

Burdur İli Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) Ormanlarında İbre Yanıklığı ve Dökümüne Neden Olan Fungal Etmenlerin Moleküler Yöntemlerle Tespiti

Zeynep TUNALI¹, H. Tuğba DOĞMUŞ-LEHTİJÄRVİ¹, Funda OSKAY²

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü, 32000, Isparta

²Çankırı Karatekin Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü, 18000, Çankırı

(Alınış / Received: 27.11.2016, Kabul / Accepted: 12.07.2017, Online Yayınlanma / Published Online: 06.10.2017)

Anahtar Kelimeler

Dothistroma septosporum,
Dothistroma pini,
Lophodermium seeditiosum,
Lecanosticta acicola,
Pinus brutia,
İbre yanıklığı

Özet: *Dothistroma* ibre yanıklığı, *Lecanosticta* kahverengi leke ibre yanıklığı ve *Lophodermium* ibre dökülme hastalığı, dünya çapında, yayılış alanları ve zararları giderek artan, çam türlerinin önemli hastalıkları arasında yer alırlar. Bu hastalıklara sebep olan funguslardan, *Dothistroma septosporum*, *Dothistroma pini* ve *Lecanosticta acicola* karantinaya tabi zararlı organizmalardır. Ancak bu fungusların ve sebep oldukları hastalıkların ülkemizdeki durumları tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada, yukarıda adı geçen önemli ibre hastalıklarının tespitinde, hızlı ve güvenilir bir yaklaşım olarak moleküler yöntemlerin kullanım olanaklarının ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, türe özgü primerlerin kullanıldığı moleküler bir yöntemden faydalanılarak; Burdur ili kızılçam ormanlarında, bu hastalıklara sebep olan fungusların ibre örneklerindeki varlıkları araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, ibrelerde yalnızca *D. septosporum* ve *Lo. seeditiosum*'un bulunduğu tespit edilmiştir. Bu iki fungusun bir arada görülmesi, bu orman alanlarının verimliliği ve sürdürülebilirliği açısından oldukça önemli bir tehdittir. Çalışmada, bu iki fungusun bulunma oranlarının, örneklerin toplandığı meşcerelere ve yıllara göre farklılıklar gösterdiği de belirlenmiştir. Bu sonuçlar, çalışmada kullanılan moleküler yöntemin, adı geçen bu fungusların hızlı ve güvenilir olarak tespitine olanak sağladığını ortaya koymaktadır. Gerek bu orman alanında, gerekse ülkemizin diğer bölgelerindeki çam ormanlarında, bu yöntemden faydalanılarak, daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Detection Of Fungal Needle Disease Agents Of Turkish Pine (*Pinus Brutia* Ten.) Forests In Burdur Province Using Molecular Techniques

Keywords

Dothistroma septosporum,
Dothistroma pini,
Lophodermium seeditiosum,
Lecanosticta acicola,
Pinus brutia,
Needle blight

Abstract: *Dothistroma* needle blight, *Lecanosticta* brown spot needle blight and *Lophodermium* needle cast disease are among the most important pine diseases with ever increasing distribution areas and damages. Among the fungi that cause these diseases, *Dothistroma septosporum*, *D. pini* and *Lecanosticta acicola* are harmful organisms which are subject to quarantine. However, the situation of these fungi and the diseases they cause in our country is not exactly known. This study is aimed towards revealing the molecular methods as a fast and reliable approach in the detection of above mentioned major needle diseases. For this purpose, presence of the fungi which cause these diseases was investigated in Burdur red pine forests using a molecular method that utilizes species specific primers. Only *D. septosporum* and *Lo. seeditiosum* were detected on the needles. Presence of these two fungi together is a great threat to productivity and maintainability of these forests. Furthermore, it was determined that their frequencies were varying between the sampling stands as well as the collection years. These results revealed that the molecular method used in this study is a fast and reliable method in detection of these fungi. More detailed studies should be done both in this forest and other pine forests in our country by using this method.

1. Giriş

Günümüzde, birçok önemli orman hastalığı arasında ibre ve sürgün hastalıkları, dünyanın çeşitli bölgelerinde, fidanlıklar, doğal ormanlar ve plantasyonlarda, çam türlerinin en önemli sorunları arasındadır[1]. Özellikle son yıllarda çam türlerinde neden oldukları zarar ile dikkati çeken ibre hastalıkları; *Dothistroma* ibre yanıklığı (DİY), *Lecanosticta* kahverengi leke ibre yanıklığı (KİY) ve *Lophodermium* ibre dökülme hastalığı (LİDH) olup bu hastalıkların, özellikle de DİY'nin, yaygınlık ve zarar şiddetinin giderek arttığı izlenmektedir[2-4].

Dothistroma septosporum (Dorogin) M. Morelet (telemorfu: *Mycosphaerella pini* Rostr. ex Munk) ve *Dothistroma pini* Hulbary (telemorfu bilinmiyor), *Dothistroma* ibre yanıklığına sebep olan fungal patojenlerdir[5]. Enfekteli ibreler, sarı-kahverengi bant şeklinde gelişim göstermekte olup, hastalık ilerledikçe ibrenin tabanı yeşil kalırken enfekteli bölgeler kısa sürede kahverengi-kırmızıya dönmektedir. Hastalıktan etkilenen ibreler vaktinden önce dökülürler. İbrelerin dökülmesi ağaçta artım kaybına neden olmakta ve ağacı zayıflatmaktadır[6]. *D. septosporum*, *D. pini*'ye kıyasla çok daha geniş bir yayılış alanına ve konukçu dizisine sahiptir[4]. *D. septosporum*'un ana konukçusu çam türleri olmakla birlikte, diğer konifer türlerinde de görülebilmektedir. Yakın zamanda yapılan bir derleme çalışmasında, bu fungusun 62 ülkede, çamgiller familyasına (Pinaceae) dahil 109 takson üzerinde tespit edildiği bildirilmiştir[4]. Türkiye'nin farklı bölgelerinde yerli ve egzotik çam türlerinde de DİY'nin varlığına ilişkin kayıtlar bulunmaktadır[7-8]. Yakın bir zamanda bu hastalık *D. septosporum* Doğmuş-Lehtijärvi ve arkadaşları[9] tarafından Burdur ili kızılçam(*P. brutia* ten.) ormanlarında tespit edilmiştir. Diğer taraftan, *D. pini*'nin ülkemizdeki varlığına dair kesin bir kayıt bulunmamaktadır. Her iki fungus da ülkemizde karantinaya tabi zararlı organizmalar arasında yer alır.

Kahverengi leke ibre yanıklığı hastalığı olarak adlandırılan ve *Lecanosticta acicola* (Thüm.) Syd. (eşeyli üreme formu *Mycosphaerella dearnessii* M.E. Barr) 'nın sebep olduğu ibre hastalığı, DİY'na kıyasla daha az yaygındır. KİY sıklıkla DİY ile karıştırılabilen bir hastalıktır[10]. KİY'nin belirtileri farklı konukçularda oldukça değişkendir. *Dothistroma* ve *Lecanosticta*'ya ait sporlar şekil yönünden benzerlik gösterse de, renkleri ile birbirlerinden ayırt edilebilirler. İbreler üzerindeki lezyonlar, hastalığın erken safhalarında, küçük gri-yeşil renginden saman rengine, enfeksiyon yayıldıkça renk açık kahve-kestane rengine dönüşmektedir[11]. Karantinaya tabi zararlı organizma olarak tanımlanan bu fungusun ülkemizdeki varlığına dair kesin bir kayıt bulunmamaktadır.

Lophodermium cinsine ait 20'den fazla türün, iğne yapraklı ağaç ve çalılarının ibreleri üzerinde kolonize olabildiği bilinmekle birlikte, bu türler arasında yalnızca bir tanesi, *Lophodermium seditiosum* (Minter, Staley ve Millar), çamlarda ibre dökülme hastalığına sebep olan başlıca patojendir. *Lo. seditiosum* tarafından hastalandırılan ibrelerdeki ilk morfolojik belirtiler, sarı renkte görülmektedir. Enfeksiyon ilerledikçe ibre, kahverengi-kırmızı renk almaya başlar ve miselyal gelişimin artması sonucunda, ibreler benekli bir hal alır. Bu durum kış ve bahar ayları boyunca devam eder ve eşeyli üreme organları, (apothecia) ilkbahar sonlarına doğru, enfekteli ibrelerin ölü kısımlarında ve dökülen ibrelerde belirmeye başlayan, küçük, siyah ve mekik şeklinde, çıplak gözle görülebilen üreme organları ibrenin çeşitli yerlerinde bulunabilir[8]. Bu fungusun ülkemizde yaygın olduğu tahmin edilmekle birlikte (Kişisel görüş; F. Oskay), varlığına dair tek kesin kayıt[12], Afyon(Dinar)'da genç kızılçam plantasyonlarından sunulmuştur.

Bu hastalıklar, görüldükleri diğer ülkelerde olduğu gibi, ülkemizde de çam ormanlarının verimliliği üzerinde önemli birer tehdittir. Diğer taraftan, bu hastalıklara sebep olan funguslardan, *D. septosporum*, *D. pini* ve *L. acicola*, ülkemizde karantinaya tabi zararlı organizmalar olup, ülkeye girişleri veya ülke içinde yayılmalarını önlemek amacıyla, bitki, bitkisel ürün ve diğer maddelerin kontrol altına alınması gerekmektedir. Bu kontroller ise ancak bu fungusların bitki, bitkisel ürün ve diğer maddeler üzerindeki varlığının doğru ve güvenilir yöntemler ile tespiti ile mümkündür. Bu amaçla, çeşitli araştırmacılar tarafından, bu fungusların doğrudan bitki dokularında tespitinde kullanılabilecek moleküler yöntemler geliştirilmiştir[13-14]. Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma organizasyonu (EPPO) tarafından, bu zararlı organizmaların tespitinde kullanılması önerilen moleküler yöntemler ise türe özgü primerlerin kullanımına dayalı geleneksel Polimeraz zincir Reaksiyonu (PZR) ve eş-zamanlı PZR'dır[3]. Diğer taraftan, karantinaya tabi olmayan *Lo. seditiosum* için de doğrudan bitki örneklerinde tespiti amacı ile Stenstörn ve Ihrmark [15] tarafından yine türe özgü primerlerin kullanımına dayalı geleneksel PZR yöntemi geliştirilmiştir.

Ülkemizde henüz bulunmayan zararlı organizmaların girişinin engellenmesinin yansıra, varlığı bilinen türlerin yayılmasının engellenmesi, ve sebep oldukları hastalıkların ülkemiz ormanlarındaki varlıklarının, yaygınlık ve zarar şiddetlerinin belirlenmesi, çevre koşulları ile ilişkileri çerçevesinde yönetim stratejilerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu kapsamda ilk adım, bu hastalık etmenlerinin doğru, güvenilir ve hızlı bir şekilde tespitinin yapılmasıdır. Bu çalışmada, yukarıda adı geçen önemli ibre hastalıklarının tespitinde, hızlı ve güvenilir bir yaklaşım olarak moleküler yöntemlerin kullanım olanaklarının ortaya konulması ve bu yöntemlerin ülkemizde uygulanarak

yaygınlaştırılmasına katkıda bulunmak amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, türe özgü primerlerin kullandığı moleküler bir yöntemden faydalanılarak; Burdur ili kızılçam ormanlarında, bu hastalıklara sebep olan fungusların; *D. septosporum*, *D. pini*, *Lo. sediciosum* ve *L. acicola*, ibre örneklerindeki varlıkları araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

Bu çalışma, 2013-2015 yılları arasında yürütülmüştür. Arazi ve laboratuvar aşamalarını içeren bu çalışmanın ana materyalini, DİY hastalığının belirtilerini gösteren ve sağlıklı görünen kızılçam ibreleri ve bu ibre örneklerinden izole edilen genomik DNA'lar oluşturmıştır. Laboratuvar çalışmaları, İsveç Tarım Bilimleri Üniversitesi (SLU) ve Süleyman Demirel Üniversitesi (SDÜ), Orman Fakültesi laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

2.1. İbre örneklerinin toplanması

İbre örnekleri, Burdur ili Ağlasun ve Bucak ilçelerinde yayılış gösteren kızılçam ormanlarından toplanmıştır. Bu ormanlar, orman idari sınırları bakımından Isparta Orman Bölge Müdürlüğü, Burdur Orman İşletme Müdürlüğü (OİM) Ağlasun Orman İşletme Şefliği (OİŞ) ile Bucak OİM, Pamucak OİŞ sınırları içerisinde yer almaktadır.

Arazi çalışmaları, Ağlasun ve Pamucak OİŞ sınırları içerisinde yer alan iki kızılçam meşceresinde gerçekleştirilmiştir. Her bir meşcere içerisinde 9 ağaç seçilmiştir. Bu örnek ağaçların her birinden, 5 adet belirti gösteren (simptomatik) ve 5 adet belirti göstermeyen (asimptomatik) ibre çifti toplanmıştır. Örnek toplama işi, 2013 ve 2014 yıllarında iki kez araziye çıkılarak gerçekleştirilmiştir. Her iki arazi çalışmasında da, yalnızca son yıla ait ibre örnekleri toplanmıştır. Buna göre bu çalışmada, Ağlasun ve Pamucak alanlarında 18 ağaçtan 180 adedi 2013, 180 adedi 2014 yılında olmak üzere toplam 360 ibre çifti toplanmıştır (Tablo 1).

Toplanan ibre örnekleri laboratuvar çalışmasına kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2. İbre örneklerindeki fungusların tespiti

2.2.1. İbre örneklerinden DNA izolasyonu

DNA izolasyonuna geçmeden önce seçilen ibre çiftleri, yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Bu işlemde ibreler sırasıyla; %75'lik etanolde 1 dakika , % 2'lik Sodyum-Hipokloridde 1,5 dakika ve % 75'lik etanolde 30 saniye (2 defa) bekletildikten sonra steril kurutma kâğıtları üzerinde kurutulmuştur. Yüzey sterilizasyonu tamamlanan her bir ibre çifti ependorf tüpler içine yerleştirilerek, -50°C'ye ayarlanmış liyofilizatörde 5 gün süre ile kurutulmuştur. Kuruyarak kırılğan hale gelen her bir ibre çifti, steril havanların içerisinde sıvı azot yardımı ile toz hale getirilmiştir.

DNA izolasyonunda CTAB protokolü izlenmiştir[16]. Toz haline getirilerek homojenize edilen ibre örnekleri ilk olarak, hücre ve çekirdek duvarlarının parçalanması için; su, CTAB (Hexadecyl-trimethyl-ammonium bromid), TRIS-HCL (1M), NaCl (5M) ve EDTA (0,5M) içeren %3'lük ekstraksiyon tomponu içinde 65 °C' de 1,5-2 saat inkübe edilmiş ve ardından santrifüjlenmiştir. Liziz artıklarının çöktürülmesinin ardından CTAB nükleik asit kompleksi, sırasıyla kloroform ve izopropanol ile muamele edilerek, sıvı çözeltide bulunan polisakkaritler, fenolik bileşikler, proteinler ve diğer hücre lizatlarından arındırılmıştır. Son olarak %70'lik alkol ile yıkanan nükleik asitler, alkolün uzaklaştırılmasından sonra steril saf su ile sulandırılmıştır. DNA izolasyonu tamamlandıktan sonra elde edilen genomik DNA'lar, geride kalan protein ve benzeri inhibitörlerden arındırmak amacı ile GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan DNA'lar, miktarlarının spektrofotometre ile belirlenmesinin ardından, PZR aşamasında kullanmak üzere, steril ultra saf su ile 5ng/µl konsantrasyonuna seyreltilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan ibre örneklerinin, toplandığı yıl ve meşcere ile belirti gösterip göstermeme durumlarına göre adetleri.

Yıllar	Simptom durumu	Örnek alanlar		Toplam
		Ağlasun OİŞ	Pamucak OİŞ	
2013	Simptomatik	45	45	90
	Asimptomatik	45	45	90
Toplam		90	90	180
2014	Simptomatik	45	45	90
	Asimptomatik	45	45	90
Toplam		90	90	180
Toplam		180	180	360

Tablo 2. PZR amplifikasyonunda kullanılan primerlere ilişkin bilgiler

Hedef fungus	Primerler	Primer dizileri (5'-3')	Hedef gen Bölgesi	Ürün Büyüklüğü (bp)	Kaynak
<i>D. septosporum</i>	DStub2F	CGAACATGGACTGAGCAAAAC	b-tub2 ^a	231	[13]
	DStub2-R	GCACGGCTCTTTCAAATGAC			
<i>D. pini</i>	DPtef-F	ATTTTTCGCTGCTCGTCACT	EF1-a ^b	237	[13]
	DPtef-R	CAATGTGAGATGTTTCGTCGTG			
<i>L. acicola</i>	LAtef-F	GCAAATTTTCGCCGTTTATC		193	[13]
	LAtef-R	TGTGTTCCAAGAGTGCTTGC			
<i>Lo. seditiosum</i>	Ls11-F	CACCCTTTGTTTACCACACTCA	ITS		[15]
	Ls12-R	CGGCACCTGCTGTCCTTC			

a: Beta-Tubulin 2, b: Translation Elongation Factor I alpha, c: Internal transcribed spacer

Tablo 3. PZR döngü ve koşulları ve reaksiyon bileşenleri

Hedef fungus	PZR döngü koşulları	Reaksiyon bileşenleri*	Kaynak
	95°C 10 dk		
<i>D. septosporum</i>	95°C 30 s	H ₂ O 30.75µl	
<i>D. pini</i>	60°C 30 s	Buffer 10µl	[13]
<i>L. acicola</i>	72°C 60s	dNTP 1µl	
	72°C 10 dk	Primer1 1µl	
	94°C 5 dk	Primer2 1µl	
	94°C 15 s	MgCL 5µl	
<i>Lo. seditiosum</i>	62°C 30 s	Taq polimeraz 0,25µl	[15]
	72°C 60s	DNA 1-3µl	
	72°C 7 dk		

*Çalışmada polimeraz enzimi olarak, GoTaq® G2 Flexi DNA polymerase(Promega) kullanılmıştır. 1 örnek için 50 µl reaksiyon hacmine ait bileşenler, kullanılan bu enzime göre optimize edilmiştir.

2.2.2. İbre örneklerindeki fungusların tespiti ve tanısı

İbrelerden izole edilen DNA'larda *D. septosporum*, *D. pini*, *L. acicola* ve *Lo. seditiosum*'un bulunup bulunmadığının tespiti için, bu funguslara özgü olarak tasarlanmış primer çiftleri kullanılarak [13,15] konvensiyonel (geleneksel) PZR ile DNA'ların belirli bölgeleri çoğaltılmıştır. Çalışmada kullanılan primerler ve bu primerlere ait diziler Tablo 2'de, PZR döngü ve koşulları Tablo 3'de verilmiştir. PZR'da, negatif kontrol olarak steril saf su kullanılırken, pozitif kontrol olarak, adı geçen her bir fungusun besi ortamında geliştirilen kolonilerinden elde edilen misellerden ekstrakte edilen genomik DNA'lar kullanılmıştır. Bu DNA'lar SLU, Orman Mikolojisi ve Bitki Koruma Bölümü'nden temin edilmiştir.

PZR ürünleri, TAE (Tris-asetat) tampon çözeltisinde, %1 agaroz (Bio Basic Inc., Markham, Canada) ve Etidyum bromid içeren jelde, elektroforez ile ayrılmış ve görüntülenmiştir. Ürün büyüklüğü, 100-1000 bp'lık DNA markörleri (Thermo Scientific Gene Ruler DNA ladder) kullanılarak belirlenmiştir.

Her bir ibre için 4 fungus türüne özgü primerler ile ayrı ayrı gerçekleştirilen PZR işlemlerinin ardından, jel görüntülerinde bant olup olmamasına göre skorlama yapılmıştır. Amplifikasyonda kullanılan primer çiftinin oluşturması beklenen ürün büyüklüğünde bant oluşumu saptanan (pozitif bant veren) örneklerde, bu primer çifti ile ilişkili fungusun bulunduğu kabul edilmiştir. Ancak bunun için öncelikle, elde edilen bu PZR ürünlerinin söz konusu fungusu ait olup olmadığı, DNA dizilemesi yapılarak teyit edilmiştir. Teyit için seçilen PZR ürünlerinin DNA dizilemesi İontek (İstanbul) firmasına yaptırılmış ve bu DNA dizileri GenBank (NCBI-National Center for Biotechnology Information)'ta kayıtlı diziler ile karşılaştırılmıştır. Bu örneklerle ait DNA dizileri GenBank'ta erişim numaraları alınarak depolanmıştır.

2.3. Verilerin analizi

Çalışma kapsamında toplam 1440 örneklik PZR işlemi gerçekleştirilmiş ve PZR işlemlerinin sonuçları, jel görüntülerine dayanarak değerlendirilmiştir. Değerlendirmede ana kriter, jel görüntüsünde, ibre örneğini temsil eden PZR ürünü bant olup

olmadığıdır. Her bir fungus türü için, her bir ibre örneğinde bant bulunup bulunmadığı 1/0 şeklinde kaydedilerek veri oluşturulmuştur. Tespit edilen fungusların bulunma oranları; fungusun tespit edildiği ibre adedinin, toplam incelenen ibre adedine oranının yüzdesi olarak hesaplanmıştır. Karşılaştırmalar, var yok verileri kullanılarak, %95 güven aralığında, Kikare testi ile analiz edilmiştir. Bu istatistik analizlerde IBM SPSS 20 yazılımı kullanılmıştır.

3. Bulgular

Çalışma kapsamında, Burdur ili sınırlarındaki iki kızılçam meşceresinden seçilen 9'ar adet ağaçtan toplan 360 adet ibre örneği toplanmış, bu ibrelerden izole edilen genomik DNA'larda, *D. septosporum*, *D. pini*, *L. acicola* ve *Lo. seditiosum*'un varlığı geleneksel PZR ile belirlenmiştir. Çalışma kapsamında toplam 1440 örneklilik PZR işlemi gerçekleştirilmiş ve PZR işlemlerinin sonuçları, jel görüntülerine dayanılarak değerlendirilmiştir. Değerlendirmede ana kriter; jel görüntüsünde, pozitif kontrol ile uyumlu olmak koşulu ile, ibre örneğini temsil eden PZR ürünü bant olup olmadığıdır.

D. septosporum'a özgü primeler kullanılarak yapılan PZR işlemleri sonucunda, 360 adet ibre çiftinin 160 adedinde bant oluşumu tespit edilirken, *Lo. seditiosum*'a özgü primeler ile yapılan PZR sonrasında, 195 adet örnekte bant tespit edilmiştir. Bununla birlikte, *D. pini* ve *L. acicola*'ya özgü primeler ile yapılan PZR'lar sonucunda, örneklerin hiç birinde bant tespit edilmemiştir.

Tespit edilen bantların, ilgili fungusa ait olup olmadığı DNA dizilemesi yapılarak kesinleştirilmiştir. NCBI'da yapılan karşılaştırma sonucuna göre örnekler, Gen bankasında bulunan *D. septosporum* ve *Lo. seditiosum*'a ait diziler ile %98 oranında benzerlik göstermiştir.

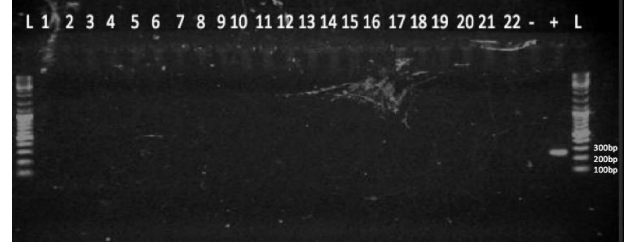
Buna göre, ibre örneklerinin toplandığı Burdur ili sınırlarındaki bu iki meşceredeki kızılçamların yalnızca *D. septosporum* ve *Lo. seditiosum* ile enfekteli oldukları, incelenen örneklerde *D. pini* ve *L. acicola* bulunmadığı anlaşılmaktadır.

Çalışma sonucunda, örneklerin toplandığı yıl esas alınarak, yer ve ibrelerin belirti gösterip göstermeme durumlarına göre elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

3.1. 2013 yılına ait bulgular

Bu yılda 90 adeti Ağlasun'dan 90 adeti Pamucak'tan olmak üzere toplam 180 ibre çifti ile çalışma yapılmıştır. Çalışmaya konu olan 4 ayrı fungus için elde edilen elektroforez jel görüntüleri incelendiğinde, 2013 yılına ait ibrelerde, *L. acicola* ve *D. pini* fungusları için herhangi bir bant oluşumu tespit edilemezken (Şekil 1,2), *D. septosporum* (Şekil

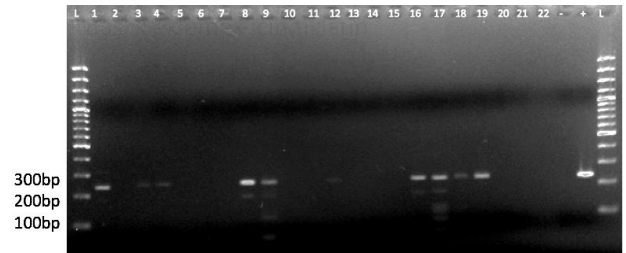
3) ve *Lo. seditiosum* (Şekil 4) fungusları için bantlar tespit edilmiştir. *D. septosporum* tespiti için gerçekleştirilen PZR'da, 200-300 bç (baz çifti) aralığında yaklaşık 230 bç uzunluğunda bantlar elde edilmiştir.



Şekil 1. 22 adet ibre örneği için, *L. acicola*'ya özgü primer çifti ile yapılan PZR sonrasında elde edilen PZR ürünlerinin elektroforez jel görüntüleri (-negatif kontrol +pozitif kontrol, sayılar örnekleri göstermektedir).

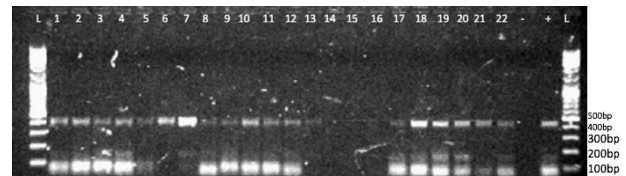


Şekil 2. 22 adet ibre örneği için, *D. pini*'ye özgü primer çifti ile yapılan PZR sonrasında elde edilen PZR ürünlerinin elektroforez jel görüntüleri (-negatif kontrol +pozitif kontrol, sayılar örnekleri göstermektedir).



Şekil 3. 22 adet ibre örneği için, *D. septosporum*'a özgü primer çifti ile yapılan PZR sonrasında elde edilen PZR ürünlerinin elektroforez jel görüntüleri (-negatif kontrol +pozitif kontrol, sayılar örnekleri göstermektedir).

Ls11-F ve Ls12-R primerleri ile[15] *Lo. seditiosum* tespiti için gerçekleştirilen PZR'da, 400-450 bç aralığında bantlar elde edilmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. 22 adet ibre örneği için, *Lo. seditiosum*'a özgü primer çifti ile yapılan PZR sonrasında elde edilen PZR ürünlerinin elektroforez jel görüntüleri (-negatif kontrol +pozitif kontrol, sayılar örnekleri göstermektedir).

Çalışma alanlarından toplanan ibrelerden elde edilen veriler meşcerelere göre kıyaslandığında Ağlasun'da *D. septosporum*'un asimptomatik ibrelerde (%62) *Lo. seditiosum*'un ise simptomatik ibrelerde (%65) daha fazla olduğu, Pamucak'ta ise *D. septosporum*'un

simptomatik ve asimptomatik ibrelerde eşit (%50), *Lo. seditiosum*'un simptomatik ibrelerde (%56) fazla olduğu gözlemlenmiştir.

Ağlasun'da 2013 yılında incelenen toplam 90 ibreden (simptom gösterip göstermemesi önemsenmeden) 16 adetinde (%17,8), *D. septosporum*, 43 adetinde ise (%47,8) *Lo. seditiosum* tespit edilmiştir. Pamucak örnek alanlarında her iki fungusun bulunma oranı Ağlasun'a göre daha fazla olup, incelenen toplam 90 ibreden 44 adetinde (%48,9) *D. septosporum*, 59 adetinde ise (%65,6) *Lo. seditiosum* tespit edilmiştir. Bu iki örnek alanda, *D. septosporum*'un bulunma oranları arasındaki fark istatistiki açıdan anlamlıdır ($X^2=19,600$, $p<0,001$), benzer şekilde alanlar arasında *Lo. seditiosum*'un bulunma oranları arasındaki fark istatistiki açıdan anlamlıdır ($X^2=5,792$, $p<0,05$). Buna göre her iki fungus da Pamucak'ta daha yaygındır.

Her iki alandan toplanan ibrelerde *D. septosporum* ve *Lo. seditiosum*'un simptomatik ya da asimptomatik ibrelerde bulunma oranları karşılaştırıldığında 2013 yılında toplanan toplam 90 adet simptomatik ibrenin %31,1'inde *D. septosporum*'a rastlanıldığı, %67,8'inde ise *Lo. seditiosum*'a rastlanıldığı tespit edilmiştir. Asimptomatik ibrelerde bu oran sırası ile, %35,6 ve %45,6'dır. Asimptomatik ve simptomatik ibrelerde *D. septosporum*'un tespit edilme oranları karşılaştırıldığında, asimptomatik ibrelerde *D. septosporum*'un daha fazla olduğu görülmektedir. Ancak yapılan Ki-kare testi bu farkın istatistiki açıdan anlamsız olduğunu göstermiştir ($X^2=0,400$, $p>0,05$). Diğer taraftan *Lo. seditiosum* simptomatik ibrelerde daha fazladır. Bu fark istatistiki açıdan %95 güven aralığında anlamlı bulunmuştur ($X^2=9,050$, $p<0,03$).

3.2. 2014 yılına ait bulgular

Bu yılda da bir önceki yıl daki gibi 90 adeti Ağlasun'dan 90 adeti Pamucak'tan olmak üzere toplam 180 ibre çifti ile çalışma yapılmıştır. Çalışmaya konu olan 4 ayrı fungus için elde edilen elektroforez jel görüntüleri incelendiğinde, 2014 yılına ait ibrelerde, *L. acicola* ve *D. pini* fungusları için herhangi bir bant oluşumu tespit edilemezken, *D. septosporum* ve *Lo. seditiosum* fungusları için bantlar tespit edilmiştir.

Çalışma alanlarından toplanan ibrelerden elde edilen verilere göre Ağlasun'da *D. septosporum*'un simptomatik (%54), *Lo. seditiosum*'un da simptomatik ibrelerde (%94), Pamucak'ta *D. septosporum*'un asimptomatik ibrelerde (%56), *Lo. seditiosum*'un simptomatik ibrelerde (%59) daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

Ağlasun örnek alanlarında 2014 yılında incelenen toplam 90 ibreden 57 adetinde (%63,3), *D. septosporum*, 32 adetinde ise (%35,6) *Lo. seditiosum* tespit edilmiştir. Pamucak örnek alanlarında

incelenen toplam 90 ibreden 43 adetinde (%47,8) *D. septosporum*, 61 adetinde ise (%67,8) *Lo. seditiosum* tespit edilmiştir. Ağlasun'da *D. septosporum*'un bulunma oranı daha yüksektir. Aradaki bu fark istatistiki açıdan anlamlıdır ($X^2=4,410$, $p<0,05$), Pamucakta ise *Lo. seditiosum*'un bulunma oranı daha yüksektir ($X^2=18,710$, $p<0,001$).

Her iki alandan toplanan ibrelerde *D. septosporum* ve *Lo. seditiosum*'un simptomatik ya da asimptomatik ibrelerde bulunma oranları karşılaştırıldığında 2014 yılında toplanan toplam 90 adet simptomatik ibrenin %55,6'sında *D. septosporum*'a rastlanıldığı, %73,3'ünde ise *Lo. seditiosum*'a rastlanıldığı tespit edilmiştir. Asimptomatik ibrelerde bu oran sırası ile, %56,6 ve %30'dur. Asimptomatik ve simptomatik ibrelerde *D. septosporum*'un tespit edilme oranları eşittir. Diğer taraftan *Lo. seditiosum* simptomatik ibrelerde daha fazladır. Bu fark istatistiki açıdan anlamlı bulunmuştur ($X^2=33,838$, $p=0,0$).

2013 ve 2014 yıllarında elde edilen verilere göre *D. septosporum*'un bulunma oranında artış gözlemlenirken, *Lo. seditiosum*'da ise azalma gözlemlenmiştir.

D. septosporum bulunma oranı, 2013 yılında %33,3'ten 2014 yılında %55,6'ya yükseldiği, yapılan Ki-kare testi sonucunda bu artışın anlamlı olduğu görülmüştür ($X^2=18,0$, $p<0,0001$). Bununla birlikte *Lo. seditiosum*'un bulunma oranında %5'lik bir azalma söz konusudur. Ancak bu azalma istatistiki açıdan anlamlı bulunmamaktadır ($X^2=0,906$, $p>0,05$).

4. Tartışma ve Sonuç

D. septosporum ve *D. pini*'nin sebep olduğu Dothistroma ibre yanıklığı, *L. acicola*'nın sebep olduğu, kahverengi leke ibre yanıklığı ve *Lo. seditiosum*'un sebep olduğu Lophodermium ibre dökülme hastalığı, dünya çapında yayılış alanları ve zararları giderek artan önemli fungal orman hastalıkları olup [4-17-18-19-20-21], DİY ve KİY etmenleri ülkemiz ve Avrupa'da karantinaya tabi zararlı organizmalardır [22]. Ülkemizde bu hastalıklardan yalnızca DİY ve LİDH'nin varlığı bilinmektedir [9]. DİY hastalığına sebep olan Dothistroma türü ise *D. septosporum* olarak teşhis edilmiştir [9,12]. Ancak bu hastalıkların yayılış alanı ve zarar boyutları henüz detaylı olarak araştırılmamıştır. Bununla ötesinde, *L. acicola* (*Scirrhia pini*), Türkiye'de, yürürlükteki Bitki Karantina Yönetmeliği'ne göre "ülkemizde varlığı bilinmeyen", *D. septosporum*, ise "ülkemizde sınırlı alanda bulunan", karantinaya tabi zararlı organizmalar listelerinde yer alırlar. Buna göre bu fungusların sebep olduğu hastalıkların güvenilir ve hızlı yöntemlerle tespiti daha da önem kazanmaktadır.

Bu hastalıkların hızlı ve güvenilir yöntemler ile tespiti ve teşhisi, gerek hastalığının yayılışının

engellenmesinde, gerekse hastalıkla bulaşık orman alanlarında hastalıkla mücadelede oldukça önemlidir. Bu sebeple, bu hastalık etmenlerinin doğrudan ibre örneklerinde tespitinde, türe özgü primerlerin kullanıldığı geleneksel PZR yöntemleri geliştirilmiştir[13, 15]. Bu hastalıkların tespitinde bu yöntemin kullanımı dünya çapında henüz yeni yeni yaygınlaşmakla birlikte, kullanıldığı çalışmalarda, daha önceden belirli bir ülkedeki ya da bölgedeki varlığı bilinmeyen bu fungusların tespit edilmesine olanak sağlamıştır[21-23-24-25-26].

Bu çalışmada, Burdur ili sınırlarında bulunan ve daha önceki çalışmalarda[9] DİY hastalığının varlığının tespit edildiği iki kızılçam meşceresinden toplam 360 adet ibre çiftinden örnekleme yapılmıştır. Toplanan ibreler semptomatik ve asimptomatik olarak gruplandırılmıştır. Bu ibre örneklerinin, *D. septosporum*, *D. pini*, *L. acicola* ve *Lo. seditiosum* ile enfekteli olup olmadıkları bu moleküler yaklaşımla ortaya koyulmaya çalışılmıştır.

Çalışmada, *D. septosporum*, *D. pini*, *L. acicola* ve *Lo. seditiosum*'a özgü primerlerin her biri ile gerçekleştirilen PZR işlemleri, kullanılan pozitif kontrollerde bant oluşumunun elde edilmesi ile başarılı bir şekilde sonuçlandırılmıştır. Buna göre, ilk olarak İsveç Tarım Bilimleri Üniversitesi'nde (İsveç, Uppsala) tekniğin öğrenilmesi amacı ile başlatılan çalışmanın, ülkemizde de kullanılabilirliği ortaya koyulmuştur. Çalışmanın ana materyalini oluşturan, her bir fungus için ayrı ayrı moleküler yöntemler ile incelenen 360 adet ibrede yalnızca, *D. septosporum* ve *Lo. seditiosum*'un varlığı tespit edilmiş, *L. acicola* ve *D. pini*'ye ise rastlanılmamıştır. Yukarıda da belirtildiği üzere, ülkemizde *L. acicola* ve *D. pini*'nin varlığı bilinmemektedir. Bu çalışmada da bu iki fungusu rastlanılmamış olması beklenen bir sonuçtur. İbrelerin toplandığı orman alanında, *D. septosporum*'un varlığı daha önceden bilinmekte idi[9]. Ancak bu alanda daha önceden *Lo. seditiosum*'un varlığı araştırılmamış ve alanda görülen belirtilerin, bu fungustan kaynaklandığından şüphelenilmemiştir. İncelenen toplam 360 adet kızılçam ibre çiftinin 160 adedinde (%44,4) *D. septosporum*'a, 195 adedinde (%54,2) *Lo. seditiosum*'a rastlanılmıştır. Semptomatik ibrelerde *D. septosporum*'un bulunma oranı %43, *Lo. seditiosum*'un bulunma oranı ise %70,6'dır. Her hangi bir belirti göstermeyen yeşil renkli ibrelerde *D. septosporum* ve *Lo. seditiosum*'un bulunma oranları sırasıyla %45,6 ve % 37,8'dir. Buna göre *Lo. seditiosum*, örneklerin toplandığı alanlarda *D. septosporum*'dan daha yaygın olup, bulunma durumu sıklıkla semptomatik ibrelerle ilişkilidir. Diğer taraftan, *D. septosporum*'un bulunup bulunmaması ibrelerin semptom durumu ile ilişkili değildir.

D. septosporum'un birçok başka ibre fungusu ile birlikte görüldüğü bilinmektedir[21,25,27]. Bu çalışmada 99 ibrede, *D. septosporum* ve *Lo. seditiosum* bir arada tespit edilmiştir. Ancak bu fungusların

birlikte bulunma durumları istatistiki açıdan anlamlı bulunmamıştır. Millberg ve ark.[21] tarafından yapılan bir çalışmada da *D. septosporum* ve *Lo. seditiosum*'un bir arada görüldüğü bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada, bu iki fungusun birlikte görülmesi durumunda, çam fidanlarının ölüm riskinin daha yüksek olduğu da ortaya koyulmuştur. Çalışmamızda, ibre örnekleri genç ağaçlardan toplanılmış olup, alanda genç fidanlar bulunmamaktadır. Fidanların bu tür hastalıklara karşı daha duyarlı olduğu bilinmektedir. Buna göre, *Lo. seditiosum* ve *D. septosporum*'un birlikte görüldüğü bu ormanlarda, bu hastalıkların yoğunluklarını azaltacak müdahalelerin yapılmaması durumunda, enfeksiyon şiddetlerinin artması ile artımın azalması yoluyla bu ormanların verimliliklerin giderek azalacağı ve ileride bu alanların gençleştirilmesinde önemli problemlerle karşı karşıya kalılabileceği ileri sürülebilir.

Yıllara göre *D. septosporum* ve *Lo. seditiosum*'un bulunma oranları da değişmektedir. *D. septosporum*'un bulunma oranının bir yıl gibi kısa bir süre içinde %22,3 oranında önemli bir artış gösterdiği anlaşılmaktadır. Nitekim Doğmuş-Lehtijärvi ark.[9] tarafından da bu hastalığın bölgede daha fazla yaygınlaşacağı ve şiddetinin artacağı bildirilmiştir. Yine Doğmuş-Lehtijärvi vd. (yayınlanmamış veri) hastalığın Antalya Orman Bölge Müdürlüğü sınırları içerisinde, Köprüçay havzasında da oldukça yaygın ve şiddetli olduğu ve bu durumun yıldan yıla ilerlediği belirtilmiştir. Watt tarafından iklimsel uygunluğa dayanan bir modellemeye[20], de ülkemizde bu hastalığın yaygınlığının ve zarar şiddetinin artacağı öngörülmektedir. Hastalığın yayılışı ve zarar şiddetinin artışında bahar ve yaz yağışları etkilidir. İklim verileri ile hastalık etmenlerinin bulunma sıklığı ve şiddeti arasındaki ilişkilerin analizi, bu çalışmada tespit edilen artışta, iklim olaylarının etkisinin ortaya koyulmasına katkı sağlayacaktır.

DİY'nın diğer dünya ülkelerinde olduğu gibi ülkemizde de ilerleyen yıllarda önemli problemlere yol açacağı Watt ve ark.[20] tarafından öngörülmüştür. Nitekim, 2013 yılında Isparta Orman Bölge Müdürlüğü, Burdur Orman İşletme Müdürlüğü sınırları içerisinde doğal ve plantasyon kızılçam sahalarında, şiddetli ve geniş alanlarda, özellikle genç ağaçları etkileyen, şiddetli ibre dökülmesi ve ibrelerde renk değişimi belirtilerinin sorumlusu olarak *D. septosporum* tespit edilmiştir. Bu hastalığın bölgede yoğun olarak bulunduğu ancak epidemilerinin belirli iklimsel olaylarla ilişkili olduğu tahmin edilmektedir. Ülkemizde hastalığın başka yörelerimizde bulunduğu dair kayıtlar[7-8] göz önünde bulundurulduğunda, DİY hastalığının ülkemizin diğer bölgelerinde de önemli zararlar yol açabileceğinin önemli bir işaretidir. Hastalıkla mücadelede kilit taşı, epidemileri tetikleyen çevresel koşullar ve konukçu özelliklerinin belirlenmesidir. Ancak bunun gerçekleştirilebilmesi için hastalık etmeninin hızlı ve güvenilir tekniklerle tespiti bir

zorunluluktur. Bu bağlamda, bu çalışma, DİY'nın ve *Lo. seditiosum*'un hızlı ve güvenilir bir şekilde moleküler yöntemlerle tespit edilebileceğini ortaya koyarak, ileride yapılması gereken çalışmalar için önemli metodolojik bir altlık oluşturmıştır.

Teşekkür

Bu çalışma, 2013-2015 yılları arasında, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Orman Mühendisliği Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak yürütülmüş ve SDÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı tarafından 4234-YL1-14'lu Proje ile desteklenmiştir. Projemizi destekleyen birime ve çalışmanın bir kısmının yürütüldüğü, İsveç Tarım Bilimleri Üniversitesi'nde çalışıldığı dönemde maddi destek sağlayan FPS COST Action FP1102 Determining Invasiveness And Risk of *Dothistroma* (DIAROD), COST projesine de ayrıca teşekkür ederiz.

Kaynakça

- [1] Gonthier, P., Nicolotti, G., (Eds.). 2013. Infectious Forest Diseases. Cabi, 441.
- [2] Bednárová, M., Dvůrák, M., Janousek, J., Jankovský, L., 2013. Other Foliar Diseases of Coniferous Trees, In, Infectious Forest Diseases. Cabi, 458-487.
- [3] OEPP/EPPO 2015. PM 7/46 (3) *Lecanosticta acicola* (formerly *Mycosphaerella dearnessii*), *Dothistroma septosporum* (formerly *Mycosphaerella pini*) and *Dothistroma pini*. EPPO Bull, 45: 163-182. doi: 10.1111/epp.12217.
- [4] Drenkhan, R., Tomešova-Haataja, V., Fraser, S., Bradshaw, R.E., Vahalik, P., Mullett, M.S., Martin-Garcia, J., Bulman, L.S., Wingfield, M.J., Kirisits, T., Cech, T.L., Schmitz, S., Baden, R., Tubby, K., Brown, A., Georgieva, M., Woods, A., Ahumada, R., Jankovsky, L., Thomsen, I.M., Adamson, K., Marçais, B., Vuorinen, M., Tsopelas, P., Koltay, A., Halasz, A., La Porta, N., Anselmi, N., Kiesnere, R.D., Markovskaja, S., Kačergius, A., Papazova-Anakieva, I., Risteski, M., Sotirovski, K., Lazarević, J., Solheim, H., Boroń, P., Braganca, H., Chira, D., Musolin, D.L., Selikhovkin, A.V., Bulgakov, T.S., Keča, N., Karadžić, D., Galovic, V., Pap, P., Markovic, M., Poljakovic Pajnik, L., Vasic, V., Ondruškova, E., Piškur, B., Sadiković, D., Diez-Casero, J.J., Solla, A., Millberg, H., Stenlid, J., Angst, A., Queloz, V., Lehtijärvi, A., Doğmuş-Lehtijärvi, H.D., Oskay, F., Davydenko, K., Meshkova, V., Woodward, S. and Barnes, I., 2016. Global Geographic Distribution and Host Range of *Dothistroma*, A Comprehensive Review. Forest Pathology, 46(2016), 408-442.
- [5] Barnes, I., Crous, P.W., Wingfield, B.D., Wingfield M. J., 2004. Multigene Phylogenies Reveal That Red Band Needle Blight of *Pinus* is Caused by Two Distinct Species of *Dothistroma*, *D. septosporum* and *D. pini*. Studies in Mycology, 50(2004), 551-565.
- [6] Brown, A.V., Webber, J.F., 2008. Red Band Needle Blight of Conifers in Britain. Edinburgh, Forestry Commission, Research Note 002, 8s, UK.
- [7] Soylu, S., Kurt, Ş., Soylu, E. M., 2001. Determination of Important Fungal Disease Agents on Pine Trees in the Kahramanmaraş Regional Forests. Journal Turkish Phytopathology, 30(2001), 79.
- [8] Özkazanç, N.K., 2004. Zonguldak Orman Bölge Müdürlüğü ormanlarındaki çam (*Pinus* spp.) ve Gökmar (*Abies* pp.)'lar da görülen fungal iğne yaprak ve sürgün hastalıkları üzerine araştırmalar. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Orman Mühendisliği Enstitü Anabilim Dalı Doktora Tezi, 200s, Zonguldak.
- [9] Doğmuş-Lehtijärvi, H.T., Lehtijärvi, A., Oskay, F., Aday-Kaya, A.G., Örtel, E., Datumani, A., 2013. *Dothistroma* Needle Blight in Turkey. Book of Abstracts; IUFRO 2013 Working Party, Foliage Shoot and Stems Diseases. Biosecurity in Natural Forests and Plantations, Genomics and Biotechnology for Biosecurity and Forestry, 20-25 May, Cerno Hora, Czech Republic, 68-69.
- [10] Bradshaw, R. E., 2004. *Dothistroma* (Red-Band) Needle Blight of Pines and the *Dothistromin* Toxin. A Review, Forest Pathology, 34 (3)(2004), 163-185.
- [11] Kais, A. G., C. E., Anderson, R. L., Hoffard, W. H., Landis, T. D., Smith, Jr., R. S., Toko, H. V., 1989. Brown Spot Needle Blight In Cordell Technichs Coordinates, Forest Nursery Pests. Agriculture Handbook 680(1989), 26-28. Washington, DC, USDA Forest Service.
- [12] Özdamar, T., Basım, E., 2002. Afyon İli Dinar İlçesinde Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) Plantasyonlarında İbre Hastalıklarına Neden Olan Etmenlerin Tespiti. SDÜ, Araştırma Fonu Projesi.
- [13] Ios, R., 2010. Development, Comparison and Validation of Real-Time and Conventional PCR Tools for the Detection of the Fungal Pathogens Causing Brown Spot and Red Band Needle Blights of Pine. Phytopathology, 100 (1)(2010), 105-114.
- [14] Stephen R. H., Langrell, 2011. Nested Polymerase Chain Reaction-Based Detection of *Dothistroma septosporum*, Red Band Needle Blight of Pine, a Tool in Support of Phytosanitary Regimes. Molecular Ecology Resources, 11(4)(2011), 749.
- [15] Stenström, E., Ihrmark, K., 2005. Identification of *Lophodermium seditiosum* and *L. pinastri* in Swedish Forest Using Species-Specific PCR

Primers From the Ribosomal ITS Region. Forest Pathology, 35(2005), 163-172.

- [16] Wagner, D. B., Furnier, G. R., Saghai-Maroo, M. A., Williams, S. M., Dancik, B. P., Allard, R. W., 1987. Chloroplast DNA Polymorphisms in Lodgepole and Jack Pines and Their Hybrids. Proceedings of the National Academy of Science, USA, 84(1987), 2097-2100.
- [17] Gibson, I. A. S., 1974. Impact and Control of Dothistroma Blight of Pines. Forest Pathology, 4(1974), 89-100.
- [18] Gibson, I. A. S., 1979. Pests and Diseases of Pines in the Tropics. Forest Pathology, 9(1979), 126-127.
- [19] Bulman, L., Ganley, R.J., Dick, M., 2008. Needle Diseases of Radiata Pine in New Zealand. Scion Client Report, 13010, Forest Biosecurity Research Council, 81 s, Rotorua, New Zealand.
- [20] Watt, M. S., Kriticos, D. J., Alcaraz, S., Brown, A. V., Leriche, A., 2009. The Hosts and Potential Geographic Range of Dothistroma Needle Blight. Forest Ecology and Management, 257(6)(2009), 1505-1519.
- [21] Millberg, H., Boberg, J., Stenlid, J., 2015. Changes in Fungal Community of Scots Pine (*Pinus sylvestris*) Needles Along a Latitudinal Gradient in Sweden. Fungal Ecology, 17(2015), 126-139.
- [22] OEPP/EPPO, 2008. Diagnostic protocol for *Mycosphaerella dearnessii* and *Mycosphaerella pini*. PM 7/46(2), Bulletin OEPP/EPPO, 38(2008), 349-362.
- [23] Adamson, K., Drenkhan, R., Hanso, M. 2015. Invasive Brown Spot Needle Blight Caused by *Lecanosticta acicola* in Estonia. Scandinavian Journal of Forest Research, 30(7)(2015), 587-593.
- [24] Piou, D., Ioos, R., 2016. First Report of *Dothistroma pini*, a Recent Agent of the Dothistroma Needle Blight, on *Pinus radiata* in France. European Journal of Plant Pathology 98(6)(2016), 841.
- [25] Millberg, H., 2015. Foliar Fungi of Scots pine (*Pinus sylvestris*). Doktora Tezi, 50s, 2015:111, Uppsala.
- [26] Matsiakh, I., Doğmuş-Lehtijärvi, H. T., Kramarets, V., Aday-Kaya, A. G., Oskay, F., Drenkhan, R., Woodward, S., 2017. *Dothistroma* spp. in Western Ukraine and Georgia. Forest Pathology (basımda)
- [27] Ortíz de Urbina, E., Mesanza, N., Aragonés, A., Raposo, R., Elvira-Recuenco, M., Boqué, R., Patten, C., Aitken, J., Iturriza, E., 2016. Emerging Needle Blight Diseases in Atlantic Pinus Ecosystems of Spain. Forests, 8(1)(2016), 18.