

## Bitlis İli Ceviz Yetiştiriciliği Yapılan Tarım Alanlarında Görülen Ceviz Antraknozu (*Ophiognomonia leptostyla*) Hastalığının Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu

İbrahim KOÇ<sup>1\*</sup>, Ali ÇELİK<sup>2</sup>, Emre DEMİRER DURAK<sup>3</sup>, İbrahim DEMİR<sup>4</sup>,  
Serkan BAYMAN<sup>5</sup>, Hamit MİRTAĞIOĞLU<sup>6</sup>, Semra DEMİR<sup>3</sup>

**ÖZET:** Bitlis, ceviz üretiminde ülkemizde öne çıkan illerimiz arasında yer almaktadır. Ceviz insan beslenmesi açısından oldukça yüksek besin değerlerine sahiptir. Ceviz antraknozu (*Ophiognomonia leptostyla*) hastalığı dünyada olduğu gibi ülkemizde de cevizin en önemli fungal hastalıkları arasında yer almaktadır. Bu çalışmada Bitlis il genelinde (Adilcevaz, Ahlat, Güroymak, Hizan, Merkez, Mutki ve Tatvan) sürveyler yapılmış ve gözle görülür semptomların çıkış zamanının Haziran sonu (Temmuz başı) olduğu gözlenmiştir. Bahsi geçen ceviz üretimi yapılan alanlardan hastalık etmeninin kültür ortamına izolasyonu yapılmış olup, besi ortamında meydana getirdiği kolonial özelliklere göre hastalık etmeni morfolojik olarak doğrulanmıştır. Ayrıca gelişen kolonilerden DNA izolasyonu yapılarak etmene ait ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgeleri PCR ile çoğaltılmıştır. PCR sonucu elde edilen yaklaşık 560 bp uzunluğundaki ampliconlar dizilenmiştir. Etmenin ITS bölgesine ait diziler diğer dünya izolatları dikkate alınarak “Blastn” analizine tabi tutulmuş ve Genbank veri tabanına erişim numaraları (MK685678 ve MK685679) altında kaydedilmiştir. Çalışma ülkemizde hastalık etmeninin moleküler düzeyde incelendiği ilk araştırma özelliğindedir.

**Anahtar Kelimeler:** Antraknoz, Bitlis, ceviz, *Ophiognomonia leptostyla*

## Morphological and Molecular Characterization of Walnut Anthracnose (*Ophiognomonia leptostyla*) Disease in Walnut Growing Areas of Bitlis Province

**ABSTRACT:** Bitlis is an important province for walnut production in Turkey. Walnut has a very high nutritional value in terms of human diets. Walnut anthracnose (*Ophiognomonia leptostyla*) is one of the most important fungal diseases of walnut in Turkey as in the world. In this study, the surveys were carried out in the provinces of Bitlis (Adilcevaz, Ahlat, Güroymak, Hizan, Merkez, Mutki, and Tatvan). The symptoms were observed towards the end of June (beginning of July). According to the colonial characteristics on PDA, the pathogen was morphologically identified. In addition, ITS (Internal Transcribed Spacer) regions of the pathogen isolates were amplified and then approximately 560 bp amplicons were sequenced. The sequences of the ITS region of the isolates were subjected to “Blastn” analysis according to the reference data in the world and deposited in Genbank database with (MK685678 and MK685679) accession numbers. This is the first study of walnut anthracnose examined at the molecular level in Turkey.

**Keywords:** Bitlis, walnut, anthracnose, *Ophiognomonia leptostyla*.

<sup>1</sup> İbrahim KOÇ (Orcid ID: 0000-0003-0803-6801), Bitlis Eren Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Bitlis, Türkiye

<sup>2</sup> Ali ÇELİK (Orcid ID: 0000-0002-5836-8030), Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Bolu, Türkiye

<sup>3</sup> Emre DEMİRER DURAK (Orcid ID: 0000-0001-5757-6332), Semra DEMİR (Orcid ID: 0000-0001-2345-6789), Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Van, Türkiye

<sup>4</sup> İbrahim DEMİR (Orcid ID: 0000-0003-1533-556X), Bitlis Eren Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Bitlis, Türkiye

<sup>5</sup> Serkan BAYMAN (Orcid ID: 0000-0002-4573-8688), Dicle Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Diyarbakır, Türkiye

<sup>6</sup> Hamit MİRTAĞIOĞLU (Orcid ID: 0000-0003-2952-9584), Bitlis Eren Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, İstatistik Bölümü, Bitlis, Türkiye

\*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: İbrahim KOÇ, e-mail: ibrahimkoc47@gmail.com

\* Bu çalışma, Bitlis Eren Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Birimince (BEBAP 2018.01) desteklenmiştir.

## GİRİŞ

Türkiye, bağ-bahçe ürünlerinin üretimi, tüketimi ve ticareti yönünden önemli ülkeler arasında yer alır ve birçok meyve çeşidinin olduğu gibi cevizin de yetiştirilebildiği uygun ekolojiye sahiptir. Dünya ceviz üretiminde Türkiye, ABD ve Çin'den sonra üçüncü sırada yerini almakta, ağaç başına verim 33-37 kg arasında değişmektedir. Bahçe, aşılı ceviz fidanları ile tesis edildiği takdirde aşısızlara göre verimde %50-60 oranında artış sağlanabilmektedir (Anonim, 2019). TÜİK 2016 yılı verilerine göre ülkemizin hemen hemen her bölgesinde ceviz tarımı yapılmakta olup özellikle Bitlis ili 31.610 da alanda yapılan ceviz üretimi ile ön plana çıkmaktadır (Anonim, 2018a). Ceviz yetiştiriciliğinde çokça görülen hastalık ve zararlıların antraknoz, karaleke (ceviz yanıklığı) ve ceviz iç kurdu olduğu bildirilmiştir (Anonim, 2019). Ceviz antraknozu [*Ophiognomonina leptostyla* (Fr.) Sogonov], Avrupa'da 1815'te ilk kez rapor edilen, ceviz yetiştiriciliğinin yapıldığı çoğu yerde yaygın olarak görülen ve ciddi kayıplara yol açabilen bir hastalıktır (Belisario ve ark., 2008). Antraknoz, Akdeniz ülkelerinde, ceviz bahçelerinde ve kereste plantasyonlarında en etkili hastalıklardan biri olarak görülmektedir (Belisario, 2005). Ülkemizde de cevizin en önemli fungal hastalıklarından biri ceviz antraknozu olup, özellikle ilkbaharın çok yağışlı, yazların ise az yağışlı olduğu dönemlerde önemli düzeyde ekonomik zararlara neden olabilmektedir. Bu hastalığın belirtileri ağacın yaprak, meyve ve genç sürgünlerinde görülebilmektedir. Yapılan bir çalışmada, yapraklarda kahve renkli nekrotik dokular üzerinde konsantrik daireler şeklindeki aservuluslar makroskobik olarak tespit edilmiştir. Sürvey alanlarının %100'ün de yoğunlukları farklı olarak bu hastalığa rastlanılmış ve kuruma etkenlerinden biri olarak ifade edilmiştir (Gökçe ve ark., 2011). Patojenin enfeksiyonu sonucunda yapraklar, sürgünler, dallar ve meyve saldırıya uğramakta, ilerleyen salgınlarda bitkinin tamamen ölümü gerçekleşebilmektedir. Enfekte bitki dokusunda koyu kahverengiden siyah yuvarlak şekline dönebilen noktalar oluşur. Özellikle vejetasyon sonlarına doğru lekeler, daha büyük nekrotik alanlar oluşturmak üzere birleşmektedirler (Belisario ve ark., 2001). Nekrotik lekeler yaprak, dallar ve kabuklarda görülür. Hastalıklı olgunlaşmamış meyveler normal şekilde gelişmez ve erken düşebilir (Nelly ve Black, 1976). *O. leptostyla* genellikle yapraklarda askokarp, nadiren dallar ve meyve lezyonlarında miselyum oluşturur. Primer enfeksiyonlar başta askosporlar olmak üzere erken ilkbaharda yeni vejetasyonda ortaya çıkar. Sporlar ve kolonizasyon yaprak yüzeyinde konsantrik halkalar halinde yer almakta olup, büyüme mevsimi boyunca birkaç ikincil döngü meydana gelir (Belisario ve ark., 2001). Çorum ilinin Oğuzlar ilçesi ülkemizin önemli ceviz üretim bölgelerinden olup, 2005-2011'te bir ceviz bahçesinde, yürütülen çalışmada hastalığın mücadelesine yönelik biyolojik parametreler tespit edilmiştir (Uzunok ve Kurbetli, 2017). İran'dan toplanan *O. leptostyla* popülasyonlarının moleküler RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ve ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) verileri ile nicel ve nitel morfolojik ve patolojik özellik ilişkileri aşamalı çoklu analiz regresyonu ile analiz edilmiştir. RAPD-12 ve RAPD-211 vermiş oldukları bant sayıları bakımından oldukça başarılı bulunmuştur. ISSR'lerin, RAPD'lere göre daha az korelasyona sahip olduğu rapor edilmiştir (Jamshidi, 2012). İran'ın kuzeybatısında toplanan 75 *O. leptostyla* izolatının genetik çeşitliliği RAPD ve ISSR primerleri ile incelenmiştir. RAPD primeri ile çalışılan izolatlarda ISSR'lerden daha fazla polimorfizm ortaya koymuş ancak daha az bant üretilmiştir. Popülasyon analizi, komşu iller arasında genetik bir ilişki tespit etmiş; ancak Tahran ve Batı Azerbaycan'daki makul mesafedeki izolatlar, RAPD ve ISSR primerleri ile elde edilen sonuçlara göre daha yakın görülmüştür. Her iki markörün de, genetik varyasyon tespitinde başarılı olduğu görülmüştür (Jamshidi ve Zare, 2012). İran'ın kuzeybatı bölgesinden toplanan 16 *O. leptostyla* izolatı üzerinde gerçekleştirilen başka bir çalışmada ITS amplifikasyonu, ITS1 ve ITS4 primerler kullanılarak gerçekleştirilmiş ve diziler analiz edilmiştir. ITS sekanslarına dayanılarak yapılan filogenetik ağaçlar,

İran izolatlarının tamamının, *Juglans regia*'dan izole edilen *O. leptostyla* izolatları ile aynı grupta yer aldığını göstermiştir (Jamshidi ve Zare, 2012). Yapılan başka bir çalışmada, Gnomoniaceae içerisinde yer alan 322 izolat için, ITS sekansları üretilmiştir (Sogonov ve ark., 2008).

Bu çalışmada Türkiye'nin önemli ceviz üretim bölgesi olan Bitlis yöresinde ceviz antraknozu hastalığı etmeni için sürveyler yapılmış, hastalık çıkışı gözlenmiş, patojen izolasyonu gerçekleştirilmiş ve ITS bölge sekans dizileri elde edilmiştir. Söz konusu çalışma ülkemiz antraknoz izolatlarına ait ilk ITS verilerinin elde edilmesi ve literatüre kazandırılması özelliğini taşımaktadır.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Sürveyler

TÜİK 2016 verilerine göre Bitlis ili ve ilçelerinin ceviz yetiştiriciliği bakımından ayrıntılı üretim verileri Çizelge 1'de verilmiştir. 2018 Mayıs-Ağustos ayları arasında söz konusu yerlere sürveyler düzenlenmiş ve hastalıkla bulaşık bitki materyalleri toplanmıştır. Hastalıkla bulaşık olduğu düşünülen bitki materyalleri lokasyon ve koordinat bilgileri yazılarak toplanmıştır. Toplanan materyal Bitlis Eren Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama laboratuvarına getirilerek izolasyon için kullanılmıştır. Toplanan bir kısım materyal soğuk zincir yoluyla Dicle Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'ne izolasyon için gönderilmiştir.

**Çizelge 1.** Bitlis ili ceviz üretim verileri (Anonim, 2018a)

Yer	Meyve Verecek Yaşta Ağaç Sayısı	Meyve Vermeyen Yaşta Ağaç Sayısı	Toplam Alan (Da)	Verim (kg/ağaç)	*Bölgeden alınan minimum izolat sayısı
Adilcevaz	49300	48700	9000	26	49
Ahlat	15200	5200	4000	42	15
Güroymak	2425	8200	1010	43	3
Hizan	55000	40000	10000	9	55
Merkez	4800	2540	650	28	5
Mutki	24700	27000	5000	22	24
Tatvan	9100	18000	1950	26	9

\*Toplanan minimum örnek sayısı meyve verecek yaşta olan ağaç sayısının 1/1000' i olarak hesaplanmıştır.

### Patojenin Dokulardan İzolasyonu ve Morfolojik Karakterizasyonu

Araziden toplanan ve hastalıkla bulaşık olduğu düşünülen bitki materyalinden patojenin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Patojenin bitki dokularından izolasyonu Jamshidi ve Salahi (2008)'e göre yapılmıştır. Bu maksatla sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.

1. Hastalıkla bulaşık bitki kısmından, enfekteli ve sağlıklı bitki dokusunu kapsayacak şekilde yaklaşık 5-6 mm çapında kesitler alınmıştır.
2. Alınan kesitler %70 etil alkol içerisinde 1 dak. bekletilmiş ve 4 defa steril saf sudan geçirilmiştir.
3. Elde edilen kesitler steril bistüri yardımıyla 2-3 parçaya ayrılarak içerisinde steril saf su bulunan 1.5 ml eppendorf tüplere aktarılmıştır.
4. Bitki parçalarının yer aldığı eppendorf tüpler 20 sn süre ile vortekslenmiştir.
5. Elde edilen karışım %2'lik water agar (WA, MERCK, Katalog No: 101614) ortamına steril pipet uçları vasıtasıyla ve otomatik pipetlerle aktarılmıştır.
6. WA ortamında 48 saatlik gelişim sonrasında çimlenen sporlar, litrede 7 g yulaf unu ihtiva eden patates dekstroz agar (PDA, MERCK, 39 gr/L) ortamına aktarılmıştır.
7. Gelişen kolonilerden Sogonov ve ark. (2008)'e göre morfolojik karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

İzolatların morfolojik karakterizasyonu makroskobik ve mikroskobik özelliklerine göre yapılmıştır. Fungusun gelişimi ve konidi üretmesi oldukça yavaş olduğu için izolatlar besiyerlerinde yaklaşık bir ay inkübe edilmişlerdir. Makroskobik teşhis için PDA'da 25 °C'de inkübasyona bırakılan izolatların besiyerindeki koloni gelişimlerine ve morfolojik özelliklerine bakılmıştır. Mikroskobik teşhis de izolatların WA'da 25 °C'de geliştirildikten sonra binoküler mikroskop kullanılarak konidi özelliklerine göre yapılmıştır.

## Patojenin Moleküler Karakterizasyonu

### DNA izolasyonu

DNA izolasyonunda iki farklı yöntem denenmiştir.

I. yöntem, proje kapsamında ticari firmalardan alınan DNA izolasyon kitleri ile gerçekleştirilmiş olup, 10 günlük patojen kolonial gelişiminden steril bistüriler ile kazınan miselyum kitleleri üzerinden firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

II. yöntem Anonim (2018b)'e göre yapılmıştır. Buna göre ;

1. 10 günlük kolonilerden yaklaşık 250 mg misel steril bistüriler yardımıyla kazınıp steril eppendorf tüplere alınmıştır.
2. 65 °C'ye kadar önceden ısıtılmış 700 µL taze karışım solüsyonu misel bulunan eppendorf tüplere ilave edilmiştir.
3. Oluşan karışım 65 °C'de 1 saat süreyle inkübe edilmiş (30 dakika daha uzatılarak), tüpleri her 20 dakikada bir ters düz etmek suretiyle homojeniasyon sağlanmıştır.
4. Elde edilen karışıma 700 µL klorofom/isoamylalkol (24:1) eklenmiş ve karıştırılmıştır.
5. Oda sıcaklığında 20 dk, 10000 g'de santrifüj edilmiştir.
6. Üst faz yeni bir tüpe alınmış ve üzerine eşit hacimde soğuk isopropanol ilave edilmiştir.
7. Tüpler ters düz edilmek suretiyle karıştırılmış ve nükleik asitler gözle görünür hale gelmiştir.
8. Elde edilen karışım 30 dk 10000 g'de santifrüj edilmiştir.
9. Süpernatant dökülmüş ve oluşan pellet 2 ml %70'lik alkolle yıkanmıştır.
10. Alkol dökülmüş ve pellet saf suda çözülüp Nanodropta kalitesi ölçülmüştür.
11. Ölçülen DNA -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

### PCR çalışmaları

PCR reaksiyonu 25 µL hacimde, 50 ng genomik DNA, her primerden 12.5 pmol Taq DNA Polymerase 2x Master Mix (Ampliqon Denmark, Katalog No: A180301) ile gerçekleştirilmiştir. ITS bölgesi amplifikasyonu için PCR programı 94 °C'de 5 dak (başlangıç denatürasyonu), 94 °C'de 40 s, 50 °C'de 50 s, 72 °C'de 2 dak (35 döngü) ve 72 °C'de 10 dak olarak ayarlanmıştır. Reaksiyon sonucunda 516 bp büyüklüğünde bir bant elde edilmiştir (Şekil 2, 3).

### Elektroforez çalışmaları

Elde edilen amplifikasyon ürünlerinin görülebilmesi için %1.5 (w/v)'lik agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılmıştır. Uygun miktarda agaroz tampon çözelti içerisinde mikrodalga fırın yardımıyla çözülmüş ve yaklaşık 50 °C sıcaklığa soğuyunca jel karışımı jel kasetine dökülerek katılaşmaya kadar bekletilmiştir. Çoğaltılan PCR ürünleri, oluşan kuyucuklara 7 µL eklenerek, 120 V'da 45 dk yürütülmüş, işlem tamamlanınca jel ethidium bromide (0.5 µg/ml) içinde bekletilmiş ve jel görüntüleme cihazında jelin görüntüsü alınmıştır (Galitelli ve Minafra, 1994).



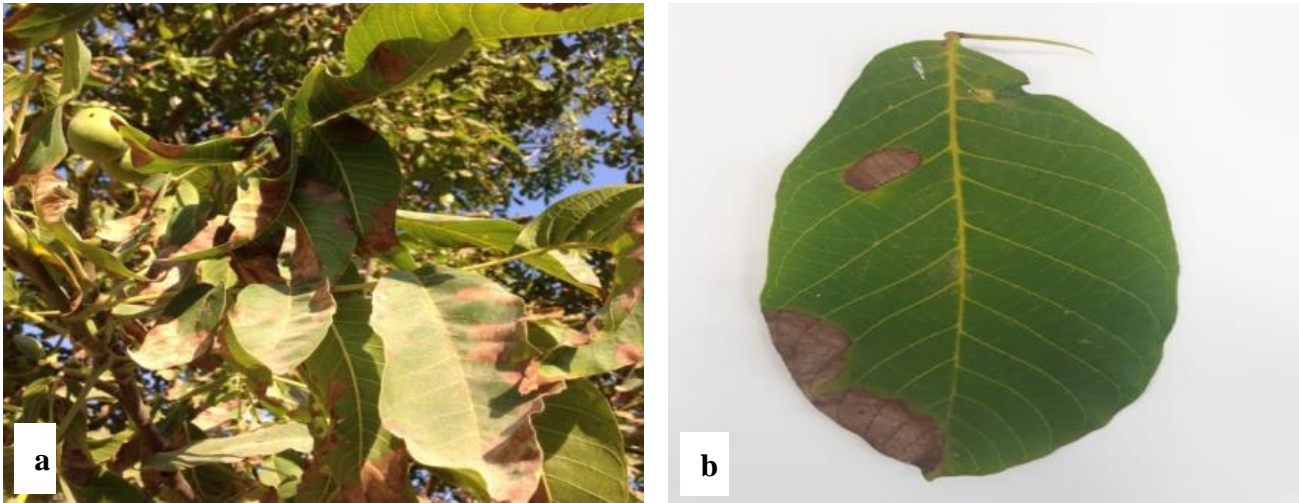
### Sekans analizi

Elde edilen PCR ürünlerinin DNA dizilimleri çift taraflı döngü dizileme metodu kullanılarak ilgili firmadan hizmet alımı yöntemiyle elde edilmiştir

### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### Sürveyler

Sürvey planı çerçevesinde Bitlis ili ve ilçelerinden üç ayrı zamanda numuneler (bazı koordinatlar; E:38.757672-B:42.520041, E:38.752939-B:42.489502, E:38.745878-B:42.474193, E:38.620635-B:42.415403, E:38.530586-B:42.306375, E:38.523434-B:42.300084, E:38.517524-B:42.295688, E:38.518981-B:42.276687, E:38.434964-B:42.138804, E:38.433837-B:42.138253 gibi) alınmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Hastalıklı yaprakların toplu görünümü (a), ve hastalıklı yaprak örneği (b)

#### Patojenin Dokulardan İzolasyonu ve Morfolojik Karakterizasyonu

Patojen izolatları dokulardan izole edildikten sonra morfolojik karakterizasyonu PDA ve SA' da gelişen kolonilerine göre yapılmıştır. Makroskobik özelliklerine göre, koloniler kirli beyaz renkte, düzgün olmayan gelişim göstermişlerdir (Şekil 2). Mikroskop altında etmenin miselyumlarının bölmeli olduğu, genç dönemlerinde renksiz, yaşlandıkça krem rengini aldığı görülmüştür. Aservulus oluşumundan sonra fungusun konidiosporları besiyerine dağılmıştır. Konidiosporlar renksiz, yarım ay şeklinde, ortadan bölmeli özelliktedir. Peritesyumlardan çıkan askosporlar renksiz, iğ şeklinde ve ortadan bölmelidirler. Askosporların boyutları konidiosporlardan daha küçüktür. Makroskobik ve mikroskobik özelliklerine göre yapılan morfolojik karakterizasyon çalışmaları sonucunda izolatların *Ophiognomonia leptostyla* fungusu oldukları belirlenmiştir.

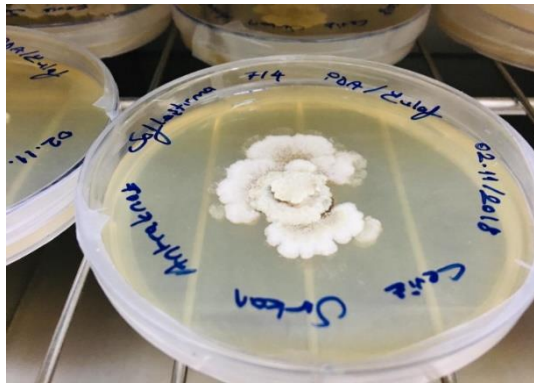
#### Moleküler Bulgular

##### DNA izolasyonu

Moleküler analizler için 20 günlük gelişmiş olan saf kolonilerden DNA izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla miseller steril bistüri yardımıyla titiz bir şekilde besi ortamından kazanılmıştır. Temiz DNA eldesi için mümkün olduğu kadar besi ortamı kazanılmamaya çalışılmıştır. DNA izolasyonu GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit (Catalog number: K0791) yardımıyla ilgili firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA Denovix (DS-11 Series) marka nanodrop yardımıyla ölçülmüş ve beklenen saflıkta ve kalitede genomik DNA izolasyonu sağlanmıştır.



Şekil 2. Patojenin dokulardan izolasyonu ve besiyeri ortamında gelişimi (a. Yaprak materyalinden kesit alınımı, b. Kesitlerin eppendorf tüplere aktarımı, c. Besiyerine aktarımı, d. Besiyerindeki koloni gelişimi)



Şekil 3. Besiyerindeki koloninin gelişimi



Şekil 4. Mikroskop altında etmenin görünümü

### PCR reaksiyonu

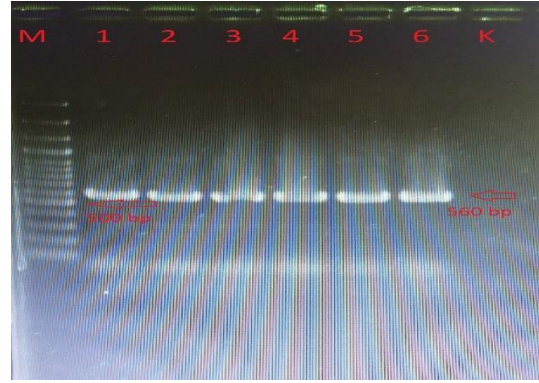
Elde edilen DNA'lar 100 ng/μL konsantrasyona ayarlanarak PCR reaksiyonuna kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. PCR reaksiyonu Bio-rad T100 Thermal Cycler (BIO-RAD) cihazında 95 °C'de 3 dk, 95 °C'de 45 sn 54 °C'de 45 sn, 72 °C'de 1.5 dk ve 72 °C'de 5 dk olmak üzere 35 döngüde (White ve ark., 1990) gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyonda ITS-1 ve ITS-4 (White ve ark., 1990) primerleri kullanılmıştır. PCR reaksiyonu 25 μL mastermix (Taq DNA Polymerase 2x Master Mix ), 1.5 μL her bir primer (10 nmol) 2 μl DNA (100 ng/μL) ve 20 μL su olmak üzere toplam 50 μL gerçekleştirilmiştir. PCR sonucu 10 μL amplifikasyon ürünü agaroz jel (%1.5) de yürütülerek sonuçlar gözlenmiştir (Galitelli ve Minafra, 1994). PCR reaksiyonu sonucu yaklaşık 560 bp büyüklüğünde beklenen bant görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 5, 6).

Bitlis İli Ceviz Yetiştiriciliği Yapılan Tarım Alanlarında Görülen Ceviz Antraknozu (*Ophiognomonina leptostyla*) Hastalığının Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu



Şekil 5. PCR sonucu elde edilen 560 bp büyüklüğündeki jel görüntüsü. (M: Marker, N: Negatif kontrol, 1-7 sırasıyla *Ophiognomonina leptostyla* PCR ürünleri)



Şekil 6. Yaklaşık 560 bp büyüklüğündeki banda ait jel görüntüsü (M: Marker, K: Kontrol)

Ceviz dünya üzerinde farklı coğrafyalarda yetiştiriciliği yapılan, özellikle ılıman ve subtropik iklim kuşağında yayılım gösteren *Juglans* cinsine ait bir bitkidir. Anavatanının bazı araştırmacılar tarafından Çin, bazıları tarafından ise İran olduğu kabul edilmektedir. İçeriğinde bulunan vitamin, protein, yağ ve mineral maddeler ile hem zengin besin hem de doğal şifa kaynağıdır. Türkiye uzun yıllar boyunca ceviz üretiminde dünya birincisi iken son yıllarda Çin, ABD ve İran üretim alanlarını büyük miktarda artırmışlardır. Zengin iklim ve coğrafik özelliklere sahip Türkiye' de birçok ceviz tiplerinden oluşan zengin bir kaynağa sahiptir ve üretimini gün geçtikçe artırmaktadır. Ceviz, sadece beslenme amaçlı değil, aynı zamanda kereste ve boya sanayisinde, parklarda süs bitkisi olarak da yetiştirilir (Oliveira ve ark., 2008; Şen, 2011). Ceviz ağacı yetiştiriciliği yapılırken en çok karşılaşılan problemlerden bir tanesi de hastalık ve zararlılar sebebiyle verim ve kalitenin düşük olmasıdır. Bunların içinde fungal bir hastalık olan ceviz antraknozu, özellikle tek konukçusunun ceviz olmasından dolayı daha fazla zarar meydana getirmektedir. Ağaçların sürgün, meyve ve yapraklarında belirtiler görülmektedir. Daha çok yaprak hastalığı olmasına rağmen meyvelerin yeşil kabuklarından içeri girerek depolama sırasında çürümelere neden olur. Ceviz, ülkemizin tüm tarım bölgelerinde yetiştirilmesine rağmen hastalık ve zararlılarıyla ilgili yapılmış araştırmalar çok azdır. Türkiye'de ceviz araştırmaları ile ilgili çalışmalar yapan Bayazit ve ark. (2016), bitki ile ilgili “ıslah” ve “çoğaltma” çalışmalarının ağırlıkta olduğu, buna rağmen hastalık ve zararlılar konusunun çok az olduğunu vurgulamışlardır. Ülkemizde ceviz antraknozu hastalığını ilk kez Bremer (1954) bildirmiştir. Özellikle nemli yerlerde zararının daha fazla olduğunu vurgulayan araştırmacı, Türkiye'nin her tarafında hastalığın yaygın olarak bulunduğunu ifade etmiştir. Geçmişten günümüze bu konuda yapılmış nadir çalışmalar hastalığın ülkenin birçok kesiminde yaygın olduğunu göstermektedir (Bremer, 1954; Karaca, 1960; Gökçe ve ark., 2011). Hastalık etmeninin biyolojisine yönelik ilk çalışma ise 1955-1959 yılları arasında Artvin ili ve ilçelerinde yapılmıştır (Karaca, 1960). Orta Anadolu'da Çorum ilinde yapılan bir çalışmada hastalığın mücadelesine yönelik biyolojik parametreler elde edilmiş, bu verilerin mücadele araştırmalarına ışık tutacağı ifade edilmiştir (Uzunok ve Kurbetli, 2017). Gökçe ve ark. (2011), Doğu Anadolu Bölgesi' nde yaptıkları sürveyler sonucunda hastalığın 0.25 bulunuş oranı ile en az Iğdır' da, 0.72 oranı ile en fazla Gümüşhane'de, yayılış ise %100 oranı ile en fazla hastalığa diğer illerde rastlanırken %76.6 ile en az Gümüşhane'de bulunduğunu belirtmişlerdir. Bitlis'te yapılan sürvey çalışmalarında antraknoz hastalığının belirtilerinin yapraklarda koyu renkli lekeler, ilerleyen zamanda genişleyerek nekrozlaşma, şiddetli durumlarda kavrulma olduğu gözlemlenmiştir. Nitekim başka araştırmacılar da belirtilerinin bu şekilde olduğunu ifade etmişlerdir (Bremer, 1954; Eken ve Demirci, 1998). Konya'nın Beyşehir ilçesinde 2015-2016 yıllarında 8 farklı ceviz çeşidinde yapılan bir çalışmada yapraklardaki yoğunluğa



göre Kaman 1 ve Yavuz, meyve üzerindeki yoğunluğa göre Kaman 1 ve Şebin olarak belirlenmiştir. En dayanıklı çeşidin hem yaprak hem de meyvede Chandler olduğu ifade edilmiştir (Karahana ve ark., 2018). Son yıllarda ülkemizde ceviz ağaç sayısı ve üretimi artış göstermektedir. Buna paralel olarak üretilen cevizin kaliteli olması için hastalık ve zararlıların takibinin iyi yapılması ve üreticinin bu konuda bilinçlendirilmesi gerekmektedir. Bölgede üreticinin hastalıkları birbirine karıştırarak yanlış mücadele yöntemleri uyguladıkları gözlenmiştir. Özellikle ceviz antraknozu ile ceviz bakteriyel yanıklık hastalıklarının belirtileri birbirine çok benzemektedir. Hastalığın biyolojisinin tespit edilmesi bu sebeplerden dolayı oldukça önemlidir. Araziden toplanan hastalıklı olduğundan şüphelenilen örneklerden patojenin izolasyonu sonrasında makroskopik ve mikroskopik özelliklerine göre morfolojik karakterizasyon çalışmaları yapılmış ve izolatların *Ophiognomonina leptostyla* fungusu oldukları belirlenmiştir. Daha sonra izolatlar moleküler olarak teyit edilmişlerdir. PCR ürünlerinden 20 tanesi 30 µL hacimde ITS1/ITS4 primerleri ile birlikte çift taraflı okuma yöntemi kullanılarak dizi analizi için gönderilmiştir. Elde edilen sekans verileri ClustalX veya BioEdit programları yardımı ile düzenlenmiştir (Thompson ve ark., 1997; Hall, 1999). Bitlis il genelini temsil eden 10 adet izolata ait sekans verileri elde edilmiş ve MEGA 6 programında Tamura ve ark. (2013)'e göre diğer dünya izolatları ile consensus serileri oluşturulmuştur. Her bir dizi NCBI veri tabanında (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) aranmış ve diğer *Ophiognomonina leptostyla* izolatlarına ait sekans verileri ile %99 üzerinde benzerlik göstermiştir. Düzenlenen sekans verilerinden 2 tanesi MK685678 ve MK685679 erişim numaraları adı altında GenBank veri tabanına kaydedilmiştir. Elde edilen sekans verileri antraknoz hastalığının DNA dizilimlerinin belirlenmesi bakımından ülkemiz için ilk kayıtlar olma özelliğindedir.

## SONUÇ

Bu çalışma ile bölgede önemli miktar ve kalitede ceviz üreticisi olan Bitlis ilinde ceviz antraknozu hastalığının yaygın olduğu yapılan sürveyler neticesinde belirlenmiştir. Hastalık etmeni izole edilmiş, morfolojik ve moleküler karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Çalışma sonucunda Türkiye'de ilk defa ceviz antraknozu hastalığının moleküler yöntemlerle (PCR) tür teşhisi yapılmış ve gen bankasına kaydı gerçekleştirilmiştir.

Türkiye'de ceviz konusunda şimdiye kadar yapılmış bilimsel çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda; özellikle ıslah çalışmalarında temel hedefin çeşit geliştirmek olduğu bildirilmiştir. Bu bağlamda verim ve kalite üzerine olumsuz etkisi bulunan özellikle fungal hastalıklar için dayanıklı çeşit geliştirmek de üzerinde durulması gereken en önemli konulardan biridir. Ülkemizde ceviz hastalık ve zararlıları üzerinde gerçekleştirilen çok az sayıda araştırma mevcuttur, daha çok çalışma yapılarak verim ve kalite kayıplarını azaltmanın çarelerini bulmak hedeflenmelidir. Ayrıca rastgele ilaç kullanımının önüne geçilebilmesi için üreticilerin hastalık hakkında bilinçlendirilmesi gerekmektedir.

## TEŞEKKÜR

Bu projenin yürütülmesinde desteklerini esirgemeyen Bitlis Eren Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne, Bitlis Eren Üniversitesi Rektörü Sayın Prof. Dr. Erdal Necip YARDIM'a, Sayın Prof. Dr. Hamit KAVAK'a (Dicle Üniversitesi) ve Adilceva Tarım İlçe Müdürü Sayın Selami SAVAŞ'a teşekkür ederiz.



## KAYNAKLAR

- Anonim, 2018a. TÜİK kayıtları, <http://www.tuik.gov.tr> (Erişim Tarihi: 07.02.2018).
- Anonim, 2018b. [https://www.diversityarrays.com/files/DARt\\_DNA\\_isolation.pdf](https://www.diversityarrays.com/files/DARt_DNA_isolation.pdf) (Erişim Tarihi: 07.02.2018).
- Anonim, 2019. [https://adana.tarimorman.gov.tr/Belgeler/SUBELER/bitkisel\\_uretim\\_ve\\_bitki\\_sagligi\\_sube\\_mudurlugu/meyve\\_yetistirciligi\\_ve\\_mucadelesi/Ceviz.pdf](https://adana.tarimorman.gov.tr/Belgeler/SUBELER/bitkisel_uretim_ve_bitki_sagligi_sube_mudurlugu/meyve_yetistirciligi_ve_mucadelesi/Ceviz.pdf) (Erişim Tarihi: 29.05.2019).
- Bayazit S, Tefek H, Çalışkan O, 2016. Türkiye’de Ceviz (*Juglans regia* L.) Araştırmaları. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 11 (1): 169-179.
- Belisario A, 2005. Aspetti Di Ezologia, Epidemiologia E Difesa Delle Principali Avversita` Patologiche Del Noce in Italia. Inf. Fitopatol. 7-8, 51-57.
- Belisario A, Scotton M, Santori A, Onofri S, 2008. Variability in the Italian Population of *Gnomonia leptostyla*, Homothallism and Resistance of Juglans Species to Anthracnose. Forest Pathology, 38 (2): 129-145.
- Belisario A, Zoina A, Forti E, Barbieri G, Valier A, 2001. Epidemiological Surveys of *Gnomonia leptostyla* in Juglans Regia Hedgerow Trained Orchard. Acta Hort. 544, 405-408.
- Bremer H. 1954. Türkiye Fitopatolojisi. Cilt 3 Bahçe Kültürleri Hastalıkları, Çeviren: M. Özkan. Ziraat Vekaleti Neşriyat ve Haberleşme Müdürlüğü, Ankara İstiklal Matbaası, Sayı: 715.
- Eken C, Demirci E, 1998. Erzurum İlinde Meyve Ağaçlarında Görülen Fungal Etmenler. Doğu Anadolu Tarım Kongresi, s:106-112.
- Gallitelli D, Minafra A, 1994. Electroforesis Course on Plant Virus Diagnosis. 15-30 October 1994, Adana-Turkey, pp: 89-99.
- Gökçe AY, Turak S, Albayrak S, Akbaş HR, 2011. Doğu Anadolu Bölgesinde Meyve Ağaçlarında Sorun Olan Fungal Etmenlerin Tespiti. Bitki Koruma Bülteni, 51 (1).
- Hall AT, 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41: 95-98.
- Jamshidi S, Salahi S, 2008. Growth and Sporulation of Some *Gnomonia leptostyla* Isolates in Various Culture Media. Agroecology Journal (Journal of New Agriculture Science). 4 (12): 1-10.
- Jamshidi S, 2012. Phenotypic and Genotypic Traits Relationship in Iranian *Ophiognomonia leptostyla* Populations Using Stepwise Multiple Regression. 2nd International Conference on Chemical, Biological and Environment Sciences (ICCEBS'2012), June 30-July 1, 2012 Bali.
- Jamshidi S, Zare R, 2012. Molecular Phylogeny of *Ophiognomonia leptostyla* Isolates Collected from Iran Based on ITS nrDNA Sequences. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, 2 (6), 438.
- Karahan A, Bostancı C, Yıldırım F, 2018. Bazı Ceviz Çeşitlerinin Antraknoz Hastalığına [*Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. & De Not.] Duyarlılığının Belirlenmesi. Bitki Koruma Bülteni, 58 (3): 183-193.
- Karaca İ. 1960. *Gnomonia Leptostyla* (Fr.) Ces. et de Not. Mantarlarının Biyolojisi Üzerinde Bir Etüd. Bitki Koruma Bülteni, 1 (3): 3-9.
- Neely D, Black WM, 1976. Anthracnose of Black Walnuts in the Midwest. Plant Disease Reporter, 60 (6): 519-521.
- Oliveira I, Sous A, Ferreira ICFR, Bento A, Estevinho L, Pereira JA, 2008. Total Phenols, Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity of Walnut (*Juglans regia* L.) Green Husks. Food and Chemical Toxicology, 46: 2326-2331.
- Sogonov MV, Castlebury LA, Rossman AY, Mejía LC, White JF, 2008. Leaf-inhabiting Genera of the Gnomoniaceae, Diaporthales. Studies in Mycology, 62, 1-77.
- Şen SM, 2011. Ceviz (4th ed.). ÜÇM yayıncılık, Samsun.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S, 2013. “MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0”. Molecular Biology and Evolution, 30 (12): 2725-2729.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. “The CLUSTAL\_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools”. Nucleic Acids Research, 25 (24): 4876-4882.
- Uzunok S, Kurbetli İ, 2017. Orta Anadolu Koşullarında Ceviz Antraknozu Etmeni *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces et de Not.’nın Mücadelesine Yönelik Biyolojik Parametreler. 1. Bitki Koruma Bülteni, 57 (3): 349.
- White TJ, Bruns T, Lee SJ, Taylor JL, 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 18 (1): 315-322.

**EK: Dizi Bilgisi 502 bp**

#4-ITS4

TCAGAGAGTTGGGGGGGTTTTATGGCAAGAAGTCCCACTAGATCTTACAAACGAGGTAAAAAGGTACTACGC  
TCAAATTTCTAGCGAGCCCGCCACTACATTTAGAGGGTACTCGGGTGAAAAGTATTCTCCAACACCAAAA  
CCAAAAGTTTTGAGGGGTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGGTGGAATACCACCGGGCGCAATGTGC  
GTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT  
GCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTATTTTTCTTTCCTCAGAAGATACTACAAAA  
CAAGAGTTTGTAAGGGGCCACCGGCCGGTTTGCTCCGCTGACGCGGGACTTCATTTCGAAGCCAACCATGCCG  
AGGCAACAAAGTAGGAATGTTTACAAAGGGTTTCTGGGTAGCGCCCGTGAGGACGTTTGTTCAGCAATGA

#3-ITS4

TCAGAGAGTTGGGGGGGTTTTATGGCAAGAAGTCCCACTAGATCTTACAAACGAGGTAAAAAGGTACTACGC  
TCAAATTTCTAGCGAGCCCGCCACTACATTTAGAGGGTACTCGGGTGAAAAGTATTCTCCAACACCAAAA  
CCAAAAGTTTTGAGGGGTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGGTGGAATACCACCGGGCGCAATGTGC  
GTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT  
GCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTATTTTTCTTTCCTCAGAAGATACTACAAAA  
CAAGAGTTTGTAAGGGGCCACCGGCCGGTTTGCTCCGCTGACGCGGGACTTCATTTCGAAGCCAACCATGCCG  
AGGCAACAAAGTAGGAATGTTTACAAAGGGTTTCTGGGTAGCGCCCGTGAGGACGTTTGTTCAGCAATGA

#2-ITS4

TCAGAGAGTTGGGGGGGTTTTATGGCAAGAAGTCCCACTAGATCTTACAAACGAGGTAAAAAGGTACTACGC  
TCAAATTTCTAGCGAGCCCGCCACTACATTTAGAGGGTACTCGGGTGAAAAGTATTCTCCAACACCAAAA  
CCAAAAGTTTTGAGGGGTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGGTGGAATACCACCGGGCGCAATGTGC  
GTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT  
GCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTATTTTTCTTTCCTCAGAAGATACTACAAAA  
CAAGAGTTTGTAAGGGGCCACCGGCCGGTTTGCTCCGCTGACGCGGGACTTCATTTCGAAGCCAACCATGCCG  
AGGCAACAAAGTAGGAATGTTTACAAAGGGTTTCTGGGTAGCGCCCGTGAGGACGTTTGTTCAGCAATGA

#1-ITS4

TCAGAGAGTTGGGGGGGTTTTATGGCAAGAAGTCCCACTAGATCTTACAAACGAGGTAAAAAGGTACTACGC  
TCAAATTTCTAGCGAGCCCGCCACTACATTTAGAGGGTACTCGGGTGAAAAGTATTCTCCAACACCAAAA  
CCAAAAGTTTTGAGGGGTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGGTGGAATACCACCGGGCGCAATGTGC  
GTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT  
GCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTATTTTTCTTTCCTCAGAAGATACTACAAAA  
CAAGAGTTTGTAAGGGGCCACCGGCCGGTTTGCTCCGCTGACGCGGGACTTCATTTCGAAGCCAACCATGCCG  
AGGCAACAAAGTAGGAATGTTTACAAAGGGTTTCTGGGTAGCGCCCGTGAGGACGTTTGTTCAGCAATGA

#5-ITS4

TCAGAGAGTTGGGGGGGTTTTATGGCAAGAAGTCCCACTAGATCTTACAAACGAGGTAAAAAGGTACTACGC  
TCAAATTTCTAGCGAGCCCGCCACTACATTTAGAGGGTACTCGGGTGAAAAGTATTCTCCAACACCAAAA  
CCAAAAGTTTTGAGGGGTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGGTGGAATACCACCGGGCGCAATGTGC  
GTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT  
GCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTATTTTTCTTTCCTCAGAAGATACTACAAAA  
CAAGAGTTTGTAAGGGGCCACCGGCCGGTTTGCTCCGCTGACGCGGGACTTCATTTCGAAGCCAACCATGCCG  
AGGCAACAAAGTAGGAATGTTTACAAAGGGTTTCTGGGTAGCGCCCGTGAGGACGTTTGTTCAGCAATGA

#6-ITS4

TCAGAGAGTTGGGGGGGTTTTATGGCAAGAAGTCCCACTAGATCTTACAAACGAGGTAAAAAGGTACTACGC  
TCAAATTTCTAGCGAGCCCGCCACTACATTTAGAGGGTACTCGGGTGAAAAGTATTCTCCAACACCAAAA  
CCAAAAGTTTTGAGGGGTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGGTGGAATACCACCGGGCGCAATGTGC  
GTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT  
GCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTATTTTTCTTTCCTCAGAAGATACTACAAAA  
CAAGAGTTTGTAAGGGGCCACCGGCCGGTTTGCTCCGCTGACGCGGGACTTCATTTCGAAGCCAACCATGCCG  
AGGCAACAAAGTAGGAATGTTTACAAAGGGTTTCTGGGTAGCGCCCGTGAGGACGTTTGTTCAGCAATGA

#7-ITS4

TCAGAGAGTTGGGGGGGTTTTATGGCAAGAAGTCCCACTAGATCTTACAAACGAGGTAAAAAGGTACTACGC  
TCAAATTTCTAGCGAGCCCGCCACTACATTTAGAGGGTACTCGGGTGAAAAGTATTCTCCAACACCAAAA  
CCAAAAGTTTTGAGGGGTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGGTGGAATACCACCGGGCGCAATGTGC

**Bitlis İli Ceviz Yetiştiriciliği Yapılan Tarım Alanlarında Görülen Ceviz Antraknozu (*Ophiognomonina leptostyla*) Hastalığının Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu**

GTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT  
GCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTATTTTTCTTTCCTCAGAAGATACTACAAAA  
CAAGAGTTTGTAAGGGGCCACCGGCCGGTTTGCTCCGCTGACGCGGGACTTCATTTCGAAGCCAACCATGCCG  
AGGCAACAAAGTAGGAATGTTACAAAGGGTTTCTGGGTAGCGCCCGTGAGGACGTTTGTTCAGCAATGA  
#8-ITS4

TCAGAGAGTTGGGGGGGTTTTATGGCAAGAAGTCCCCTAGATCTTACAAACGAGGTAAAAAGGTTACTACGC  
TCAAATTTCTAGCGAGCCCGCCACTACATTTAGAGGGTACTCGGGTGAAAAGTATTCTCCAACACCAAAA  
CCAAAAGTTTTGAGGGGTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGGTGGAATACCACCGGGCGCAATGTGC  
GTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT  
GCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTATTTTTCTTTCCTCAGAAGATACTACAAAA  
CAAGAGTTTGTAAGGGGCCACCGGCCGGTTTGCTCCGCTGACGCGGGACTTCATTTCGAAGCCAACCATGCCG  
AGGCAACAAAGTAGGAATGTTACAAAGGGTTTCTGGGTAGCGCCCGTGAGGACGTTTGTTCAGCAATGA  
#9-ITS4

TCAGAGAGTTGGGGGGGTTTTATGGCAAGAAGTCCCCTAGATCTTACAAACGAGGTAAAAAGGTTACTACGC  
TCAAATTTCTAGCGAGCCCGCCACTACATTTAGAGGGTACTCGGGTGAAAAGTATTCTCCAACACCAAAA  
CCAAAAGTTTTGAGGGGTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGGTGGAATACCACCGGGCGCAATGTGC  
GTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT  
GCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTATTTTTCTTTCCTCAGAAGATACTACAAAA  
CAAGAGTTTGTAAGGGGCCACCGGCCGGTTTGCTCCGCTGACGCGGGACTTCATTTCGAAGCCAACCATGCCG  
AGGCAACAAAGTAGGAATGTTACAAAGGGTTTCTGGGTAGCGCCCGTGAGGACGTTTGTTCAGCAATGA  
#10-ITS4

TCAGAGAGTTGGGGGGGTTTTATGGCAAGAAGTCCCCTAGATCTTACAAACGAGGTAAAAAGGTTACTACGC  
TCAAATTTCTAGCGAGCCCGCCACTACATTTAGAGGGTACTCGGGTGAAAAGTATTCTCCAACACCAAAA  
CCAAAAGTTTTGAGGGGTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGGTGGAATACCACCGGGCGCAATGTGC  
GTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT  
GCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTCATTTATTTTTCTTTCCTCAGAAGATACTACAAAA  
CAAGAGTTTGTAAGGGGCCACCGGCCGGTTTGCTCCGCTGACGCGGGACTTCATTTCGAAGCCAACCATGCCG  
AGGCAACAAAGTAGGAATGTTACAAAGGGTTTCTGGGTAGCGCCCGTGAGGACGTTTGTTCAGCAATGA