

Şanlıurfa peyzaj alanlarında çam ağaçlarında sürgün kurumalarına ve geriye doğru ölümlere neden olan *Alternaria alternata* etmeninin Türkiye'deki ilk kaydı

The first record of *Alternaria alternata* causing shoot drying and dieback in pine trees in Sanliurfa landscape areas in Türkiye

Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR¹, Murat DİKİLİTAŞ¹, Berfin KILINÇ¹, Eray ŞİMŞEK¹

¹Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye.

ARTICLE INFO	ÖZET
<p>Article history: Recieved / Geliş: 14.11.2023 Accepted / Kabul: 09.01.2024</p> <p>Anahtar Kelimeler: Çam <i>Alternaria alternata</i> Yanıklık Patojenisite ITS LSU</p> <p>Keywords: Pine <i>Alternaria alternata</i> Blight Pathogenicity ITS LSU</p> <p>✉ Corresponding author/Sorumlu yazar: Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR mguldur@harran.edu.tr</p> <p>Makale Uluslararası Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 Lisansı kapsamında yayınlanmaktadır. Bu, orijinal makaleye uygun şekilde atıf yapılması şartıyla, eserin herhangi bir ortam veya formatta kopyalanmasını ve dağıtılmasını sağlar. Ancak, eserler ticari amaçlar için kullanılamaz. © Copyright 2022 by Mustafa Kemal University. Available on-line at https://dergipark.org.tr/pub/mkutbd</p> <p>This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.</p> 	<p>Şanlıurfa ili peyzaj alanlarındaki çam ağaçlarında son zamanlarda sürgün yanıklığı ve geriye doğru ölümler şeklinde hastalık belirtileri görülmüştür. Bölgede bu tür hastalık belirtisi gösteren ağaçların sayısı gittikçe artmaktadır. Tipik hastalık belirtisi gösteren ağaçlardan yapılan izolasyonlar sonucunda, PDA (Patates Dekstroz Agar) besi yerinde gelişen fungal izolatların koloni ve sporlarının morfolojik gözlemlere dayalı olarak hastalık etmeninin <i>Alternaria</i> spp.'a ait olduğu belirlenmiştir. Bölge izolatları arasından seçilen temsili izolatlarla yapılan yapay inokulasyon sonucu çam fidanları üzerinde doğal enfekteli çam ağaçlarında görülen belirtilere benzer belirtiler gözlenmiş olup, fungal etmen bu dokulardan yeniden izole edilmiştir. İzole edilen fungal etmenin morfolojik tanısı Internal Transcribed Spacer (ITS) gen bölgesi (<i>ITS1-5.8S rDNA-ITS4</i>) ve large subunit (LSU) gen bölgesi (<i>NL1-NL4</i>) çoğaltılıp dizilenmesi ile moleküler olarak da teyit edilmiştir. Gen bankasına kaydedilen temsili izolatın (ITS için erişim no: OR145842; LSU için erişim no; OR616592) sekans sonucu <i>Alternaria alternata</i> izolatı ile %99.9 oranında benzerlik göstermiştir. Elde edilen morfolojik ve moleküler çalışma sonuçları <i>A. alternata</i>'nın Türkiye'de yetişen çam ağaçlarında sürgün yanıklığı ve geriye doğru ölüm hastalığı etmeni olduğu ilk kez bu çalışma ile belirlenmiştir.</p> <p>ABSTRACT</p> <p>Shoot blight and dieback disease symptoms have been observed in the landscape areas of Sanliurfa province of Türkiye recently. The number of trees showing symptoms of this type of disease is gradually spreading in the region. As a result of the isolations made from the symptomatic trees exhibiting typical disease symptoms, it was determined that the causative agent was <i>Alternaria</i> spp. based on the morphological observations of the fungal colonies and fungal structures developing on PDA (Potato Dextrose Agar) nutrient medium. Following pathogenicity test with using regional representative isolates, symptoms similar to those observed in naturally infected pine trees were observed on artificially inoculated pine saplings and the fungal agent was re-isolated from these tissues. The morphological identification of the fungal agent was confirmed molecularly by amplifying and sequencing the Internal Transcribed Spacer (ITS) gene region (<i>ITS1-5.8S rDNA-ITS4</i>) and large subunit (LSU) gene region (<i>NL1-NL4</i>). The sequence result of the representative isolate (Accession number for ITS: OR145842; accession number for LSU; OR616592) registered in the GenBank showed 99.9% similarity with <i>Alternaria alternata</i> isolate. According to results of the morphological and molecular studies, this is the first report of <i>A. alternata</i> as a causal agent of shoot blight and dieback death disease on pine trees growing in Türkiye.</p>
Cite/Atf	Güldür, M.E., Dikilitaş, M., Kılınç, B., & Şimşek, E. (2024). Şanlıurfa peyzaj alanlarında çam ağaçlarında sürgün kurumalarına ve geriye doğru ölümlere neden olan <i>Alternaria alternata</i> etmeninin Türkiye'deki ilk kaydı. <i>Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi</i> , 29 (1), 212-223. https://doi.org/10.37908/mkutbd.1390538

GİRİŞ

Yaklaşık 80 milyon hektarlık alanı ile Türkiye, ekolojik bakımdan zengin bir çeşitliliğe sahiptir (Aktan ve ark., 2017). Bu biyoçeşitlilik içinde ormanlar tür ve kompozisyon bakımından önem taşımaktadır. Ormanlık alanlar, 2015 yılı itibarı ile yapılan araştırmalara göre ülke alanının %28.6'sını oluşturmaktadır (Kahriman ve ark., 2016). Ormanlık alanın %33'lük oranını yapraklı ağaçlar (meşe, kestane, kızılğaç, gürgen, kayın gibi ağaç türleri), %48'ini iğne yapraklı ağaçlar (sedir, ladin, köknar, karaçam, kızılçam, sarıçam gibi ağaç türleri), %19'luk kısmını ise karışık ormanlar oluşturmaktadır (OGM, 2015). Ülkemiz, çam türleri açısından oldukça zengin bir yapıya sahiptir. Ülkemizde 400-2100 m yükseltilerde yer alan ve coğrafi olarak en geniş yayılışa sahip olan çam türü karaçam (*Pinus nigra* Arnold)'dır. Karaçam yetiştiriciliği özellikle Ege ve Akdeniz bölgelerinde oldukça yaygın olup dağlık ve kullanılmayan boş arazilere Orman Genel Müdürlüğü tarafından karaçam tohumu ve fidanı ekilip dikilmektedir. Karaçam, toprak ve bitki örtüsü bakımından seçici olmayıp bulunduğu bölgeye hemen uyum sağlayan bir özelliğe sahiptir. Gövdesinde derin çatlaklar ve boz renginde gövde kabukları vardır. Boyu 40 m'ye ulaşabilen ve 1 m'den fazla en oluşturabilen silindirik şeklinde düzgün bir gövdeye sahiptir. Tepe yapısı, ölçsüz bir biçimde büyümeye eğilimli olsa da yüksek mıntikalarda ve sık bitki örtüsüne sahip ormanlarda dar ve küçüktür. Genç fidanlar çabuk büyür ve her dem yeşil iğne yapraklara sahiptir. Karaçam yumuşak topraklarda kazık kök, sert ve sığ yapıya sahip olan topraklarda ise kalp kök sistemine sahiptir. Nemli, derin, ağır killi, killi-kumlu ve kumlu-killi toprak koşullarında iyi yetişir (Anonymous, 2018a).

Ormancılıkta sürdürülebilirliğin sağlanması yeterli bakım ve koruma ile mümkündür. Oksijen kaynağı bakımından önem teşkil eden ormanlarımızı mevcut hastalık ve zararlılara karşı en iyi biçimde koruyabilmek için ilk etapta onları tehdit eden tehlikeleri çok iyi bilmek ve bu tehlikelere karşı zamanında tedbirler almak gerekmektedir. Ülkemizde karaçam alanlarını tehdit eden birçok hastalık ve zararlı mevcuttur. Zararlılar olarak; çam kese böceği (*Thaumetopoea pityocampa*), sünger örücüsü (*Lymantria dispar*), çam çalı antenli yaprak arısı (*Diprion pini*), çam sürgün bükücüsü (*Rhyacionia buoliana*) ve çam solgunluk nematodu (*Bursaphelenchus xylophilus*) yaygın olarak bulunmaktadır. Zararlılardan sonra orman ağaçlarında en önemli hastalık etmeni funguslardır. Fungus, virüs ve viroid benzeri hastalık kökenine sahip etmenler; orman ağaçlarını zayıflatmak, odun dokularında, ibre, yaprak, tomurcuk, sürgün, meyve ve köklerde zarar yapmak ve öldürmek suretiyle önemli kayıplara yol açarlar. *Armillaria mellea* (bal şapkalı mantarı), çamgillerin en tehlikeli hastalıklarından biridir. *Melampsora pinitorqua* (çam sürgün bükücü pası), bilhassa sarıçamlarda oldukça geniş alanlarda etkilidir. *Lophodermium pinastri* (çam yaprak dökümü mantarı), *Peridermium pini* (çam ibre kabarcık pası) ve *Coleosporium* türleri çam ağacı ölümlerine sebep olmaktadır (Anonymous, 2018b).

Yirmiden daha fazla çam türünü enfekte eden fungal etmen *Diplodia pinea*, ilk olarak Avusturya (*Pinus nigra*) çamlarında ve İskoç (*Pinus sylvestris*) çamlarında görülmüştür (Peterson, 1981). Daha sonra 1900'lü yılların başlarından beri Amerika ve civarındaki alanlarda (rüzgar kesici ağaçlandırmalar ve park alanları) yaygınlık göstermiştir. Güney yarımkürede (Yeni Zelanda, Avustralya ve Güney Afrika) ve Kaliforniya'da *P. radiata* ile geniş ölçüde yapılan ağaçlandırma çalışmalarında bu mantar çok ciddi hastalıklar ve dolayısı ile kayıplar meydana getirmiştir (Peterson, 1981). Ülkemizde ise Kahramanmaraş bölgesinde *P. nigra*, *P. brutia* ve *P. elderica* türlerinde zarar yaptığı Orman Bakanlığı tarafından rapor edilmiştir (Sümer, 2000).

Gürel ve ark. (1993) kavaklarda *Crytodioportha populea*, *Cytospora chrysosperma*; göknarlarda *Cytospora abieti*; çamlarda *Cytospora pinastri*, *Lophodermium pinastri*; okaliptüslerde *Cytospora eucalypti*, *Endothia gyrosa*, *Endothia hawaniensis* türlerini tespit etmişlerdir. *Diplodia sapinea*, ölü sürgünler ve kozalaklar üzerinde kısa sürede piknidyum formuna dönüşerek fungal etmenin hayatta kalmasında önemli rol oynayan inokulum kaynağını oluşturmaktadır (Palmer ve ark., 1988).

Soylu ve ark. (2001) Kahramanmaraş bölgesi ormanlarındaki çam ağaçları üzerinde kurumlara sebep olan hastalık etmenlerinin belirlenmesi yönelik yaptıkları çalışmada, çamlarda sürgün ucu yanıklığı hastalık etmeni *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & Sutton (*Diplodia pinea* (Desm.) Kickx), ve Scleroderris kanseri etmeni *Gremmeniella abietina* (Lagerb.) Marelet (*Scleroderris lagerbergii* Gremmen) ve kahverengi lekeli iğne yanıklığı hastalığı etmeni *Mycosphaerella pini*'yi belirlemişlerdir. Yapılan izolasyonlar sonucunda, fungal etmenlerin kızılçam (*Pinus brutia*) ve İran çamı (*P. elderica*) üzerinde genellikle ayrı ayrı veya birlikte bulunduğu bildirilmiştir.

Türkiye'de *Cedrus libani* üzerinde kök ve sürgünlerde lezyonlara yol açan *Diplodia sapinea* adındaki fungal etmen ilk defa rapor edilmiştir (Oskay ve ark., 2018). Yine Şanlıurfa'da yürütülen bir çalışmada, çamlarda (*Pinus* spp.) sürgün ve iğne yanıklığına neden olan *Neoscytalidium dimidiatum* etmeni Türkiye'de ilk defa rapor edilmiştir (Türkölmez ve ark., 2019). Çin'de bir çam türü olan *Pinus bungeana*'nın iğne yapraklarında yanıklığa neden olan *Alternaria alternata* etmeni ilk defa rapor edilmiştir (Zhang ve ark., 2023). Soylu ve Kurt (2011) Orman fidanlarında solgunluk, kök ve kökboğazı çürüklüklerine neden olan toprak kökenli etmenlerin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmalarda *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolicola*, *Fusarium* spp.'a ait bir çok fungal hastalık etmeninin varlığını bildirmişlerdir.

Son yıllarda (özellikle son 7 yıl) çam ağaçlarında sıcaklık artışı ve kuraklık ile birlikte artan kurumaların etiyolojisinin sadece abiyotik stres etmenleri olmadığı, patojen faktörünün de önemli rol oynadığı görülmüştür (Türkölmez ve ark., 2019). Kurumalardan büyük pay sahibi olduğu düşünülen patojenin morfolojik ve filogenetik yollarla tanısının yapılması amaçlanmış, daha sonra ilgili patojenin abiyotik stres koşullarına adapte olup olmadığı incelenmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Materyal

Bu çalışma, Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji Laboratuvarında yürütülmüştür. Şanlıurfa'da çam ağaçlarının yetiştirildiği peyzaj alanlarında bulunan bitkilerden alınan örnekler çalışmanın ana materyalini oluşturmuştur. Ayrıca çalışmada çeşitli kimyasallar, alet ve cihazlar kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan örnekler hastalık belirtisi gösteren, kurumakta olan çam ağaçlarının yaprak ve sürgünlerinden alınmıştır.

Yöntem

Fungal izolasyon

Şanlıurfa ili genelinde, park ve peyzaj alanlarında hastalık belirtisi gösteren çam ağaçlarından ibrelili yaprak sürgün ve dal örnekleri toplanmıştır (Bora & Karaca, 1970). Bu örneklerden izolasyon yapmak için öncelikle PDA (Patates Dekstroz Agar) besi ortamı hazırlanmıştır. Bunun için 39 g PDA hassas terazide tartılıp cam şişede 1 L saf suyun içerisine ilave edilip homojen hale gelene kadar ısıtılarak karıştırılmış ve 121°C'de 15 dakika otoklav edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan besi ortamına 50 mg L⁻¹ antibiyotik (streptomisin) eklenip karıştırıldıktan sonra Petri kaplarına eşit miktarlarda dökülmüştür. Yüze sterilizasyonu için çam ağaçlarından alınan bitki örnekleri çeşme suyu ile durulandıktan sonra 2-4 mm'lik küçük parçalara ayrılıp %1'lik NaOCl çözeltisi içerisinde 1 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Daha sonra 3 kez saf suda durulandıktan sonra %70'lik alkole birkaç kez daldırılıp tekrar 3 kez saf suda durulandırılmıştır (Kurt ve ark., 2020). Daha sonra steril kurutma kağıdına alınan bitki parçacıkları kuruduktan sonra her petriye 5 adet olacak şekilde yerleştirilmiştir (Michaillides ve ark., 1992; Kılınc ve ark., 2022). Petri kaplarının etrafı parafilm ile sarılarak 25°C'deki inkübatörde bekletilmiştir. 7-10 günlük inkübasyon süresi sonunda petri kaplarında gelişen kolonilerin rengi, şekli ve yapısı gibi makroskobik ve pigment varlığı, konidi şekli, rengi, misel varlığı, septa oluşumu gibi mikroskobik özellikleri OLYMPUS BX5 araştırma mikroskobu aracılığıyla gözlemlenip konidi çap ve uzunlukları için 50 adet konidi sayımı yapılmıştır. Çam ağaçlarından yapılan izolasyonlar sonucunda makroskobik ve mikroskobik olarak çok sayıda birbirine benzer izolat elde edilmiş, aralarından bir tane temsili izolat

seçilmiş ve tüm çalışmalar bu izolat üzerinden devam edilmiştir.

Fungusların tek spor izolasyonu

Hastalık etmenine ait tek spordan gelişen koloniler elde etmek için PDA (Patates Dekstroz Agar) ortamında saf olarak gelişen etmeden bir iğne yardımı ile miselleri ve makrokonidileri alınıp steril saf suda karıştırılmış ve seri seyreltmeler sonucu (10^4) konidi ve misel barındıran seyreltme suyu petri kaplarına ilave edilip, besi ortamının tüm yüzeyine yayılmıştır (Soylu ve ark., 2023). Kontaminasyonu önlemek için PDA ortamına antibiyotik (streptomisin) ilave edilmiştir. Petri 5-7 gün süre ile 25°C 'de inkübasyon sürecine bırakılmıştır. Seyreltme sonrası tek spordan gelişen miselden steril bistüri ile küçük bir hif parçası alınarak gelişmek üzere PDA içeren başka bir Petri kabına aktarılmıştır. Gelişen saf kültürler patojenisite çalışmaları ve moleküler çalışmalarda kullanılmıştır.

Fungus izolatlarının saklanması

Saf olarak elde edilen *Alternaria* spp. kültürleri, PDA ortamı içeren Petri kaplarındaki Whatman kağıtlarında geliştirilmiştir. Bunun için gelişen fungal etmeden steril bistüri ile küçük bir parça alınarak steril Whatman kağıtlarının üzerine eklenmiş ve gelişmek üzere 7-10 gün boyunca 25°C 'de inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda üzeri misellerle kaplanan Whatman kağıdı steril bir pens yardımı ile ortamdan alınıp steril kabindeki Petri kaplarında kurutulmuştur. Kurutulan izolatlar steril kağıt zarflara konularak -20°C 'de muhafaza edilmiştir (Uysal ve ark., 2022).

Patojenisite testleri

Patojenisite testlerinde, kurumakta olan çam ağaçlarının sürgünlerinden alınan örneklerden elde edilen izolatlar kullanılmıştır. Sürgünlerden elde edilen her izolat için ikişer adet sağlıklı çam fidanı kullanılmıştır. Çam fidanlarının yaprakları %70'lik etanol ile dezenfekte edilerek sürgünler bir iğne ile yaralanarak, saf kültürden bu yaralara etmen inokule edilmiştir. Kontrol bitkileri ise suni olarak açılan yaralara steril iğne inokulasyonu ile oluşturulmuştur. Fidanlar, 24°C ve % 80 nem içeren iklim odasında 1 ay inkübe edildikten sonra, doğal koşullara alınmış; bu aşamada, iki ayrı fidanın üç farklı dalındaki sürgünlerine saf olarak izole edilen patojenin 10^6 spor mL^{-1} konsantrasyonu püskürtülmüştür. Kontrol bitkilerine ise saf su püskürtülmüştür (Kılınç ve ark., 2022). Daha sonra fidanlar, belirtiler açısından değerlendirmenin yapılacağı tarihe kadar doğal koşullarda sulama ve bakım işlemleri yapılarak muhafaza edilmiştir.

DNA izolasyonu

Çalışmada Ahrens ve Seemüller (1992) tarafından geliştirilen DNA izolasyon metodları küçük modifikasyonlar yapılarak hastalıklı çam ağaçlarının sürgün ve ibrelili yapraklarından izole edilen saf fungusların miselleri üzerinden CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) Buffer protokolüne göre TNA (Total Nükleik Asit) izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Berbee ve ark., 2003; Andrew ve ark., 2009). Bunun için saf olarak geliştirilen miseller Petri kaplarından bir Cork borer ile alınıp bu misel diskleri 2 ml'lik Eppendorf tüplere konulmuştur. Eppendorf tüplerin içine konulan fungus miselleri; üzerine 150 μL DNA ekstraksiyon buffer ilave edilerek steril bir plastik çubuk yardımıyla ezilmiştir. İyice ezilen misellerin üzerine 850 μL daha DNA ekstraksiyon bufferi ilave edilmiştir. Daha sonra misel ekstraktını içeren tüpler 500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden çıkartılan tüplerin süpernatant kısımlarından (üst faz) 600 μL alınarak steril Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Daha sonra bu tüpler sıcak su banyosunda 65°C 'de 30-45 dk inkübe edilmiştir. Sıcak su banyosundan çıkartılan ve fungusa ait DNA solüsyonunu içeren tüplere 600 μL kloroform izoamil alkol (24:1) solüsyonu ilave edilerek 1 dk vortex ile homojenize edilmiş ve daha sonra tüpler 12.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden çıkartılan Eppendorf tüplerinin süpernatant kısımlarından 500 μL alınarak yeni Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Eppendorf tüplerine tekrar 500 μL kloroform izoamil alkol eklenerek 1 dk vortex ile karıştırılmış ve tüpler santrifüje yerleştirilerek 12.000 rpm'de 10 dk santrifüj

edilmiştir. Santrifüjden çıkan tüplerden tekrardan süpernatant kısmından 300 µl alınmış ve yeni tüplere ilave edilmiştir. Eppendorf tüplerinin üzerine 300 µl isopropanol alkol ilave edilerek karıştırılmış daha sonra -20 °C'de 1 saat bekletilmiştir. -20 °C'den çıkartılan Eppendorf tüpleri 12.000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş ve santrifüj işleminden sonra pelet kısımları alınmıştır. Eppendorflara 1000 µl etanol (-20 °C'de %70) eklenerek 15 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Eppendorf tüplerindeki peletler daha sonra kurutma kağıdının üzerinde ters çevirilerek kurutulmuştur. Kurutma işlemi sonrasında 50 µl steril saf su veya TE tamponu tüplere ilave edilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri +4°C'de 24 saat bekletilmeye bırakılmıştır (daha sonraki kullanım için -20°C'de muhafaza edilmiştir).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Fungal izolatlar *ITS* (internal transcribed spacer) primerleri (*ITS1*: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ve *ITS4*: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White ve ark., 1990) ve *LSU* (large subunit) primerleri (*NL1*: 5'-ACCGCTGAACTTAAGC-3' ve *NL4*: 5'-TCCTGAGGGAACTTCG-3') (Vilgalys & Hester, 1990; Rehner & Samuels, 1994) kullanılarak PCR yöntemi ile tanılanmıştır. PCR işlemi Çizelge 1'de belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. Her iki gen bölgesi de aynı PCR koşullarına tabi tutulmuştur.

Çizelge 1. Çalışmada kullanılan *ITS1-ITS4* ve *NL1-NL4* primerlerinin PCR koşulları

Table 1. PCR conditions of the *ITS1-ITS4* and *NL1-NL4* primers used in the study

PCR Aşamaları	Sıcaklık	Süre (dakika)	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	95°C	3	1
Denatürasyon	95°C	1	35
Primer bağlanması	55°C	2	35
Uzama	72°C	3	35
Son uzama	72°C	10	1

PCR sonucunda çoğalan DNA'lar %1' lik agaroz jel aracılığı ile UV ışık altında kontrol edilmiştir.

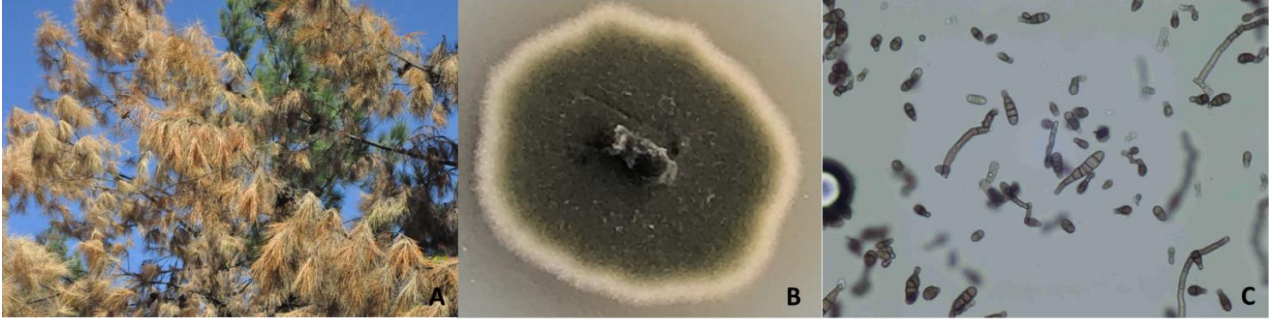
Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi için %1'lik agaroz, 1X TAE (40 mM Tris, 20 mM glacial asetik asit, 1 mM EDTA) solüsyonunda, mikrodalgada ısıtılarak çözdürülmüştür. Agaroz jel içine DNA'nın UV ışık altında görülebilmesi için 60 µl (1 mM stok) etidium bromide eklenmiştir. Jel soğuduktan sonra, solüsyon jel tankına dökülmüş, taraklar yerleştirilmiştir. Jel polimerize olduktan sonra taraklar çıkarılıp 1xTAE buffer içeren elektroforez tankına alınmış, DNA marker'leri ve örnekler yüklendikten sonra 80 voltta 80 dakika boyunca elektroforez işlemi yapılmıştır. Elektroforez süreci bittikten sonra elde edilen jel, UV Transilluminator (Daihan) cihazı ile görüntülenmiş ve çoğaltılan bant boyutları tespit edilmiştir (Galitelli & Minafra, 1994).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Fungus izolatlarının morfolojik karakterizasyonu

Bu çalışmanın amacı, Şanlıurfa'daki çam ağaçlarında kurumalara neden olan fungal patojenlerin belirlenmesidir. Yapılan arazi gözlemleri sonucu çam ağaçlarında yaprak ve sürgünlerde kuruma, dal kurumaları, dallarda yanıklık ve geriye doğru ölüm şeklindeki belirtiler gözlenmiştir (Şekil 1 ve Şekil 3A).



Şekil 1. Arazide çam ağaçlarında gözlemlenen genel kurumalar (A), izole edilen *Alternaria alternata* etmeninin Petri kabındaki misel kolonisi (B) ve etmenin mikroskoptaki görüntüsü (C)

Figure 1. General drying observed on pine trees in the field (A), mycelial colony of isolated *Alternaria alternata* in Petri dish (B) and microscope image of the isolated agent (C)

Çam ağaçlarının hastalık belirtisinin görüldüğü sürgün ve dallarından hastalığa neden olan *Alternaria alternata* türü izole edilmiştir. Geniş konukçu dizisine sahip olan *Alternaria* spp. fungusu çok sayıda saprofitik ve patojenik türden oluşmaktadır. Yapılan izolasyon sonucunda Petri ortamında fungal etmenin misel görüntüsü siyahımsı koyu yeşile çalan bir görüntü sergilemiştir (Şekil 1B). Uzun konidiosporlara sahip zincirli bölmeli ve ters armut görünümünde konidial yapılar oluşturmuştur (Şekil 1C). Miselyal yapıların görüntü ve gelişimleri, Zhang ve ark. (2023)'ün Bungeana çamı (*Pinus bungeana*)'nda rapor ettikleri *Alternaria alternata* etmeni ile uyum halinde olup etmen morfolojik olarak benzer gelişimler göstermiştir. *A. alternata*'nın hifleri kalın ve pamuksu bir yapıda olup miseller ilk başta renksizken daha sonra soluk kahverengi ve siyaha dönmüştür. Konidioforlar tek tek ayrılıp soluk kahverengi olarak gözlemlenmiştir. 50 adet konidi ölçümü sonucunda, konidilerin ortalama boy uzunluğu 88.65 µm, çap uzunluğu ise 27.10 µm olarak ölçülmüştür. Fungus, konidial ve miselyal anamorflarının teşhis kriterlerine göre *Alternaria alternata* olarak tanılanmıştır. Survey çalışmaları, izole edilen ve birbirlerine benzer izolatların morfolojik yapısının *A. alternata* ile uyumlu olduğunu göstermiştir. Koch postulatları, doğal şartlarda hastalık belirtileri gösteren çam ağaçlarından elde edilen *Alternaria* sp.'nin sağlıklı çam fidanlarında da benzer belirtilere yol açıp açmadığını saptamak amacıyla çalışmada etkili bir şekilde kullanılmıştır.

Moleküler karakterizasyon

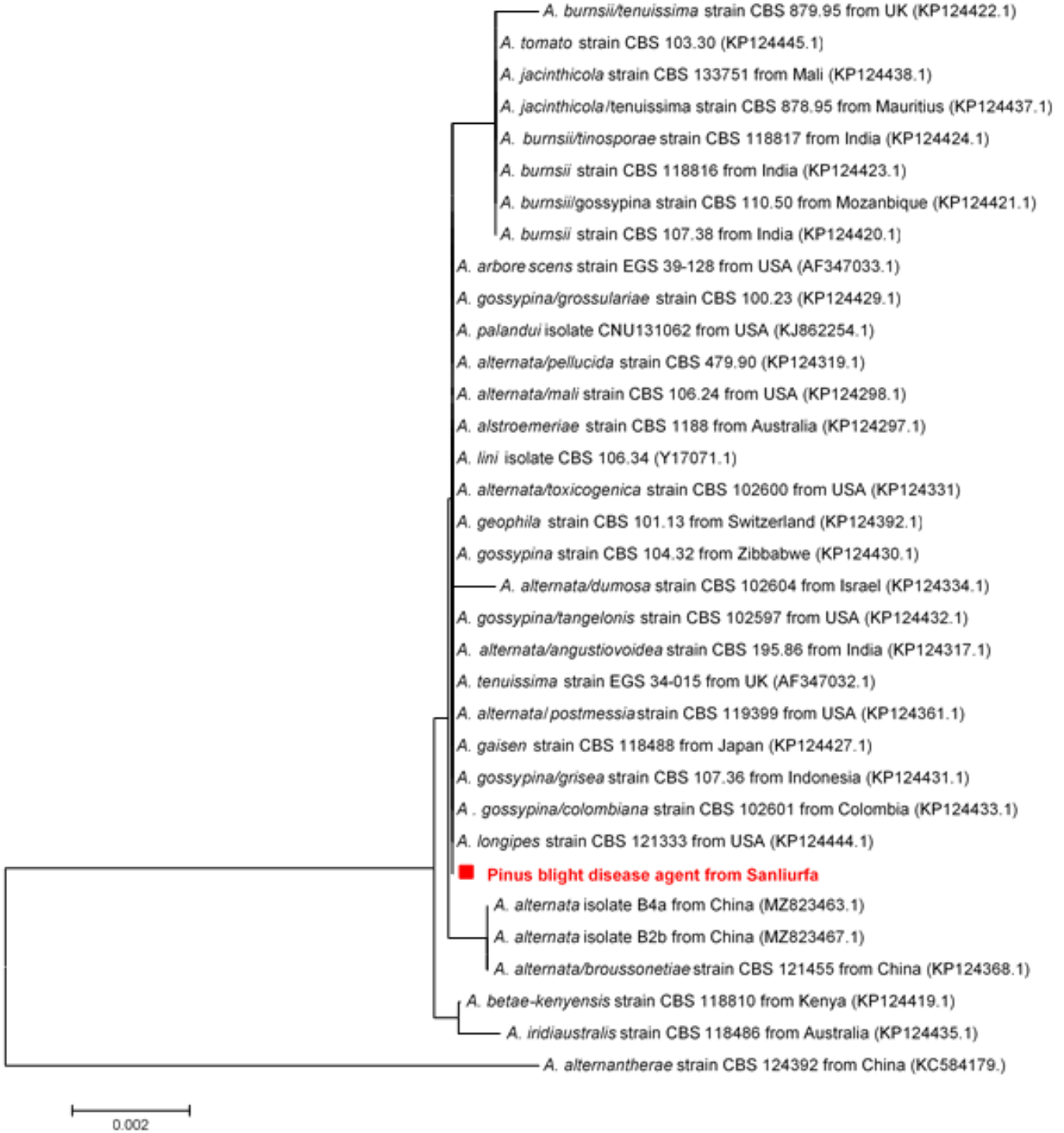
PCR çalışmalarında, *ITS* gen bölgesi için 600 bp, *LSU* gen bölgesi için 700 bp civarında bantlar gözlemlenmiştir. Moleküler analizler sonucu izolatların *Alternaria alternata* olduğu belirlenmiştir. Çam peyzaj alanlarından izole edilen *A. alternata* etmenlerinin izolatları, çift yönlü DNA sekansı için MEDSANTEK firmasına gönderilmiş ve bu izolatların hepsi BLAST analiziyle *A. alternata* etmenine %99.9 benzer bulunmuştur. Bu nedenle bu izolatlardan temsili olarak OR145842 (*ITS*) ve OR616592 (*LSU*) erişim numaralı bir izolat seçilmiş ve geri kalan çalışmalar bu izolat ile yürütülmüştür. *ITS* ve *LSU* gen bölgesi primerleri ile amplifiye edilen PCR ürünleri sekans analizi sonrası, forward ve reverse dizileri Bioedit programı (Hall, 1999) vasıtası ile birleştirilerek tek dizi haline getirilmiştir. Gerekli bazı düzenlemeler sonucunda dizilerin BLAST analizi yapılmış, daha sonra NCBI (National Center for Biotechnology Information) gen bankasındaki diğer izolatlar ile karşılaştırılması yapılmış ve izolat bilgileri Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. NCBI’da kayıtlı olan 35 *Alternaria* türünün ITS gen bölgesine ait bilgileriTable 2. ITS gene region information of 35 *Alternaria* species registered in NCBI

İzolat kodu	Tür ismi	Konukçu	Ülke	Erişim numarası
CBS 879.95	<i>Alternaria burnsii</i>	<i>Sorghum</i> sp.	United Kingdom	KP124422
CBS 103.30	<i>A. tomato</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	Netherlands	KP124445
CBS 133751	<i>A. jacinthicola</i>	<i>Eichhornia crassipes</i>	Mali	KP124438
CBS 878.95	<i>A. jacinthicola/tenuissima</i>	<i>Arachis hypogaea</i>	Netherlands	KP124437
CBS 118817	<i>A. burnsii/tinosporae</i>	<i>Tinospora cordifolia</i>	India	KP124424
CBS 118816	<i>A. burnsii</i>	<i>Rhizophora mucronata</i>	India	KP124423
CBS 110.50	<i>A. burnsii/gossypina</i>	<i>Gossypium</i> sp.	Mozambique	KP124421
CBS 107.38	<i>A. burnsii</i>	<i>Cuminum cyminum</i>	India	KP124420
EGS 39-128	<i>A. arborescens</i>	<i>Pistachio</i>	USA	AF347033
CBS 100.23	<i>A. gossypina</i>	<i>Malus domestica</i>	Netherlands	KP124429
CNU131062	<i>A. palandui</i>	<i>Cucurbita maxima</i>	Korea	KJ862254
CBS 479.90	<i>A. alternata</i>	<i>Citrus unshiu</i>	Japan	KP124319
CBS 106.24	<i>A. alternata</i>	<i>Malus sylvestris</i>	USA	KP124298
CBS 118809	<i>A. alstroemeriae</i>	<i>Alstroemeria</i> sp.	Australia	KP124297
CBS 106.34	<i>A. lini</i>	<i>linseed</i>	Ireland	Y17071
CBS 102600	<i>A. alternata</i>	<i>Citrus reticulata</i>	USA	KP124331
CBS 101.13	<i>A. geophila</i>	...	Switzerland	KP124392
CBS 104.32	<i>A. gossypina</i>	<i>Gossypium</i> sp.	Zimbabwe	KP124430
CBS 102604	<i>A. alternata</i>	<i>Citrus x tangelo 'Minneola'</i>	Israel	KP124334.
CBS 102597	<i>A. alternata</i>	<i>Citrus x tangelo 'Minneola'</i>	USA	KP124432
CBS 195.86	<i>A. alternata</i>	<i>Euphorbia esula</i>	Canada	KP124317
EGS 34-015	<i>A. tenuissima</i>	<i>pistachio</i>	USA	AF347032
CBS 119399	<i>A. alternata</i>	<i>Citrus x tangelo 'Minneola'</i>	USA	KP124361
CBS 118488	<i>A. gaisen</i>	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Japan	KP124427
CBS 107.36	<i>A. gossypina</i>	...	Indonesia	KP124431
CBS 102601	<i>A. gossypina</i>	<i>Citrus x tangelo 'Minneola'</i>	Colombia	KP124433
CBS 121333	<i>Alternaria longipes</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	USA	KP124444
Pinus-Blight63ITS*	<i>A. alternata*</i>	<i>Pinus</i> sp.*	Turkey*	OR145842*
B4a	<i>A. alternata</i>	...	China	MZ823463
B2b	<i>A. alternata</i>	...	China	MZ823467
CBS 121455	<i>A. alternata</i>	<i>Broussonetia papyrifera</i>	China	KP124368
CBS 118810	<i>Alternaria betae-kenyensis</i>	<i>Beta vulgaris</i> var. <i>cicla</i>	Kenya	KP124419
CBS 118486	<i>A. iridiaustralis</i>	<i>Iris</i> sp.	Australia	KP124435
CBS 124392	<i>Alternaria alternantherae</i>	<i>Solanum melongena</i>	China	KC584179

*Mevcut çalışmada tespit edilen türün ITS gen bölgesine ait izolat bilgileri.

Çizelge 2’de bulunan ve ITS gen bölgesi erişim numaraları aracılığıyla elde edilen diziler ile MEGA XI (MEGA_11.0.13) yazılım paketi kullanılarak filogenik ağaç oluşturulmuş ve dünyadaki *Alternaria alternata* türleri ile olan benzerlikler ve farklılıklar analiz edilmiştir (Kumar & ark., 2016). Filogenetik analizler için kullanılan izolatlar ile bu çalışmada tanısı yapılan OR145842 izolatının bir araya gelmesinden elde edilen dendogram Şekil 2’de verilmiştir. Dış grup olarak *Alternaria alternantherae* türü seçilmiştir.

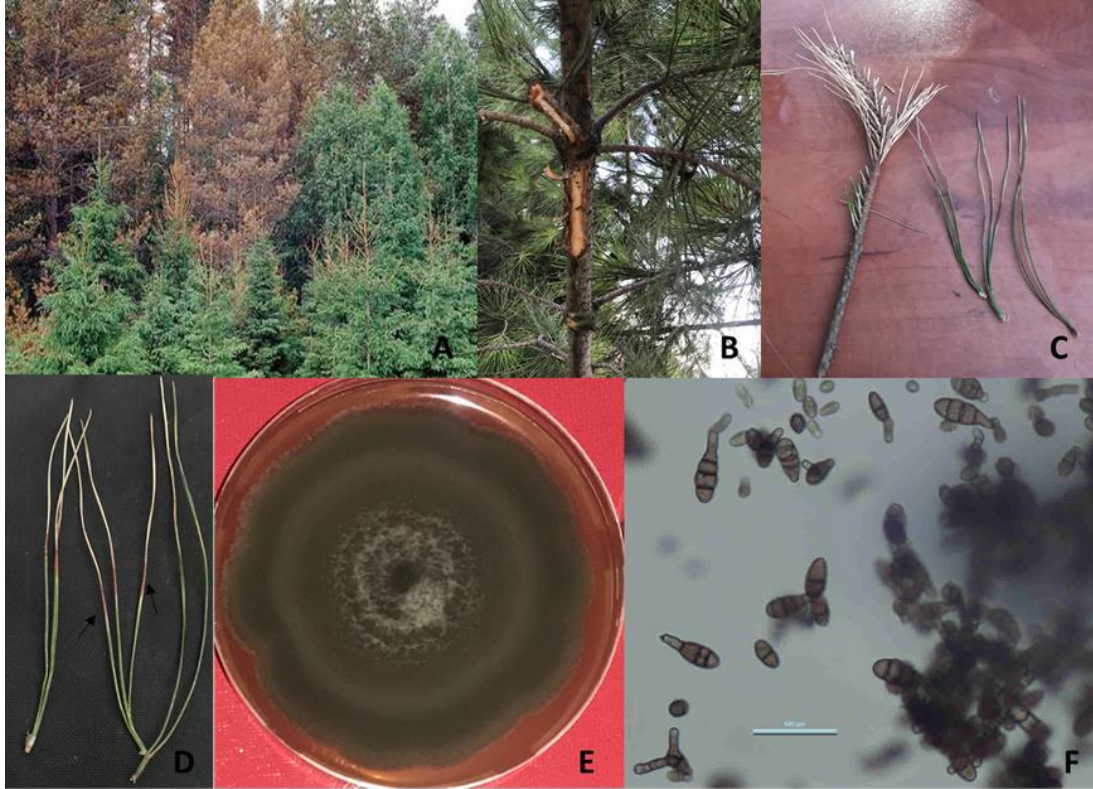


Şekil 2. Neighbour-joining methodu kullanılarak çam ağaçlarından elde edilen *Alternaria alternata* etmeninin (kırmızı işaretli izolat= OR145842) ITS gen bölgesine ait filogenetik analizi (MEGA XI programı kullanılarak yapılmıştır)

Figure 2. Phylogenetic analysis of the ITS gene region of the *Alternaria alternata* agent (red marked isolate= OR145842) obtained from pine trees using the neighbour-joining method (performed using the MEGA XI program)

Patojenisite testi ve reizolasyon

Patojenisite testi yapıldıktan 20 gün sonra inokulasyon yerlerinde kahverengi lezyonlar ve sürgün kurumaları meydana gelmiştir. Gözlemlenen belirtiler, arazide görülen belirtilere benzer yapılarda olup, kontrol bitkisinde herhangi bir belirti oluşmamıştır. Patojenisite sonucu gövdelerde görülen ilk belirtiler ve bu noktalardan elde edilen hastalık etmeni Şekil 3'te gösterilmiştir. Sera koşullarında 2 yaşındaki çam ağacı sürgünlerine sprey edilen 10^6 spor mL^{-1} yoğunluğundaki spor solüsyonu ile yapılan patojenisite çalışması sonucunda sürgün ve ibre yapraklarda kurumalar meydana gelmiştir.



Şekil 3. Arazideki çam ağaçlarında görülen geriye doğru ölüm (A); kabuk altı gövde nekrozu (B); patojenisite sonucu sürgünde görülen kuruma (C) ve ibreli yapraklarda geriye doğru kurumalar (C-D); reizolasyon sonucu *Alternaria alternata* etmenine ait Petri kabı görüntüsü (E) ve mikroskop görüntüsü (resim üzerinde $100\mu\text{m}$ 'lik bar çubuğu verilmiştir) (F)

Figure 3. Dieback observed in pine trees in the field (A); stem necrosis under the bark (B); drying of shoots as a result of pathogenicity (C); and retrograde drying of coniferous leaves (C-D); Petri (E) and microscope image of *Alternaria alternata* as a result of re-isolation ($100\mu\text{m}$ bar on the photo) (F)

İspanya'da *Pinus halepensis* üzerinde izole edilen ve geriye doğru ölüme neden olan fungal patojenler arasında en yaygın bulunan tür *Alternaria alternata* etmeni olup bunu *Leptostroma pinastri*, *Aspergillus niger*, *Diplodia pinea* ve *Phomopsis* sp. izlemiştir (Botella ve ark., 2010). Bir diğer çalışmada Meksika'da *Pinus patula* ağaçlarını hastalandıran etmenlerin tanımı yapılmış ve patojen olan etmenlerden bir tanesinin *A. alternata* oduğu tespit edilmiştir (Gutierrez-Flores ve ark., 2020). Çin'de *Pinus bungeana*'da iğne yanıklığına yol açan *A. alternata* türü rapor edilmiştir (Zhang ve ark., 2023). Yine mevcut çalışmada çam ağaçlarında yaprak ve sürgün kurumalarına yol açan *A. alternata* türü tespit edilmiştir.

Mevcut çalışmada yapılan gözlemlerde, *A. alternata* hastalık etmeninin hangi şekilde bitkiye temas ederse etsin sürgün ve nihayetinde ağaç kurumalarına yol açtığı gözlemlenmiştir. Fungal etmenin yara yerlerinde kolonize olduğu ve hastalığın seyrinde bu yaraların önemli rol oynadığı da görülmüştür. Bu nedenle ağaç budanmaları sırasında oluşan mekanik zararların hastalığın yayılmasında etkili olacağı öngörülmüştür. Yaralanmalara abiyotik stres faktörleri (dolu, don, kuraklık, sıcaklıktan dolayı gövde çatlama ve yıldırım düşmesi, vb.) yanında vektörel böceklerin penetrasyon kabiliyetine sahip olduğu da düşünülürse bu tip fungal etmenlerin daha hızlı ve etkili enfeksiyon yapabileceği göz ardı edilmemelidir. Bu etmenler ve faktörler ile mücadele edilmesi hastalığın kontrolünde etkin rol oynayacaktır.

Alternaria alternata'nın veya Botryosphaeriaceae familyasına ait olan patojenlerin de benzer etkiler oluşturduğu göz önüne alınırsa fakültatif ve saprofit patojenlerin ciddi ekonomik kayıplara yol açabileceği ve ormanlar gibi doğal varlıklarımızı tehlike altında bırakacağı öngörülmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada Şanlıurfa il genelinde parklarda ve peyzaj alanlarında son zamanlarda kurumalara yol açan hastalık etmeni izole edilmiştir. Morfolojik ve moleküler karakterizasyonlar sonucu kurumalara neden olan etmenin *Alternaria alternata* olduğu tespit edilmiştir. Yapılan literatür araştırmasında, bu hastalık etmeninin Türkiye' de çam ağaçlarında daha önce herhangi bir kaydı bulunmamakla birlikte, etmenin bölgede ve Türkiye'de çam ağaçlarında hastalık etmeni olduğu ilk defa bu çalışma ile tespit edilmiştir. Çam ağaçlarının kurumasıyla ilgili olarak bölgede yürütülmüş herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu hastalık etmeninin daha önce Çin'de yetişen çamlarda görüldüğü bildirilmiştir (Wang & Guo, 2007; Zhang ve ark., 2023). Mevcut çalışma ile ağaçların kurumasına neden olan biyotik etmenin araştırılması, belirlenmesi ve hastalıkla mücadele olanaklarının geliştirilmesinde önemli bir adım atılmıştır. Çam ağaçlarında sorun teşkil eden bu hastalık etmeninin hastalık şiddeti ve hastalık indekslerinin belirlenmesi hakkında nasıl bir mücadele metoduna başvurulması gerektiği hakkında ilk aşama tamamlanmıştır. Bitkinin savunma mekanizmasının özellikle biyokimyasal tepkilerinin belirlenmesi hem çevre sağlığı hem de dayanıklı türlerin geliştirilmesi için önemli bir kriter olacaktır.

TEŞEKKÜR

Yazarlar çalışmadaki katkılarından dolayı Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP)'ne (Proje no: 18428) teşekkür ederler.

ÇIKAR ÇATIŞMA BEYANI

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

ARAŞTIRMACILARIN KATKI ORANI BEYANI

Çalışma, birinci ve üçüncü yazar tarafından yürütülmüş, üçüncü yazar makaleyi yazmış, dördüncü yazar moleküler çalışmalarda yardımcı olmuş, ikinci yazar makaleyi okumuş ve gerekli düzeltmelerde bulunmuştur.

ETİK ONAY BEYANI

Bu makalede insan veya hayvan deneklerle herhangi bir çalışma bulunmaması nedeniyle etik onaya gerek duyulmamaktadır.

KAYNAKLAR

- Ahrens, U., & Seemüller, E. (1992). Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16 S rRNA gene. *Phytopathology*, 82 (8), 828-832.
- Aktan, M., Çimen, N., & Özçelik, Y. (2017). Madencilik amaçlı orman izinlerinin Türkiye ve dünyadaki mevzuat uygulamalarının karşılaştırılması. 25. *Uluslararası Madencilik Kongresi ve Sergisi*, 11-14, Antalya, Türkiye.

- Anonymous (2018a). <https://www.camagaci.gen.tr/karacam.html>
- Anonymous (2018b). <https://ormuh.org.tr/uploads/docs/Orman%20zararilari%20ve%20mucadelesi.pdf>
- Bora, T., & Karaca, İ. (1970). *Kültür bitkilerinde hastalığın ve zararın ölçülmesi*. Ege Üniversitesi Yardımcı Ders Kitabı, 167, 8.
- Botella, L., Santamaría, O., & Diez, J.J. (2010). Fungi associated with the decline of *Pinus halepensis* in Spain. *Fungal Diversity*, 40, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0025-5>
- Gallitelli, D., & Minafra, A., (1994). Electroforesis. Course on Plant Virus Diagnosis, 89-99 p., Adana-Türkiye.
- Gutierrez-Flores, L.M., Mauricio-Gutierrez, A., Carcano-Montiel, M.G., Portillo-Manzano, E., Gomez-Velazquez, L., Sanchez-Alonso, P., & Lopez-Reyes, L. (2020). Fungi associated with sick trees of *Pinus patula* in Tetela de Ocampo, Puebla, Mexico. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 53 (13-14), 591-611. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1778241>
- Gürel, M., Kocatürk, S., & Maden, S. (1993). Önemli Orman Ağaçlarında Görülen Gövde ve Dal Kanseri. I. Ormancılık Şurası, 1-5 Kasım 1993, Tebliğler ve Ön Çalışma Grubu Raporları, Ankara, 3 (13), 73-179.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-8.
- Kahriman, A., Kumaş, G., Yılmaz, S., Sönmez, T., Yavuz, M., Şahin, A., & Uzun, M. (2016). Antalya ve Mersin Yöresi saf Kızılcım meşcerelerinde hasılat araştırmaları. 1120808 Nolu Proje Raporu.
- Kılınç, B., Güldür, M.E., & Dikilitaş, M. (2022). Şanlıurfa ilinde Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) ağaçlarında *Neoscytalidium novaehollandiae*'nin bulaşıklık oranının belirlenmesi, morfolojik ve genetik karakterizasyonu. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 26 (1), 25-39. <https://doi.org/10.29050/harranziraat.1028027>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGAX: Molecular evolutionary genetics analysis version 10.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33 (7), 1870-1874.
- Kurt, Ş., & Soylu S. (2011). Orman fidanlarında solgunluk, kök ve kökboğazı çürüklüklerine neden olan toprak kökenli etmenlerin belirlenmesi. *Türkiye 1. Orman Entomolojisi ve Patolojisi Sempozyumu*, 23-25 Aralık 2010, Antalya, 287-288.
- Kurt, Ş., Soylu, S., Uysal, A., Soylu, E.M., & Kara, M. (2020). Ceviz gövde kanseri hastalığı etmeni *Botryosphaeria dothidea*'nin tanılanması ve bazı fungusitlerin hastalık etmenine karşı *in vitro* antifungal etkinliklerinin belirlenmesi. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 25(1), 46-56. <https://doi.org/10.37908/mkutbd.686111>
- Michailides, T.J., & Morgan, D.P. (1992). Control of Alternaria Late Blight of Pistachio by Skipping One "Critical" Irrigation and by Applying Organic Fungicides. California Pistachio Industry Annual Report, Crop Year 1992-1993, 80-92.
- Orman Genel Müdürlüğü. (2015). Türkiye Orman Varlığı. www.ogm.gov.tr
- Oskay, F., Lehtijarvi, A., Dogmus-Lehtijarvi, H.T., & Woodward, S. (2018). First report of *Diplodia sapinea* on *Cedrus libani* in Turkey. *New Disease Reports*, 38 (1), 13. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2018.038.013>
- Palmer, M.A., Mc Roberts, R.E., & Nicholls, T.H. (1988). Sources of inoculum of *Sphaeropsis sapinea* in forest tree nurseries. *Phytopathology*, 78, 831-835.
- Peterson, G.W. (1981). *Diplodia* Blight of Pines, Forest Insect and Disease Leaf let 161, U.S. Agriculture Forest Service. www.na.fs.fed.us/spfo/pubs/fidls/diplodia/diplodiafidl.htm
- Rehner, S.A., & Samuels, G.J. (1994). Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research*, 98 (6), 625-634.
- Soylu, S., Kurt, Ş., & Soylu, E.M. (2001). Kahramanmaraş bölgesi ormanlarındaki çam ağaçları üzerinde sorun olan önemli fungal hastalıkların belirlenmesi. *Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi*, 3-8 Eylül 2001, Tekirdağ, 385-391.

- Soylu, S., Atay, M., Kara, M., Uysal, A., Soyly, E.M., & Kurt, Ş. (2023). Morphological and molecular characterization of *Fusarium incarnatum* as a causal disease agent of pepper (*Capsicum annuum*) fruit rot. *Journal of Phytopathology*, 171, 688-699. <https://doi.org/10.1111/jph.13228>.
- Sümer, S. (2000). Orman Bakanlığı Makamına Kahramanmaraş Yöresi İçin Hazırlanan Rapor. İstanbul.
- Türkölmez, Ş., Derviş, S., Çiftçi, O., & Dikilitas, M. (2019). First report of *Neoscytalidium dimidiatum* causing shoot and needle blight of pines (*Pinus* spp.) in Turkey. *Plant Disease*, 103 (11), 2960-2961. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-19-0964-PDN>
- Uysal, A., Kurt, Ş., Soyly, S., Kara, M., & Soyly, E.M. (2022) Hatay ilinde yer alan turunçgil paketleme tesislerinde meyve ve hava kökenli mikrobiyaya içerisindeki fungal ve bakteriyel türler ile yoğunluklarının belirlenmesi. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 27 (2), 340-351. <https://doi.org/10.37908/mkutbd.1095692>
- Vente, J., Verduyn, R., Verstraeten, G., Vanmaercke, M., & Poesen, J. (2011). Factors controlling sediment yield at the catchment scale in NW Mediterranean geoecosystems. *Journal of Soils and Sediments*, 11, 690-707. <https://10.1007/s11368-011-0346-3 launch>
- Vilgalys, R., & Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172, 4238-4246. <https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4238-4246.1990>
- Wang, Y., & Guo, L.D. (2007). A comparative study of endophytic fungi in needles, bark, and xylem of *Pinus tabulaeformis*. *Canadian Journal of Botany*, 85, 911-917. <https://doi.org/10.1139/B07-084>
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, pp. 315-322. Academic Press: San Diego, U.S.A.
- Zhang, M-J., Zheng, X-R., Li, H., & Chen, F-M. (2023) *Alternaria alternata*, the causal agent of a new needle blight disease on *pinus bungeana*. *Journal of Fungi*, 9 (1), 71. <https://doi.org/10.3390/jof9010071>