şiddeti sınıfı toplanan veriler ile (Tablo 5.1) yapılan analizler sonucunda değerlendirilmiştir. Meşcerelerde ortalama hastalık şiddeti %38 ila %62 (ortalama = %47) arasında değişmiştir. Baskın hastalık şiddeti sınıfı orta seviye (skor =3) olarak belirlenmiştir.

Tablo 5. 1. Örnek alanlara ait hastalık şiddeti verileri

Örnek Alan No	Toplam Ağaç Sayısı (20x20 m)	Belirti Gösteren Ağaç Sayısı	Hastalık şiddeti (%)	Hastalık şiddeti sınıfı (1-5)
1	52	27	62	4
2	33	14	45	3
3	22	13	42	3
4	49	23	38	3
5	25	16	48	3

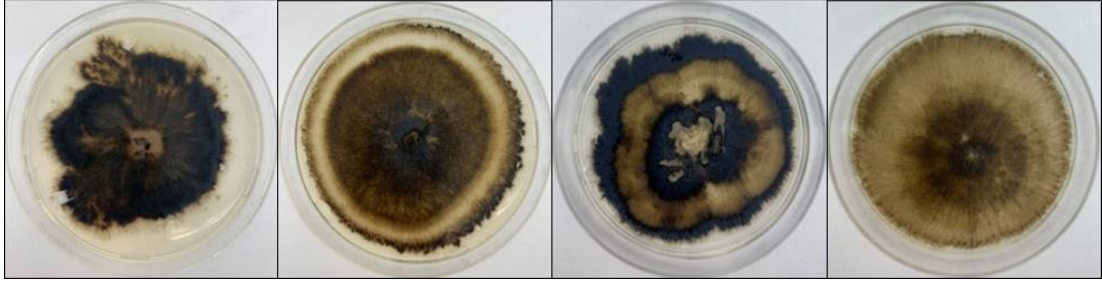
Fungusun mevsimsel ibre nekrozu ile ilişkili olduğu ve tüm ibrelerde nekrotik ve apsisli hale gelebildiği tespit edilmiştir. Semptomlu ibreler klorotik ve kırmızımsı kahverengi lezyonlar gösterirken bu ibreler sağlıklı ibreler arasında rastgele dağılım göstermektedir. Fungusun ağaçların taç kısmında geriye doğru ölümlere ve yoğun ibre dökülmesine sebep olduğu kanısına varılmıştır.

Çalışmada semptomlu ağaçlardan her biri farklı ağaçtan olmak üzere toplam 68 adet *S. polyspora* izolatu elde edilmiştir (Şekil 5.2). Elde edilen fungal izolatların teşhisi; geleneksel (klasik) yöntemlerle morfolojik özelliklerden faydalanılarak yapılmıştır.



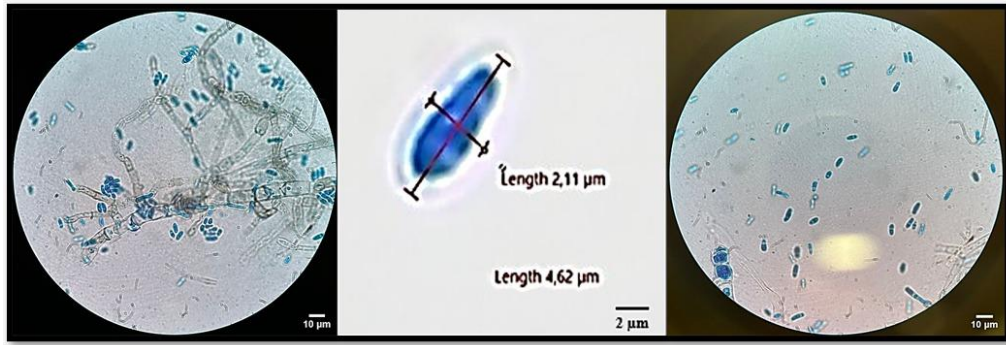
Şekil 5.2. Fungusun izolasyonu (a) Kızılcım bireylerinden toplanmış üreme yapısı bulunduran ibreler (b) *Sydowia polyspora*'nın ibrelerden izolasyonu (c) PDA besi ortamında saflaştırılmış *Sydowia polyspora* kolonisi.

Fungal izolatların makroskobik özellikleri; kolonilerin rengi, şekli ve yapısı (Şekil 5.3) kullanılarak belirlenmiştir.



Şekil 5.3. *Sydowia polyspora*'nın %2'lik PDA besi ortamında 20 °C'de karanlıkta inkübe edilmiş 4 farklı morfortipte 10 günlük koloni görüntüsü.

Fungal izolatların mikroskopik özellikleri ise sporların rengi, şekli, çeperlerinin özellikleri ve spor büyüklükleri (Şekil 5.4) incelenerek belirlenmiştir.



Şekil 5.4. *Sydowia polyspora*'nın ışık mikroskobu altında lactophenol cotton blue ile hazırlanmış hyaline konidiaları.

Elde edilen sonuçlara göre *S. polyspora* izolatının kolonilerinin tümü, başlangıçta %2 PDA besi ortamında beyaz kenarlı krem rengindedir daha sonra koyu kahverengi ile grimsi siyah renge dönmüştür. İzolatlar septat olmayan, elipsoid, hiyalin ve multigutulate sporlar bulundurmaktadır. Miselyum, bazen dallanan ve enteroblastik konidia üreten koniojen hücreler gibidir. Konidia, hiyalin, tek hücreli, septat olmayan, multigutat, esas olarak elipsoiddir ve 30 sporda ortalama 5,7 x 3,2 um olarak ölçülmüştür.

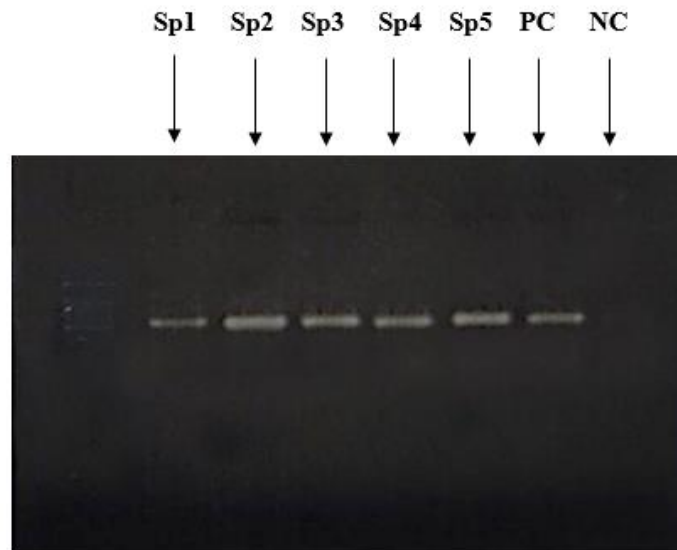
Morfolojik karakterizasyonları doğrulamak amacıyla her alandan bir tane olmak üzere 5 temsilci izolat DNA ekstraksiyonuna hazırlamak amacıyla üzerinde selofan membran bulunan MEA (%2) besi ortamında 24 °C' de ortalama 10 gün boyunca inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda besi ortamında gelişen miseller, selofan membran üzerinden dikkatli bir şekilde kazınarak, eppendorf tüpler içerisinde

aktarılmış ve DNA izolasyonu yapıncaya kadar -20 °C’ de muhafaza edilmiştir. Dondurularak kurutulan miseller, steril porselen havan içerisinde iyice ezilerek toz haline getirildikten sonra steril eppendorf tüpler içerisinde alınmıştır. Total genomik DNA, High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Almanya) kullanılarak, kit içerisinde bulunan protokole göre ekstrakte edilmiştir. İzole edilen DNA’lar yoğunluklarının ve saflıklarının (Tablo 5.2) belirlenmesi amacıyla microplate reader kullanılarak ölçülmüştür.

Tablo 5. 2. Total genomik DNA’ların saflık ve konsantrasyonları

ES1CZ1	1.73	260/280
	12.606	ng/μL
ES2CZ2	2.174	260/280
	14.741	ng/μL
ES3CZ1	1.745	260/280
	19.063	ng/μL
ES4CZ5	1.731	260/280
	13.452	ng/μL
ES5CZ3	2.107	260/280
	17.31	ng/μL

PCR reaksiyonları ITS1-ITS4 primer çifti ile Xpert Fast Hotstart Mastermix (Grisp, Portugal) kullanılarak (Şekil 5.5) gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.5. Türe özgü ITS1-ITS4 primer çifti ile gerçekleştirilen PCR amplifikasyon ürünleri.

ITS1-ITS4 primer çifti ile gerçekleştirilen PCR ürünleri, aynı primer çiftleri kullanılarak, ABI 3730XL Sanger dizileme cihazında (Applied Biosystems, Foster City, CA), BigDye, Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti ile (Applied Biosystems, Foster City, CA) dizilenmiştir. Sanger dizileme işlemi ticari bir firma aracılığıyla (BM LABOSİS, Ankara, Türkiye) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen nükleotit dizileri, dizi benzerliklerini belirlemek için GenBank araştırmasında kullanılmıştır (NCBI - Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi). En benzer ve bazı dış grup dizileri NCBI veri tabanından seçilerek ve BioEdit sürüm 7.2.6 yazılımı kullanılarak hizalanmıştır. Elde edilen sonuçlar, ITS sekanslarının tümünün BLAST analizinin, daha önce bildirilen NCBI GenBank *S. polyspora* sekanslarıyla >%98 benzerlikle izolatların tanımlanmasını doğruladığını göstermiştir. ES1CZ1 nolu izolat, *S. polyspora* MK907720.1 kodlu izolat ile %99,81 dizi benzerliği göstermiştir. ES2CZ2 nolu izolat, *S. polyspora* MT663478.1 kodlu izolat ile %99,81 dizi benzerliği göstermiştir. ES3CZ1 nolu izolat, *S. polyspora* OK576253.1 kodlu izolat ile %98,70 dizi benzerliği göstermiştir. ES4CZ5 nolu izolat, *S. polyspora* MK907720.1 kodlu izolat ile %98,90 dizi benzerliği göstermiştir. ES5CZ3 nolu izolat ise *S. polyspora* EU877261.1 kodlu izolat ile %99,62 dizi benzerliği göstermiştir.

İki aylık inkubasyon süresinin sonunda patojenisite çalışmaları aşıl原因an sürgünlerde enfeksiyon sıklığının %90 olduğunu göstermiştir. Yapılan testlerde aşıl原因an sürgünlerin floeminde, aşıl原因an noktaların dışına taşın nekrotik alanlar (Şekil 5.6) gözlenmiştir. Tüm bu aşıl原因anmış sürgünlerden *S. polyspora* izolatları PDA besi ortamına yeniden izole edilmiştir. Kontrol sürgünleri hiçbir hastalık belirtisi göstermemiştir. Çalışmada kullanılan fidanlarda inkubasyon süresi boyunca hiç ölüm gerçekleşmemiştir. Örnek alan 1 ve 2'den elde edilen (ES1CZ1 ve ES2CZ2) iki izolat diğer izolatlara nazaran önemli ölçüde daha geniş lezyonlara sebep olmuştur. Konukçularda meydana gelen lezyon boyu ve lezyon enine ait aritmetik ortalamalarının kontrolü basit varyans analizi (Anova testi) ile yapılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 5.3'de gösterilmiştir.

Tablo 5. 3. Konukçularda meydana gelen patojenisite değerleri (mm)

	İzolat 1	İzolat 2	İzolat 3	İzolat 4	İzolat 5
Lezyon boyu	16,1 (0,02) ¹ a ²	15 (0,02) a	10,2 (0,01) b	8 (0,01) bc	7 (0,01) c
Lezyon çapı	8 (0,02) b	17,2 (0,03) a	5 (0,01) c	5.4 (0,01) c	6 (0,01) bc

1: Standart sapma, 2: Duncan testine göre; testine göre oluşan homojen gruplar her satırda harflerle gösterilmiştir. Lezyon boyu ve lezyon eni için (P<0,05) bulunmuştur.

Patojenite testlerinin sonuçları ve *S. polyspora*'nın semptomatik ibrelerden yeniden izolasyonu, *S. polyspora*'nın mevsimsel ibre nekrozu gelişiminde rol oynadığını açıkça göstermektedir.



Şekil 5.6. Patojenisite çalışması a) *Sydowia polyspora* ile inokule edilmiş kızılçam fidanı b) kızılçam sürgününün floemine inokulasyon noktasının dışına çıkan nekrotik alan c) kontrol fidanı

6. TARTIŞMA

S. polyspora kozalaklı ağaçlarda yaşayan yaygın bir fungus türüdür ve genellikle asemptomatik bitkilerde ve tohumlarda epifit (Kowalski ve Kehr, 1996; Kowalski ve Pozdzik, 1993) veya endofitik olarak ortaya çıkmaktadır (Sieber-Canavesi ve Sieber, 1993). Ayrıca bu fungus abiyotik veya biyotik stres koşulları altında kolonize bir konukçuda patojenik hale gelebilmektedir (Ridout ve Newcombe, 2018; Talgø ve diğ. 2010). Fungus Avrupa ve Kuzey Amerika’da özellikle *Abies* spp. ve *Pinus* spp. gibi kozalaklı türlerde mevsimsel ibre nekrozu ile ilişkilendirilmektedir (Talgø ve diğ. 2010; Tinivella ve diğ. 2014; Pan ve diğ. 2018; Silva ve diğ. 2020). Ekonomik önemi nedeniyle başta Akdeniz olmak üzere birçok bölgede en önemli fungal türlerden biri olarak kabul edilmektedir (Silva ve diğ. 2020). Fungusun *Pinus* spp. üzerinde bulunan başlıca semptomları arasında; ibreler üzerinde yaz aylarında kırmızımsı kahverengiye dönüşen ten rengi ile sarı renkli şeritler veya benekler bulunmaktadır (Tinivella ve diğ. 2014; Pan ve diğ. 2018; Silva ve diğ. 2020). İbreelerde klorotik lezyonlara neden olan fungus, sağlıklı ibreler arasında rastgele dağılmış şekilde bulunabilmektedir (Pan ve diğ. 2018). Bu fungus *Abies* türlerinin enfekte olmuş dokularından da izole edilmiştir (Talgø ve diğ. 2010). Tinivella ve diğ. (2014), İtalya’da *P. halepensis*’in hastalıklı ibrelerinden *S. polyspora*’nın sorumlu olduğunu bildirmiştir. *S. polyspora*, *P. yunnanensis*’in kök floemini ve çam ibrelerini kolonize edebilmektedir (Pan ve diğ. 2018). Ayrıca *P. pinea*’da hastalığa neden olduğu da bildirilmiştir (Silva ve diğ. 2020). Lazarevic ve Menkis (2022), *S. polyspora*’nın abiyotik strese maruz kalan Güney Avrupa’daki *Abies concolor*’un ani ölümüyle ilişkili olduğunu bildirmiştir. Türkiye’de, *S. polyspora* tarafından mevsimsel ibre nekrozunun ilk raporu *A. nordmanniana* subs. *equi-trojani*’de bildirilmiştir (Çakar ve diğ. 2022). Ayrıca, Cleary ve diğ. (2019), Türkiye’den *P. pinea*’nın asemptomatik tohumlarında *S. polyspora* varlığını rapor etmiştir.

Pinus türlerinde *S. polyspora*’nın çam ibrelerinde kloraza veya renk bozulmasına neden olabileceği Pan ve diğ. (2018) tarafından rapor edilmiş ve *S. polyspora*’nın *P. yunnanensis*’i enfekte edebildiğini doğrulamıştır. İbreler kahverengi bantlar ve lekeler geliştirmekte, kırmızımsıdan kahverengiye dönük lezyonlar oluşturmakta

(nekrotik) hatta ibreler dökülmektedir. Ayrıca, İtalya’da yapılan bir çalışmada *S. polyspora*’nın *P. halepensis* ibrelerinde sararmaya ve kavrulmaya yol açtığı Tinivella ve diğ. (2014), tarafından bildirilmiştir. Broders ve diğ. (2015), *S. polyspora*’nın *P. ponderosa*’da *Dothistroma* ibre yanıklığının şiddetini arttırdığını ve Kuzeydoğu Amerika’da beyaz çam ibresi hasarı ile ilişkili olabileceğini bildirmiştir. Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz semptomatik bulgular tüm bu literatür çalışmaları ile uyumludur. Sörveylerin gerçekleştirildiği 5 farklı meşcerede de ibrelerde kırmızıdan kahverengiye dönen lezyonlar, ağaçların taç kısmındaki ibrelerde dökülme ve ibre sararmaları tespit edilmiştir.

Çalışmada 5 farklı meşcerede toplam 156 ağaçta hastalık şiddet ölçümleri yapılmıştır. Arazilerde değerlendirilen 77 ağacın tümü, farklı seviyelerde mevsimsel ibre nekrozu enfeksiyonu semptomlarına sahip olduğu tespit edilmiştir. Meşcerelerde ortalama hastalık şiddeti %38 ila %62 (ortalama = %47) arasında değişmiştir. Baskın hastalık şiddeti sınıfı orta seviye (skor =3) olarak belirlenmiştir. Meşcereler arasındaki hasar sınıfları karşılaştırıldığında 1 numaralı örnek alanın görsel olarak diğer alanlara göre daha fazla hastalık hasarı gösterdiği gözlemlenmiştir, bu durumun alanda yayılış gösteren *T. destruens* zararlısı ile ilişkisi olduğu söylenebilir. Bu örnek alanda yer alan bireyler ciddi şekilde hasar görmüştür. Ayrıca tüm örnek alanlarda son zamanlarda gerçekleşen sürgün ölümlerinde ibreler üzerinde sarı kahverengi lezyonlar görülmüştür. Daha uzun süre önce meydana gelen sürgün ölümlerinden kalan ibreler ise grimsi kahverengi ve koyu gri renktedir. Çakar ve diğ. (2022), Bolu yakınlarındaki Aladağ Yaylası’nda bulunan *A. nordmanniana* subsp. *equi-trojani* (Kazdağı göknarı) ağaçlarında şiddetli mevsimsel ibre nekrozu (CSNN) belirtileri gözlemlenmiş, incelenen 1000 hektarlık alandaki 300 bitkinin %60’ında *S. polyspora* semptomlarını tespit etmişlerdir.

Örnek alanlardan toplanan hastalıklı sürgünlerinden her ağaçtan bir adet olmak üzere toplam 68 adet *S. polyspora* izolatu elde edilmiştir. Karanlıkta 20°C’de 8 günlük inkübasyondan sonra *S. polyspora* kolonilerinin tümü, başlangıçta %2 PDA besi ortamında beyaz kenarlı krem rengindedir daha sonra koyu kahverengi ile grimsi siyah renge dönmüştür. İzolatlar septat olmayan, elipsoid, hiyalin ve multigutulate sporlar bulundurmaktadır. Miselyum, bazen dallanan ve enteroblastik konidia üreten koniojen hücreler gibidir. Konidia, hiyalin, tek hücreli, septat olmayan, multigutat,

esas olarak elipsoiddir ve 30 sporda ortalama 5,7 x 3,2 µm olarak ölçülmüştür. Çakar ve diğ. (2022), yaptıkları çalışmada *S. polyspora* sporlarını 6,8 (4,2 ila 10,7) x 2,8 (2,4 ila 4,25) µm büyüklüğünde ölçmüştür. Ayrıca Talgø ve diğ. (2010), *S. polyspora* sporlarını 4,8-(7,1)-12,5 x 2,3-(2,8)-5,3µm büyüklüğünde ölçtüklerini bildirmişlerdir. Funk ve diğ. (1985), *H. merioides* ile yaptıkları çalışmada sporların büyüklüğünü 7-12 x 3-5µm ölçerken, Butin ve Pehl. (1993), *K. abietis* ile yaptıkları çalışmada sporları 6-12 x 3,5-6,5 µm olarak belirlemişlerdir.

Morfolojik karakterizasyonları doğrulamak amacıyla her alandan bir tane olmak üzere 5 temsilci izolata DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. ITS1-ITS4 primer çifti ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonları sonucunda izolatlar ticari bir firma (BMLabosis, Ankara) aracılığı ile sekanslanmıştır. Elde edilen nükleotit dizileri, dizi benzerliklerini belirlemek için GenBank araştırmasında kullanılmıştır (NCBI - Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi). En benzer ve bazı dış grup dizileri NCBI veri tabanından seçilerek ve BioEdit sürüm 7.2.6 yazılımı kullanılarak hizalanmıştır. Elde edilen sonuçlar, ITS sekanslarının tümünün BLAST analizinin, daha önce bildirilen *S. polyspora* sekanslarıyla %99-%100 benzerlikle izolatların tanımlanmasını doğruladığını göstermiştir. Silva ve diğ. (2020), *P. pinea* ile yaptıkları çalışmada ITS dizilerinin BLAST analizi, daha önce bildirilen *S. polyspora* dizileriyle %99-%100 benzerlikle izolatların tanımlanmasını doğrulamıştır.

İki aylık inkubasyon süresinin sonunda patojenisite çalışmaları aşılana sürgünlerde enfeksiyon sıklığının %90 olduğunu göstermiştir. Yapılan testlerde 5 izolatla aşılana sürgünlerin floeminde, aşılana noktaların dışına taşan nekrotik alanlar gözlenmiştir. Tüm nekrotik alan bulduran sürgünlerden *S. polyspora* izolatları PDA besi ortamına yeniden izole edilmiştir. Kontrol sürgünleri hiçbir hastalık belirtisi göstermemiştir. Çalışmada kullanılan fidanlarda inkubasyon süresi boyunca hiç ölüm gerçekleşmemiştir. Örnek alan 1 ve 2'den elde edilen iki izolat diğeri izolatlara nazaran önemli ölçüde daha geniş lezyonlara sebep olmuştur ve izolatlar kadar örnek alanın önemli bir etkisi olduğu düşünülebilir. Patojenite testlerinin sonuçları ve *S. polyspora*'nın semptomatik ibrelerden yeniden izolasyonu, *S. polyspora*'nın mevsimsel ibre nekrozu gelişiminde rol oynadığını açıkça göstermektedir. Ayrıca aynı izolatlar ile gerçekleştirilen 5 tekrardan bazılarında enfeksiyonun meydana gelmemesi çeşitli abiyotik ve biyotik faktörlerin, patojenin

ekolojisini veya konukçunun duyarlılığını etkileyerek hastalığın gelişiminde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Talgø ve diğ. (2010), aynı izolatlarla gerçekleştirilen üç testten birinde semptom gelişiminin olmadığını bildirmiştir.

Silva ve diğ. (2020), aşılama testlerinde kullanılan üç izolattan ikisinin *P. pinea* sürgünlerinde nekroza neden olmadığını bildirmiştir. Pan ve diğ. (2018), *S. polyspora*'nın *P. yunnanensis*'e karşı virülensini değerlendirmek için, fungus *P. yunnanensis*'in gövdelerine ve ibrelerine aşılansarak patojenite testleri yapılmıştır. Testlerin 30 gün sonraki sonuçları, *S. polyspora* ile aşılama sonrası floemdeki lezyon uzunluklarının, kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha uzun olduğunu bildirmiştir. Çalışmada test edilen on izolattan dördünün hiçbir semptom göstermediğini, farklı *S. polyspora* izolatları ile aşılansmış *P. yunnanensis*'in ibrelerinde farklı derecelerde semptom gelişiminin olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Ridout ve Newcombe (2018), *P. ponderosa* konukçusunun tohumundan izole edilen fungusların, o konukçuya diğ. türlere göre daha fazla afinite gösterdiğini ve çeşitli bitki türlerinin çimlenmesini belirli şekillerde etkilediğini göstermiştir. Ayrıca araştırmacılar *S. polyspora*'nın *P. ponderosa* tohumlarının zamanında çimlenmesini yavaşlattığını ve engellediğini bildirmiştir.

H. dematioides olarak bildirilen *S. polyspora*, birçok ülkede *T. piniperda*, *T. minor* ve *P. bidentatus* ile ilişkili yaygın bir fungustur (Pan ve diğ. 2018). Çalışmalarımızı gerçekleştirdiğimiz örnek alanlarda *T. destruens* ve *Dioryctria sylvestrella* Ratz.'nın varlığı tespit edilmiştir. Örnek alanlarda bulunan birçok sürgünde *T. destruens* belirtileri bulunduğundan, fungusun vektörlenmesinde veya konukçu stresinde yer alan olası bir etken böcek *T. destruens* olabilir. Fungus-böcek-bitki etkileşimi belirsizliğini korusa da, *S. polyspora*'nın ayrıca çam sürgünlerinde beslenen böcekler (*Tomicus* spp.) tarafından taşınan baskın fungus türü olduğu bulunmuştur (Muñoz-Adalia ve diğ. 2017). Pan ve diğ.'nin Güneybatı Çin'de yapmış oldukları bir çalışmada *P. yunnanensis*'i istila eden *T. minor* ve *T. yunnanensis*'in böcek gövdelerinden ve galerilerinden toplanan ITS sekans verileri ve morfolojik özelliklerine dayalı 14 izolat *S. polyspora* olarak tanımlanmıştır.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu yüksek lisans tezinin gerçekleştirildiği örnek alanlarda *P. brutia* bireylerinin tepe tacının üst aksamındaki nekrotik sürgünler endişe vericidir. Bu semptomlar ağaçların gelişimini tehlikeye atmaktadır. Ağaçların taç kısımlarında meydana gelen nekrozlar ağaçların gelişimini etkileyerek önemli ekonomik kayıplara sebep olabilir. Ayrıca bu fungusun asemptomatik tohum ve sürgünlerde bulunuyor olması fungusun yayılma yollarının ve fungus ile konukçuları arasındaki etkileşimlerin daha iyi anlaşılması gerektiğini vurgulamaktadır. Ülkemiz kızılçam ormanlarındaki fungus zararlarına katkıda bulunan ve biyotik ve/veya abiyotik faktörleri anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada, 5 farklı örnek alanda toplam 156 ağaçta hastalık şiddeti ölçümleri yapılarak 77 bireyin tamamında mevsimsel ibre nekrozu tespit edilmiştir. Çalışmada gerçekleştirilen izolasyon ve patojenisite yöntemleri ile bu sahalarda meydana gelen mevsimsel ibre nekrozunun *S. polyspora* ile ilişkilendirilmesini sağlamıştır. Ayrıca günümüzde mevsimsel ibre nekrozu birden fazla biyotik ve abiyotik faktörlere bağlı olarak konukçularda görülebilmektedir. Dünya üzerinde *S. polyspora* Çin, Portekiz, İtalya, Slovakya ve Norveç gibi ülkelerde mevsimsel ibre nekrozu ile ilişkili olarak bildirilmiştir. Bildiğimiz kadarıyla, bu çalışma Türkiye’de *P. brutia* bireylerinde ibrelerde lezyon ve geriye doğru sürgün ölümü belirtilerinin destekleyicisi olan *S. polyspora*’yı tanımlayan ilk rapordur.

S. polyspora’nın etkileri biyolojik, kültürel ve kimyasal yöntemleri içeren çok yönlü bir mücadele programıyla en aza indirilebilir. Sonbaharda kuru havalarda mümkün olduğu kadar çok kurumuş dalların budanması ve kozalakların toplanması ilkbaharda yeni enfekte oluşumunu azaltmaya yardımcı olacaktır. Hatta inokulumu azaltmak için ciddi semptomatik ağaçlar feda edilerek meşcereden çıkarılabilir.

Dünya küresel ısınma ve iklim değişikliğiyle karşı karşıyadır. Artan sıcaklıklar, yağışlardaki rejim düzensizlikleri, kuraklık ve aniden ortaya çıkan doğal afetler gibi ekolojik sebepler orman ekosistemlerini doğrudan ve dolaylı olarak tehdit etmektedir. İklim değişikliğinin bir sonucu olarak yeni patojen türleri önümüzdeki

yakın gelecekte ormanlarda zarar yapma potansiyeline sahip olacaktır. Endofit fungusların, böcek zararına uğramış ya da farklı patojen funguslar tarafından zayıf kalmış olan kızılçam ağaçlarında hızlı evrim kapasiteleriyle patojene dönüşerek bireylerde hastalığa sebep olmaktadır. Sonuç olarak, küresel ısınmanın olumsuz etkilerine karşı fungus türlerinin adaptasyon geliştirerek orman ekosistemlerinde şiddetli derecede tehdit unsuru olabileceği unutulmamalıdır. Gelecekte daha fazla ekonomik ve ekosistemsel zararlarla karşı karşıya kalmamak için gereken önlem alınmalıdır. Ülkemizde *P. brutia* meşcerelerinin izlenmesine, izolasyon ve kültür yöntemleriyle endofitik fungusların tanımlanmasına öncelik verilmesi gerekmekte ve *S. polyspora* için çalışmalar arttırılmalıdır.

8. KAYNAKLAR

- Aday Kaya, G.A., Yeltekin, Ş., Lehtijarvi T.D., Lehtijärvi, A., Woodward, S., “Severity of Diplodia shoot blight (caused by *Diplodia sapinea*) was greatest on *Pinus sylvestris* and *Pinus nigra* in a plantation containing five pine species”, *Phytopathologia Mediterranea*, 58(2), (2019).
- Arbez, M., “Distribution, ecology and variation of *Pinus brutia* in Turkey”, *Information sur les Ressources Genetiques Forestieres*, (1974).
- Arnold, A.E., “Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers”, *Fungal Biology Reviews*, 21(2-3), 51-66, (2007).
- Bacon, L. D., Hunt, H. D., Cheng, H. H., “A review of the development of chicken lines to resolve genes determining resistance to diseases”, *Poultry science*, 79(8), 1082-1093, (2000).
- Bahçecioğlu, Z., “*Malatya Yöresi Parazit Mantarları Üzerinde Taksonomik Çalışmalar*”, Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Malatya, 142, (1995).
- Balami, S., Vašutová, M., Godbold, D., Kotas, P., Cudlín, P., “Soil fungal communities across land use types”, *iForest-Biogeosciences and Forestry*, 13(6), 548, (2020).
- Baltacı, N., Kalkancı, A., “Küresel ısınmanın mantar enfeksiyonlarına etkisi”, *Kocatepe Tıp Dergisi*, 22(4), 304-308, (2021).
- Bernicchia, A., “*Polyporaceae s.l Fungi europaei 10*”, Candusso, Alassio, (2005).
- Bihon, W., Burgess, T., Slippers, B., Wingfield, M. J., Wingfield, B. D., “Distribution of *Diplodia pinea* and its genotypic diversity within asymptomatic *Pinus patula* trees”, *Australasian Plant Pathology*, 40(5), 540-548, (2011).
- Bikzad, M. R., “Orman ağaçlarından izole edilen bazı endofitik fungusların *Diplodia Sapinea* (FR.) fuckel izolatlarına karşı antagonistik etkilerinin belirlenmesi” Yüksek Lisans Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Denizli, (2022).
- Blumenstein, K., Langer, G., Bußkamp, J., Langer, E., Terhonen, E., “The opportunistic pathogen *Sphaeropsis sapinea* is found to be one of the most abundant fungi in symptomless and diseased Scots pine in Central-Europe”, (2020).
- Broders, K., Munck, I., Wyka, S., Iriarte, G., Beaudoin, E., “Characterization of fungal pathogens associated with white pine needle damage (WPND) in northeastern North America”, *Forests*, 6, 4088–4104, (2015).
- Butin H., Pehl L., “*Kabatina abietis* sp. nov. associated with browning of fir needles”, *Mycology Research*, 97: 1340e1342, (1993).
- Capretti, P., Santini, A., Solheim, H., “21 Branch and Tip Blights”, *Infectious Forest Diseases*, 420, (2013).

- Carroll, G., “Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont”, *Ecology*, 69(1), 2-9, (1988).
- Cleary, M., Oskay, F., Doğmuş, H. T., Lehtijärvi, A., Woodward, S., Vettraino, A. M., “Cryptic risks to forest biosecurity associated with the global movement of commercial seed”, *Forests*, 10(5), 459, (2019).
- Çakar, D., Şimşek, S. A., Çömez, A., Maden, S., “First report of *Sydowia polyspora* causing needle necrosis on Trojan fir in Turkey”, *Journal of Plant Pathology*, 104(4), 1589-1590, (2022).
- Çanakçioğlu, H., Mol, T., “Zararlı ve Yararlı Böcekler”, Orman Entomolojisi, *İstanbul Üniversitesi, Orman Fakültesi Yayınları İstanbul*, 540, 141-144, (1998).
- Desprez-Loustau, M. L., Marçais, B., Nageleisen, L. M., Piou, D., Vannini, A., “Interactive effects of drought and pathogens in forest trees”, *Annals of Forest Science*, 63(6), 597-612, (2006).
- Dıngıloğlu, E., “Bazı Meşcere Özellikleri ve Topoğrafik Faktörlerin Kayın Yaprak Yumrusineği (*Mikiola fagi* (HARTIG, 1839)) Gal Oluşumu Üzerine Etkileri, Doktora Tezi, *Kastamonu Üniversitesi, Kastamonu*, (2019).
- Eo, J. K., Eom, A. H., “Community of Endophytic Fungi from Alpine Conifers on Mt. Seorak”, *Mycobiology*, 50(5), 317-325, (2022).
- Farr, D. F., Rossman, A. Y., “Fungal Databases, Syst. Mycol. Microbiol. Lab., USDA-ARS”, Retrieved January, 12, 2022, (2022).
- Flowers, J., Nuckles, E., Hartman, J., Vaillancourt, L., “Latent Infection of Austrian and Scots Pine Tissues by *Sphaeropsis sapinea*”, *Plant Disease*, 85: 1107-1112, (2001).
- Funk, A., Woods, T. A. D., Hopkinson, S. J., “*Hormonema merioides* n. sp., on Douglas-fir needles”, *Canadian Journal of Botany*, 63(9), 1579-1581, (1985).
- Hillebrand, H., “On the generality of the latitudinal diversity gradient”, *The American Naturalist*, 163(2), 192-211, (2004).
- Holling, C. S., Schindler, D. W., Walker, B. H., Roughgarden, J., “Biodiversity in the Functioning of Ecosystems: An Ecological Synthesis”, (1995).
- Kivlin, S. N., Emery, S. M., Rudgers, J. A., “Fungal symbionts alter plant responses to global change”, *American Journal Botany*, 100(7), 1445–1457 (2013).
- Koski, V., Antola, J., “National tree breeding and seed production programme for Turkey 1994-2003”, *The Research Directorate of Forest Tree Seeds and Tree Breeding*, Ankara, Turkey, 52, (1993).
- Kowalski, T., Pozdzik, P., “Grzyby endofityczne w żywych igłach *Pinus sylvestris* L.” *Acta Agraria et Silvestri, Series Silvestris*, (31), 17-30, (1993).
- Kowalski, T., Kehr, R. D., “Fungal endophytes of living branch bases in several European tree species”, *Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants: Systematics, Ecology, and Evolution*, 67-86, (1996).

Lazarevic, J., Menkis, A., “*Cytospora friesii* and *Sydowia polyspora* are associated with the sudden dieback of *Abies concolor* in”, *Southern Europe*, (2022).

Maestre, F. T., Delgado-Baquerizo, M., Jeffries, T. C., Eldridge, D. J., Ochoa, V., Gozalo, B., Singh, B. K., “Increasing aridity reduces soil microbial diversity and abundance in global drylands”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(51), 15684-15689, (2015).

Mooney, H., Lubchenco., Dirzo, R and Sala, O., “*Biodiversity and ecosystem functioning: basic principles* ”, (in V.Heywood (ed)), *Global Biodiversity Assessment*, Cambridge: Cambridge University Press, 275-325, (1995).

Muñoz-Adalia, E. J., Sanz-Ros, A. V., Flores-Pacheco, J. A., Hantula, J., Diez, J. J., Vainio, E. J., Fernández, M., “*Sydowia polyspora* dominates fungal communities carried by two *Tomicus* species in pine plantations threatened by *Fusarium circinatum*”, *Forests*, 8(4), 127, (2017).

OGM, Asli Ağaç Türleri, (10.11.2023), <https://www.ogm.gov.tr/tr/e-kutuphane-sitesi/Yayinlar/Asli%20A%C4%9Fa%C3%A7%20T%C3%BCrleri.pdf>, (2009).

OGM, Türkiye'nin Orman Varlığı, (11.11.2023) , <https://www.ogm.gov.tr/tr/ormanlarimizsitesi/TurkiyeOrmanVarligi/Yayinlar/2015%20T%C3%BCrkiye%20Orman%20Varl%C4%B1%C4%9F%C4%B1.pdf>, (2015).

OGM, Türkiye'nin Orman Varlığı,(11.11.2023), <https://www.ogm.gov.tr/tr/ormanlarimizsitesi/TurkiyeOrmanVarligi/Yayinlar/2020%20T%C3%BCrkiye%20Orman%20Varl%C4%B1%C4%9F%C4%B1.pdf>, (2021).

Oskay, F., “Dedegöl Dağı (Isparta) karaçam gençliklerinde zarara neden olan kar fungusları”, Doktora Tezi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Isparta, (2014).

Pan, Y., Ye, H., Lu, J., Chen, P., Zhou, X. D., Qiao, M., Yu, Z. F., “Isolation and identification of *Sydowia polyspora* and its pathogenicity on *Pinus yunnanensis* in Southwestern China”, *Journal of Phytopathology*, 166(6), 386-395, (2018).

Peay, K. G., Kennedy, P. G., Talbot, J. M., “Dimensions of biodiversity in the Earth microbiome”, *Nature Reviews Microbiology*, 14, 434–447 (2016).

Prihatini, I., Glen, M., Wardlaw, T. J., Ratkowsky, D. A., Mohammed, C. L., “Needle fungi in young Tasmanian *Pinus radiata* plantations in relation to elevation and rainfall”, *New Zealand Journal of Forestry Science*, 45(1), 1-10, (2015).

Ranta, H., Saloniemi, I., “Distribution of fungal foliage and shoot pathogens in a natural Scots pine population in relation to environmental variables”, *Canadian Journal of Forest Research*, 35(3), 503-510, (2005).

Redman, R. S., Sheehan, K. B., Stout, R. G., Rodriguez, R. J., Henson, J. M., “Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis”, *Science* 298(5598), 1581, (2002).

Ridout, M., Newcombe, G., “*Sydowia polyspora* is both a foliar endophyte and a preemergent seed pathogen in *Pinus ponderosa*”, *Plant Disease*, 102(3), 640-644, (2018).

Ruiz-Almenara, C., Gándara, E., Gómez-Hernández, M., “Comparison of diversity and composition of macrofungal species between intensive mushroom harvesting and non-harvesting areas in Oaxaca, Mexico”, *PeerJ* 7, e8325, (2019).

Ryvarden, L., “The Polyporaceae of North Europe. Volume 2. Inonotus-Tyromyces”, *The Polyporaceae of North Europe Volume 2. Inonotus-Tyromyces*, 219-507, (1978).

Sayın, C., Gülçubuk, B., Bozoğlu, M., Koçak, A., Özalp, A., İlbasmış, O. S. E., Ceylan, M., “Türkiye’de Tarımsal Yapıda Değişim ve İzlenen Politikalar”, *Türkiye Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi Bildiriler Kitabı-1*, 9, (2015).

Schulz, B., Boyle, C., “The endophytic continuum”, *Mycological Research* 109 (6): 661–686, (2005).

Shang, Y. Z., “A propounding list of Chinese names in current use for tree fungal diseases in China” Proceedings of the Third Congress of Mycological Society of China and the Sixth National Symposium on Mycology, 22–25 Sep 2003, Beijing, China, (in Chinese), 446–450, (2003).

Sieber-Canavesi, F., Sieber, T. N., “Successional patterns of fungal communities in needles of European silver fir (*Abies alba* Mill.)”, *New Phytologist*, 125, 149–161, (1993).

Silva, A. C., Henriques, J., Diogo, E., Ramos, A. P., Bragança, H., “First report of *Sydowia polyspora* causing disease on *Pinus pinea* shoots”, *Forest Pathology*, 50(1), e12570, (2020).

Steel, G. S., Dickie, I. A., Sapsford, S. J., “A risk to the forestry industry? Invasive pines as hosts of foliar fungi and potential pathogens”, *New Zealand Journal of Ecology*, 46(1), 1-13, (2022).

Stanosz, G. R., Smith, D. R., Guthmiller, M. A., Stanosz, J. C., “Persistence of *Sphaeropsis sapinea* on or in asymptomatic shoots of red and jack pines”. *Mycologia*, 89(4), 525-530, (1997).

Stanosz, G. R., Smith, D. R., Leisso, R., “*Diplodia* shoot blight and asymptomatic persistence of *Diplodia pinea* on or in stems of jack pine nursery seedlings” *Forest Pathology*, 37(3), 145-154, (2007).

Stanosz, G. R., Blodgett, J. T., Smith, D. R., Kruger, E. L., “Water stress and *Sphaeropsis sapinea* as a latent pathogen of red pine seedlings”, *New Phytologist*, 149(3), 531-538, (2001).

Şimşek, Z., Öner, N., Kondur, Y. M., “Kuraklığın Orman Biyoçeşitliliği Üzerine Etkileri ve Gelecekte Alınması Gereken Önlemler”, *III. Ulusal Karadeniz Ormancılık Kongresi*, 2, 827-838, (2010)

Talgø, V., Chastagner, G., Thomsen, I. M., Cech, T., Riley, K., Lange, K., Stensvand, A., “*Sydowia polyspora* associated with current season needle necrosis (CSNN) on true fir (*Abies* spp.)”, *Fungal Biology*, 114(7), 545-554, (2010).

Tinivella, F., Dani, E., Minuto, G., Minuto, A., “First report of *Sydowia polyspora* on Aleppo pine (*Pinus halepensis*) in Italy”, *Plant Disease*, 98(2), 281-281, (2014).

Townsend G.R., Heuberger J.W., “Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments”, *The Plant Disease Reporter* 27: 340-343, (1943).

Tüfekçioğlu, A., “Küresel Isınmanın Ülkemiz Ladin Ormanları Üzerine Olası Etkilerinin İrdelenmesi”, Orman Fakültesi, *Artvin Çoruh Üniversitesi*, Artvin (2008).

Větrovský, T., Kohout, P., Kopecký, M., Machac, A., Man, M., Bahnmann, B. D., Baldrian, P., “A Meta-Analysis of Global Fungal Distribution Reveals Climate-Driven Patterns”, *Nature Communications*, 10(1), 5142, (2019).

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

Yeşil, A., Asan.Ü., “Ormanların karbon birikimindeki mevcut ve potansiyel rolü”, *Küresel İklim Değişikliği ve Su Sorunlarının Çözümünde Ormanlar*, 13-14 Aralık, İstanbul, 109-119, (2007).