

## ANNOSUM KÖK ÇÜRÜKLÜĞÜNE KARŞI UYGULANAN BİYOLOJİK KONTROL AJANI: *Phlebiopsis gigantea*

H. Tuğba DOĞMUŞ-LEHTİJÄRVİ<sup>1</sup>, Asko LEHTİJÄRVİ<sup>1</sup>, A. Gülden ADAY<sup>1</sup>, Funda OSKAY<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Orman Fakültesi, 32260 Isparta, tugba@orman.sdu.edu.tr

### ÖZET

*Heterobasidion annosum* kompleksinde yer alan ve kök ve alt gövde çürüklüğüne neden olan türler, Avrupa ve ülkemiz konifer ormanlarında önemli kayıplara yol açmaktadır. Hastalık etmeni tarafından neden olunan zararın ekonomik boyutu endişe verecek düzeyde olduğundan, *Heterobasidion* türleri ile kimyasal ve biyolojik mücadele yöntemlerinin belirlenmesi, birçok ülkede öncelikli çalışma konularının arasında yerini almıştır. Fungal etmen, işletme ormanlarında, yeni kesilmiş kütük yüzeyine ulaştıktan sonra, buradan civardaki ağaçların kök sistemlerine, oradan da gövde içlerine kadar ilerlemektedir. Patojenin çevredeki ağaçlara yayılışında izlemiş olduğu rotadan yola çıkarak, hastalığın engellenmesinde kesilmiş kütüğe yapılan uygulamalar önem kazanmıştır. Bu amaçla Kuzey Yarımküre' de yer alan tüm ılıman ülkelerde, *Heterobasidion annosum* sensu lato'ya karşı yer ve besin çekişmesinde klasik bir antagonist olarak dünya literatürüne geçen *Phlebiopsis gigantea* Fr. Jül., biyolojik mücadele etmeni olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. *P. gigantea*' nin ülkemiz koşullarında *H. annosum* s.l.'ya karşı kullanılma olanaklarını ortaya koymak üzere başlatmış olduğumuz bu çalışmada, ilk olarak Antalya- Akseki kızılçam tenzil sahasında, kızılçam kütük yüzeylerindeki üreme yapılarından elde edilen, *P. gigantea* izolatları arasındaki akrabalık dereceleri, moleküler yöntemlerle belirlenmeye çalışılmıştır. Sonuç olarak, aynı bölgeden elde edilen *P. gigantea* izolatları arasında yüksek düzeyde polimorfizmin olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Heterobasidion annosum* s.l., *Phlebiopsis gigantea*, biyolojik kontrol, genetik varyasyon, M13

### ABSTRACT

Members of *Heterobasidion annosum* species complex cause root and butt rot, which has led to significant losses in conifer forests throughout Europe as well as in Turkey. Due to the high economical losses, chemical and biological control methods against *Heterobasidion* have been developed. As one of the main routes of infection in managed forests is fresh thinning stumps, from which the fungus spreads to neighboring standing trees via root contacts, the efforts have focused on stump treatments. One of the most successful treatments has been the application of the biological control agent *Phlebiopsis gigantea* (Fr.) Jülich on the fresh stump surfaces after felling the trees. This basidiomycete colonizes the stumps rapidly preventing the growth of *Heterobasidion*. Due to this feature, converted into biopreparate, *P. gigantea* is widely used against *Heterobasidion* in Finland, Sweden and other European countries. In the present study, genetic variation among *P. gigantea* isolates obtained from fruiting bodies on *Pinus brutia* Ten. stumps in a single stand was investigated. The molecular markers showed a high level of polymorphism among the isolates.

Key words: *Heterobasidion annosum* s.l., *Phlebiopsis gigantea*, biological control, genetic variation, M13

## 1. GİRİŞ

*Heterobasidion annosum* kompleksinde yer alan türler, Avrupa ve ülkemiz ormanlarında önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Kuzey Yarımküre' de yer alan tüm ılıman ülkelerde, özellikle ibreli ağaçlarda oldukça tahripkâr bir hastalık etmenidir. Etmenin oluşturduğu çürüklük, kök ve kök boğazından başlayarak, gövde içlerine kadar

ilerlemekte ve son aşamada gövde odunu faydalanılamaz duruma gelmektedir (Stenlid ve Westerlund, 1986; Doğmuş-Lehtijärvi vd., 2006). Ormancılık sektöründe hastalık etmeni tarafından neden olunan zararın ekonomik boyutu endişe verecek düzeyde olduğundan, *Heterobasidion* türlerinin özellikleri, biyolojik ve ekolojik istekleri ile bu patojene karşı alınabilecek kontrol yöntemleri tüm dünyada öncelikli çalışma konularından olmuştur. Hastalık etmeninin zararı, biyolojik ve kimyasal metotlarla etkili bir şekilde kontrol altına alınabilmektedir. Biyolojik mücadelede kullanılan diğer bir fungus, *Phlebiopsis gigantea* (Fr.) Jülich (Basidiomycota, Corticiaceae; syn. *Peniophora gigantea*, *Phanerochaete gigantea*, *Phlebia gigantea*), konifer ormanlarında devrik ağaç gövde ve kütüklerinde, diğer odun artıklarında sıklıkla rastlanan bir türdür (Holdenrieder ve Grieg, 1998). Saprotrofik yaşam sürecinde, koniferlerde kök ve alt gövde çürüklüğüne neden olan *Heterobasidion annosum* sensu lato ile aynı substrat üzerinde yer ve besin çekişmesine girmekte ve bu özelliği ile orman ağacı hastalıklarına karşı kullanıla gelen, en başarılı antagonist olarak dünya literatürüne geçmiş bulunmaktadır (Meredith, 1959; Kallio, 1965; Greig, 1976; Rönnberg vd., 2006).

Saprotrofik özellikteki fungus, çoğunlukla koniferlerin yeni kesilmiş taze kütük yüzeyini tercih etmekte ve alışlagelmiş tarzda beyaz çürüklüğe neden olmaktadır. *P. gigantea*'nin, konifer kütükleri üzerindeki etkili kolonizasyonundan ötürü, Kuzey Yarımküre' de konifer ormanlarının ekonomik yönden en önemli ve tahripkar hastalık etmeni; *H. annosum*' a karşı biyopreparat haline dönüştürülmüş ve hastalığı önlemede başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Rishbeth, 1963; Greig, 1976; Korhonen vd., 1994; Holdenrieder ve Greig, 1998; Pratt vd., 2000; Annesi vd., 2005; Berglund vd., 2005; Nicolotti ve Gonthier, 2005; Vainio, 2008).

Tek yıllık üreme organlarına sahip olan *P. gigantea*, basidiosporları sayesinde yüzlerce kilometrelerce uzağa taşınabilmektedir (Rishbeth, 1959). Bu nedenle, traşlama kesimini takip eden yılda, kesik kütük yüzeyinde farklı genetik özelliğe sahip *P. gigantea* bireyleri bulmak mümkündür (Annesi vd., 2005). Substrata yapışık haldeki üreme yapıları, 0,5 mm kalınlığında, derimsi parçacıklar halindedir. Taze iken grimsi- beyaz harelili saydam, mumsu yapıda üreme organları ile arazide kolaylıkla tanınırlar. Yaşlandığında kenar kısımlarından içeriye doğru kıvrılır. Basidiosporlar, olgun üreme organlarından salınır ve hava akışına bağlı olarak hareket ederler. Sporların bu sayede çok geniş bir alana yayıldığı bildirilmiştir. Sporulasyon aşırı sıcak ve soğuk koşullar altında azalmakta, ılıman iklimlere sahip ülkelerde yılın tüm aylarında devam etmektedir. *P. gigantea* oidia adı verilen eşeysiz sporlara sahiptir. Saf kültürde, zincir şeklindeki oidia sporları, havai hifleri ve çoklu kanca oluşumu ile kolaylıkla teşhis edilebilmektedir. Çam ve ladin kütüklerinde *H. annosum* s.l. kolonizasyonunu engellemek amacıyla kullanılan da *P. gigantea* 'nin oidia sporlarıdır (Piri, 1996; Varese vd., 1999; Piri, 2003).

Laboratuar koşullarında gerçekleştirilen denemelerde, Avrupa ve Kuzey Amerika *P. gigantea* popülasyonlarının birbirleri ile eşleşmediği tespit edilmiştir (Korhonen ve Kauppila, 1988; Korhonen ve Stenlid, 1998). Klasik yöntemlere paralel olarak, RAMS parmak izi metodu ile gerçekleştirilen moleküler analizlerde, Avrupa ırkları arasında polimorfizmin yüksek düzeyde olduğ u, ancak bölgeler kendi içlerinde incelendiğinde, herhangi genetik bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Böylece biyolojik kontrol etmeni olarak kullanılan *P. gigantea*'nin, genetik çeşitliliği ile ilgili birçok detaylı araştırma yapılmıştır.

Bu çalışmaların çoğunda, farklı izolatların aralarındaki genetik farklılığın incelenmesi için rastgele amplifike olan polimorfik DNA ya da rastgele amplifike olan mikrosatellit markörlerinden faydalanılmıştır (Roy vd., 1997; Vainio vd., 1998; Vainio ve Hantula, 2000;

Vainio vd., 2001; Grillo vd., 2005). Bu çalışmada da, Antalya- Akseki yöresinden elde edilen *P. gigantea* izolatlarının, genetik yakınlıkları, mikrosatelit yöntemlerinden biri olan ve günümüzde yaygın olarak kullanılan M13 ve RAMS mikrosatelit yöntemi ile belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçların *P. gigantea* ile yapılan diğer çalışmaların sonuçlarına ne derece uyum gösterdiği tartışılmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Materyal

Çalışmamızda fungal materyal olarak, Akseki Orman İşletme Müdürlüğü sınırları içerisinde yer alan kızılçam tenzil sahalarındaki kesik kütük yüzeylerinden elde edilen 10 adet *P. gigantea* izolatu test edilmiştir. Mikrosatelit analizlerinin materyalini *P. gigantea* izolatlarına ait DNA'lar, Tsq polimeraz (Biobasic), dNTP'ler (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2x PCR Master mix (Biobasic) ve primerler (tek iplikli oligonükleotidler; M13 ve CGA) oluşturmaktadır. Nükleik asitlerin amplifikasyonunda Bio Rad Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır.

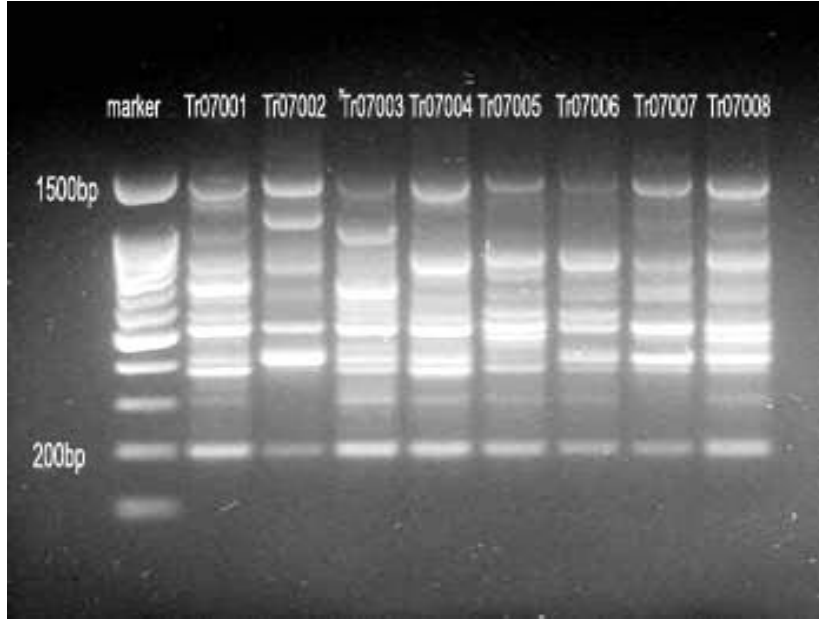
### 2.2. Metot

*P. gigantea* izolatları, üzerinde selofan membran bulunan % 2'lik malt extract agar besi ortamına aşılanarak, 10 günlük süre ile inkube edilmiştir. Bu sürenin sonunda besi ortamında gelişen miseller, selofan membran üzerinden kazınarak, eppendorf tüpleri içerisinde aktarılmış ve DNA izolasyonunu yapıncaya kadar -20 °C' de muhafaza edilmiştir. Dondurularak kurutulan miseller, porselen havan içerisinde, sıvı azot ile ezilerek toz haline getirildikten sonra, Qiagen DNeasy Plant Mini kit kullanılarak, DNA'ları ekstrakte edilmiştir.

İzole edilen genomik DNA'lar M13 ve CGA primeri kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Toplam 50 µl reaksiyon hacminde; Tris-HCl 10 mM, pH 8; dNTPs 0,2 mM; MgSO<sub>4</sub> 2 mM; Tsq polimeraz 1,25 U; primer (M13) 2 µM; yaklaşık 10 ng hedef DNA yer almıştır. Amplifikasyonlar, M13 primeri için; başlangıç denatürasyonundan (95°C'de 10 dk) sonra, 95 °C' de 30 saniye, 48°C' de 1 dk ve 72 °C' de 2 dk olacak şekilde 37 döngüden ve son sentez döngüsünden (72°C'de 10 dk) oluşurken, CGA primeri için; başlangıç denatürasyonundan sonra, 95 °C' de 30 saniye, 61°C' de 45 saniye ve 72 °C' de 2 dakika olacak şekilde 37 döngü ve son sentezleme döngüsünden oluşmuştur.

PCR ürünlerinin ayrıştırılmasında, % 1,5 'lik agaroz, TAE buffer, 100bp Plus DNA Marker (Promega), reaksiyon ürünü, yükleme tamponu (Loading), Agaroz jel tankı (Bio Rad Power) ve güç kaynağı kullanılmıştır. Jeldeki DNA bantları, ethidium bromid ile boyandıktan sonra, UV Transilluminatör altında görüntülenerek, fotoğraflandırılmıştır.

Jel görüntülemesi sonucunda sonra fotoğraflarda net olarak ayırt edilebilen bantlar değerlendirilmeye alınmıştır. Bireyler arasındaki genetik farklılık belirlenirken, markörlerin varlığı (1) ve yokluğu (0) bakılarak yapılmış ve benzerlik matrisi oluşturulmuştur. Oluşturulan benzerlik matrisi Arlequin 3.1 programında değerlendirilmiştir.



Şekil 1. CGA primeri ile elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

## 2. BULGULAR

Çalışmada kullanılan her iki primerden de polimorfik bantlar elde edilmiştir. PCR amplifikasyonu sonucunda toplamda 20 bant elde edilmiş olup, bant uzunlukları 200- 1300 bp arasında değişmektedir. Skorlanma sonucunda, 370 ile 790 bp arasındaki büyüklüklerdeki bantlar, izolatlar göre farklılık gösterirken, 200, 300, 500 ve 1300 bp büyüklükte olduğu tespit edilen bantların tüm izolatlarda bulunduğu belirlenmiştir. Tr07004 izolatu diğer izolatlardan farklılık gösterirken, Tr07009 ve Tr07010 izolatlarının tamamıyla aynı bant düzenine sahip olduğu görülmektedir.

*P. gigantea'* ya ait tüm izolatlarda iki adet ortak bant bulunurken, diğer markörler izolatlar arasında dağılım göstermiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. M13 ve CGA ile çoğaltılan *P. gigantea* izolatlarının var/ yok (1/0) skorlaması

İzolat No	Markör <sup>a</sup>
Tr07001	11100011111111100
Tr07002	00000010000011101
Tr07003	10111011011100010
Tr07004	11100111011010100
Tr07005	10111011011011100
Tr07006	10100010011011100
Tr07007	00100111011011100
Tr07008	10111011111011111
Tr07009	10100011011010100
Tr07010	10100011011010100

Her bir izolattaki markörlerin var (1) ya da yok (0) olma durumları.

<sup>a</sup> Band büyüklükleri soldan sağa doğru sırasıyla  
M13- 350, 370, 400, 430, 450, 470, 500, 530,  
CGA-590,630,670,700,  
M13- 790,830,900,950,1050bp

Çizelge 2. *P. gigantea* izolatları arasındaki genetik farklılığı gösteren Moleküler Varyasyon Analizi sonuçları (AMOVA)

Varyasyon kaynağı	d.f.	Kareler toplamı	Varyasyon içeriği	Varyasyon yüzdesi
Popülasyon içinde	7	20.133	2.87619 vb	112.53
FST(fiksasyon indeksi: $p(\text{rand. value} > \text{obs value}) = 0,87781$ $P(\text{rand. Value} = \text{obs. Value}) = 0.00978$				

Moleküler varyans analizi çizelgesine bakıldığında (Çizelge 2) aynı popülasyona ait *P. gigantea* izolatları arasında % 112 oranında genetik farklılık olduğu görülmektedir. İstatistiksel veriler incelendiğinde, izolatlarda toplam 20 adet lokusa ve 24 adet ise polimorfik özellikte lokusa rastlanmıştır (Çizelge 3).

Çizelge 3. AMOVA analizinde değerlendirmeye alınan verilerin istatistikleri

İstatistikler	Akseki popülasyonu	Standart sapma
Gene kopya sayısı	10	1.528
Toplam Lokus sayısı	20	0.000
Analize alınan lokus sayısı	20	0.000
Polimorfik lokus sayısı	24	8.000

#### 4. TARTIŞMA

*P. gigantea* konifer ormanlarında oldukça yaygın ve bulunduğu ortama kolay adapte olan bir türdür ancak, *Heterobasidion* ve *Armillaria* türleri gibi geniş alanlara dağılım gösteren genetik türler oluşturmamaktadır (Korhonen vd., 1994). Yeni kesilmiş bir kütük yüzeyinde, genetik olarak farklılık gösteren onlarca ya da yüzlerce bireye rastlamak mümkündür (Korhonen ve Kauppila, 1988; Vainio, 2008). Bundan ötürü, çalışmamızda *P. gigantea* izolatlarının aynı meşcereden elde edilmesine rağmen, izolatlar arasında genetik farklılığın bulunması, mevcut bilgiyi doğrulayan bir sonuç olmuştur. *P. gigantea*'den hazırlanan biyopreparatın, fungusun sadece bir ya da iki irkına ait olması, sürekli olarak doğaya verilen aynı irkin, ekosistemde hali hazırda var olan *P. gigantea* popülasyonları

arasındaki genetik varyasyonun daralmasına dolayısıyla, bireyler arasındaki polimorfizmin azalmasına neden olmaktadır (Vainio, 2008). Rotstop üzerinde yapılan çalışmalar, bu durumun izolatların genetik çeşitliliği üzerine henüz bir tehdit oluşturmadığını göstermiştir (Vainio vd., 2001). Bunun yanında, *P. gigantea* popülasyonları içinde rastlanan yüksek orandaki genetik varyasyon, daha fazla sayıda izolatin biyolojik kontrol etmeni olarak denenme şansını da arttırmaktadır (Vainio vd., 2001).

Aynı yöreden toplanan izolatların arasında tespit edilen genetik farklılık, bu izolatların biyolojik kontrol etmeni olarak kullanıldığında hastalığı engellemedeki etkinliklerinin farklı olabileceğini düşündürmektedir. Vainio ve Hantula, (2000) çalışmalarında, Kuzey Amerika ve Avrupa' dan elde edilen *P. gigantea* izolatlarını, DNA parmak izi ve rastgele çoğaltılmış mikrosatelit yöntemi ile analiz ederek, ırklar arasındaki melezlenmeye bakılmaksızın, Kuzey Amerika ve Avrupa popülasyonları arasında genetik farklılık bulunduğunu bildirmişlerdir. Grillo ve arkadaşlarının (2005) çalışmalarında ise, tüm Kuzey Amerika ırkları araştırılmış ve bu ırkların bir ya da birden fazla Avrupa ırkı ile eşleştğinde mezlelenebildiğini, kıtalar arası eşleşme sonucu elde edilen melezleme oranının, kıta içinde olandan daha düşük olduğunu belirtmişlerdir. Buna ek olarak, Kuzey Amerika' da *P. gigantea*' ye ait farklı intersteril grupların varlığına dair bir kanıt rastlamadıklarını bildirmişlerdir.

Vainio, 2008 yılında gerçekleştirdiği çalışmada, yedi farklı Avrupa ülkesinden elde edilen *P. gigantea* izolatları arasındaki varyasyonu, Rastgele Çoğaltılan Mikrosatelit (RAMS) markörleri kullanılarak incelemiş ve izolatlar arasında genetik farklılığın belirlendiğini ancak daha fazla sayıda markör kullanılarak bu farklılığın kesinleştirilebileceğini belirtmiştir. Bizim çalışmamızda aynı bölgeden elde edilen izolatların genetik olarak birbirlerinden farklı olmaları, bu izolatların değişik gen kaynaklarından gelmiş olabileceği hipotezini doğrulamaktadır. Dolayısıyla, Vainio `nun (2008)' nin belirttiği gibi, daha fazla sayıda RAMS markörü ile test edilip, izolatların laboratuvar koşullarında birbirleri ile olan uyumlulukları daha detaylı karşılaştırılması gerekmektedir.

*P. gigantea* 'nin coğrafik alan farklılığından kaynaklanan, genetik farklılığı üzerine elde edilmiş kesin bilgiler bulunmamaktadır (Korhonen ve Kauppila 1988; Korhonen ve Stenlid, 1998). Bunun yanı sıra, fungus bazı ekosistemlerde saprotrofik özelliğini kaybedip, egzotik olarak yetişen bitki türleri üzerinde patojenik karakter kazanabilmektedir. Dolayısıyla, bir bölgede ya da geniş ölçekte düşünülürse ülkede, biyolojik kontrol etmeni olarak kullanılan bir ırk, bir başka coğrafyada tamamıyla farklı bir yaşam biçimine geçebilir. Bu olgunun açıklığa kavuşması için, farklı ırkların değişik coğrafik bölgelerde antagonistik ve parazitik özelliklerinin test edilmesi gerekmektedir.

Bugüne kadar in vitro ve arazi koşullarında göknar bireyleri üzerinde annosum kök çürüklüğünün engellenmesine yönelik gerçekleştirdiğimiz uygulamalar, kızılçamdan izole etmiş olduğumuz *P. gigantea* izolatının, diğer biyolojik ve kimyasal uygulamalara oranla başarısının daha düşük olduğunu göstermektedir (Doğmuş-Lehtijärvi vd., 2009; Lehtijärvi vd., 2009). Bu durumda, öncelikle, diğer ağaç türlerinden ziyade, göknar türlerinden izole edilen *P. gigantea* izolatlarını kullanmak, bu izolatlar arasındaki polimorfizmde göz önünde bulundurularak, denemelerde daha fazla sayıda izolata yer vermek daha akılcı olacaktır. Moleküler analizler sayesinde, birbirlerine genetik anlamda benzerlik gösteren ırkların elenerek, farklılığın yüksek olduğu ırkların test edilmesi, araştırmacılara pratik anlamda kolaylıklar sağlayacaktır.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, TÜBİTAK (TOVAG 104- O- 560 Kariyer Projesi) çerçevesinde yürütülmüştür. Desteklerinden ötürü TÜBİTAK'a çok teşekkür ederiz.

## 5. KAYNAKLAR

- Annesi, T., Curcio, G., D'amico, L. and Motta, E., 2005. Biological control of *Heterobasidion annosum* on *Pinus pinea* by *Phlebiopsis gigantea*. Forest Pathology 35: 127-134.
- Berglund, M., Rönnerberg, J., Holmer, L. and Stenlid, J., 2005. Comparison of five strains of *Phlebiopsis gigantea* and two *Trichoderma* formulations for treatment against natural *Heterobasidion* spore infections on Norway spruce stumps. Scand. J. Forest Res. 20: 12-17.
- Doğmuş-Lehtijärvi, H.T., Lehtijärvi, A. and Korhonen, K., 2006. *Heterobasidion abietinum* on *Abies* species in western Turkey. Forest Pathology. 36: 280-286.
- Doğmuş-Lehtijärvi, H.T., Lehtijärvi, A., Aday, A.G., Oskay, G. and Karaca, G., 2009. Bazı Biyolojik ve Kimyasal uygulamalarının *Heterobasidion abietinum*'un gelişimi üzerine etkisi. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 15-18 Temmuz 2009, s. 339, (Özet).
- Greig, B.J.W., 1976. Biological control of *Fomes annosus* by *Peniophora gigantea*. European Journal of Forest Pathology. 6: 65-71.
- Grillo, R., Korhonen, K. and Hantula, J., 2005. Interfertility between North American and European strains of *Phlebia gigantea*. Forest Pathology. 35: 173-182.
- Holdenrieder, O. and Greig, B.J.W., 1998. Biological control of *Heterobasidion annosum*. In: Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R., Hüttermann, A. (Eds), *Heterobasidion annosum: Biology, Ecology, Impact and Control*, CAB International, Wallingford, UK, pp. 235-239.
- Kallio, T., 1965. Studies on the biology of distribution and possibilities to control *Fomes annosus* in southern Finland. Acta Forestalia Fennica. 78: 1-21.
- Korhonen, K. and Kauppila, P., 1988. The sexuality of *Phlebiopsis gigantea*. Karstenia 27: 23-30.
- Korhonen, K. and Stenlid J., 1998. Biology of *Heterobasidion annosum*. In: Woodward, S., Stenlid, J., Karjalainen, R., Hüttermann, A. (Eds), *Heterobasidion annosum: Biology, Ecology, Impact and Control*, CAB International, Wallingford, UK, pp. 43-70.
- Korhonen, K., Lipponen, K., Bendz, M., Johansson, M., Ryen, I., Venn, K., Seiskari, P. and Niemi, M., 1994. Control of *Heterobasidion annosum* by stump treatment with 'ROTSTOP', a new commercial formulation of *Phlebiopsis gigantea*. In: Johansson, M. and Stenlid, J. (Eds), Proceeding of the Eight IUFRO Conference on Root and Butt Rots. Sweden /Finland August 1993. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, pp. 675- 685.
- Lehtijärvi, A., Doğmuş-Lehtijärvi, H.T., Aday, A.G. and Oskay, F., 2009. *Abies cilicica* Ant. & Kotschy Meşçerelerinde *Heterobasidion abietinum* Niemelä & Korhonen'un Kimyasal ve Biyolojik Kontrolü. Türkiye 3. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 15-18 Temmuz 2009, s. 339, (Özet).

- Meredith, D.S., 1959. The infection of pine stumps by *Fomes annosus* and other fungi. *Ann. Bot. N. S.* 23: 455-476.
- Nicolotti, G. and Gonthier, P., 2005. Stump treatment against *Heterobasidion* with *Phlebiopsis gigantea* and some chemicals in *Picea abies* stands in the western Alps. *Forest Pathology*, 35: 365-374.
- Piri, T., 1996. The spreading of the S type of *Heterobasidion annosum* from Norway spruce stumps to the subsequent tree stand. *European Journal of Forest Pathology*. 26: 193-204.
- Piri, T., 2003. Early development of root rot in young Norway spruce planted on sites infected by *Heterobasidion* in southern Finland. *Canadian Journal of Forest Research*.33: 604-611.
- Pratt, J.E., Niemi, M. and Sierota, Z.H., 2000. Comparison of three products based on *Phlebiopsis gigantea* for the control of *Heterobasidion annosum* in Europe. *Biocont. Sci. Technol.* 10: 467-477.
- Rishbeth, J., 1963.. Stump protection against *Fomes annosus*. III. Inoculation with *Peniophora gigantea*. *Ann. Appl. Biol.* 52: 63-77.
- Roy, G., Cormier, M., Hamelin, R.C. and Dessureault, M., 1997. Comparison of rapid technique and somatic incompatibility tests for the identification of *Phlebiopsis gigantea* strains. *Canadian Journal of Botany*. 75: 2097-2104.
- Rönnerberg, J., Sidorov, E. and Petrylaite, E., 2006. Efficacy of different concentrations of Rotstop and Rotstop S and imperfect coverage of Rotstop S against *Heterobasidion* spp. Spore infections on Norway spruce stumps. *Forest Pathology*. 36: 422-433.
- Stenlid, J. and Westerlund, I., 1986. Estimating the frequency of stem rot in *Picea abies* using an increment borer. *Scandinavian Journal of Forest Research* 1: 303-308.
- Vainio, E.J., 2008. Ecological impacts of *Phlebiopsis gigantea* biocontrol treatment against *Heterobasidion* spp. as revealed by fungal community profiling and population analyses. University of Helsinki, Faculty of Biosciences. *Dissertationes Forestales*.
- Vainio, E.J. and Hantula, J., 2000. Variation of RAMS markers within the intersterility group of *Heterobasidion annosum* in Europe. *European Journal of Forest Pathology*. 29: 231-246.
- Vainio, E.J., Korhonen, K. and Hantula, J., 1998. Genetic variation in *Phlebiopsis gigantea* as detected with random amplified microsatellite (RAMS) markers. *Mycological Research*. 102: 187-192.
- Vainio, E.J., Lipponen, K. and Hantula, J., 2001. Persistence of a biocontrol strain of *Phlebiopsis gigantea* in conifer stumps and its effects on within-species genetic diversity. *Forest Pathology*. 31: 285-295.
- Varese, G.C., Buffa, G., Luppi, A.M., Gonthier, P., Nicolotti, G. and Cellerino, G.P., 1999. Effects of biological and chemical treatments against *Heterobasidion annosum* on the microfungal communities of *Picea abies* stumps. *Mycologia*. 5: 747-755.