

**SOĞAN SAK NEMATODU (*Ditylenchus dipsaci*)’
NUN SARIMSAK BİTKİSİNDE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Zeki Mutlu AKAR

Yüksek Lisans Tezi

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doç. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU

Temmuz - 2018

T.C
KARAMANOĞLU MEHMETBEY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SOĞAN SAK NEMATODU (*Ditylenchus dipsaci*)' NUN SARIMSAK
BİTKİSİNDE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeki Mutlu AKAR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU

KARAMAN-2018

TEZ ONAYI

Zeki Mutlu AKAR tarafından hazırlanan “Soğan Sak Nematodu (*Ditylenchus dipsaci*)’ nun Sarımsak Bitkisinde Moleküler Karakterizasyonu” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı’ nda **YÜKSEK LİSANS** Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Doç. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU

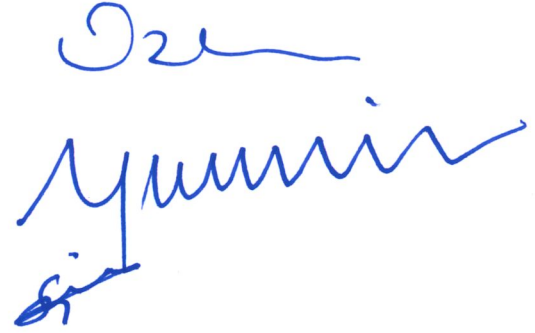
Juri Üyeleri

Doç. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU

Doç. Dr. Mustafa İMREN

Dr. Öğr. Ü. Elif YAVUZASLANOĞLU

İmza:



Tez Savunma Tarihi: 20/07/2018

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Doç. Dr. Kamil ARI

Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Zeki Mutlu AKAR

ÖZET

Yüksek Lisans

SOĞAN SAK NEMATODU (*Ditylenchus dipsaci*)' NUN SARIMSAK BİTKİSİNDE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Zeki Mutlu AKAR

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU

Temmuz, 2018, 79 sayfa

İnsan beslenmesinde olduğu kadar ekonomik olarak da önemli bir yere sahip olan sarımsak bitkisinin Türkiye’ de geniş bir alanda üretimi yapılmaktadır. Sarımsak yetiştiriciliğinde üretimi kısıtlayan önemli biyotik streslerden biri olan, soğan sak nematodu olarak da bilinen *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) karantinaya tabi olup bulunduğu yerlerde sarımsak üretimini büyük sekteye uğratmaktadır. Bu nedenle sarımsak yetiştirme alanlarında bölgesel olarak bulunan soğan sak nematodunun dağılım ve populasyon durumunun güncel olarak bilinmesi, sarımsak bitkisi üzerinde bulunan ırkların moleküler düzeyde tespiti ve o bölgede bulunan ırkların konukçu spektrumlarının bilinmesi büyük önem arz etmektedir.

Bu çalışmanın amacı; Türkiye’ nin en fazla sarımsak üretimi yapılan illerinden alınan soğan sak nematodu izolatlarının ITS-rDNA dizilerine spesifik moleküler markörler ile tür teşhislerinin yapılmasıdır. Çalışmada 2016 ve 2017 yıllarında Kastamonu, Amasya, Tokat, Aksaray, Tekirdağ, Balıkesir, Bursa, Hatay, Gaziantep, Kahramanmaraş, Adıyaman ve Kırklareli illerinde sarımsak yetiştirilen alanlardan alınan bitki ve toprak örneklerinden izole edilen nematodların moleküler taramaları sonucunda elde edilen verilerin filogenetik analizi ile incelenen nematodların tür teşhisleri yapılmıştır. Bu tezde türe spesifik 10 farklı SSR ve SCAR primeri ile moleküler taramalar yapılarak 58 adet nematod örneğinden 39 tanesinin *Ditylenchus dipsaci* olduğu tespit edilmiştir. Çalışma ile ülkemizde sarımsak yetiştirme alanlarında bulunan soğan sak nematodu ırklarının tespiti, bu nematoda karşı alınabilecek kontrol önlemlerinin daha bilinçli ve etkin bir şekilde yapılmasına yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Ditylenchus dipsaci*, ITS-rDNA, Nematod, Sarımsak, Soğan sak nematodu.

ABSTRACT

Ms Thesis

MOLECULAR CHARACTERIZATION of STEM and BULB NEMATODE (*Ditylenchus dipsaci*) on GARLIC

Zeki Mutlu AKAR

Karamanoğlu Mehmetbey University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU

July, 2018, 79 pages

Garlic plant, which has an important place in the economy as well as in human nutrition, is grown extensively in Turkey. *Ditylenchus dipsaci* (Kühn), also known as the stem and bulb nematode, is one of the most important biotic stresses that limit the production in garlic cultivation and is under quarantine as it significantly interrupts garlic production wherever it emerges. Thus, being up to date regarding the distribution and population of the stem and bulb nematode, which is locally found in the areas of garlic cultivation, identification of the breeds found on the garlic plant at the molecular level and knowing the host spectra of the breeds found at the region are of great importance.

The objective of this study is to perform species diagnosis of the ITS-rDNA sequences of the stem and bulb nematode isolates collected from the cities where the highest level of garlic cultivation is performed in Turkey using specific molecular markers. In the study, the types of nematodes have been identified using the phylogenetic analysis of the data obtained as a result of the molecular screening of the nematodes isolated from the plant and soil samples collected from the areas where garlic is cultivated in Kastamonu, Amasya, Aksaray, Tekirdağ, Balıkesir, Bursa, Hatay, Gaziantep, Kahramanmaraş, Adıyaman and Kırklareli provinces between 2016 and 2017. In this thesis, upon molecular screening using 10 different species-specific SSR and SCAR primers, it was found that 39 nematode samples of 58 are *Ditylenchus dipsaci*. Identification of the breeds of stem and bulb nematodes found in the areas of garlic cultivation in our country with this study will be useful in the conscious and efficient application of the preventive measures against this nematode.

Keywords: *Ditylenchus dipsaci*, Garlic, ITS-rDNA, Nematode, Stem and Bulb Nematode.

ÖN SÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam, kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm kıymetli ve danışman hoca statüsünü hakkıyla yerine getiren Doç. Dr. Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU' na teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum. Tez çalışmam için gerçekleştirdiğimiz arazi çalışmasında ve lisansüstü eğitimimde her yardıma ihtiyacım olduğunda yardımlarını ve desteğini esirgemeyen saygıdeğer hocam Dr. Öğr. Ü. Elif YAVUZASLANOĞLU' na teşekkürlerimi sunuyorum. Yine çalışmamda konu, kaynak ve yöntem açısından bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren ve gelecekteki hayatında çok daha başarılı olacağına inandığım kıymetli Arş. Gör. Begüm Terzi' ye de sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca lisans eğitimimden bu yana bana gerek hayatla gerek derslerimde ve çalışmalarımda yol gösterip ışık tutan kıymetli hocam Prof. Dr. Ahmet YILDIRIM' a da sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Lisansüstü eğitime başlamamda bana öncülük eden kıymetli hocam Dr. Öğr. Ü. Taner ZORBAY' a da teşekkürü bir borç bilirim.

Teşekkürlerin az kalacağı diğer üniversite hocalarımdan da bana lisansüstü ve lisans hayatım boyunca kazandırdıkları her şey için hepsine teşekkürlerimi sunuyorum. Çalışmamda bana her daim yardımını esirgemeyen Nimet GENÇ, Halil AKDAĞ ve Mehmet Sait KARACA' ya minnetlerimi sunuyorum. Son olarak çalışmamda desteğini ve bana olan güvenini benden esirgemeyen maddi manevi desteklerini her zaman arkamda hissettiğim Elçin ÇEVİK, Şehnaz ÇEVİK ve Hasan ÇEVİK' e de teşekkürlerimi sunuyorum. Beni bu günlere sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek getiren ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan annem Havse AKAR' a, babam Adnan AKAR' a ve ağabeyim Burkay AKAR' a sonsuz teşekkürler.

Bu tez çalışmasına ve yüksek lisans eğitimime 215O468 nolu proje ile sağladığı maddi kaynaklardan ötürü TÜBİTAK' a da teşekkürlerimi sunarım.

Zeki Mutlu AKAR

Temmuz, 2018

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖN SÖZ	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
3. MATERYAL VE METOD	17
3.1. Nematodların Bitki ve Toprak Örneklerinden Ayrılması	23
3.2. Moleküler Tür Teşhislerinin Yapılması	25
3.3. DNA İzolasyonu	26
3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	27
3.5. Filogenetik Analizler	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	34
5. SONUÇ	54
6. KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1. Örneklemenin yapıldığı il ve köyler.....	17
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan SSR ve SCAR primerlerine ait dizi bilgileri	28
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primerlere ait PZR koşulları	30
Çizelge 3.4. PZR ürünlerinin jele yüklenme sırası.....	32
Çizelge 4.1. Çalışmada incelenen nematod popülasyonlarının spesifik primer setleri ile moleküler taramalarına ait veriler	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Nematodların bitkilere verdiği zarar örnekleri	6
Şekil 3.1. Örneklerin toplandığı iller	19
Şekil 3.2. Bitki ve toprak örneklerinin toplanması	20
Şekil 3.3. Örnek toplama şekli ve tek seferde alınması gereken toprak miktarı	20
Şekil 3.4. Örnek toplanırken kullanılan malzemeler ve toprak örneğinin alınma şekli .	21
Şekil 3.5. Bitki örneğinin topraktan çıkarılması	22
Şekil 3.6. Bitki ve toprak örneklerinin paketlenip etiketlenmesi	22
Şekil 3.7. Toplanan toprak örnekleri	23
Şekil 3.8. Mikroskop altında incelenen nematod örnekleri	24
Şekil 3.9. Baermann huni yönteminin uygulanışı	25
Şekil 3.10. DNA izolasyonu kontrolü için DitNF1 - rDNA2 primeri ile yapılan PZR ürünlerine ait jel görüntüsü	27
Şekil 3.11. Nematod genomu	27
Şekil 3.12. Tez çalışmasında kullanılan ısı döngüsü cihazı	29
Şekil 3.13. PZR ürünlerinin yürütüldüğü agaroz jel elektroforezi	29
Şekil 3.14. Jel görüntüleme sistemi	30
Şekil 3.15. Bant büyüklükleri işaretlenmiş jel görüntüsü	33
Şekil 4.1. DitNF1 - rDNA2 primeri ile yapılan moleküler karakterizasyon	35
Şekil 4.2. PF1 - PR1 primerine ait agaroz jel görüntüsü	37
Şekil 4.3. PF2 - PR2 primeri ile yapılan moleküler taramalar	38
Şekil 4.4. 18S - 26S primer setine göre D. dipsaci olarak tanımlanan örnekler	45
Şekil 4.5. H05 - H06 primerleri ile yapılan moleküler tarama sonuçları	43
Şekil 4.6. DdpS1 - rDNA2 primer seti ile PZR taramalarına ait jel görüntüsü	44
Şekil 4.7. DipUF - Dip1R primeri ile yapılan taramalara ait PZR jel görüntüleri	46

Şekil 4.8. DipU F - DipU R primer seti ile yapılan moleküler karakterizasyon	48
Şekil 4.9. DIT2 F - DIT2 R primerlerine ait agaroz jel görüntüsü	50
Şekil 4.10. DIT5F - DIT5R primeri ile yapılan taramalar	51
Şekil 4.11. 2016-2017 yılı sarımsaklara ait nematod örnekleri arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendogram	56
Şekil 4.12. Sarımsak tarlalarından alınan 58 adet nematod örneğinin H05-H06 primeri ile yapılan taramaları sonucunda elde edilen dendogram	57



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

bç	Baz çifti
gr	Gram
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
V	Volt

Kısaltmalar

BME	β-mercaptoethanol
dNTP	Deoksi Nükleozin Trifosfat
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EtBr	Ethidium Bromür
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
FAO	Food and Agriculture Organisation Gıda ve Tarım Örgütü

Kısaltmalar

g	Relatif <i>Santrifüj</i> Kuvveti
ITS	Internal Transcribed Spacer İç Transkripsiyon Bölgesi
NaCl	Sodyum Klorür

NK	Negatif Kontrol
MgCl₂	Magnezyum Klorür
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PK	Pozitif Kongrol
RNA	Ribonükleik Asit
SCAR	Sequence Characterized Amplified Regions Dizisi Karakterize Edilmiş Çoğaltılan Bölgeler
sn	Saniye
SSR	Simple Sequence Repeats Basit Dizi Tekrarları
TBE	Tris/ Borik Asit/ EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAF	Trietanolamin Formalin
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Sarımsak geçmişten günümüze yemeklerde ve ilaç sektöründe kullanılan, geniş alanlarda üretimi yapılıp, pazar değeri yüksek olan tıbbi ve aromatik bir bitkidir. Tıbbi önemi ve lezzeti nedeniyle pek çok yemek çeşidi içerisinde yer alan sarımsak farklı yemek kültürlerinde sıkça kullanılmaktadır. Sarımsak Türkiye’ de olduğu gibi dünya üzerinde de sıkça tüketilen bir bitki türüdür. İnsan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan sarımsağın, insan sağlığı üzerine çok sayıda yararlı etkilerinin belirlenmesiyle, günlük diyetteki önemi giderek artmaktadır.

Dünyadaki sarımsak üretim alanları incelendiğinde Çin % 77’ lik payla birinci sırada yer almaktadır. Türkiye 15.166 hektarlık sarımsak üretim alanı ile dünyada 10. sırada yer alırken, 135.148 tonluk üretim miktarı ile 11. sırada yer almaktadır (FAO, 2016). Türkiye’ de en fazla üretimin gerçekleştirildiği il Kastamonu’ dur. Kastamonu ili ve Taşköprü ilçesi sadece ülkemizde değil, üretilen sarımsağın kalitesi nedeniyle tüm dünyada tanınmaktadır (Artık ve Poyrazoğlu, 1994).

Türkiye’ nin birçok bölgesi sarımsak yetiştiriciliği için uygundur, ancak sarımsak verimi dünya genelinin neredeyse yarısı kadardır. FAO verilerine göre dünya ortalama sarımsak verimi 18,09 hg/ha iken; Çin’ de 26,69 hg/ha olan verimi Türkiye’ de 8,91 hg/ha’ dır (FAO, 2016). Birim alandan elde edilen verimi arttırmak için gerçekleştirilen çalışmalar arasında özellikle hastalık ve zararlılarla mücadelede büyük önem verilmelidir. Bu bağlamda sarımsakta verim ve kalite kayıplarına neden olan nematodlarla mücadele oldukça önemlidir.

İnsan beslenmesinde olduğu kadar ekonomik olarak da önemli bir yere sahip olan sarımsak bitkisinin Türkiye’ de geniş bir alanda üretimi yapılmaktadır. Sarımsak yetiştiriciliğinde üretimi kısıtlayan önemli biyotik streslerden biri olan soğan sak nematodu *Ditylenchus dipsaci* (Kühn) karantinaya tabi olup bulunduğu yerlerde sarımsak üretimini büyük sekteye uğratmaktadır. Bu nedenle sarımsak yetiştirme alanlarında bölgesel olarak bulunan soğan sak nematodunun dağılım ve populasyon durumunun güncel olarak bilinmesi büyük önem arz etmektedir. Bunun yanında soğan sak nematodunda tür içi çeşitlilik çok fazla olup ırkların konukçuluk durumları çok

komplekstir. Bu nedenle sarımsak bitkisi üzerinde bulunan ırkların moleküler düzeyde tespiti ve o bölgede bulunan ırkların konukçu spektrumlarının bilinmesi gerekmektedir.

Türkiye’ de soğan sak nematodunun tespiti sadece morfolojik karakterlere göre yapılmakta olup, ülke ekonomisi için önemi yüksek olan sarımsak bitkisinin yetiştirme alanlarında bulunan soğan sak nematodu izolatlarının moleküler farklılık ve benzerliklerinin belirlenmesine yönelik gerçekleştirilmiş kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı; Türkiye’ nin en fazla sarımsak üretimi yapılan bölgelerinden elde edilen soğan sak nematodu izolatlarının ITS-rDNA dizilerine spesifik moleküler markörler ile tür teşhislerinin yapılmasıdır. Moleküler taramalar sonucunda elde edilen verilerin filogenetik analizi ile incelenen nematodların genetik benzerlik ve farklılıkları ortaya konularak, tür teşhisleri yapılmıştır. DitNF1 - rDNA2, PF1 - PR1, PF2 - PR2, DdpS1 - rDNA2, H05 - H06, 18S - 26S, DipU F - Dip1 R, DipU F - DipU R, DIT2 F - DIT2 R ve DIT5 F - DIT5 R primerleri ile yapılan moleküler taramalara dayalı olarak oluşturulan dendograma göre 58 adet nematod örneğinden 39 tanesi *D. dipsaci* olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca H05 - H06 primeri ile yapılan moleküler taramaların sonucuna göre de *D. dipsaci* olduğu tespit edilen bu örneklerden 19’ unun *D. dipsaci*’ nin normal ırkı olduğu da belirlenmiştir. Çalışma ile ülkemizde sarımsak yetiştirme alanlarında bulunan soğan sak nematodu ırklarının tespiti, bu nematoda karşı alınabilecek kontrol önlemlerinin daha bilinçli ve etkin bir şekilde yapılmasına yardımcı olacaktır. Dolayısıyla önemli oranda zarar potansiyeli bulunan bu zararlı ile etkin mücadele sarımsak veriminin artışına ve ekonomik kalkınmaya katkı sağlayacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

Sarımsak (*Allium sativum*) zambakgiller familyasında, *Allium* cinsinde yer almaktadır. *Allium*' un yetiştirilmesi tarihte ilk olarak Mezopotamya' da Sümerlerle başlamıştır. Dünyadaki toplam 1.468.811 hektarlık sarımsak ekim alanı göz önüne alındığında Türkiye 15.166 hektarlık sarımsak ekim alanı ile 10. Sıradadır (FAO, 2016). Türkiye İstatistik Kurumunun açıkladığı verilere göre ülkemizde kuru sarımsak üretimi 2009 yılında 83.134 ton iken 2017 yılında 121.805 ton kuru sarımsak üretimi yapılmıştır. Bunun yanında ülkemizin 2009 yılında 22.229 ton olan taze sarımsak üretimi, 2017 yılında 26.328 ton olmuştur (TÜİK, 2017). Bu durum ülkemizdeki sarımsağın ekonomik önemini açıkça ortaya koymaktadır. Ülkemizin hemen hemen her yerinde yetiştirilebilmekte olan sarımsağın verimi dünya ortalamasının yarısı kadardır. Dünya ortalama sarımsak verimi 18,09 hg/ha iken Türkiye ortalaması 8,91 hg/ha' dır. Bu veriler doğrultusunda Çin 26,69 hg/ha verimi ve 21.263.237 ton üretimi ile birinci sırada yer almaktadır. Verimi arttırmak için yapılan çalışmalardan en önemlisi hastalık ve zararlılarla mücadeledir.

Sarımsağın ülkemizde yoğun olarak yetiştirildiği yerler Ege, Karadeniz, Akdeniz ve İç Anadolu bölgeleridir. Kastamonu ülkemizin en önde gelen sarımsak üretim illerinden birisidir. Türkiye' deki yıllık toplam sarımsak üretim miktarının yaklaşık % 20' si Kastamonu ilinde gerçekleştirilmektedir. Sarımsak üretimi Kastamonu' da en fazla Taşköprü ilçesinde yapılmaktadır. İldeki üretilen sarımsak miktarının % 90' lık kısmı Taşköprü' de gerçekleştirilmektedir. Taşköprü sarımsağının kalitesinin yüksek olması, dayanıklılığının fazla olması ve aromasının diğer bölge sarımsaklarından iyi olması nedeni ile ülkemizin başta gelen önemli sarımsak çeşitleri arasındadır (İbret, 2005). Sarımsak, yemeklerde ve ilaç yapımında kullanılan kültür sebzeleri arasında kullanımı çok eski olan sebze türlerinden birisidir. Yemeklere tat ve lezzet kattığı için mutfakların vazgeçilmez sebzelerindendir ve soğan gibi sadece yemek yapımında kullanılmamaktadır. Aynı zamanda yapraklarının ve dişlerinin antibakteriyel, idrar söktürücü, iştah açıcı, solunum ve sindirim yolları rahatsızlıkları ve antitroid etkileri bulunmaktadır. Bunların yanı sıra kan şekeri ve kandaki yağları düşürücü, safra temizleme, öksürük kesici, tansiyon düşürücü, nezleye karşı etkili ve iltihap önleme özellikleri de bulunmaktadır (Anonim, 2017a).

Uzun yıllar boyunca sarımsağın antibakteriyel, antiviral ve antifungal etkilerinden dolayı rahatsızlıklara çare olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Evren ve ark., 2006). Orta çağ zamanlarında verem ve kara veba hastalıklarının tedavisinde de sarımsak başarılı sonuçlar vermiştir. Tıbbi öneminin yanı sıra pek çok yemek çeşidinde yer alır ve çok farklı kültürlerde sıkça kullanılmaktadır. Sarımsağın 100 gramında 63,8 gr su, 28,2 gr karbonhidrat, 5,3 gr protein, 0,2 gr yağ ve 1,1 gr selüloz vardır. Çok fazla kimyasal bileşik içermekte olan sarımsak bitkisinin içinde kükürt ihtiva eden bileşiklerden (allicin, allin ve ajoene) oluşan uçucu yağlar, enzimler (allinaz, peroksidaz ve mirasinaz), karbonhidratlar (sakaroz, glikoz), mineraller, aminoasitler ile A, B1, B2, niasin ve C vitamini gibi önemli bileşikler bulunmaktadır. Keskin kokusunu veren allil sülfid, kükürtlü ve eterli yağlardan oluşmuştur (Ayaz ve Alpsoy, 2007).

Sarımsak, genel olarak besin maddesi ve antimikrobiyel etkilerinden dolayı kurutulmuş sarımsak, sarımsak suyu, sarımsak tozu, uçucu sarımsak yağı ve sarımsak püresi şeklinde doğrudan sarımsaktan elde edilebilen ürünler şeklinde tüketilebilmektedir. Sarımsağın diğer ticari üretimleri ise kokusu alınmış sarımsak tozu tabletleri, yağda bekletilmiş sarımsak yağı, kapsüllenmiş sarımsak yağı veya suyudur. Sarımsak spektrumu geniş antibiyotik olarak nitelendirilmektedir. Sarımsağın mikroorganizmaların etkilerini engelleyici özelliklerinden dolayı bu konu hakkında birçok araştırma yapılmıştır (Evren ve ark., 2006).

Sarımsak insan beslenmesi ve sağlığı açısından bu denli öneme ve çok farklı tüketim şekillerine sahip olmasına karşın sarımsak üretimine zarar veren birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler içerisinde en önemlilerinden biri soğan sak nematodu olarak da bilinen *Ditylenchus dipsaci*' dir.

Kastamonu' da üretiminin çoğu gerçekleştirilen sarımsak bitkisinin yetiştirilmesinden, pazarlanmasına kadar birçok zorluklar yaşanmaktadır. Sarımsağın ekilip hasat edilmesine kadar geçen sürede yörede göçüren olarak adlandırılan nematodlar, zarar görmemiş ve sağlıklı tohum seçme işleminin yapılmadığı ve çok yağışlı geçen dönemlerde büyük miktarda zayıyata neden olmaktadır. Bu zararlının etkilerini azaltmak ve korunmak için mübadeleli ekim yönetimine gidilerek ve aynı zamanda sulama yöntemini değiştirip yağmurlama sistemi ile bitkiler sulanmaya başlamıştır (İbret, 2005).

Bu tez çalışmasında da sarımsak üretimini sekteye uğratan ve her geçen gün daha geniş alanlara yayılış gösteren, bitki paraziti olarak adlandırılan *Ditylenchus dipsaci* nematodunun moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Nematodlarla mücadele etmenin ilk basamağı yayılış alanlarının belirlenmesi ve tür tespitinin gerçekleştirilmesidir.

Nematodlar, sayıca dünya üzerinde en fazla bulunan silindirik yapıda, omurgasız hayvanlar şubesinde bulunmaktadır. Genellikle toprakta, suda ve çürümekte olan organik maddelerde yaşarlar. Vücutları şekilleri uzamış, silindirik, bilateral simetridir. Nematodlar, dünya üzerinde pek çok yaşam yerlerine uyum sağlamışlardır. Birçok nematod türü de bitkilerin çeşitli kısımlarından beslenir ve bitkiye zarar verirler. Bitkilerde beslenen ve zarar veren bu gibi nematodlara bitki paraziti nematodları adı verilmektedir (Anonim, 2017b).

Soğan sak nematodu (*Ditylenchus dipsaci*) soğanlı bitkilerin iç parazit nematodudur ve sak, sürgün ve yapraklarında bulunur. Konukçu bitki içinde dölden dölge geçerler (Anonim, 2014a). Nematodlar, konukçu bitkilerde yaşam koşulları bozulmaya başladığında (bitki çürüdüğünde) bitkiyi terk ederek toprağa geçerler. Soğan sak nematodu olan *Ditylenchus dipsaci* yaşam döngüsünü 15 °C’ de 19 ila 23 gün içinde tamamlar, üreme yeteneğine kavuştuğunda 45-75 gün yaşamını devam ettirir. Nematodun larvaları bitki dokularının yüzeylerinde ya da yüzeyin hemen altında kalarak dördüncü dönem larva şeklinde vücutlarındaki suyun belli bir kısmını bırakarak 5 yıla kadar yaşamlarını koruyabilirler. Konukçu bitki olmadığı durumlarda ise toprakta iki yıl boyunca mantari dokular ile besin ihtiyaçlarını gidererek yaşamlarını devam ettirebilirler. *D. dipsaci* dünyanın her yerine yayılmıştır ancak zararı ılıman bölgelerde daha fazla olmaktadır. Bu bitki parazitleri tropik bölgelerde serin hava ve nemli iklim koşullarını, subtropikal bölgelerdeyse kış aylarında rutubetli yerleri yaşam döngüsünü devam ettirebilmek için tercih eder. Nematodların aktivitesi 36 °C’ de durduğu için bir insana bulaşsa bile herhangi bir zarar veremez (Dikici ve ark., 2014).

Soğan sak nematodu genellikle bitkilerin yaprak, sak, yumru, soğan ve sürgünlerine yayılmış halde görülür. Hücre aralarındaki boşluklara yerleşerek bazı maddeler salgılayarak hücrelerde büyüme ve çoğalma meydana getirir (Anonim, 2017b). Bu bitki paraziti nematod sarımsakta genellikle yapraklarda şekilsiz büyüme, solgunluk,

şişkinlikler ve yıpranmalara neden olur (Şekil 2.1). Genç bitkilerin ölmesine neden olabilir. Yumruların iç bölgeleri dış bölgelerine göre daha çok zarar görür.



Şekil 2.1. Nematodların bitkilere verdiği zarar örnekleri

Soğan sak nematodu olan *Ditylenchus dipsaci* ve *Ditylenchus destructor*, patatestе çürümeye neden olan Kanada’ daki en ciddi zararlılardan ikisidir. Bu nematodlar sıkı bir şekilde denetlenmektedirler ve karantinaya tabidirler. Daha önce Kanada’ da yaygın olarak görülmekte olan nematodla ilgili son veriler endişe verici durumu göstermiştir. *Ditylenchus destructor*’ un zararı ilk olarak Ontario çevresinde tespit edilmiş olup, *D. dipsaci* salgını da Ontario’ daki sarımsak alanlarında görülmüş ve yakın alanlara yayılmaya başladığı bildirilmiştir (Yu ve ark., 2016).

Benzer şekilde ABD’ de 2011 yılında Morrison ve Dakota eyaletlerindeki iki farklı bağımsız sarımsak örneği ve 2012 yılında Minnesota’ daki Carver ilçesinden bir sarımsak örneği, ticari yetiştiriciler tarafından hastalık analizleri için Minnesota Bitki Hastalığı Birimine gönderilmiştir. Bitki parçalarının belirtileri bodurluk ve kloroz olduğu bildirilmiştir. Bitki soğanındaki belirtilerin ise nekroz, gelişememe ve biçim bozuklukları olduğu kaydedilmiştir. Mikroskopik incelemerde, fitonematodların çevredeki su damlalarına sızdıkları gözlemlenmiştir. Gönderilen örneklerin analizi sonucunda, bitki soğanında, koruyucu yapraklarında, absisyon bölgesi ve sarımsak

dişlerinin arasında nematodların olduğu bildirilmiştir. Dişilerin, erkeklerin ve küçük nematodların morfometrik incelemesi ile *Ditylenchus dipsaci* oldukları tespit edilmiştir. Sarımsak dişlerinden ayrılan nematodlar, TAF' de (97 ml formalin [% 40], 2 ml trietanolamin ve 91 ml dH₂O) tespit edilmiştir. Bu bölgelerde üretilen sarımsakların pazarlanamayacağı kabul edilmiş ve çiftçilere büyük oranda zarar vereceği açıklanmıştır. Çalışma sonucunda *D. dipsaci*' nin varlığının sarımsak sektöründe önemli bir ekonomik etkiye sahip olabileceği bildirilmiştir (Mollov ve ark., 2012).

Soğan sak nematodu (*Ditylenchus dipsaci*), tohumlar ve ekim materyalleri vasıtasıyla tüm dünyaya yayılmış karantinaya tabi olan çok önemli bir organizmadır. Bu nematodların oldukça geniş konukçu aralığı ve anhidrobiyoza girme kabiliyetleri nedeniyle bu ciddi zararlıya karşı bitki koruması oldukça zor ve karmaşıktır. Genellikle, eğer toprakta nematod meydana gelirse, sadece toksik nematisidler uygulanması ile yok edilebilir. Bununla birlikte, kullanılabilir nematisitlerin sayısı azdır. Sonuç olarak, yetiştirilen bitkileri *D. dipsaci*' ye karşı korumanın tek yolunun tohum ve fide tedavisi olduğu ifade edilmiştir. Halen, uygulamada çok zor ve tohuma zarar verme riski yüksek olan tohum ön muamelesi olarak sıcak su tekniği kullanmak mümkündür (Zouhar ve ark., 2016).

Evlice ve Bayram 2012 yılında Niğde, Nevşehir, Aksaray, Isparta ve Kayseri illerini kapsayan survey çalışmasında toplam 72 farklı alanda kök-ur nematoduyla bulaşık örnekler toplamışlardır. Bulaşık örneklerden elde edilen ikinci dönem larvalardan ve diş bireylerin vulva kesitlerinden morfolojik teşhisleri yapılmıştır. Ayrıca yumurta paketlerinden DNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve JMV1, JMV2, JMV primerleri ile multiplex polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulanarak moleküler teşhisleri yapılmıştır. Hem morfolojik hem de moleküler yöntemlerle yapılan incelemeler sonucu örneklerin tamamının *Meloidogyne chitwoodi* olduğu bildirilmiştir (Evlice ve Bayram, 2012).

Nematoda şubesinde yer alan ve mikroskobik yuvarlak solucanlar olan *Ditylenchus* Filipjev cinsi birçoğu fungivor olmakla birlikte bitkilerde ciddi zararlara neden olan bitki paraziti türleri içeren bir gruptur. En önemli bitki paraziti türleri; *Ditylenchus destructor* (Thorne) ve *D. dipsaci* (Kühn) Filipjev' dir (Jeszke ve ark., 2014). Dünyanın her yerine yayılmış olan her iki türünde konukçu spektrumları çok geniştir. Bu nedenle

bitkisel üretimde önemli zararlılar arasında yer alırlar. *Ditylenchus destructor* türü çoğunlukla kültürü yapılan bitkilerden patateslerde zarar yapmaktadır ancak sarımsakta zarara neden olmamaktadır.

Ditylenchus dipsaci (Kühn) Filipjev türü ise 500 bitki türünde gelişebilen 30' dan fazla ırka sahiptir (Sturhan ve Brzeski, 1991). Bu nedenle *D. dipsaci* tür kompleksi olarak adlandırılmaktadır. En son yapılan taksonomik çalışmalarda *D. dipsaci* türü iki gruba ayrılmıştır birincisi diploid özellikte bireyleri içeren “*D. dipsaci sensu strico*” veya “normal boyutlu tür” olarak adlandırılan gruptur. Diğer grup poliploid özellikte bireyleri içeren 6 alt gruba ayrılmıştır; *Vicia faba* bitkisinden elde edilen *Ditylenchus* sp. B, *Cirsium setosum* bitkisinden elde edilen *Ditylenchus* sp. C *Pilosella* cinsi bitkilerle ilişkili olan *Ditylenchus* sp. D, *Crepis praemorsa* bitkisinden elde edilen *Ditylenchus* sp. E, *Pilosella* ve *Leontodon* cinsi bitkilerle ilişkili *Ditylenchus* sp. F ve *Plantago maritima* bitkisinden elde edilen *Ditylenchus* sp. G gruplarıdır (Subbotin ve ark., 2005). Bakla (*Vicia faba*) bitkisinden elde edilen *Ditylenchus* sp. B grubu daha sonraki araştırmalarla *Ditylenchus gigas* (Vovlas ve ark., 2011) ve *Ditylenchus* sp. C grubu ise *Ditylenchus weischeri* (Chizhov ve ark., 2010) türü olarak ayrılmıştır.

Ditylenchus dipsaci sensu strico grubunda yer almakta olan bireyler filogenetik kapsamda birbirlerine çok yakın gruplar olarak yer almaktadırlar ve alt tür olarak ayırma gidilememiştir (Subbotin ve ark., 2005). Morfolojik olarak gerçekleştirilen gözlemler neticesinde sonuçlara ulaşmak fazlasıyla deneyim ve oldukça fazla zaman gerektirmekte, ayrıca elde edilen sonuçlar kimi zaman araştırmacılara göre farklılıklar gösterebilmektedir. Bu nedenlerle son yıllarda geleneksel yöntemlerin yanı sıra çok sayıda avantaj ve üstünlükleri nedeniyle moleküler yöntemler nematod sistematğinde sıkça kullanılmaya başlanmıştır (Kılıçoğlu ve Özkoç, 2008).

Nematodlarda taksonomik ayırım ve tanı için günümüzde çok sayıda DNA tabanlı teknik kullanılarak genetik varyasyonlar belirlenebilmektedir (Vrain ve McNamara, 1994; Hyman ve Whipple, 1996; Powers ve Fleming 1998; Abrantes ve ark., 2004). Genomun özel bölgelerinin çoğaltımı tür içindeki ve tür ile cinsler arasındaki varyasyonların saptanmasında etkili bir metottur.

En yaygın iki tekrar bölgesi olan Ribozomal DNA (rDNA) ve mitokondriyal DNA (mtDNA) taksonomik ayırım ve teşhis için kullanılmaktadır (Abrantes ve ark., 2004).

Ditylenchus dipsaci' nin son yıllardaki moleküler tür teşhisi ile ilgili çalışmalar patojenite özelliklerinin kodlandığı gen bölgelerinin analizine yönelik çalışmalardır (Douda ve ark., 2013; Jeszke ve ark., 2014).

Büyük alt birim (LSU) ve küçük alt birim (SSU) genlerinde korunmuş diziler bulunur. Nematodlarda birçok taksonomik çalışmada LSU ve SSU genleri kullanılmıştır. Alt birimler arasındaki ara (spacer) bölgeler; transkripsiyonu yapılan ara bölge (Internal Transcribed Spacer-ITS) ve genler arası bölge (Intergenic Spacer-IGS) olarak adlandırılır. Bu ara bölgeler alt birim dizilerinden daha değişkendir ve en hızlı evrimleşen bölgeler oldukları için türler arasındaki ya da tür içi popülasyonlar arasındaki çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Dahlman ve ark., 2000).

Ribozomal DNA (rDNA) birimi içinde yer alan 18S rDNA, 5.8S rDNA ve 28S rDNA' nın yanısıra ITS bölgeleri nematod sistematğinde en çok tercih edilen bölgelerdir. Daha hızlı evrim geçiren ve kodlanmayan bölge olan ITS bir popülasyon içindeki suşların veya bir cins içindeki nematod türlerinin kıyaslanmasında oldukça kullanışlıdır. ITS bölgesi, kodlanmayan iki değişken bölgeden meydana gelmektedir. Korunmuş küçük alt birim (SSU) ile 5.8S alt birimi arasında (ITS1 bölgesi) ve büyük alt birim (LSU) rRNA genleri ile 5.8S alt birimleri arasında kalan bölgede (ITS2) dizisi yer almaktadır (Kılıçoğlu ve Özkoç, 2008).

ITS bölgesinin dört temel özelliği bu bölgeyi nematodlarda moleküler karakterizasyon çalışmaları için yararlı ve kullanışlı kılmaktadır. Tek bir primer çifti kullanılarak (rRNA) PZR ile kolaylıkla çoğaltılabilen ITS bölgesi diğer dizilere göre küçüktür (500-800 bp). Morfolojik olarak farklı türler arasında ITS bölgesi farklı olabileceğinden sistematik ve filogenetik testler için markör destekli seleksiyon kullanılabilir. ITS bölgesi seyreltik ya da oldukça degrade olmuş DNA örneklerinden bile kolaylıkla çoğaltılabilir. Bunun nedeni rDNA birimlerinin çok sayıda tekrarları olmasıdır. ITS türe özgü problemler, bir kromozomal kütüphane oluşturmaya gerek kalmadan hızlı bir şekilde PZR ile oluşturulabilir. Ayrıca ITS bölgeleri, ribozomal RNA içerisinde tekrarlayan birimler şeklinde olması ile türler arasında değişken, tür içinde benzer olma eğiliminde olmasından dolayı, türe özgü problemleri ve primerleri geliştirmek için yaygın olarak tercih edilmektedirler (White ve ark., 1990; Bruns ve ark., 1991; Lee ve Taylor, 1992; Kılıçoğlu ve Özkoç, 2008).

Filogenetik olarak Volvas ve ark. (2011), 5 farklı gen dizisini [ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi; 28S rDNA geni ve 18S rDNA geninin D2-D3 parçaları; sitokrom c oksidaz I için kısmi mitokondiral geni (*mtCOI*) ve nüklear kodlanan protein *hsp90* geni] kullanarak nematod populasyonları arasındaki genetik ilişkileri analiz etmişlerdir. *D. dipsaci* sensu strico grubu ve *D. gigas* nematodları aralarındaki en büyük fark, *hsp90* ve *mtCOI* gen dizilerinden elde edilmiştir. Benzer olarak *Ditylenchus weisheri* nematodunun *Ditylenchus dipsaci* sensu strico grubundan ayrılması, ITS-rDNA' nın *Hinf*I, *Bsh*1236I, *Taq*I ve *Rsa*I enzimleri ile kesilmesiyle oluşan parçacık polimorfiziminin yanında *hsp90* gen dizisinin testleri ile gerçekleştirilmiştir (Chizhov ve ark., 2010).

D. dipsaci nematodlarının moleküler karakterizasyonunda ve tanımlanmasında kullanılmak üzere spesifik primerler geliştirmek amacıyla yürütülen bir çalışmada iki adet Sekansı Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölge (SCAR) markörü geliştirilmiştir (Zouhar ve ark., 2007). *D. dipsaci*' nin tüm izolatlarında geliştirilen primerlerden DIT2 primeri 325 bp' lik; DIT5 primeri ise 245 bp' lik bir fragment vermiştir. Çalışma neticesinde geliştirilen PZR protokolünün ve primerlerin yüksek düzeyde hassas olduğu ve yapay bir şekilde bitki dokularına bulaştırılan *D. dipsaci* ' lerin spesifik olarak tespit edilmesinde yararlı olduğu bildirilmiştir (Zouhar ve ark., 2007). Başka bir çalışmada, *Ditylenchus dipsaci* sensu strico, *Ditylenchus* sp. B ve *D. destructor* ' u içeren karışık örneklerin analizi için spesifik primerlerin kullanıldığı multipleks PZR tekniği geliştirilmiştir. Bu yöntemle rutin olarak kontrol yapılan karantina laboratuvarlarında gerçekleştirilen işlem basamakları kısaltılmış ve markör destekli seleksiyon çalışmaları için güvenilir bir diyagnostik yöntem geliştirilmiştir (Marek ve ark., 2010).

Türe özgü spesifik primerler kullanan Madani ve ark. (2015), soğan ve köklerde zarar meydana getiren *Ditylenchus dipsaci* ile *Ditylenchus weischeri* ' yi teşhis etmişler ve aralarındaki moleküler farklılıkları ortaya koymuşlardır. Bir diğer çalışmada, *Ditylenchus dipsaci* ' nin normal ve giant ırkları geliştirilen özel primerler ve PZR tekniği ile başarılı bir şekilde tespit edilmiştir (Kerkoud ve ark., 2007). Başka bir araştırmada ise SCAR markörleri ve multipleks PZR ile *Ditylenchus dipsaci* ' nin normal ve giant ırklarının farklılıkları moleküler olarak ortaya konmuştur (Esquibet ve ark., 2003).

Karantinaya tabi nematodlar olan *D. dipsaci* ve *D. destructor* için Sturhan ve Subbotin (2008), bu nematodlara yönelik geliştirilmiş olan diyagnostik PZR-RFLP, ITS-rDNA, SCAR PZR ve spesifik PZR yöntemlerine ait protokollerin başarılı bir şekilde kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Bu yöntemlerin yanı sıra Zouhar ve ark. (2007) ve Esquibet ve ark. (1998) tarafından daha önceleri *Ditylenchus dipsaci*'nin ayırımında rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) tekniği de kullanılmıştır. RAPD markörleri ile giant ve normal ırkların moleküler karakterizasyonunun yapıldığı bir çalışmada, kullanılan primerlerden dördünün *D. dipsaci* popülasyonları için yüksek derecede polimorfik olduğu saptanmıştır (Esquibet ve ark., 1998). Yapılan bir başka çalışmada ise incelenen 30 adet *D. dipsaci* türü karışımının rDNA ITS bölgeleri çoğaltılarak, filogenetik analizleri yapılmış, aralarındaki farklılık ve benzerliklerin gösterildiği dendogram oluşturulmuştur (Subbotin ve ark., 2005). Farklı konukçu bitkilerden elde edilen *Ditylenchus* spp. popülasyonları filogenetik analiz metodları kullanılarak gerçekleştirilen araştırmada *Ditylenchus* spp. sınıflandırılmış ve aralarındaki akrabalık ilişkileri belirlenebilmiştir (Vovlas ve ark., 2011; Jeszke ve ark., 2014).

Farklı bir araştırmada Ontario genelindeki sarımsak örneklerinde morfolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak *Ditylenchus* türlerinin tanımlanması yapılmıştır (Qiao ve ark., 2013). Farklı bölgelerden toplanan 90 popülasyonun genetik çeşitliliği, RAPD primerleri kullanılarak incelenmiştir. Sarımsaktan izole edilen *D. dipsaci* popülasyonlarının; ilin güney taraflarındaki ilçelerden elde edilen ve 19 popülasyon içeren küçük grup ve genellikle doğu bölgesinden elde edilen ama güney batı ve kuzey bölgelerinden de bir kaç popülasyonun dahil edildiği 71 popülasyonu içeren büyük grup olmak üzere iki farklı gruba ayrıldığı saptanmıştır. Sarımsaktan izole edilen *D. dipsaci* popülasyonları arasındaki ortalama benzerlik katsayısının % 82 olduğu ve incelenen popülasyonlarda genetik varyasyon bulunduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmanın *D. dipsaci*'nin ırk içi genetik varyasyonlarını gösteren ilk araştırma olduğu bildirilmiştir (Qiao ve ark., 2013).

Ağırlıklı olarak *Vicia faba* (bakla) üzerinde yetişen popülasyonlar arasındaki ilişkileri belirlemek ve teşhise yönelik markörleri geliştirmek için *D. dipsaci* kompleksindeki DNA polimorfizminin, Çoğaltılmış Parçacık Uzunluğu Polimorfizmi (AFLP) markörleri kullanılarak araştırıldığı bir çalışmada, farklı coğrafi bölgelerden

D. dipsaci' den köken alan 22 popülasyon ve bir *Ditylenchus myceliophagus* popülasyonu kullanılmıştır. İki türün ayrımını yapan iki spesifik AFLP belirteci, SCAR markörüne dönüştürülmüştür. Multipleks PZR' de kullanılan SCAR primerinin, *D. dipsaci*' nin giant ve normal tiplerini tanımlamak için hızlı ve etkili bir araç olduğu gösterilmiştir (Esquibet ve ark., 2003).

Kerkoud ve ark. (2007), *Ditylenchus dipsaci* tür kompleksine ait bitki soğanı ve gövde nematodunun tanımlanması için PZR' ye dayalı spesifik primerlerin kullanılmasına dayanan bir teknik geliştirilmişlerdir. *D. dipsaci* sensu stricto ve *Ditylenchus* sp. B' ye ait olan, *D. dipsaci* tür kompleksinin 20 popülasyonunun ITS1 ve ITS2 bölgeleri, 5.8S, 18S ve 26S genlerine özgü iki genel ribozom primeri ile çoğaltılmıştır. PZR ile çoğaltılmış DNA örnekleri, *Fabaceae* tohumlarıyla ilişkili *D. dipsaci* popülasyonlarının tanımlanmasına izin veren bazı polimorfizmleri ortaya çıkarmak için beş adet restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Türler arasındaki polimorfizm, PZR ürünlerinin dizi analizi ile teyit edilmiştir. Hem *D. dipsaci* sensu stricto hem de çalışmada ele alınan *Ditylenchus* spp. türlerinin tüm popülasyonlarında korunan bir bölgeye yönelik bir primer (DdpS2) tasarlanmıştır. Ribozomal bölgede bulunan bu primer ile baklagil (*Fabaceae*) tohumlarında bulunan *D. dipsaci* tür kompleksi popülasyonlarının PZR ile tanımlanmasında iyi bir aday olduğu bildirilmiştir. İkinci bir primerin (DdpS1) de benzer şekilde tasarlandığı ve *D. dipsaci* sensu stricto' ya özgü olduğu ifade edilmiştir (Kerkoud ve ark., 2007).

Bitki soğanı ve gövde nematodu *Ditylenchus dipsaci*' nin farklı popülasyon ve ırklarının morfolojik, biyokimyasal, moleküler ve karyolojik analizleri bu grubun bir tür kompleksini temsil ettiğini göstermektedir. Bunlardan yalnızca *D. dipsaci* sensu stricto ve onun morfolojik olarak daha büyük varyantı olan ve *D. gigas* olarak bilinen varyantı ekonomik açıdan önemli bitki parazitleridir. Bu çalışmada, bu kompleks içinden *Ditylenchus gigas* n. sp. adlı yeni bir tür olarak tanımlanan bir ırk, Güney İtalya, Güney İspanya ve Lübnan' dan toplanan çeşitli nematod popülasyonlarından elde edilen morfolojik ve moleküler veriler temel alınarak ortaya çıkarılmıştır. ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi, gen dizileri dahil rDNA dizilerinin moleküler analizinin sonuçları, *D. dipsaci* eski dev ırkının yeni taksonomik tür statüsünü desteklerken ve *D. gigas* n. sp.' inin *D. dipsaci* sensu stricto' dan net bir şekilde ayırt edilebileceğini göstermiştir (Volvas ve ark., 2011).

Asma bitkisinin köklerinden elde edilen ve *Ditylenchus* cinsinin yeni üyesi olan *D. periscus* n. sp.' nin moleküler ve morfolojik açıdan farklılıklarının incelendiği bir çalışmada, *D. persiküs* n. sp.' nin morfolojik olarak cinsin bilinen beş türüne (*D. arachis*, *D. caudatus*, *D. clarus*, *D. myceliophagus* ve *D. nanus*) yakın benzerliklere sahip olduğu belirlenmiştir. 28S rRNA, ITS ve kısmi 18S rRNA gen bölgelerine özgü primerlerle moleküler karakterizasyona dayanan filogenetik analizlerin sonuçları neticesinde, *D. persicus* n. sp.' nin *D. myceliophagus*, *D. africanus*, *D. arachis*, *D. destrucor* ve *D. halictus* gibi diğer *Ditylenchus* türleri ile moleküler olarak benzer olduğu doğrulanmıştır (Esmaceli ve ark., 2017)

Marek ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada, *Ditylenchus* cinsinin nematodlarının sınıflandırılması ve teşhisini geliştirmek için rDNA dizi verilerinin belirlenmesi ve bilgisayar destekli karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. ITS1-5.8S-ITS2 parçalarının dot-plot analizleri, *D. destructor*' un ITS1 bölgesinde lokalize edilmiş kısa tekrarlanan DNA motiflerinin varlığını ortaya çıkarırken, cinsin diğer üyelerinde benzer DNA tekrarları tanımlanmamıştır. Buna ek olarak, karmaşık filogenetik çalışmalar için değerli bir kaynak sağlayan ITS2 transkriptleri için üç alanlı sekonder yapı modelleri çıkarılmıştır. Son olarak, ITS-rDNA sekans verisinin hizalanması ve oligonükleotid kombinasyon denemeleri taksona özgü güçlendirilmiş bölgelerin gelişimine yol açmıştır. Ayrıca, *Ditylenchus* bitki-parazit nematodlarının en yaygın üç taksonu olan *D. dipsaci sensu stricto*, *Ditylenchus* sp. B ve *D. destructor*, multipleks PZR tabanlı bir yaklaşımla tespit edilmiştir. Bu DNA teknolojisinin, bitki sağlığı kontrolü ve markör destekli seleksiyonda (MAS) kullanılabileceği, moleküler teşhisler açısından oldukça değerli olduğu ifade edilmiştir (Marek ve ark., 2010).

Farklı konukçu bitkilerden elde edilen 23 adet *Ditylenchus dipsaci* popülasyonunun rDNA ITS bölgesinin amplifikasyonu ve sekanslamasının gerçekleştirildiği bir çalışmada, ITS1 ve ITS2 sekans dizilimlerinin filogenetik analizi iki ana kademeli olarak ortaya çıkarılmıştır: (i) *D. dipsaci sensu stricto*, diploid kromozom sayılarına sahiptir ve tarımsal, süsen ve birçok yabancı bitkiden elde edilen izolatların çoğundan oluşur ve (ii) *Ditylenchus spp.* poliploid kromozom sayılarıyla, diploid popülasyonlardan izole edilmiş ve altı alt bölüme ayrılmıştır. Filogenetik analizler için rDNA ITS bölgelerinin başarılı bir şekilde kullanılabileceği ifade edilmiştir (Subbotin ve ark., 2005).

Marek ve ark (2010) tarafından gerçekleştirilen çalışmada *D. dipsaci* sensu stricto, *Ditylenchus* sp. B ve *D. destructor*’ u içeren karışık örneklerden oluşan popülasyonun analizi için türe özgü 18S - 26S primer seti kullanılmıştır. PZR ürünlerinin jel görüntüleri incelendiğinde *D. dipsaci* sensu stricto için 967 bp, *Ditylenchus* sp. B için 966 bp ve *D. destructor*’ da ise 1105 bp’ lik bir ürün verdiği bildirilmiştir.

2011 yılında gerçekleştirilen çalışmada, baklada birçok nematod popülasyonlarından elde edilen morfolojik ve moleküler veriler esas alınarak *D. dipsaci*’ nin iki farklı türü olan *D. dipsaci* sensu stricto ve *D. gigas* türlerinin morfolojik ve moleküler taramaları gerçekleştirilmiştir. Moleküler olarak gerçekleştirilen taramalarda türe özgü üç adet primer seti (D2A - D3B, TW8 - AB28, 18S - 26S) kullanılmıştır. Moleküler taramalar sonucunda iki türün ayrımının başarılı ve güvenilir bir şekilde gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Vovlas ve ark., 2011). Bu tez çalışmasında da 18S - 26S primerleri kullanılarak moleküler taramalar yapılmıştır.

Ditylenchus dipsaci soğan ve sarımsağın önemli bir patojenidir ve ürün kalitesinde azalmaya neden olur. Yapılan bir çalışmada (Pethybridge ve ark., 2016) 345 sarımsak örneği *Ditylenchus* spp. türleri için test edilmiştir. *Ditylenchus* spp. cinsinin bulaşıklık oranının % 14,1 olduğu bildirilmiştir. İncelenen örneklerden otuz tanesinin, morfoloji ve türlere spesifik PZR ile *D. dipsaci* olarak tanımlandığı bildirilmiştir. Ribozomal DNA’ nın ITS1-5.8S-ITS2 bölgesinin sıralaması, popülasyonların birbirine % 99,7 ila % 100 benzer olduğu belirlenmiştir. Bir popülasyonun *Ditylenchus* spp. olarak tanımlandığı ve ITS1-5.8S-ITS2 bölgesi bakımından *D. destructor*’ a % 97 benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. Bu bilgilerin, incelenen bölgelerde sarımsak için gelecekteki zararlı salgınlara izlenmesi ve yönetim önerilerinin etkinliği açısından yararlı olacağı açıklanmıştır. Popülasyonun çoğunluğu (30/31), morfolojik özelliklerin gözlenmesi ile *D. dipsaci* olarak tanımlanmıştır. *D. dipsaci*’ nin teşhisini daha da teyit etmek için Marek ve ark. (2005) tarafından geliştirilen türe spesifik PZR primerleri (PF1 - PR1) kullanılmıştır. PZR ile spesifik tür tanımlamasının daha kesin ve güvenilir şekilde yapıldığı ifade edilmiştir (Pethybridge ve ark., 2016). Bu tez çalışmasında da moleküler karakterizasyonda kullanılan PF - PR1 primeri ile yararlı sonuçlar elde edilmiştir.

D. dipsaci’ nin normal ve dev (giant) ırkları arasındaki farklılığı göstermek amacıyla SCAR PZR testi geliştirilmiştir (Esquibet ve ark., 2003). Bu amaçla H05 - H06 ve D09

- D10 primer setleri kullanılarak PZR yapılmıştır. *D. dipsaci*’nin normal ırklarında 242 bp’lik bant gözlenirken, *D. dipsaci*’nin dev ırklarında ise 198 bp’lik bir bant gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu iki primer seti içinde hedef olmayan türler için amplifikasyon gözlenmeyeceği bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında da bu primer setlerinden H05 - H06 kullanılarak ırk ayrımı yapılmıştır.

Subbotin ve ark. (2005) tarafından geliştirilen teknik, *D. dipsaci*’nin normal türleri için türe özgü olarak tasarlanmıştır. *D. destructor*, *D. dipsaci* normal ırkı ve *Ditylenchus spp.* karşılıklı olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada DitNF1 ve rDNA2 primer seti kullanılmıştır. Bu primer çiftinin *D. dipsaci* için yaklaşık 263 bp’lik bir fragment verdiği, hedef olmayan türler için ise bant vermediği bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında da aynı primer seti başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Kerkoud ve ark. (2007) *D. dipsaci* için türe özgü bir tespit tekniği geliştirmişlerdir. Değerlendirme *D. dipsaci*, *D. africanus*, *D. destructor*, *D. myceliophagus*, *Aphelenhoides ritzemabosi* ve diğer *Ditylenchus* türleri arasında yapılmıştır. Bu testte iki primer seti kullanılmıştır. DdpS1 - rDNA2 primer seti *D. dipsaci* için 517 bp, DdpS2 - rDNA2 primer setleri ise *D. dipsaci* ve *D. gigas* türlerinde 707 bp’de bant verdiği bildirilmiş ve tür tespiti için kullanılmıştır. Benzer şekilde DdpS1 - rDNA2 primerleri bu tez çalışmasında da tür tespitinde kullanılmıştır.

Marek ve ark. (2005) tarafından türe spesifik olarak *D. dipsaci* için geliştirilen PF1 - PR1 primer setinin hedef olmayan diğer cins popülasyonlarında bant vermediği, *D. dipsaci*’de ise 327 bp’lik bir bant verdiği bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında da kullanılan primer çifti *D. dipsaci*’nin tespitinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Ditylenchus dipsaci nematodunun moleküler taramalarında ve karakterizasyonunda kullanılmak için türe özgü primerler geliştirmek amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada iki adet SCAR markörü geliştirilmiştir (Zouhar ve ark., 2007). Gerçekleştirilen çalışmada tüm *D. dipsaci* nematod örneklerinin geliştirilen primer setlerinden DIT-2 primeri ile 325 bp’lik; DIT-5 primeri ile ise 245 bp’lik bir bant uzunluğu verdiği saptanmıştır. Ayrıca geliştirilen SCAR primerleri 20 farklı ve sağlıklı konukçu bitkide PZR yapılarak test edilmiş ve herhangi bir çoğaltım olmadığı görülmüştür. Çalışma sonucunda geliştirilen PZR protokolünün *Ditylenchus dipsaci* nematodunun spesifik bir

şekilde tespit edilebilmesinde kullanışlı bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Zouhar ve ark., 2007).

Yavuzaslanoglu ve ark. (2017) gerçekleştirdikleri çalışmada 51 adet nematod popülasyonunda, beş adet türe spesifik primerler ile (PF1 - PR1, PF2 - PR2, DdpS1 - rDNA2, DitNF1 - rDNA2, H05 - H06) moleküler tür tespiti başarılı bir şekilde yapıldığını bildirmişlerdir. İncelenen nematod popülasyonlarından PF1 - PR1, PF2 - PR2, DdpS1 - rDNA2 ve DitNF1 - rDNA2 primer setlerine göre 20 tanesinin *D. dipsaci* olduğu bildirilmiştir. H05 - H06 primeri ile gerçekleştirdikleri PZR taramalarında ise dört popülasyonun *D. dipsaci*'nin normal ırkı olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde PF1 - PR1, PF2 - PR2, DdpS1 - rDNA2, DitNF1 - rDNA2 ve H05 - H06 primer setleri bu tez çalışmasında moleküler tür tespitinde kullanılmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

Nematod örnekleri Türkiye’ de sarımsak üretiminin en fazla gerçekleştirildiği Kastamonu, Amasya, Tokat, Aksaray, Tekirdağ, Balıkesir, Bursa, Hatay, Gaziantep, Kahramanmaraş, Adıyaman ve Kırklareli illeri örnekleme alanlarından alınmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Örneklemenin yapıldığı il ve köyler

Örnek No	Toplanıldığı İl	Toplanıldığı İlçe/Köy
01	Hatay	Demirköprü Köyü
02	Hatay	Kırıkhan
03	Hatay	Reyhanlı-1
04	Hatay	Reyhanlı-2
05	Hatay	Reyhanlı-3
06	Hatay	Reyhanlı-4
07	Tekirdağ	Köseilyas Köyü
08	Tekirdağ	Merkez
09	Tekirdağ	Kayı
10	Aksaray	Toprakkaya-1
11	Aksaray	Toprakkaya-2
12	Aksaray	Acıpınar-1
13	Aksaray	Acıpınar-2
14	Aksaray	Sapmaz Köyü-1
15	Aksaray	Akyamaç Köyü
16	Aksaray	Sapmaz Köyü-2
17	Aksaray	Acıpınar-3
18	Gaziantep	Yeniköy
19	Gaziantep	Koçaklar Köyü-1
20	Gaziantep	Koçaklar Köyü-2
21	Gaziantep	Koçaklar Köyü-3
22	Gaziantep	Koçaklar Köyü-4
23	Tokat	Dedeli Köyü
24	Tokat	Döllük Köyü
25	Tokat	Kızılköy
26	Tokat	Yakınca Köyü
27	Balıkesir	Karacalar köyü
28	Bursa	Yenişehir
29	Amasya	Gümüşhacıköy-1

Çizelge 3.1. Örneklemenin yapıldığı il ve köyler (devam)

30	Amasya	Gümüşhacıköy-2
31	Amasya	Gümüşhacıköy-3
32	Kastamonu	Taşköprü-1
33	Kastamonu	Taşköprü-2
34	Kastamonu	Taşköprü-3
35	Kastamonu	Taşköprü-4
36	Kastamonu	Taşköprü-5
37	Kastamonu	Afşar Köyü
38	Kastamonu	Donalar Köyü
39	Kastamonu	Vakıfbelören Köyü
40	Kastamonu	Vakıfbelören Köyü
41	Kastamonu	Yukarı Çauırcık Köyü
42	Kastamonu	Yukarı Çauırcık Köyü
43	Kastamonu	Vakıfbelören Köyü
44	Kahramanmaraş	Aksu Köyü
45	Kahramanmaraş	Karaçay Köyü
46	Kahramanmaraş	Tatar Köyü
47	Kahramanmaraş	Yaylaüstü Köyü
48	Adıyaman	Köseli Köyü
49	Adıyaman	Yeşilyurt Köyü
50	Balıkesir	Pamukça Beldesi
51	Balıkesir	Çinge Köyü
52	Kırklareli	Osmaniye Köyü
53	Kırklareli	Osmaniye Köyü
54	Gaziantep	Yakacık Köyü
55	Gaziantep	Kaçaklar Köyü
56	Gaziantep	Köklüce Köyü
57	Gaziantep	Yeniköy
58	Gaziantep	Göçmez Köyü

Bitki paraziti nematod türlerini belirlemek amacıyla, Türkiye’ de sarımsak üretiminin en fazla gerçekleştirildiği Hatay, Tekirdağ, Aksaray, Gaziantep, Tokat, Balıkesir, Bursa Amasya, Kastamonu, Kahramanmaraş, Adıyaman ve Kırklareli illerinden 2016 yılı Mayıs, Haziran ve Temmuz aylarında 20 adet, 2017 yılı Nisan, Mayıs ve Haziran aylarında bitkinin gelişimine göre baş bağlama dönemine denk gelecek şekilde 11 adet toprak ve bitki örneği alınmıştır. Ayrıca Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma

Bölümünden Kastamonu, Kahramanmaraş, Balıkesir, Gaziantep, Adıyaman ve Kırklareli illerinden temin edilmiş 27 adet nematod örneğinde de moleküler taramalar yapılmıştır. Toplamda bu tez çalışmasında 58 adet nematod örneğinin moleküler taramaları yapılmıştır. Örneklemenin yapıldığı alanlar Şekil 3.1’ de verilen harita üzerinde işaretlenmiştir.

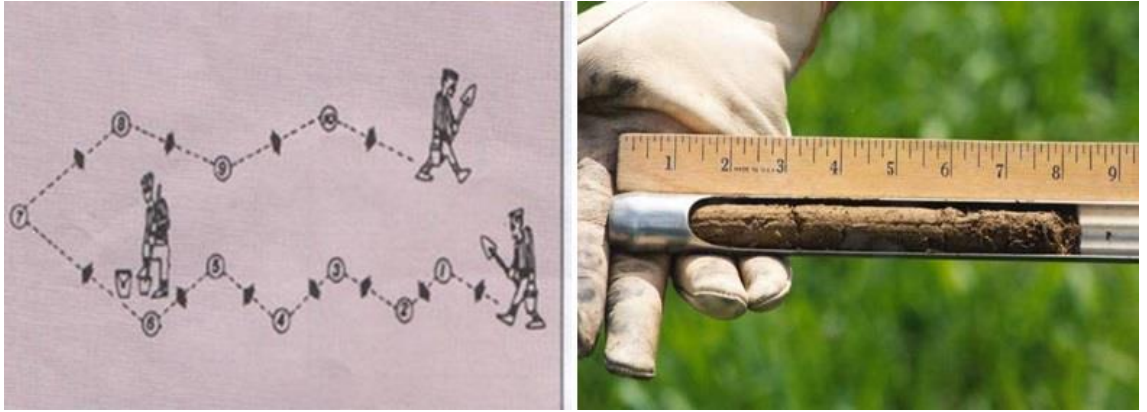


Şekil 3.1. Örneklerin toplandığı iller

Sarımsak bitkileri ve toprak örnekleri bölgedeki sarımsak ekiliş alanlarına göre, o bölgeyi temsil edecek şekilde 3 km’ de bir durularak (Bora ve Karaca, 1970), sarımsak tarlasında zig zag şeklinde yürünerek alınmıştır (Şekil 3.2 ve 3.3). Bir tarladan 10-15 farklı noktadan 2 cm çapında toprak sondası ile alınan topraklar birleştirilerek, yaklaşık 2 kg’ lık bir paçal örnek oluşturulmuştur. O andaki ürün ve eğer mümkün ise bir önceki ürün GPS (Coğrafik Belirleme Sistemi; Geographic Coordinate System) kullanılarak, bulunulan noktanın derece, dakika ve saniye olarak, kuzey meridyenine ve doğu paraleline uzaklığı kayıt edilmiştir (Şahin, 2010). Sarımsak bitkileri ve toprak örnekleri ikişer tekerrür olacak şekilde toplanmıştır.



Şekil 3.2. Bitki ve toprak örneklerinin toplanması



Şekil 3.3. Örnek toplama şekli ve tek seferde alınması gereken toprak miktarı

Sarımsakların ve toprak örneklerinin alındığı survey çalışmasında, toprak örneklerini yeterli derinlikten toplayabilmek için özel olarak yaptırılan metal burgu kullanılmıştır (Şekil 3.4). Bu sayede tarlanın yüzey kısmından değil de 20 cm altından alınan toprak örnekleri ile nematod içeriği bakımından daha zengin olan kök bölgesinden numune alınması ve daha doğru sonuç elde edilmesi sağlanmıştır. Metal burgu Şekil 3.4’ de görüldüğü üzere 70-75° açı ile toprağa batırılıp ve sağa sola çevrilerek toprağın burgu

içerisinde kalması sağlanmıştır. Daha sonra her noktadan alınan toprak örneği plastik poşetlere konularak gerekli etiketleme yapılmıştır.



Şekil 3.4. Örnek toplanırken kullanılan malzemeler ve toprak örneğinin alınma şekli

Sarımsak örnekleri toplanırken bitkiye zarar vermeden topraktan köküyle birlikte sökülüştür (Şekil 3.5). Eğer bitki toprağa sağlam bir şekilde tutunmuşsa bitkinin köküne zarar vermemek için metal burgu bitkinin dibinden 10 cm kadar uzağa batırılıp bitki köküyle birlikte topraktan çıkartılır. Bitki topraktan temizlendikten sonra plastik poşetlere konularak gerekli paketlenme ve etiketleme işlemleri yapılmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.5. Bitki örneğinin topraktan çıkarılması



Şekil 3.6. Bitki ve toprak örneklerinin paketlenip etiketlenmesi

3.1. Nematodların Bitki ve Toprak Örneklerinden Ayrılması

Hareketli nematodlar 100 gr toprak örneğinden (Şekil 3.7) Whitehead ve Hemming (1965) ve Hooper (1986) tarafından geliştirilen Baermann huni yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Bir elek üzerinde olmak üzere toprak örnekleri su içerisinde 3 gün laboratuarda bekletilmiş ve her bir petri kabındaki nematodları bulunduran su 20 µm çapındaki filtreden geçirilerek, nematodlar ayrılmıştır (Şekil 3.8). Nematodları içeren süspansiyonun hacmi 15 ml' lik santrifüj tüpü içinde 1 ml' ye kadar azaltılarak, 1 ml süspansiyon içinden alınan 50 µl örnek içinde bulunan nematodlar cins düzeyinde sayılmıştır. Daha sonra her bir nematod cinsi için sayılan değer 20 ile çarpılarak 1 ml örnek içindeki her bir cinse ait toplam nematod sayısı belirlenmiştir (Şahin, 2010).



Şekil 3.7. Toplanan toprak örnekleri

Sarımsak örneklerinden seçilen 3 adet bitki örneği ayrı petri kaplarına elekler üzerine yerleştirilerek ve petri kabı çeşme suyu ile doldurularak 4 saat bekletilmiştir. Süre sonunda petri kabındaki su 100 ml' lik mezürlere doldurulmuştur. İki saat süre ile nematodların yerçekimi etkisiyle dipte toplanması için beklenilmiştir. Üst kısımdaki su sifon yapılarak alınmış ve altta kalan 10 ml' lik nematod süspansiyonu 15 ml' lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Sarımsak örneklerinden elde edilen nematod süspansiyonları 1 ml' ye azaltılarak içerisinde alınan 50 µl lam üzerine yerleştirilerek incelenmiştir (Şekil 3.8). Elde edilen örneklerden izole edilen DNA' larda moleküler taramalar yapılmıştır. Nematodların bitki örneklerinden ayrılması için de Walker ve Wilson (1960) tarafından geliştirilen Baermann Huni Tekniği' nin modifiye edilmesiyle geliştirilen seleksiyon petri yöntemi (Hooper, 1986) kullanılmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.8. Mikroskop altında incelenen nematod örnekleri



Şekil 3.9. Baermann huni yönteminin uygulanışı

3.2. Moleküler Tür Teşhislerinin Yapılması

Sarımsak yetiştirme alanlarından toplanan numunelere ait nematod örneklerinin moleküler olarak tür teşhislerinin yapılması iki basamakta gerçekleştirilmiştir. Öncelikle her numunedeki nematod örneklerinden DNA izole edilmiştir. İkinci aşamada izole edilen DNA' lar, *D. dipsaci* sensu strico grubu ile poliploid grupların ayrımını ve özel bölgelerin çoğaltılmasını sağlayan spesifik primerler (Çizelge 3.2) kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. Her bir primer ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin baz büyüklükleri karşılaştırılarak populasyonların grupları teşhis edilmiştir. Her bir aşamada kullanılan prosedürler aşağıda bölümler halinde açıklanmıştır. Moleküler taramalar iki tekrerrür olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.3. DNA İzolasyonu

Nematod örneklerinin DNA izolasyonu Waeyenberge ve ark. (2000) tarafından geliştirilen Holterman ve ark. (2006)' ın modifiye ettiği DNA ekstraksiyonu prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir. İzolasyonda kullanılan solüsyonların hazırlanışı aşağıda verilmiştir.

1) 1M Sodyum Klorür stok solüsyon;

- 5,84 gr NaCl 100 ml dH₂O' da çözülür.
- Otoklavlanır, 4 °C de saklanır.

2) 1M Tris HCl (pH 8) stok solüsyon;

- 12,11 gr Tris 100 ml dH₂O' de çözülür.
- HCl kullanılarak pH 8.0 ayarlanır.
- Otoklavlanır, 4 °C de saklanır.

3) 20 mg/ml Proteinase K stok solüsyon;

- 20 mg Proteinase K steril su ile çözülür, toplam hacim 1 ml' ye tamamlanır. -20 °C en fazla bir yıl saklanabilir.

4) Lizis Tampon Negatif (WLB-)

- Karışım 2 ml 1M NaCl + 2 ml 1M Tris-HCl (pH 8) 5,5 ml olacak şekilde 10-15 ml' lik steril plastik tüplerde steril su içinde hazırlanır. +4 °C' de saklanır.

5) Lizis Tampon Pozitif (WLB+)

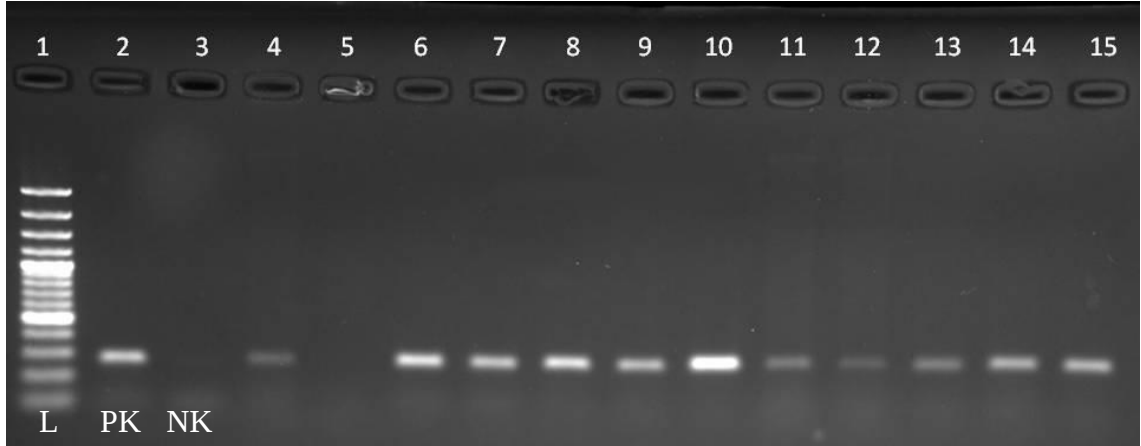
- Karışım 950 µl WLB- + 10 µl beta-merkaptoetanol (saf olarak) + 40 µl 20 mg/ml Proteinase K 1,5-2 ml' lik ependorf tüp içinde hazırlanır.
- -20° C' de en fazla bir ay saklanabilir.

DNA İzolasyonu Prosedürü:

- 5 nematod 25 µl steril su içinde PZR tüpüne konulur.
- Üzerine 25 µl WLB+ eklenir.
- 65 °C' de 1,5 saat ve sonrasında 99 °C' de 5 dakika ısıtıcı blokda inkübe edilir.

DNA izolasyonu yapıldıktan sonra izolasyonun başarılı olup olmadığı örnekler agaroz jelde yürütülerek görülebilir. Ancak nematod DNA' ları çok küçük oldukları için jel de

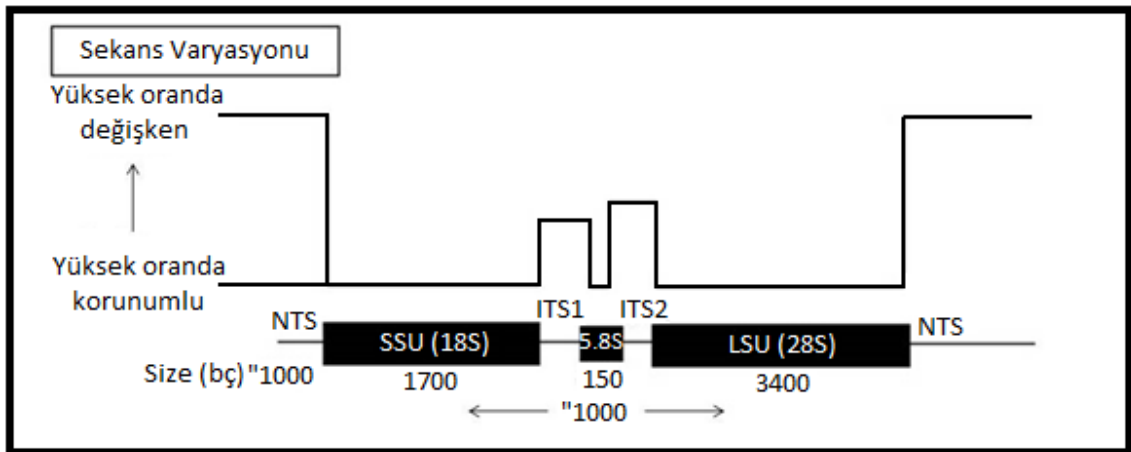
yürütüldükleri zaman doğrudan görüntülenememektedir. Bunun için DNA izolasyonu sonrasında örnekler DitNF1 - rDNA2 primeri kullanılarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıp, elde edilen PZR ürünleri 24 ml 5x TBE, 96 ml ddH₂O, 1,2 gr Agaroz ve 13µl Etidyum Bromür (10 mg/ml) içeren toplam hacmi 120 ml' lik % 1' lik agaroz jellerde koşulmuş ve görüntülenmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. DNA izolasyonu kontrolü için DitNF1 - rDNA2 primeri ile yapılan PZR ürünlerine ait jel görüntüsü

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Bu tezde kullanılan ve nematod genomu boyunca dağılım gösteren 5.8S, 18S ve 28S rDNA bölgelerini hedefleyen, ITS bölgelerini çerçeve içine alan primer setleri Çizelge 3.2' de verilmiştir. Nematod genomu Şekil 3.11' de verilmiştir.



Şekil 3.11. Nematod genomu

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan SSR ve SCAR primerlerine ait dizi bilgileri

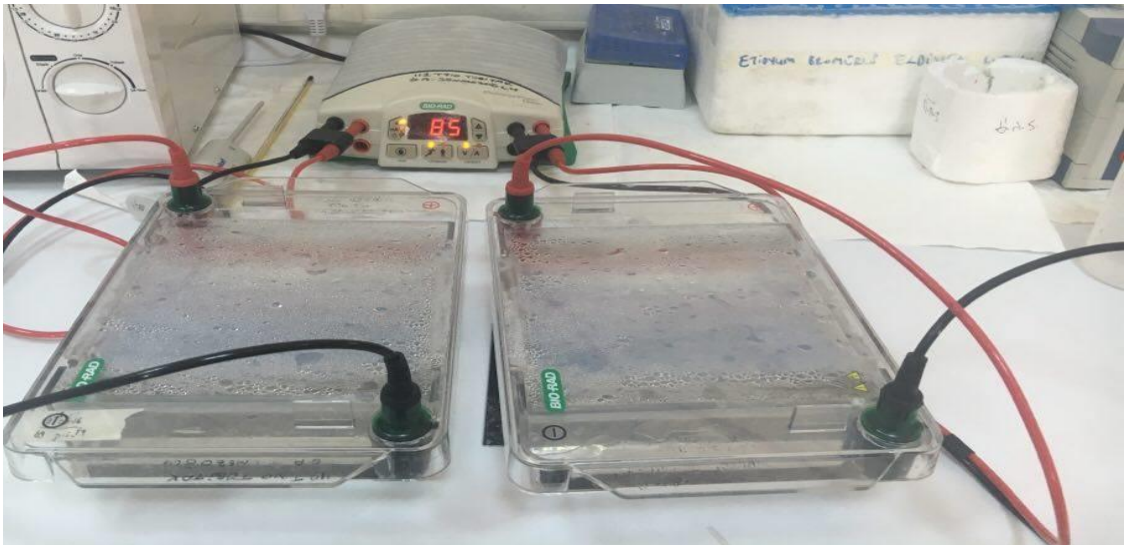
Primer Adı	Primer Dizisi (5' --- 3')	<i>D. dipsaci</i> ' de Beklenen Bant Büyüklüğü (bç)	Hedef Bölge	Kaynak Makale
DdpS1	5'-TGGCTGCGTTGAAGAGAACT-3'	517 bç	5.8S rDNA	Vrain ve ark., 1992
rDNA2	5'-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3'			
DipU F	5' -CCCATTTTTGAACTTTTTTACAAG-3'	333 bç	ITS bölgelerini çevreleyen	Vovlas ve ark., 2011
DipU R	5' -CTAGATTAGCAAAGACGTATATC-3'			
DipU F	5' -CCCATTTTTGAACTTTTTTACAAG-3'	256 bç	ITS1-ITS2	Marek ve ark., 2010
Dip1 R	5' -GAAAAGCACCCAACCACTACC-3'			
DIT2 F	5'-GCAATGCACAGGTGGATAAAG-3'	325 bç	ITS bölgelerini çevreleyen	Zouhar ve ark., 2007
DIT2 R	5'-CTGTCTGTGATTTACGGTAGAC-3'			
DIT5 F	5'-GAAAACCAAAGAGGCCGTAAC-3'	245 bç	ITS bölgelerini çevreleyen	Zouhar ve ark., 2007
DIT5 R	5'-ACCTGATTCTGTACGGTGCAA-3'			
DitNF1	5'-TTATGACAAATTCATGGCGG-3'	263 bç	18S ve ITS1	Vrain ve ark., 1992
rDNA2	5'-TTTCACTCGCCGTTCTAAGG-3'			
H05	5'- TCAAGGTAATCTTTTTCCCCACT-3'	242 bç	5.8S rDNA	Esquibet ve ark., 2003
H06	5'-CAACTGCTAATGCGTGCTCT-3'			
PF1	5'-AACGGCTCTGTTGGCTTCTAT-3	327 bç	ITS bölgelerini çevreleyen	Marek ve ark., 2005
PR1	5'-ATTTACGACCCTGAGCCAGAT-3'			
PF2	5'-TCGCGAGAATCAATGAGTACC-3'	396 bç	ITS bölgelerini çevreleyen	Marek ve ark., 2005
PR2	5'-AATAGCCAGTCGATTCCGTCT-3'			
18S	5' -TTGATTAGGTCCCTGCCCTTT-3'	967 bç	ITS1-5.8S-ITS2	Marek ve ark., 2010
26S	5' -TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3'			

Polimeraz Zincir Reaksiyonlarında PF1-PR1 primer seti için Dream Tag Green MM (Thermo, K1081), diğer primerler için ise Tag polimeraz (Thermo, EP0402) enzimleri kullanılmıştır. PZR ısı döngüleri ve miktarları kaynak makaleler referans alınarak optimize edilerek ayarlanmıştır (Vrain ve ark., 1992; Esquibet ve ark., 2003; Marek ve ark., 2005; Zouhar ve ark., 2007; Vovlas ve ark., 2011). PZR' lerde negatif kontrol (NK) olarak DNA yerine su, pozitif kontrol (PK) olarak ise *Ditylenchus dipsaci* olduğu kesin olarak bilinen önceden hazırlanmış havuç kültürlerinden temin edilen örnekler kullanılmıştır. PZR işlemi, BIO-RAD C1000 Touch Thermal Cycler kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Tez çalışmasında kullanılan ısı döngüsü cihazı

DNA ve PZR ürünlerinin elektroforezi % 1' lik agaroz jellerde UV ışık altında Sambrook ve ark. (1989) tarafından belirtilen standart yöntemlere göre gerçekleştirilmiştir. PZR ürünlerinin yürütülmesinde Thermo Scientific EC 1000 XL Power Supply Elektroforez Sistemi (Şekil 3.13), PZR ürünlerinin yürütüldüğü jellerin görüntülenmesinde ise BIO-RAD ChemiDOC MP görüntüleme sistemi (Şekil 3.14) kullanılmıştır.



Şekil 3.13. PZR ürünlerinin yürütüldüğü agaroz jel elektroforezi



Şekil 3.14. Jel görüntüleme sistemi

PZR reaksiyonları her bir primer için kaynak makalelerinde belirtilen şartlar optimize edilerek yapılmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primerlere ait PZR koşulları

Primer Adı	PZR Döngüsü	PZR Mix (1x)
DdpS1 rDNA2	94°C 1 dk 94°C 30 dk 60°C 30 sn 72°C 45 sn 72°C 10 dk 40 döngü	2 µL 10X Tag Buffer with KCL 1,2 µL MgCl ₂ 1,6 µL dNTP 1,5 µL Primer F 0,2 µL Tag 10 µL ddH ₂ O 3 µL DNA
DipU F DipU R	95°C 11 dk 95°C 45 sn 55°C 30 sn 72°C 1 dk 72°C 5 dk 45 döngü	2,2 µL 10X Tag Buffer with KCL 2,2 µL MgCl ₂ 1,76 µL dNTP 0,22 µL Primer F-R 0,44 µL Tag 14,96 µL ddH ₂ O 3 µL DNA
DipU F Dip1 R	95°C 11 dk 95°C 45 sn 55°C 30 sn 72°C 1 dk 72°C 5 dk 45 döngü	2,2 µL 10X Tag Buffer with KCL 2,2 µL MgCl ₂ 1,76 µL dNTP 0,22 µL Primer F-R 0,44 µL Tag 14,96 µL ddH ₂ O 3 µL DNA

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primerlere ait PZR koşulları (devam)

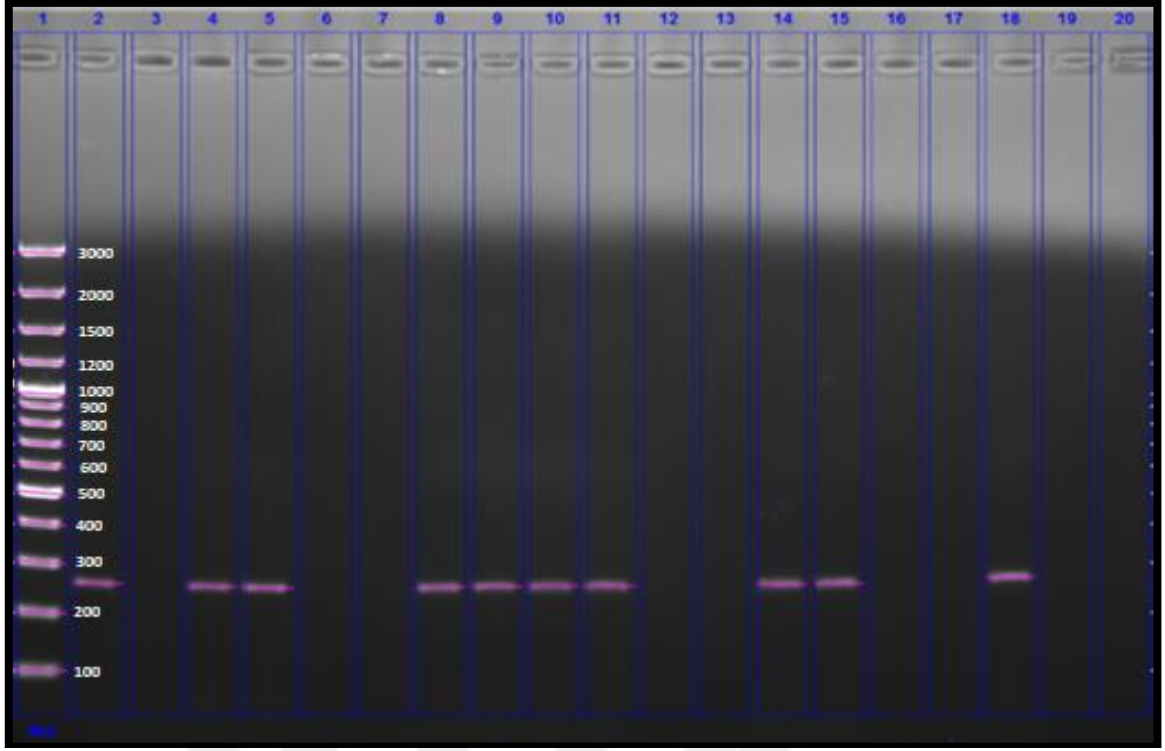
Primer Adı	PZR Döngüsü	PZR Mix (1x)
DIT2 F DIT2 R	94°C 3 dk 95°C 1 dk 58.7°C 45 sn 72°C 1 dk 72°C 10 dk 30 döngü	2,5 µL 10X Tag Buffer with KCL 2,5 µL MgCl ₂ 2,2 µL dNTP 0,30 µL Primer F-R 0,5 µL <i>Tag</i> 13,7 µL ddH ₂ O 3 µL DNA
DIT5 F DIT5 R	94°C 3 dk 94°C 1 dk 58.7°C 1 dk 72°C 90 sn 72°C 10 dk 35 döngü	2,5 µL 10X Tag Buffer with KCL 2,5 µL MgCl ₂ 2,2 µL dNTP 0,30 µL Primer F-R 0,5 µL <i>Tag</i> 13,7 µL ddH ₂ O 3 µL DNA
DitNF1 rDNA2	94°C 4 dk 94°C 15 sn 57°C 30 sn 72°C 30 sn 72°C 10 dk 35 döngü	2,5 µL 10X Tag Buffer with KCL 1,5 µL MgCl ₂ 2 µL dNTP 0,15 µL Primer F-R 0,4 µL <i>Tag</i> 15,3 µL ddH ₂ O 3 µL DNA
H05 H06	94°C 3 dk 94°C 1 dk 57°C 1 dk 72°C 1 dk 72°C 10 dk 30 döngü	2 µL 10X Tag Buffer with KCL 1,2 µL MgCl ₂ 0,8 µL dNTP 1,5 µL Primer F-R 0,2 µL <i>Tag</i> 9,8 µL ddH ₂ O 3 µL DNA
PF1 PR1	94°C 3 dk 94°C 2 dk 62°C 30 sn 72°C 2 dk 72°C 10 dk 30 döngü	7,5 µL Dream Tag 0,5 µL Primer F-R 13,5 µL ddH ₂ O 3 µL DNA
PF2 PR2	94°C 3 dk 94°C 2 dk 63°C 30 sn 72°C 2 dk 72°C 10 dk 30 döngü	2,5 µL 10X Tag Buffer with KCL 2 µL MgCl ₂ 2 µL dNTP 0,25 µL Primer F-R 0,3 µL <i>Tag</i> 14,7 µL ddH ₂ O 3 µL DNA
18S 26S	94°C 2 dk 94°C 30 dk 60°C 20 sn 72°C 1 dk 72°C 7 dk 30 döngü	2,2 µL 10X Tag Buffer with KCL 2,2 µL MgCl ₂ 1,76 µL dNTP 0,22 µL Primer F-R 0,44 µL <i>Tag</i> 14,96 µL ddH ₂ O 3 µL DNA

Araştırmada incelenen nematodlarının DNA'larına ait PZR ürünlerinin tüm jellerde yürütülme sırası Çizelge 3.4' deki gibi düzenlenmiştir. Jellerde verilen numaralar Çizelge 3.1' de verilen örnek numaraları ile aynıdır.

Çizelge 3.4. PZR ürünlerinin jele yüklenme sırası

1. Jel Sıra No	2. Jel Sıra No	3. Jel Sıra No	4. Jel Sıra No
100 bç Ladder	100 bç Ladder	100 bç Ladder	100 bç Ladder
Pozitif Kontrol	Pozitif Kontrol	Pozitif Kontrol	Pozitif Kontrol
Negatif Kontrol	Negatif Kontrol	Negatif Kontrol	Negatif Kontrol
01	18	30	42
02	19	31	43
03	20	32	44
04	21	33	45
05	22	34	46
06	23	35	47
07	24	36	48
08	25	37	49
09	26	38	50
10	27	39	51
11	28	40	52
12	29	41	53
13			54
14			55
15			56
16			57
17			58

Jel imaj sisteminde görüntülenen jellere ait fotoğraflar Biorad ChemiDoc MP programında açıldıktan sonra kuyucuklar (lane) işaretlenmiştir. Ladder' ın baz çifti (bç) bakımından bant büyüklükleri ve bulunduğu kuyucuk numarası girilmiştir (Şekil 3.15). Çalışmada 100 bç Ladder (Thermo Scientific, SM0321) kullanılmıştır. Filogenetik analizlerde kullanılmak üzere tüm primerlerin bantlarını içeren tablo oluşturulurken beklenen büyüklükteki bant varsa 1 yoksa 0 yazılmıştır.



Şekil 3.15. Bant büyüklükleri işaretlenmiş jel görüntüsü

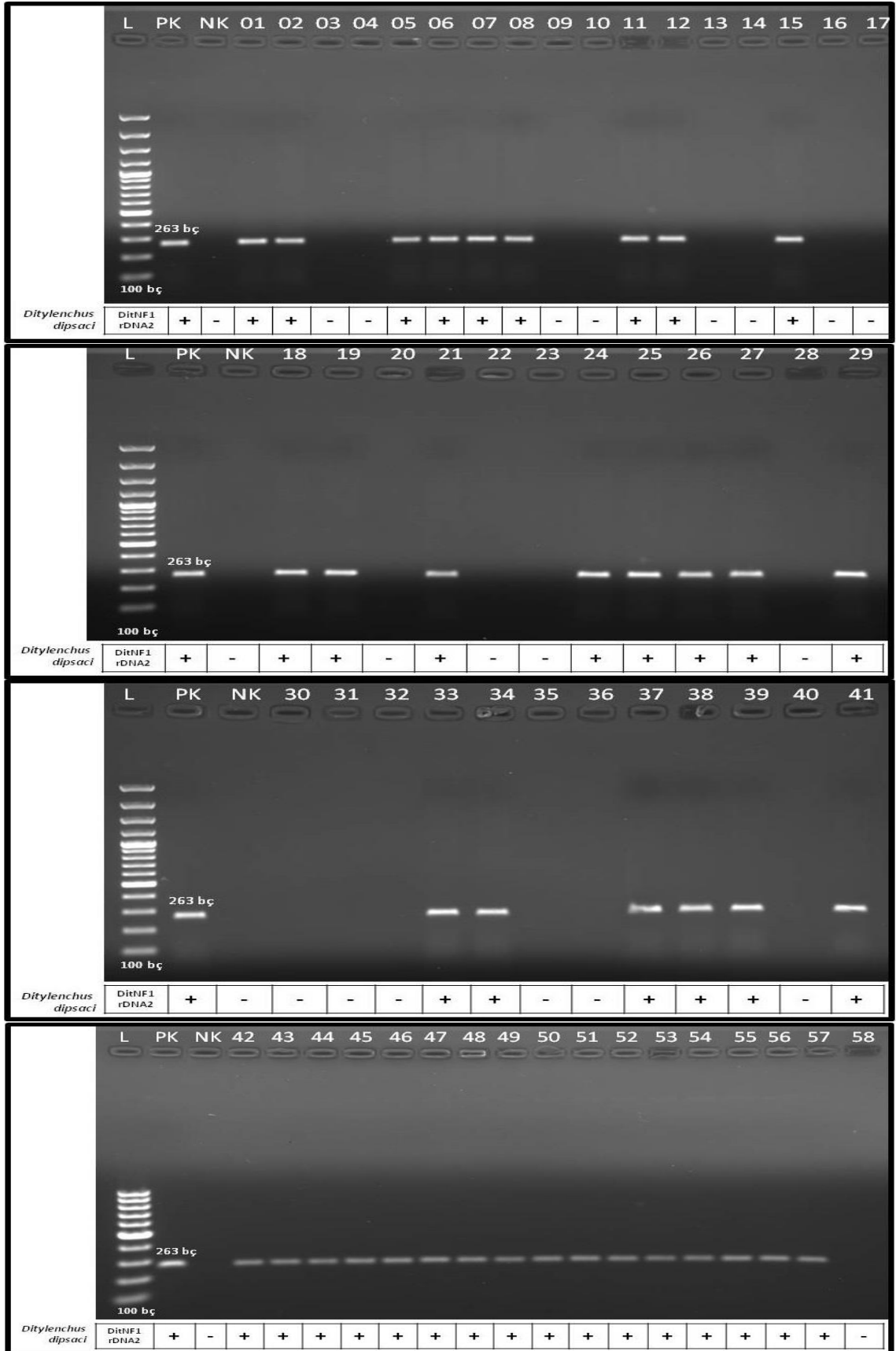
3.5. Filogenetik Analizler

Elde edilen nematod popülasyonlarının dendogramlarının oluşturulmasında DendroUPGMA (D-UPGMA) programı kullanılmıştır (Anonim, 2018). Genetik benzerlik ve uzaklıklar Nei ve Li (1979) tarafından önerilen program kullanılarak hesaplanmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Çalışmada sarımsak bitkisi ve toprak örneklerinden izole edilen nematodlar ve *Ditylenchus dipsaci* olduğu bilinen pozitif kontrol, tür teşhislerinin yapılması amacıyla SSR ve SCAR markörleri ile taranmıştır. Bu amaçla toplam 10 adet moleküler markör (DitNF1 - rDNA2, PF1 - PR1, PF2 - PR2, DdpS1 - rDNA2, H05 - H06, 18S - 26S, DipU F - Dip1 R, DipU F - DipU R, DIT2 F - DIT2 R ve DIT5 F - DIT5 R) kullanılarak sarımsak tarlalarından toplanılan 58 adet nematod örneğinin moleküler taramaları yapılmıştır (Şekil 4.1 - 4.10). Jellerde verilen numaralar Çizelge 3.1' de verilen nematod örneği numaraları ile aynıdır. Toplam 58 adet örneğe ait PZR ürünleri 20' lik ve 15' lik kuyucuklardan oluşmak üzere toplam dört jelde yürütülmüştür. Tüm primerler için 1. jele 100 bp ladder, pozitif kontrol, negatif kontrol ve sırasıyla 1-17 numaralı örnekler yüklenmiştir. İkinci jelde ladder ve kontrol gruplarını takiben sırasıyla 18-29 numaralı örnekler, 3. Jelde ladder ve kontrol grupları ile sırasıyla 30-41 numaralı örnekler, dördüncü jelde ise ladder ve pozitif kontrol gruplarıyla birlikte 42-58 numaralı örnekler yürütülmüştür (Şekil 4.1 - 4.10).

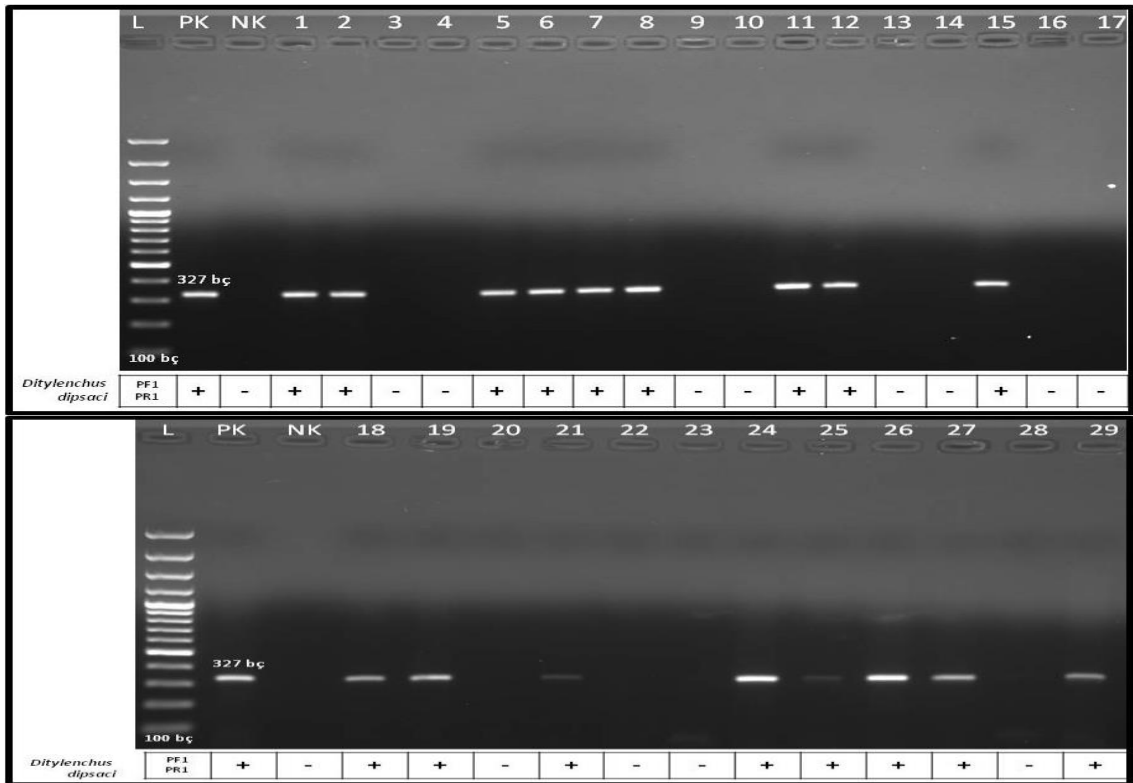
DitNF1 - rDNA2 primeri ile yapılan moleküler taramalar sonucunda 58 adet örnekten 01, 02, 05, 06, 07, 08, 11, 12, 15, 18, 19, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 33, 34, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 ve 57 numaralı örneklerin *Ditylenchus dipsaci* nematodu olduğu saptanmıştır (Şekil 4.1). Bu primere göre toplam 58 adet nematod örneğinden 39 tanesinin *D. dipsaci* olduğu tespit edilmiştir. Örnekler kaynak makalelerde de belirtildiği gibi DitNF1 - rDNA2 primer seti için yaklaşık 263 bp' de bant vermiştir (Subbotin ve ark., 2005). Bu örneklerden 01, 02, 05 ve 06 numaralı örnekler Hatay' dan, 07 ve 08 numaralı örnekler Tekirdağ' dan, 11, 12 ve 16, numaralı örnekler Aksaray' dan, 18, 19, 21, 54, 55, 56, 57 ve 58 numaralı örnekler Gaziantep' den, 24, 25 ve 26 numaralı örnekler Tokat' dan, 27, 50 ve 51 numaralı örnekler Balıkesir' den, 29 numaralı örnek Amasya' dan, 33, 34, 37, 38, 39, 41, 42 ve 43 numaralı örnekler Kastamonu' dan, 44, 45, 46 ve 47 numaralı örnekler Kahramanmaraş' dan, 48 ve 49 numaralı örnekler Adıyaman ilinden ve 52 ile 53 numaralı örnekler ise Kırklareli ilinden toplanılan numunelerdir.



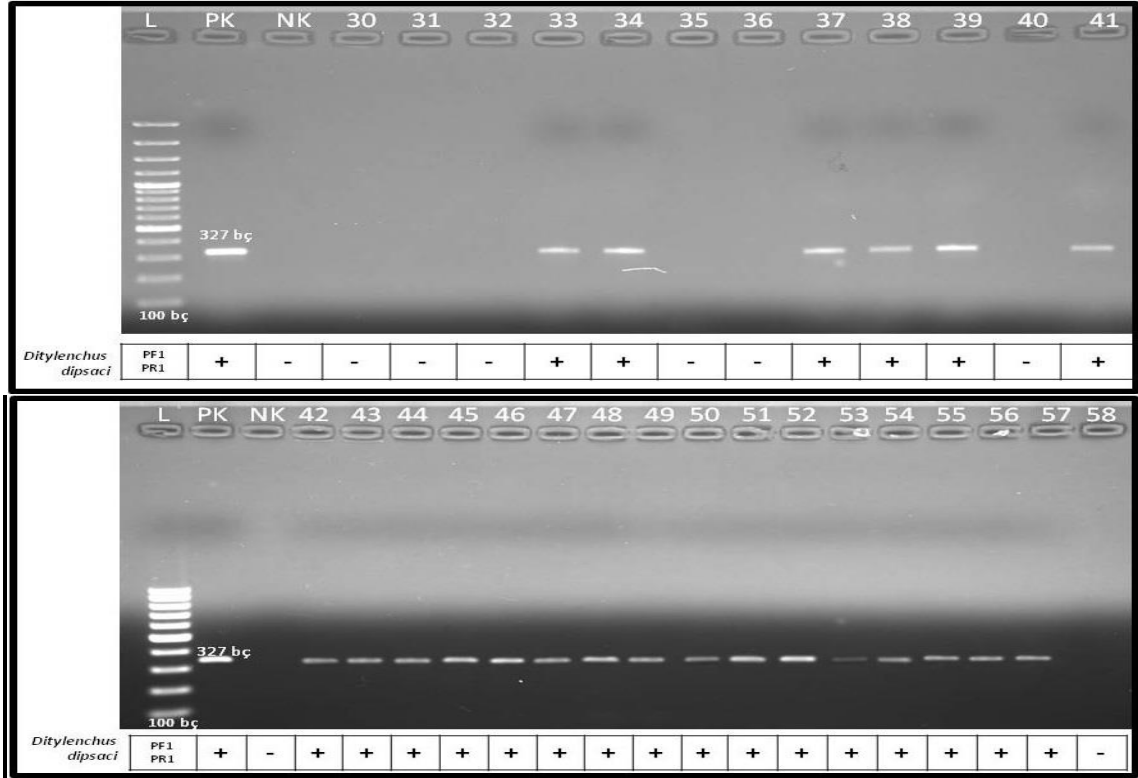
Şekil 4.1. DitNF1 - rDNA2 primeri ile yapılan moleküler karakterizasyon
(L: 100 bç, NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol)

Subbotin ve ark. (2005) da nematod popülasyonlarında *Ditylenchus* türlerinin sınıflandırılması amacıyla DitNF1 - rDNA2 primer setini kullanarak başarılı sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Sınıflandırma işleminde kullanılan bu türe özgü primer ile *Ditylenchus dipsaci* için 263 bç' lik bantlar elde edildiğini ifade etmişlerdir. Yapılan bu tez çalışmasında da sarımsak bitkisinden izole edilen nematodların 39 tanesinin *Ditylenchus dipsaci* nematodu olduğu moleküler taramalar sonucunda güvenilir bir şekilde ortaya konmuştur (Şekil 4.1).

PF1 - PR1 primeri ile yapılan PZR taraması ile elde edilen örneklerin % 1' lik agaroz jellerde görüntülenmesi sonucunda kontrol gruplar baz alınarak *Ditylenchus dipsaci* için 327 bç' lik beklenen baz çifti büyüklüğünde bant veren (Marek ve ark., 2005; Pethybridge ve ark., 2016) 39 adet örnek tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Yapılan taramalar sonucunda 01, 02, 05, 06, 07, 08, 11, 12, 15, 18, 19, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 33, 34, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 ve 57 numaralı örneklerin *D. dipsaci* olduğu saptanmıştır. Bu örnekler Hatay, Tekirdağ, Aksaray, Gaziantep, Tokat, Balıkesir, Amasya, Kastamonu, Kahramanmaraş, Adıyaman ve Kırklareli illerinden alınmıştır.



Şekil 4.2. PF1 - PR1 primerine ait agaroz jel görüntüsü
(L: 100 bç, NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol)

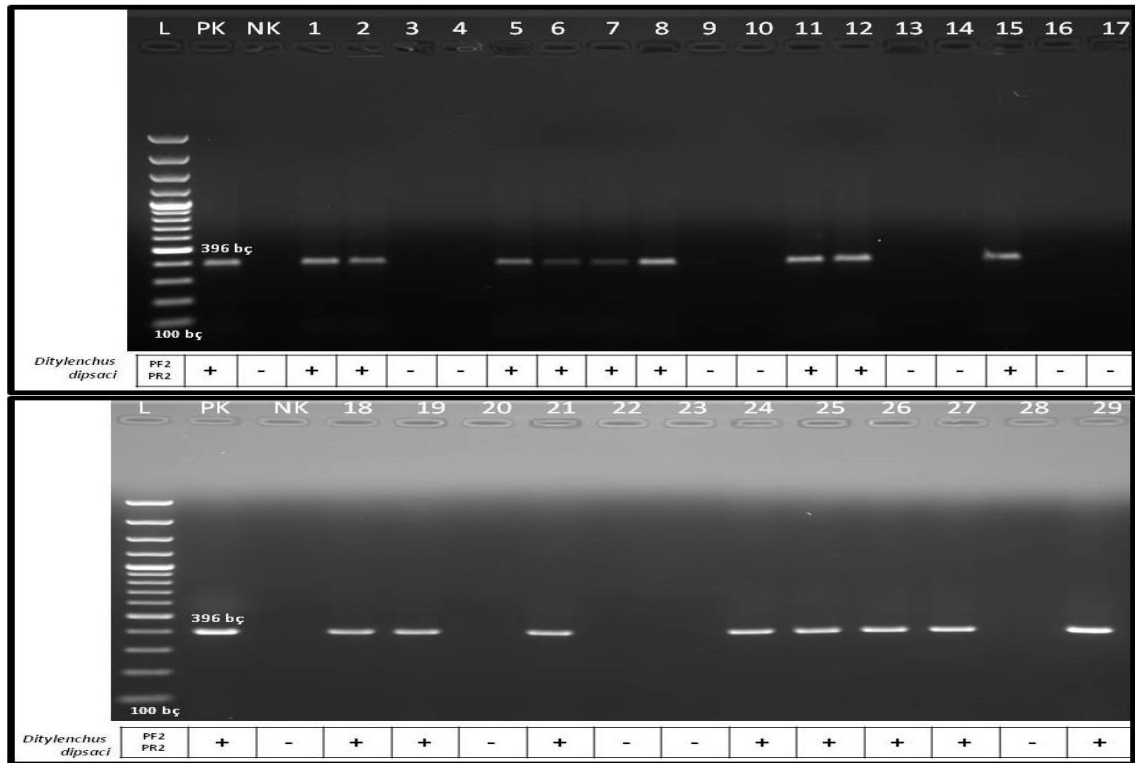


Şekil 4.2. PF1 - PR1 primerine ait agaroz jel görüntüsü (Devam)
(L: 100 bç, NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol)

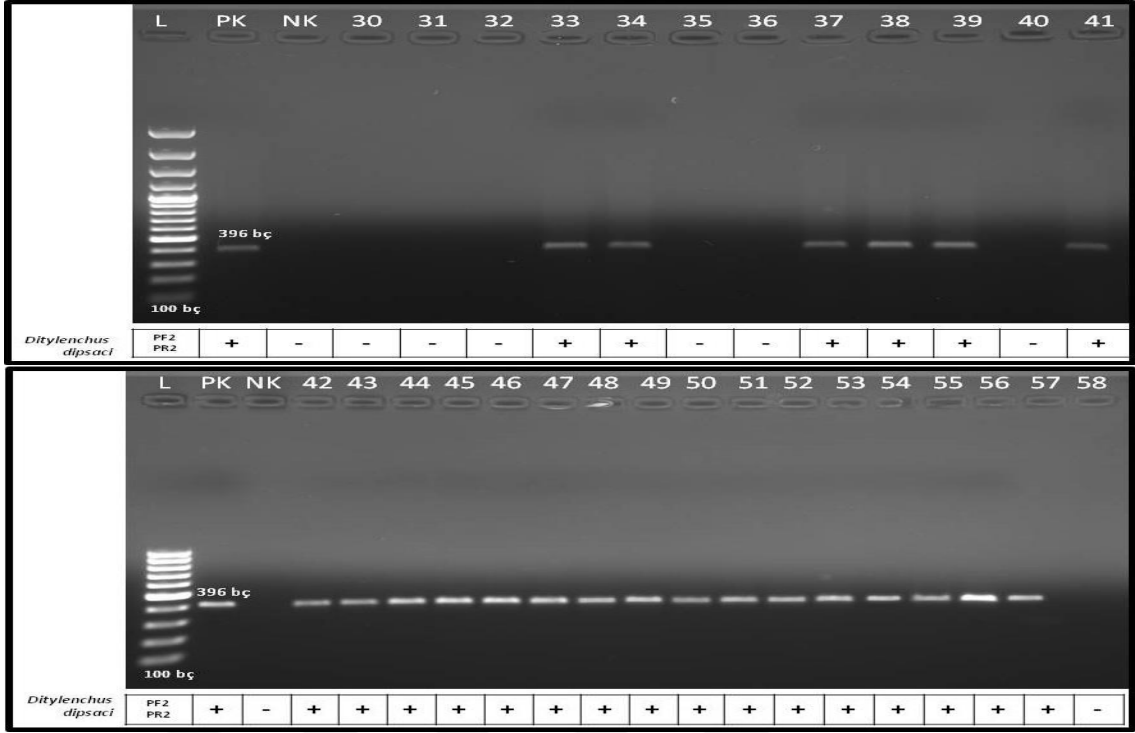
Pethybridge ve ark. da 2016 yılında 345 adet sarımsak örneği ile yaptıkları çalışmada, *Ditylenchus* spp. türlerini tespit amacıyla PF1 - PR1 primer setini kullanmışlardır. Yaptıkları çalışmada, PZR taramaları sonucunda incelenen sarımsak örneklerine *Ditylenchus* spp.'nin % 14,1 oranında bulaşık olduğu tespit edilmiştir. Morfometrik olarak ve türe spesifik primer seti olan PF1 - PR1 primerleri ile gerçekleştirilen moleküler taramalar sonucu inceledikleri 345 adet örnekten 30 tanesinin *Ditylenchus dipsaci* nematodu olduğu tespit edildiği bildirilmiştir. Pethybridge ve ark. (2016) tarafından yapılan araştırmada bu tez çalışmasında da olduğu gibi öncelikle morfolojik özellikler bakımından *D. dipsaci* olarak seçilen örnekler daha sonra sonuçların güvenilir olması açısından moleküler olarak da incelenmiştir. Moleküler taramaları türe özgü primer seti (PF1 - PR1) ile gerçekleştirerek bu şekilde tür teşhislerinin daha güvenilir ve net bir şekilde yapılabildiğini bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında da PF1 - PR1 primer seti oldukça başarılı bir şekilde kullanılarak, sarımsak bitkisinden elde edilen 58 adet nematod örneği moleküler olarak taranmıştır. Bu nematod örnekleri öncelikli olarak 2150468 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında morfolojik özelliklerine göre mikroskop altında seçilmiştir. Daha sonra moleküler olarak taranarak kesin ve güvenilir sonuçlar

elde edilmiştir. Bu bağlamda morfolojik olarak seçilen 58 adet nematod örneğinden 39 tanesinin (01, 02, 05, 06, 07, 08, 11, 12, 15, 18, 19, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 33, 34, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 ve 57) *Ditylenchus dipsaci* nematodu olduğu kesin olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2).

PF2 - PR2 primeri ile yapılan moleküler taramalar ile 58 adet nematod örneğinin agaroz jelde görüntülenmesi sonucunda kaynak makalede de (Marek ve ark., 2005) belirtildiği gibi 396 bp' de bant profili veren 01, 02, 05, 06, 07, 08, 11, 12, 15, 18, 19, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 33, 34, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 ve 57 numaralı örneklerin *Ditylenchus dipsaci* olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.3). Yapılan taramalar sonucunda beklenen bantın gözlemlendiği 01, 02, 05 ve 06 numaralı örnekler Hatay, 07 ve 08 numaralı örnekler Tekirdağ, 11, 12 ve 15, numaralı örnekler Aksaray, 18, 19, 21, 54, 55, 56, 57 ve 58 numaralı örnekler Gaziantep, 24, 25 ve 26 numaralı örnekler Tokat, 27, 50 ve 51 numaralı örnek Balıkesir, 29 numaralı örnek Amasya, 33, 34, 37, 38, 39, 41, 42 ve 43 numaralı örnekler ise Kastamonu, 44, 45, 46 ve 47 numaralı örnekler Kahramanmaraş' dan, 48 ve 49 numaralı örnekler Adıyaman ilinden ve 52 ile 53 numaralı örnekler ise Kırklareli ilinden toplanmıştır.



Şekil 4.3. PF2 - PR2 primeri ile yapılan moleküler taramalar
(L: 100 bp, NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol)

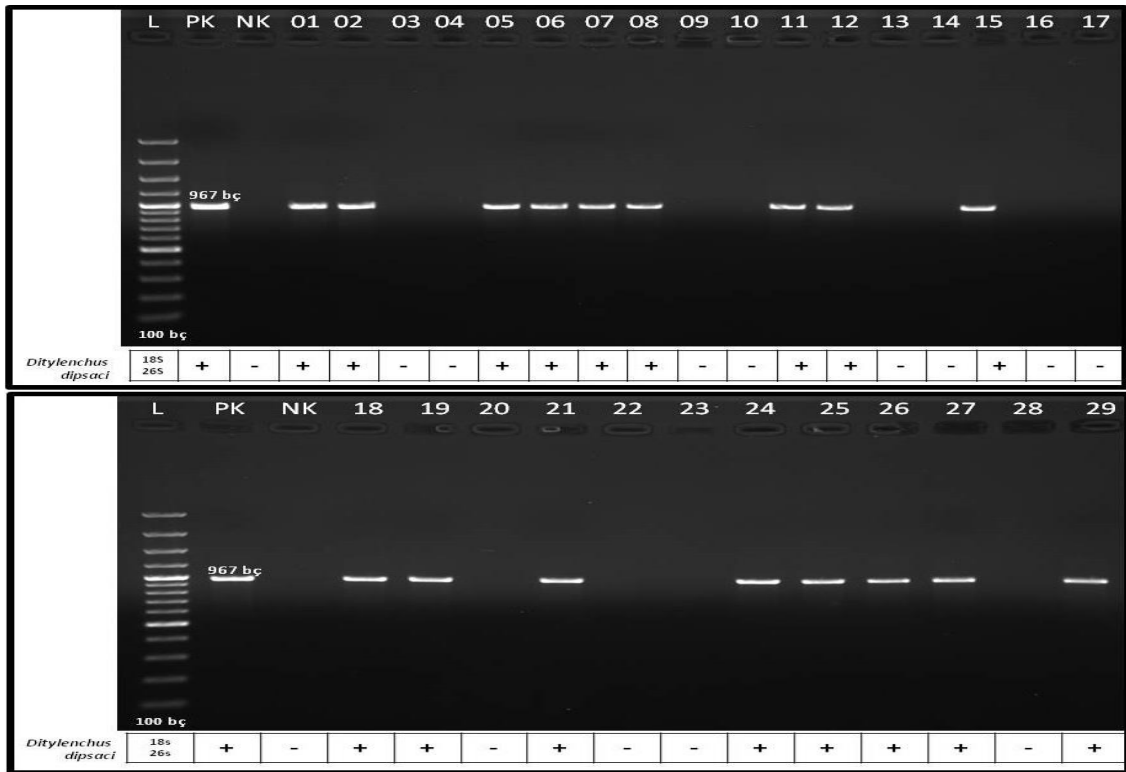


Şekil 4.3. PF2 - PR2 primeri ile yapılan moleküler taramalar (devam)
(L: 100 bç, NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol)

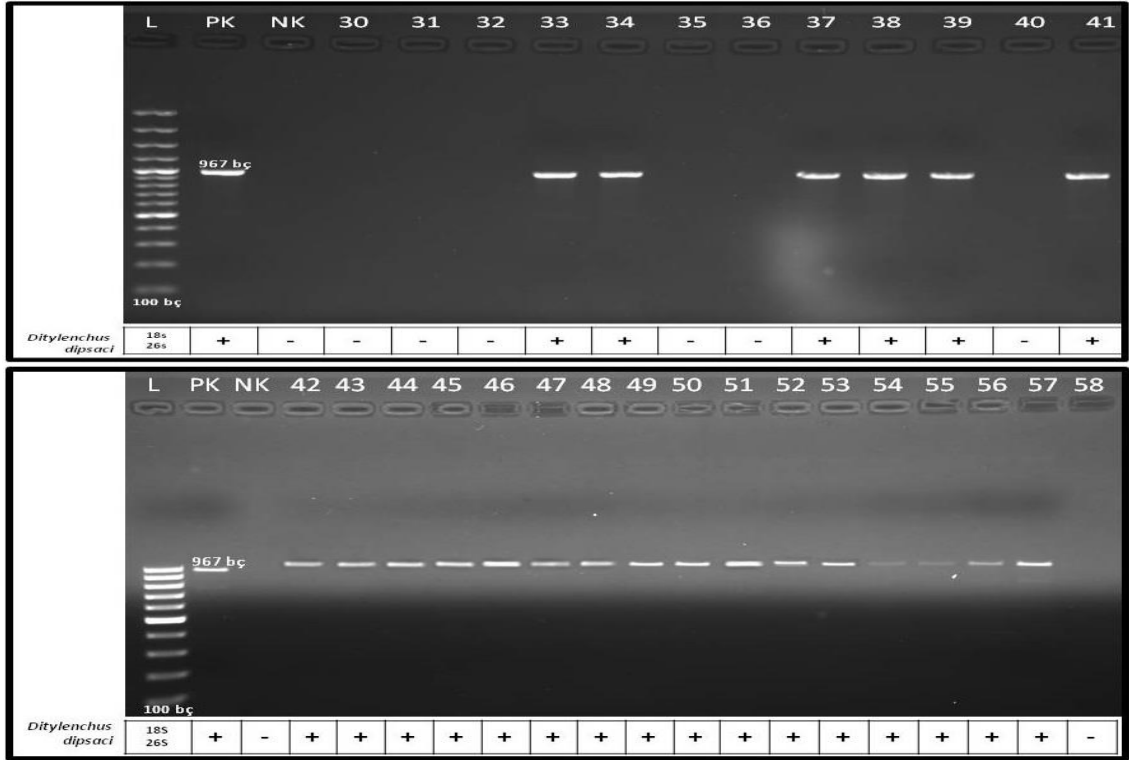
Marek ve ark. (2005) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, *Ditylenchus dipsaci* nematodu için türe özgü primer setleri olan, PF1 - PR1, PF2 - PR2 ve 18S - 26S primerlerinin moleküler taramalarda başarılı ve güvenilir bir şekilde kullanıldığı bildirilmiştir. Çalışmada morfolojik tür tespitinin her zaman doğru sonuç vermeyeceği, morfolojik tespit için çok deneyimli olmak gerektiği ancak buna rağmen hatalar olabileceği bildirilirken, moleküler tür tespitinden morfolojik tür tespitine göre daha kesin ve güvenilir sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. Yaptıkları çalışmada sarımsak bitkisinden elde edilen örneklerden *Ditylenchus* cinsi içinden *D. dipsaci* nematodunun tür tespitini gerçekleştirmişlerdir. Türe spesifik olarak geliştirilen PF1 - PR1 primeri için *D. dipsaci* nematodunda 327 bç' lik bant elde edildiği, PF2 - PR2 primer çiftinde *D. dipsaci* için 396 bç' lik bant gözlemlendiği ve 18S - 26S primerleri için de 967 bç' lik bant elde edildiği bildirilmiştir. *D. dipsaci* dışındaki nematod örneklerinde ise bant gözlemlenmediği ifade edilmiştir. Bu tez çalışmasında da kullanılan bu üç primer setiyle (PF1 - PR1, PF2 - PR2 ve 18S - 26S) benzer bant profilleri elde edilmiştir. Kastamonu, Amasya, Tokat, Aksaray, Tekirdağ, Balıkesir, Bursa, Hatay ve Gaziantep illerinden toplanılan sarımsak örneklerinden elde edilen popülasyonlarda morfolojik olarak tespit edilen 58 adet nematod örneğinden 39 tanesinin *Ditylenchus dipsaci*

olduğu moleküler olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.2 - Şekil 4.4). Elde edilen sonuçlar Marek ve ark. (2005)' nın da çalışmalarında belirtildiği gibi morfolojik tür tespitinin her zaman tam güvenilir olmadığını, moleküler taramalara dayalı tür teşhisinin daha net ve güvenilir sonuçlar verdiğini göstermiştir.

18S - 26S primeri ile yapılan moleküler taramalar sonucunda incelenen 58 adet örnekten kontrol grup referans alınarak ve kaynak makalede belirtilen (Marek ve ark., 2010) beklenen baz çifti büyüklüğünde (967 bp) bant veren 39 tanesinin *Ditylenchus dipsaci* olduğu belirlenmiştir. Birinci jelde bant gözlenen 01, 02, 05 ve 06 numaralı örnekler Hatay, 07 ve 08 numaralı örnekler Tekirdağ, 11, 12 ve 15 numaralı örnekler Aksaray illerinden, ikinci jeldeki 18, 19 ve 21 numaralı örnekler Gaziantep, 24, 25 ve 26 numaralı örnekler Tokat, 27 numaralı örnek Balıkesir, 29 numaralı örnek Amasya ve üçüncü jelde bant veren 33, 34, 37, 38, 39 ve 41 numaralı örnekler Kastamonu' dan dördüncü jeldeki bant veren 42 ve 43 numaralı örnkeler Kastamonu, 44, 45, 46 ve 47 numaralı örnekler Kahramanmaraş, 48 ve 49 numaralı örnekler Adıyaman, 50 ve 51 numaralı örnekler Balıkesir, 52 ve 53 numaralı örnekler Kırklareli, 54, 55, 56, 57 ve 58 numaralı örnekler ise Gaziantep ilinden alınmıştır (Şekil 4.4).



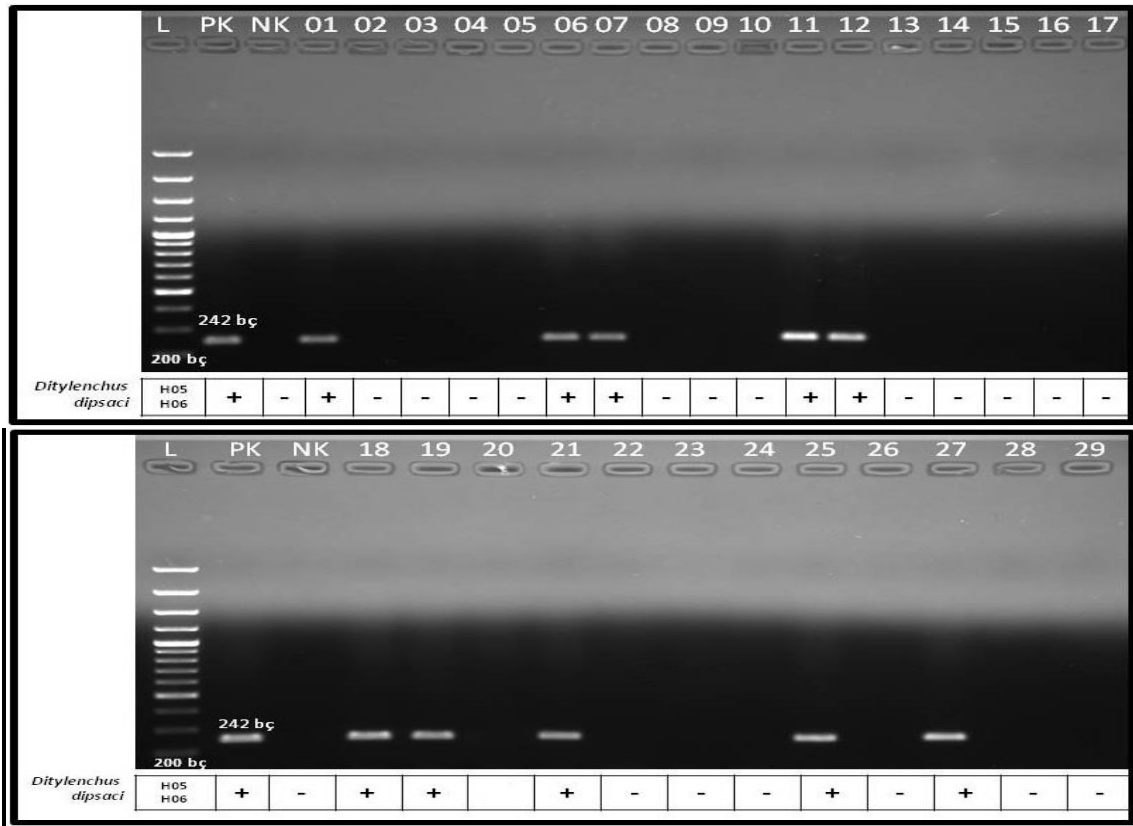
Şekil 4.4. 18S - 26S primer setine göre *D. dipsaci* olarak tanımlanan örnekler (L: 100 bp, NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol)



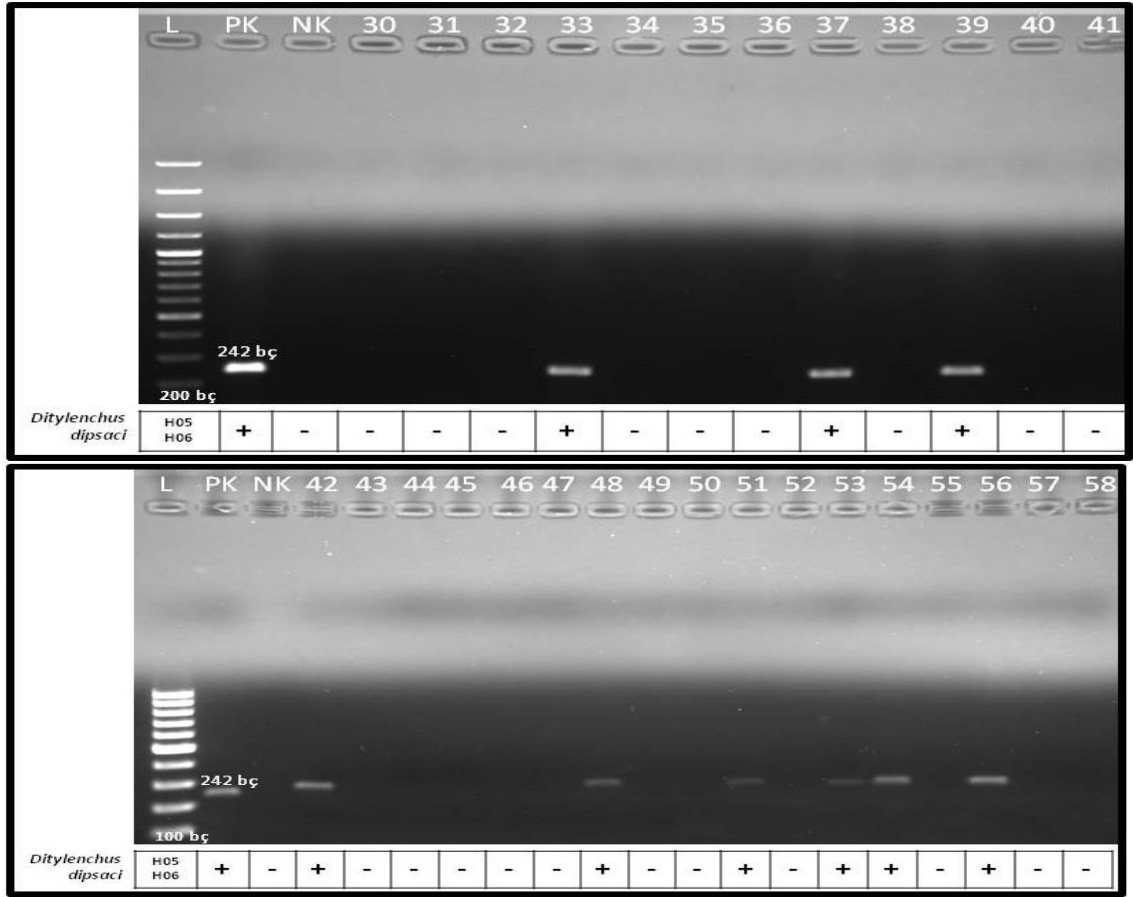
Şekil 4.4. 18S - 26S primer setine göre *D. dipsaci* olarak tanımlanan örnekler (devam)
(L: 100 bç, NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol)

Farklı bir çalışmada, *D. dipsaci* sensu stricto, *Ditylenchus* sp. B ve *D. destructor* nematodlarını içeren karışık bir popülasyonun moleküler taramaları için türe spesifik olan 18S - 26S primerleri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, *D. dipsaci* sensu stricto 967 bç, *Ditylenchus* sp. B 966 bç ve *D. destructor* nematodunda 1105 bç' lik bantlar elde edildiği bildirilmiştir (Marek ve ark., 2010). Gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise bakla bitkisinden elde edilen bir çok nematod popülasyonu üzerinde morfolojik ve moleküler taramalar yapılmıştır. Taramaları yapılan *D. dipsaci* nematodunun iki farklı türü olan, *D. dipsaci* sensu stricto ve *D. gigas* türleri morfolojik incelemeler sonrasında moleküler olarak D2A - D3B, TW8 - AB28 ve 18S - 26S primer setleri ile taranmıştır. Çalışma sonucunda iki türün moleküler olarak ayrımının başarılı ve net bir şekilde tamamlandığı bildirilmiştir (Vovlas ve ark., 2011). Bu tez çalışmasında da 18S - 26S primer seti kullanılmış ve güvenilir sonuçlar elde edilmiştir. Moleküler olarak taraması gerçekleştirilen 58 adet örnekten 967 bç' de bant veren 39 tanesinin *Ditylenchus dipsaci* nematodu olduğu net bir şekilde ortaya konmuştur (Şekil 4.4).

İncelenen nematod örneklerinin moleküler karakterizasyonu amacıyla H05 - H06 primer seti ile yapılan PZR taraması sonucunda 01, 06, 07, 11, 12, 18, 19, 21, 25, 27, 33, 37, 39, 42, 48, 51, 53, 54 ve 56 numaralı örneklerin kaynak makalelerde de belirtildiği gibi yaklaşık 242 bç' de (Esquibet ve ark., 2003) bant verdiği gözlenmiştir. H05 - H06 primeri *D. dipsaci*' nin normal ırkını göstermektedir. Bu nedenle bu primer için beklenen büyüklükte bant veren, Hatay, Tekirdağ, Aksaray, Gaziantep, Tokat, Balıkesir, Kastamonu, Adıyaman ve Kırklareli illerinden toplanan 19 örneğin *Ditylenchus dipsaci*' nin normal ırkı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



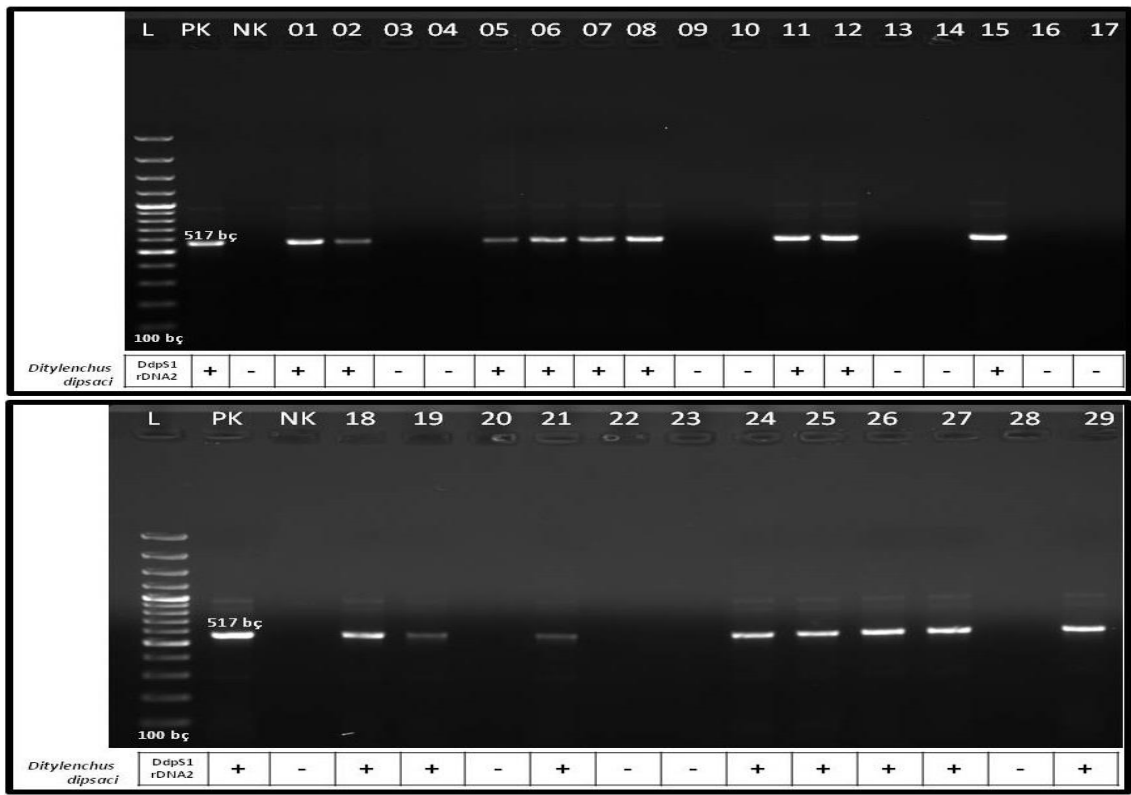
Şekil 4.5. H05 - H06 primerleri ile yapılan moleküler tarama sonuçları
(L: 100 bç, NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol)



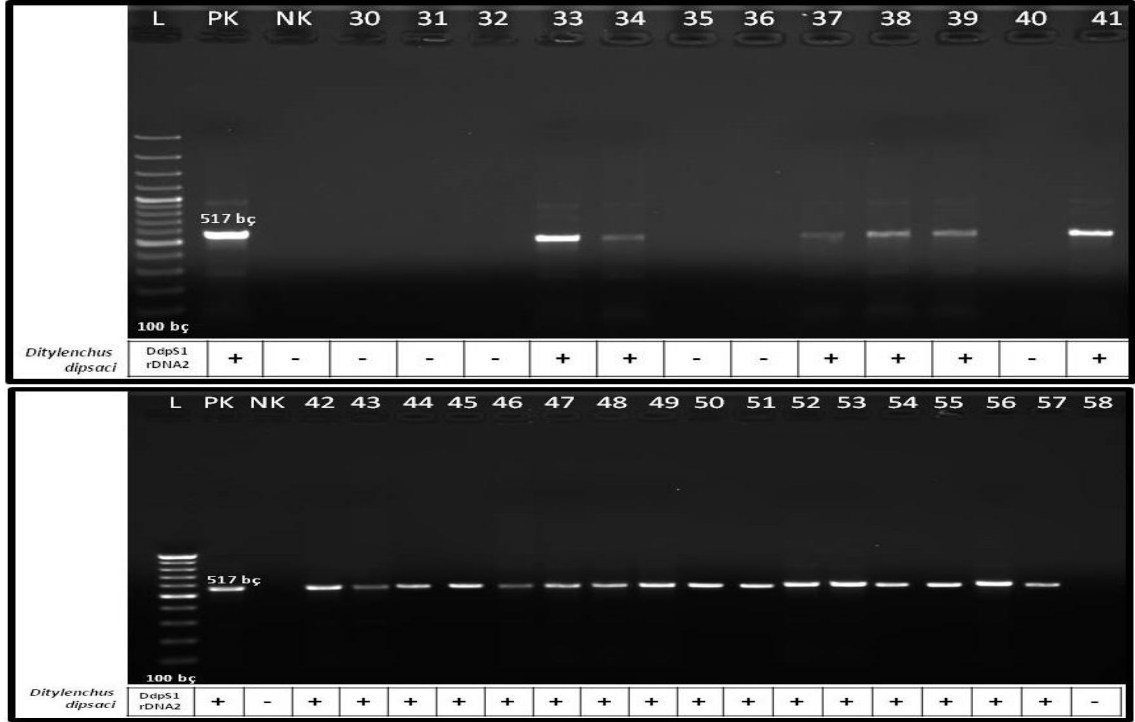
Şekil 4.5. H05 - H06 primerleri ile yapılan moleküler tarama sonuçları (devam)
(L: 100 bç, NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol)

Esquibet ve ark. (2003) gerçekleştirdiği bir çalışmada, 22 *Ditylenchus dipsaci* popülasyonunun tür içi ırk ayırımına gidilerek, normal ve giant ırklarının moleküler olarak ayırımı yapılmıştır. Bu amaçla SCAR markörleri olan ve türe özgü primerler olan H05 - H06 ve D09 - D10 primer setleri kullanılmıştır. Çalışmada 19 popülasyonun H05 - H06 primerleri için 242 bç' de, D09 - D10 primerleri için ise 198 bç' de bant verdiği bildirilmiştir. Diğer üç popülasyonun ise bu primer setleri için bant vermediği gözlemlenmiştir ve primer setlerinin *D. dipsaci* nematoduna özgü olduğu bildirilmiştir. Çalışma sonucunda bant veren 19 popülasyonun *Ditylenchus dipsaci* nematodunun normal ırkı olduğu, gen bankalarındaki verilerle kıyaslanarak bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında da kullanılan H05 - H06 primer seti ile yapılan moleküler karakterizasyon sonucunda 58 nematod örneğinden 242 bç' de bant elde edilen 19 tanesinin (01, 06, 07, 11, 12, 18, 19, 21, 25, 27, 33, 37, 39, 42, 48, 51, 53, 54 ve 56) *D. dipsaci* nematodunun normal ırkı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5).

DdpS1 - rDNA2 primer seti ile yapılan moleküler tarama sonucunda 58 adet nematod örneğinden 39 tanesinin *D. dipsaci* nematodu olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6). *D. dipsaci* için beklenen 517 bç' lik büyüklükte (Kerkoud ve ark., 2007) bant veren 01, 02, 05, 06, 07, 08, 11, 12, 15, 18, 19, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 33, 34, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 ve 57 numaralı örneklerin *Ditylenchus dipsaci* nematodu olduğu saptanmıştır. *D. dipsaci* için beklenen bantın gözlemlendiği örnekler Hatay, Tekirdağ, Aksaray, Gaziantep, Tokat, Balıkesir, Amasya, Kastamonu, Kahramanmaraş, Adıyaman ve Kırklareli illerinden alınmıştır.



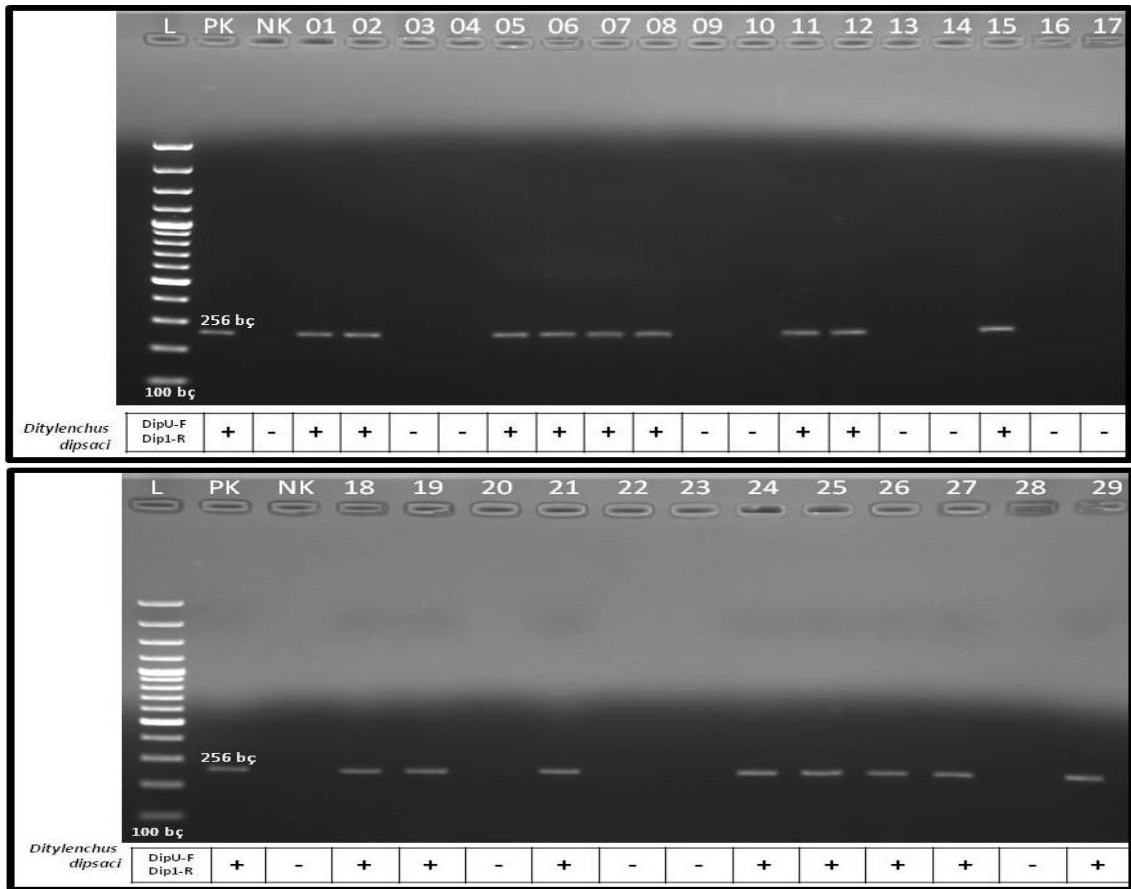
Şekil 4.6. DdpS1 - rDNA2 primer seti ile PZR taramalarına ait jel görüntüsü (L: 100 bç, NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol)



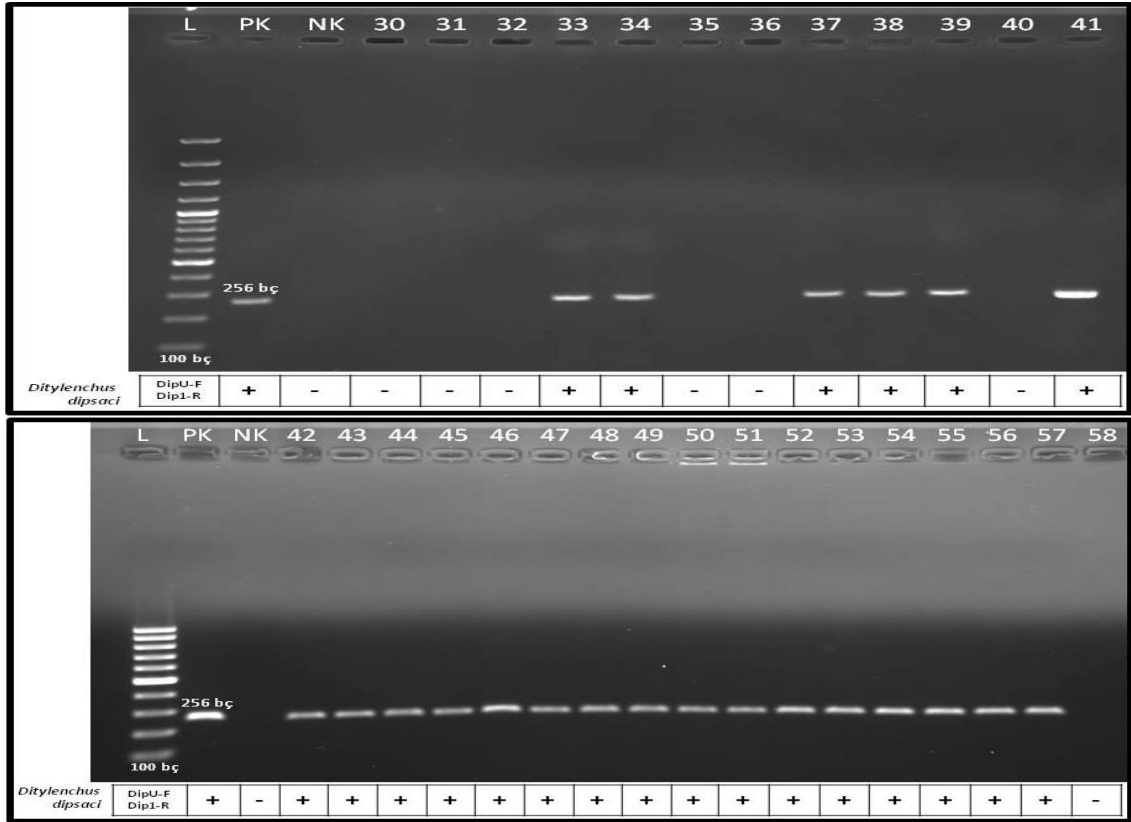
Şekil 4.6. DdpS1 - rDNA2 primer seti ile PZR taramalarına ait jel görüntüsü (devam)
(L: 100 bç, NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol)

Bir diğer çalışmada avrupanın farklı ülkelerinden toplanan toplam 20 adet *Ditylenchus* popülasyonu üzerinde moleküler taramalar gerçekleştirilmiştir. Çalışmada *D. dipsaci* ve *D. gigas* nematodlarının moleküler olarak farklılıkları ortaya konmak istenmiştir. Bu kapsamda *D. dipsaci* nematodunun belirlenmesi için DdpS1 - rDNA2 primer seti kullanılırken, *D. gigas* nematodu için DdpS2 - rDNA2 primerleri kullanılmıştır. İncelenen 20 popülasyondan, DdpS1 - rDNA2 primeri ile taraması gerçekleştirilen 14 popülasyonun sekiz tanesinin *D. dipsaci* nematodunun normal ırkı, altı tanesinin de *D. dipsaci* sensu stricto türü olduğu bildirilmiştir. *D. dipsaci* olduğu tespit edilen örneklerin DdpS1 - rDNA2 primer seti için 517 bç' de bant verdiği bildirilmiştir (Kerkoud ve ark., 2007). Bu tez çalışmasında da *Ditylenchus dipsaci* nematodunun moleküler tür teşhisinde kullanılan DdpS1 - rDNA2 primer setinden kaynak makalede de belirtildiği gibi 517' bç lik bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.6). İncelenen 58 adet nematod örneğinden 39 tanesinin *D. dipsaci* olduğu moleküler olarak tanımlanmıştır.

DipUF - Dip1R primerlerine ait jel görüntüsü Şekil 4.7’ de verilen toplam 58 adet nematod örneğinden 39 tanesinin *D. dipsaci* olduğu saptanmıştır. İncelenen örneklerden 39’ unun (01, 02, 05, 06, 07, 08, 11, 12, 15, 18, 19, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 33, 34, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 ve 57 numaralı örnekler) kaynak makalede belirtilen DipUF - Dip1R primer seti için beklenen büyüklükte yaklaşık 256 bç’ de bant verdiği tespit edilmiştir (Marek ve ark., 2010). Böylece morfolojik teşhiste *Ditylenchus* spp. olarak tanımlanan 58 adet nematod örneğinden 19 tanesinin *D. dipsaci* nematodu olmadığı moleküler olarak ortaya konulmuştur.

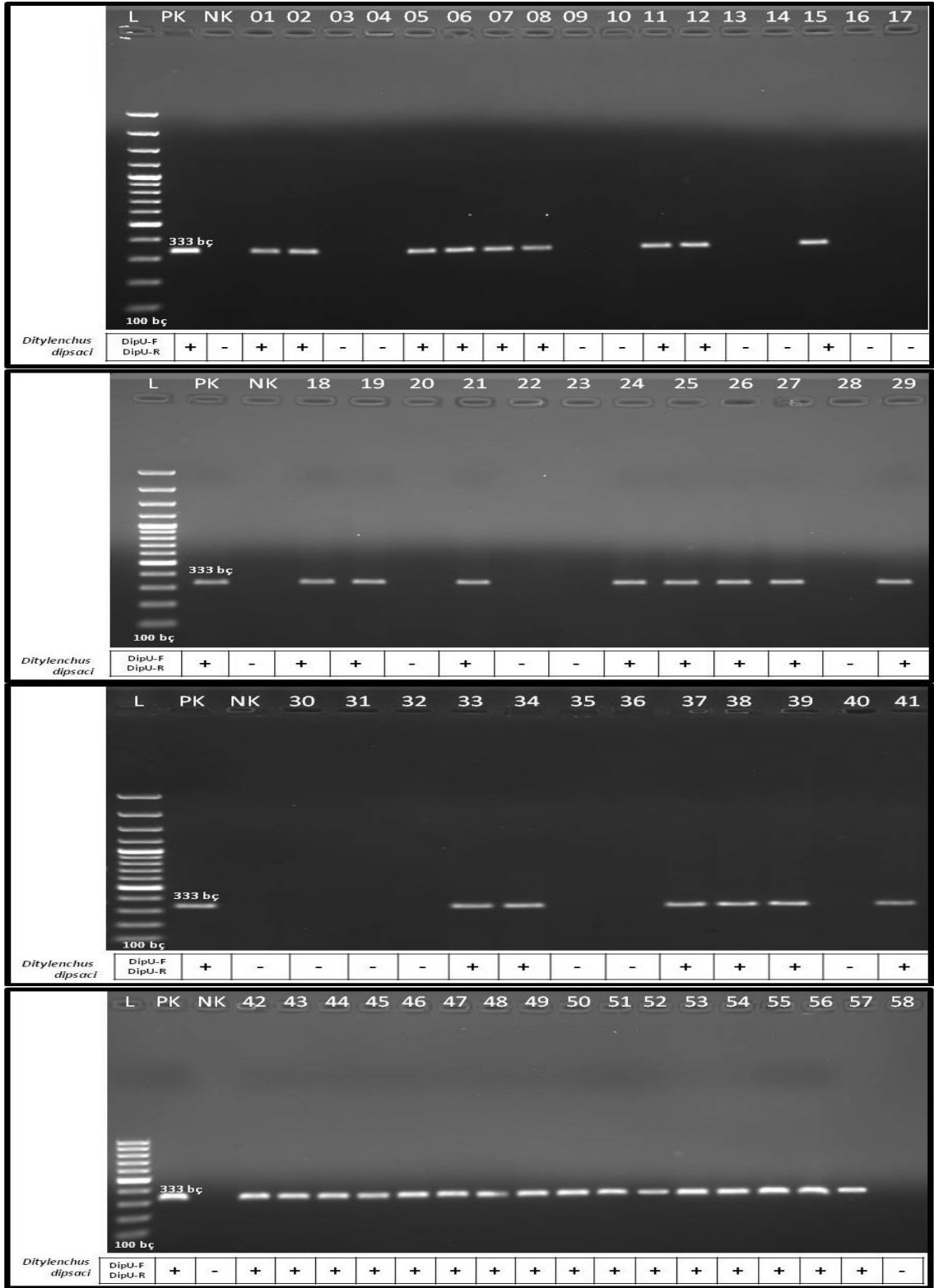


Şekil 4.7. DipUF - Dip1R primeri ile yapılan taramalara ait PZR jel görüntüleri (L: 100 bç, NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol)



Şekil 4.7. DipUF - Dip1R primeri ile yapılan taramalara ait PZR jel görüntüleri (Devam)
(L: 100 bç, NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol)

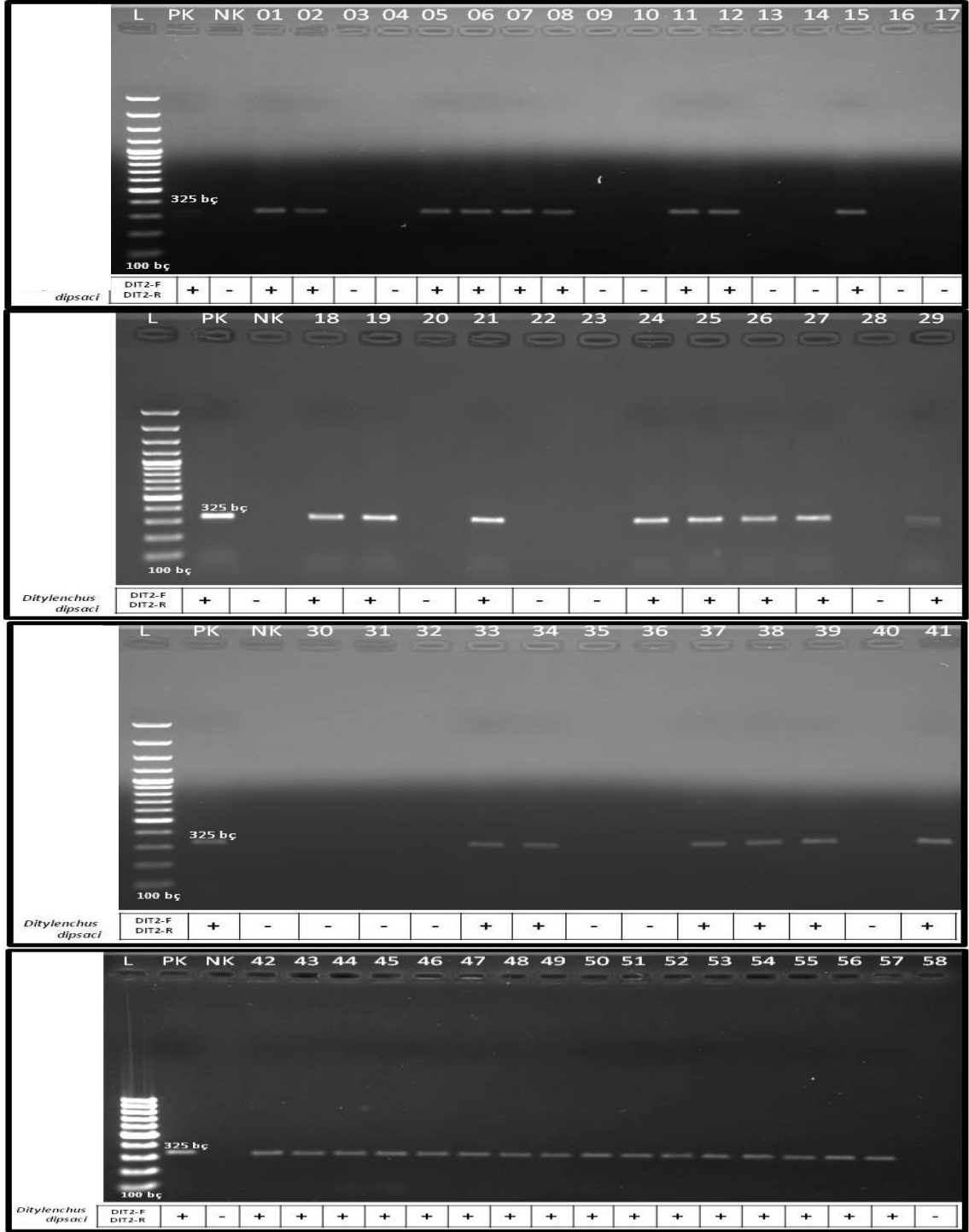
Çalışmada incelenen örneklerden 01, 02, 05, 06, 07, 08, 11, 12, 15, 18, 19, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 33, 34, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 ve 57 numaralı örneklerin DipUF - DipUR primerleri ile yapılan moleküler taramaları sonucunda *Ditylenchus dipsaci* nematodu olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.8). Bu örnekler kaynak makalede de belirtildiği gibi DipUF - DipUR primer seti için yaklaşık 333 bç' de bant vermiştir (Marek ve ark., 2010). Mikroskop altında morfolojik tür teşhisi yapılan 58 adet örnekten, DipUF - DipUR primeri ile yapılan moleküler taramalarda 39 tanesinin *D. dipsaci* olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.8. DipU F - DipU R primer seti ile yapılan moleküler karakterizasyon
(L: 100 bç, NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol)

Bir başka çalışmada ise Marek ve ark. (2010) tarafından *Ditylenchus* türlerine ait olan üç farklı SCAR primeri ile moleküler karakterizasyon gerçekleştirilmiştir. Çalışma neticesinde DipU F - DipU R, DipU F - Dip1 R ve Des2 F - Des1 R primerleri ile yapılan moleküler taramalar sonucunda incelenen *Ditylenchus* popülasyonlarından, 12 tanesinin *Ditylenchus dipsaci* sp., iki popülasyonun *Ditylenchus* sp. B ve dört tanesinin ise *D. destructor* nematodu olduğu bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında da bu üç primer setinden DipU F - DipU R ile DipU F - Dip1 R primerleri başarılı bir şekilde moleküler taramalarda kullanılarak, 58 nematod örneğinden 39 tanesinin *D. dipsaci* nematodu olduğu tespit edilmiştir. DipU F - DipU R primeri ile yapılan tarama sonucunda *D. dipsaci* olduğu saptanan örnekler kaynak makalede de belirtildiği gibi 333 bç' de bant vermiştir (Şekil 4.8). DipU F - Dip1 R primeri ile gerçekleştirilen moleküler tanımlama sonucunda da 58 adet nematod örneğinden 39 tanesi *D. dipsaci* nematodu için beklenen 256 bç' lik büyüklükte bant vermiştir (Şekil 4.7).

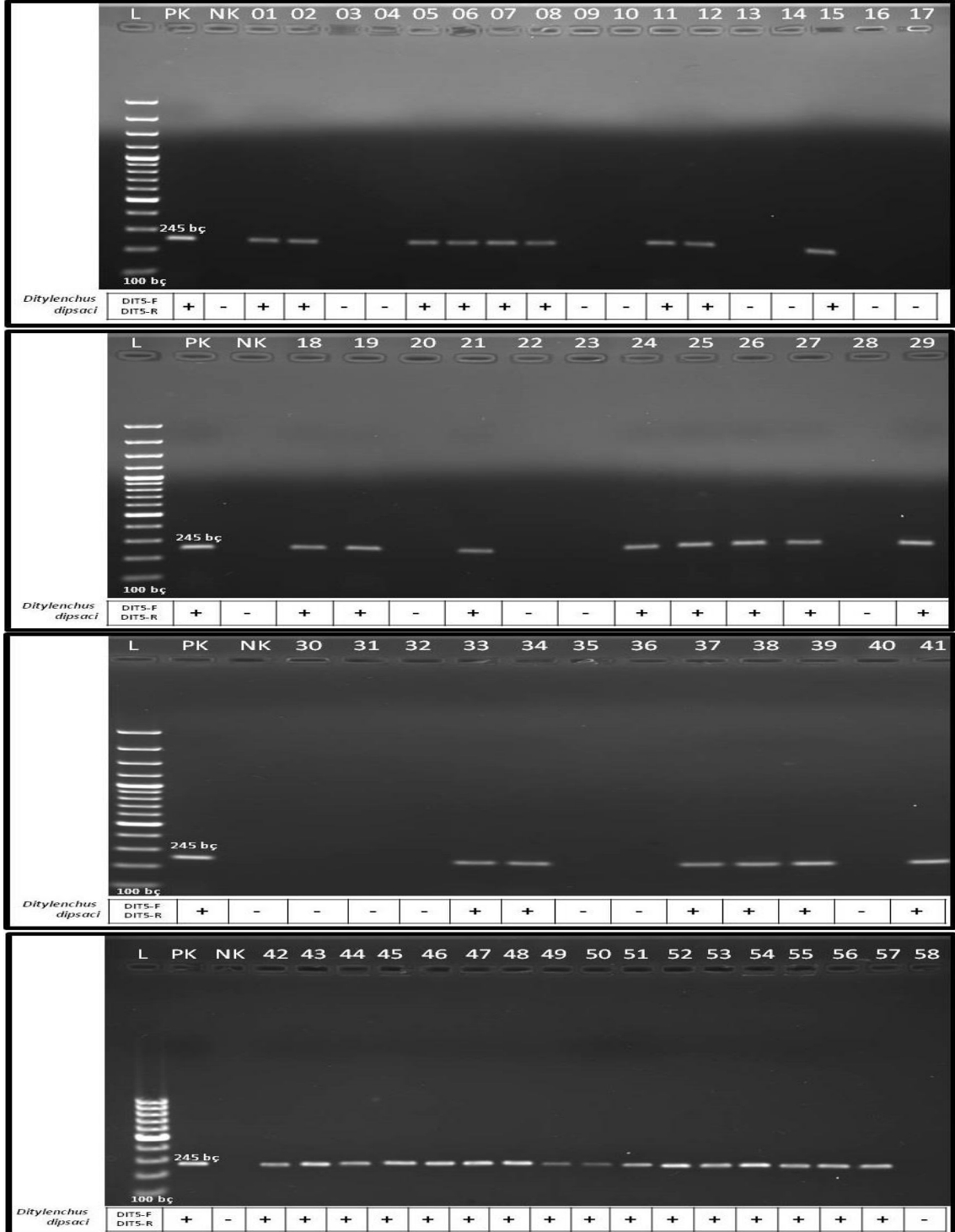
Moleküler taramaları yapılan 58 adet nematod örneğinden DIT2F - DIT2R primer setine göre 39 tanesinin *Ditylenchus dipsaci* olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9). DIT2F - DIT2R primer seti için yaklaşık 325 bç' lik büyüklükte (Zouhar ve ark., 2007) bant gözlenmiştir. Beklenen büyüklükte bant veren nematod örnekleri Hatay (01, 02, 05 ve 06), Tekirdağ (07 ve 08), Aksaray (11, 12 ve 15), Gaziantep (18, 19, 21, 54, 55, 56, 57 ve 58), Tokat (24, 25 ve 26), Balıkesir (27, 50 ve 51), Amasya (29), Kastamonu (33, 34, 37, 38, 39, 41, 42 ve 43), Kahramanmaraş (44, 45, 46 ve 47), Adıyaman (48 ve 49) ve Kırklareli (52 ve 53) illerinden alınan örneklerdir.



Şekil 4.9. DIT2 F - DIT2 R primerlerine ait agaroz jel görüntüsü
(L: 100 bç, NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol)

DIT5F - DIT5R primeri ile moleküler taramaları tamamlanan 58 adet örnekten 39 tanesinin *Ditylenchus dipsaci* olduğu saptanmıştır (Şekil 4.10). İncelenen örneklerden yaklaşık 245 bç' lik bant gözlemlenen (Zouhar ve ark., 2007) 01, 02, 05, 06, 07, 08, 11, 12, 15, 18, 19, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 33, 34, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48,

49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 ve 57 numaralı örneklerin DIT5F - DIT5R primerleri bakımından *D. dipsaci* olduğu belirlenmiştir. *D. dipsaci* olduğu tespit edilen nematod örnekleri Hatay, Tekirdağ, Aksaray, Gaziantep, Tokat, Balıkesir, Amasya, Kastamonu, Kahramanmaraş, Adıyaman ve Kırklareli illerinden alınmıştır.



Şekil 4.10. DIT5F - DIT5R primeri ile yapılan taramalar
(L: 100 bç, NK: Negatif Kontrol, PK: Pozitif Kontrol)

Bu tez çalışmasında başarılı bir şekilde kullanılan DIT2 F - DIT2 R ve DIT5 F - DIT5 R primer setleri, Zouhar ve ark. tarafından 2007 yılında geliştirilmiştir. Yürüttükleri çalışmada *D. dipsaci* nematodu ile bulaşık olduğu bilinen sarımsak bitkilerinden elde ettikleri nematodları kullanmışlardır. Çalışmada tasarladıkları altı adet primer setini denemişler ancak sadece DIT2 F - DIT2 R ve DIT5 F - DIT5 R primerlerinin *D. dipsaci* nematodu için güvenilir bant verdiğini bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda DIT2 F - DIT2 R primeri için 325 bp'lık, DIT5 F - DIT5 R primeri için ise 245 bp'lık bant profili elde edildiğini ifade etmişlerdir. Bu tez çalışmasında da bu iki primer seti ile benzer sonuçlar gözlenmiştir. Toplam 12 ilden (Kastamonu, Amasya, Tokat, Aksaray, Tekirdağ, Balıkesir, Bursa, Hatay, Gaziantep, Karahamammaras, Adıyaman ve Kırklareli) alınan sarımsak örneklerinden 58 tanesi morfolojik incelemelerle *Ditylenchus* spp. nematodu olarak seçilmiştir. Ancak moleküler tarama sonucunda incelenen örneklerden sadece 39 tanesinin (01, 02, 05, 06, 07, 08, 11, 12, 15, 18, 19, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 33, 34, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 ve 57) moleküler olarak *Ditylenchus dipsaci* olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9 - 4.10).

Bu tez çalışmasında *Ditylenchus dipsaci* türü için moleküler taramaları yapılan nematod popülasyonlarından elde edilen tüm primerlere ait sonuçlar Çizelge 4.1' de verilmiştir. Kullanılan moleküler markörlerde *D. dipsaci* için beklenen büyüklükte bant verenlere 1, beklenen büyüklükte bant vermeyenlere 0 yazılmıştır. Aynı çizelge filogenetik analiz için de kullanılmıştır.

Çizelge. 4.1. Çalışmada incelenen nematod popülasyonlarının spesifik primer setleri ile moleküler taramalarına ait veriler

Örnekleme Yapılan İl	Örnek Toplama Yılı	Örnek No	Primer									
			PF1 PR1	PF2 PR2	DdpS1 rDNA2	DitNF1 rDNA2	H05 H06	DipU R DipU F	18S 26S	DIT5 F DIT5 R	DIT2 F DIT2 R	DipU F Dip1 R
Hatay	2016	01	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Hatay	2017	02	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Hatay	2017	03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hatay	2017	04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hatay	2017	05	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Hatay	2017	06	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tekirdağ	2016	07	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tekirdağ	2016	08	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Tekirdağ	2017	09	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aksaray	2016	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aksaray	2016	11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Çizelge. 4.1. Çalışmada test edilen nematod popülasyonlarının spesifik primer setleri ile moleküler taramalara ait veriler (devam).

Örnekleme Yapılan İl	Örnek Toplam a Yılı	Örne k No	Primer									
			PF1 PR1	PF2 PR2	DdpS1 rDNA2	DitNF1 rDNA2	H05 H06	DipU R DipU F	18S 26S	DIT5 F DIT5 R	DIT2 F DIT2 R	DipU F Dip1 R
Aksaray	2016	12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Aksaray	2016	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aksaray	2016	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aksaray	2016	15	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Aksaray	2016	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aksaray	2017	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gaziantep	2016	18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Gaziantep	2016	19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Gaziantep	2016	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gaziantep	2016	21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Gaziantep	2016	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tokat	2016	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tokat	2016	24	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Tokat	2016	25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tokat	2016	26	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Balıkesir	2016	27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Bursa	2017	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amasya	2017	29	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Amasya	2017	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amasya	2017	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kastamonu	2016	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kastamonu	2016	33	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Kastamonu	2016	34	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Kastamonu	2016	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kastamonu	2016	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kastamonu	2016	37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Kastamonu	2016	38	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Kastamonu	2016	39	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Kastamonu	2016	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kastamonu	2016	41	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Kastamonu	2016	42	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Kastamonu	2016	43	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Kahramanmaraş	2016	44	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Kahramanmaraş	2016	45	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Kahramanmaraş	2016	46	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Kahramanmaraş	2016	47	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Adıyaman	2016	48	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Adıyaman	2016	49	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Balıkesir	2016	50	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Balıkesir	2016	51	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Kırklareli	2016	52	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Kırklareli	2016	53	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Gaziantep	2016	54	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Gaziantep	2016	55	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Gaziantep	2016	56	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Gaziantep	2016	57	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
Gaziantep	2016	58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2017 yılında yapılan bir çalışmada (Hajihassani ve Tenuta, 2017) Kanada' nın Manitoba eyaletinde *Ditylenchus dipsaci* nematodu ilk kez tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmada 2015 yılında zarar görmüş sarımsak yumrularından izole edilen nematodların morfolojik ve morfometrik incelemeleri yapılmış, bunun sonucunda sarımsak bitkilerine zarar veren nematodların *D. dipsaci* olduğu bildirilmiştir. Daha sonra türe spesifik primerlerle (Dipsaci hsp90R U831) moleküler tarama yapıldığını ve moleküler tarama sonucunda da kesin olarak nematod örneklerinin *D. dipsaci*' ye ait olduğu bildirilmiştir.

Jeszke ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada, *D. dipsaci*, *D. destructor* ve *D. gigas* nematodlarının ayrımlarının eş zamanlı PZR ve klasik PZR ile gerçekleştirilen moleküler tarama sonucunda başarılı bir şekilde yapılabildiğini bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada, soğan (*Allium cepa*), alev çiçeği (*Phlox paniculata*) ve bakla (*Vicia faba*) gibi bitkilerden elde edilen nematod popülasyonları kullanılmıştır. Gerçekleştirilen çalışmada DITuniF, DITdipR, DITgigR ve DITdesR primerleri kullanılarak *D. dipsaci* nematodunun 148 bç, *D. gigas* nematodunun 270 bç ve *D. destructor* nematodunun ise 339 bç' de bant verdiği bildirilmiştir. Yapılan PZR taramalarında bütün nematod türleri aynı anda kullanılıp her bir nematod için farklı büyüklükte bantlar elde edildiği ve tür ayrımının moleküler olarak başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği bildirilmiştir.

Bir diğer araştırmada ise *Ditylenchus weischeri* ve *D. dipsaci* nematodlarının tür ayrımlarının yapılabilmesi için türe özgü primerler kullanarak PZR taramaları gerçekleştirilmiştir (Madani ve ark., 2015). Araştırmacılar moleküler taramalarda kendi geliştirdikleri primer setlerini (U831 - L1110, U831 – Dipsaci hsp90R, U831 – Weischeri hsp90R) kullanmışlardır. Çalışma sonucunda *D. dipsaci* ve *D. weischeri* nematodlarının ayrımlarının başarılı bir şekilde yapıldığı bildirilmiştir.

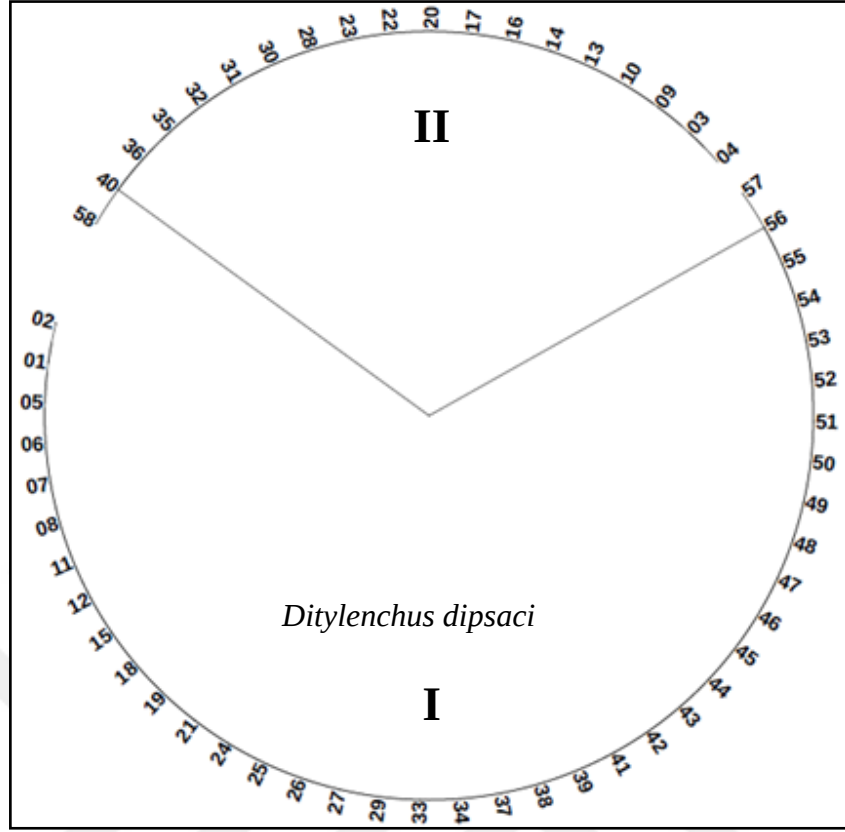
Batı Meksika' da 2017 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada ise *D. dipsaci* nematodunun yonca bitkisinde ilk tespiti yapılmıştır (Hernandez ve ark., 2017). Çalışmada PCR-RFLP tekniğini kullanarak *D. dipsaci* nematodunun tanımlamasını AB28 - TW81 ve D2A - D3B primer setlerini kullanarak yapmışlardır. Pozitif kontrol olarak sarımsaktan izole edilen *D. dipsaci* popülasyonlarını kullandıklarını bildirmişlerdir. PZR işlemleri sonucunda *RsaI* ve *Hinf* restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi gerçekleştirildiği ve çalışma sonucunda yonca bitkisinden elde edilen *D. dipsaci*

nematodu olduğu düşünölen örneklerin pozitif kontrol grubundan elde edilen *D. dipsaci* popölasyonu ile karşılaştırılması neticesinde yonca bitkisinden elde edilen nematodların *D. dipsaci* nematodu olduğu ve Batı Meksikada *D. dipsaci* nematodunun yonca bitkisinde ilk kez tespit edildiği bildirilmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar da göstermektedir ki, morfolojik ve morfometrik tür teşhisleri her zaman kesin ve güvenilir bir sonuç vermemektedir. Bu kapsamda yapılan farklı araştırmalarda morfolojik ve morfometrik teşhislerin yanı sıra moleküler taramalar da yapılarak tür tespitlerinin daha güvenilir ve kesin bir şekilde yapılabilindiği ifade edilmiştir (Esquibet ve ark., 2003, Marek ve ark., 2010, Vovlas ve ark., 2011, Jeszke ve ark., 2014 ve Madani ve ark., 2015).

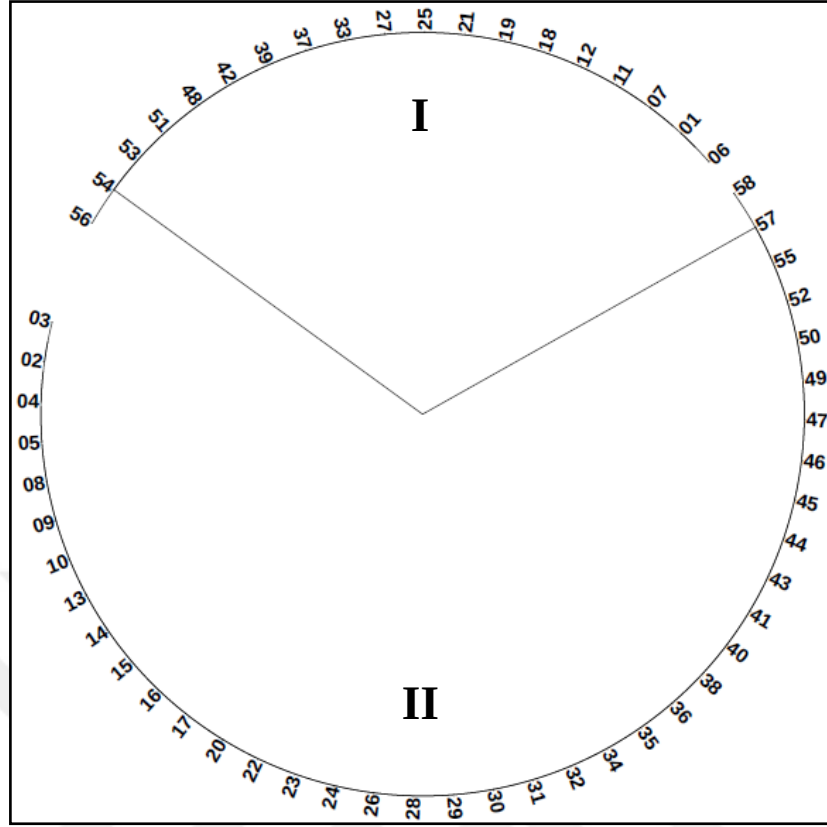
Bu tez çalışmasında da morfolojik ve morfometrik tanımlama sonucunda tür tespiti yapılan ve *D. dipsaci* olduğu düşünölen nematodların moleküler taramaları yapılmış ve morfolojik olarak *D. dipsaci* olarak seçilen bazı nematodların moleküler olarak *D. dipsaci* olmadığı ortaya konulmuştur.

Bu tezde 2016 ve 2017 yıllarında sarımsak tarlalarından elde edilen 58 adet nematod örneğinin PF1-PR1, PF2-PR2, DitNF1-rDNA2, DdpS1-rDNA2, DipU-R-DipU-F, DipU-R-Dip1-F, DIT2-R-DIT2-F, DIT5-R-DIT5-F ve 18S-26S primerleri ile yapılan moleküler taramalarına ait verilere dayalı dendogram Şekil 4.11' de verilmiştir. Filogenetik analiz için oluşturulan dendogram incelendiğinde 58 adet nematod örneğinin iki ana gruba ayrıldığı saptanmıştır. Birinci grupta moleküler taramalar sonucu *Ditylenchus dipsaci* olduğu saptanan örnekler yer almaktadır. Bu grupta yer alan ve türe spesifik primerlerde beklenen büyüklükte bant veren 58 adet nematod örneğinden 39 tanesinin (01, 02, 05, 06, 07, 08, 11, 12, 15, 18, 19, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 33, 34, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 ve 57 numaralı örnekler) *Ditylenchus dipsaci* olduğu saptanmıştır. İkinci grup ise türe spesifik primerlerle yapılan taramalar sonucu bant vermeyen yani *Ditylenchus dipsaci* olmayan örnekleri içermektedir. Dolayısıyla ikinci grupta yer alan 58 adet nematod örneğinden 19 tanesi (03, 04, 09, 10, 13, 14, 16, 17, 20, 22, 23, 28, 30, 31, 32, 35, 36, 40 ve 58) *Ditylenchus dipsaci* değildir.



Şekil 4.11. 2016-2017 yılı sarımsaklara ait nematod örnekleri arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendrogram

D. dipsaci'nin normal ırklarının ayrımının sağlanması için kullanılan türe spesifik H05-H06 primeri ile yapılan moleküler taramalar sonucunda elde edilen dendrogram incelendiğinde birinci grupta sarımsaklara ait 58 adet nematod örneğinden beklenen büyüklükte (242 bç' de) bant veren 19 tanesinin (01, 06, 07, 11, 12, 18, 19, 21, 25, 27, 33, 37, 39, 42, 48, 51, 53, 54 ve 56) *Ditylenchus dipsaci*'nin normal ırkı olduğu saptanmıştır (Şekil 4.12). Çalışmada diğer primerler ile yapılan taramalar sonucunda *D. dipsaci* olduğu tespit edilen 39 adet örnekten H05 - H06 primerine göre 19 tanesinin normal ırk olduğu tespit edilmiştir. İkinci grupta ise *Ditylenchus dipsaci*'nin farklı ırklarına ait 19 adet örnek (02, 05, 08, 24, 26, 29, 34, 38, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 49, 50, 52, 55 ve 57) ve *Ditylenchus dipsaci* olmayan 20 adet (03, 04, 09, 10, 13, 14, 16, 17, 20, 22, 23, 28, 30, 31, 32, 35, 36, 40 ve 58) örnek bulunmaktadır.



Şekil 4.12. Sarımsak tarlalarından alınan 58 adet nematod örneğinin H05-H06 primeri ile yapılan taramaları sonucunda elde edilen dendrogram

5. SONUÇ

Bu tez çalışmasının amacı; ülkemizde sarımsak bitkisinin yoğun olarak üretimi gerçekleştirilen illerden elde edilen nematod popülasyonlarının ITS-rDNA dizilerine spesifik 10 adet primer ile (DitNF1 - rDNA2, PF1 - PR1, PF2 - PR2, DdpS1 - rDNA2, H05 - H06, 18S - 26S, DipU F - Dip1 R, DipU F - DipU R, DIT2 F - DIT2 R ve DIT5 F - DIT5 R) moleküler karakterizasyonun yapılmasıdır. Moleküler tür tespiti sonucunda elde edilen veriler, filogenetik analiz ile genetik olarak benzerlikleri ve farklılıkları ortaya konularak toplanılan örneklerin tür tespiti yapılmıştır. Yapılan bu moleküler tür tespiti ülkemizde sarımsak yetiştirme alanlarında yayılım gösteren, soğan sak nematodu, *Ditylenchus dipsaci*' nin ırklarının tespiti, bu zararlıya karşı alınabilecek önlemlerin daha etkili, bilinçli ve etkin bir şekilde yapılmasına yardımcı olacaktır. Bundan dolayı önemli miktarda zarara neden olan bu nematod ile etkin bir şekilde mücadele edilebilecek ve dünya ortalamasına göre (18,09 hg/ha) düşük olan sarımsak verimi 8,91 hg/ha değerinin üzerine çıkıp dünya ortalamasına yaklaşabilecektir. Dolayısıyla ekonomik kalkınmaya da katkı sağlanmış olunacaktır.

Türkiye' de nematod çalışmalarının büyük kısmı morfolojik özelliklere göre yapılmaktadır ve morfolojik olarak yapılan tür tespitleri her zaman doğru sonuç vermemektedir. Sarımsak üretimine büyük zararlar veren bu bitki parazitin yayılımının güvenilir ve net olarak bilinebilmesi için moleküler tür tespitinin yapılması büyük önem arz etmektedir. Bu bağlamda bu tez çalışmasında da morfolojik olarak *Ditylenchus* spp. olarak seçilen 58 adet örneğin hepsinin *D. dipsaci* olmadığı, 39 nematod örneğinin *D. dipsaci* olduğu moleküler olarak tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında soğan sak nematodunun tür tespiti için sarımsak üretiminin yoğun olarak gerçekleştirildiği Kastamonu, Amasya, Tokat, Aksaray, Tekirdağ, Balıkesir, Bursa, Hatay Gaziantep, Kahramanmaraş, Adıyaman ve Kırklareli illerinden toplanılan sarımsak örnekleri öncelikle, 215O468 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında morfolojik olarak incelenmiştir. Morfolojik tür tespitinde, *Ditylenchus* spp. olduğu düşünülen 58 adet nematod örneği moleküler karakterizasyon için seçilmiştir (Çizelge 4.1). Toplam 58 adet nematod örneği, türe spesifik olan DitNF1 - rDNA2, PF1 - PR1, PF2 - PR2, DdpS1 - rDNA2, H05 - H06, 18S - 26S, DipU F - Dip1 R, DipU F - DipU R, DIT2 F - DIT2 R ve DIT5 F - DIT5 R primerleri ile taranmıştır. Yapılan bu

taramalarda 58 adet örnekten 39' unun *D. dipsaci* olduğu tespit edilmiştir. Her bir primer için *D. dipsaci*' de beklenen büyüklükte bant veren örnekler Hatay (01, 02, 05 ve 06), Tekirdağ (07 ve 08), Aksaray (11, 12 ve 15), Gaziantep (18, 19, 21, 54, 55, 56, 57 ve 58), Tokat (24, 25 ve 26), Balıkesir (27, 50 ve 51), Amasya (29), Kastamonu (33, 34, 37, 38, 39, 41, 42 ve 43), Kahramanmaraş (44, 45, 46 ve 47), Adıyaman (48 ve 49), Kırklareli (52 ve 53) illerine aittir. Ayrıca H05 - H06 primerine ait taramalar sonucunda incelenen örneklerin 19' unun (Hatay; 01 ve 06, Tekirdağ; 07, Aksaray; 11 ve 12, Gaziantep; 18, 19, 21, 54, 55, 56, 57 ve 58, Tokat; 25, Balıkesir; 27, 50 ve 51, Kastamonu; 33, 37, 39, 42 ve 43, Kahramanmaraş; 44, 45, 46 ve 47, Adıyaman; 48 ve 49 ve Kırklareli; 52 ve 53) normal ırk olduğu belirlenmiştir.

Tez çalışmasında türe spesifik primerlerle (DitNF1 - rDNA2, PF1 - PR1, PF2 - PR2, DdpS1 - rDNA2, 18S - 26S, DipU F - Dip1 R, DipU F - DipU R, DIT2 F - DIT2 R ve DIT5 F - DIT5 R) gerçekleştirilen moleküler taramalarda elde edilen agaroz jel görüntüleri sonucunda genetik benzerlik ve uzaklıkları ortaya koymak için dendogram oluşturulmuştur. Dendogram incelendiğinde 58 adet nematod örneğinin iki ana gruba ayrıldığı gözlemlenmiştir. Birinci grupta gerçekleştirilen moleküler taramalar sonucu *D. dipsaci* olduğu ortaya konan örnekler (01, 02, 05, 06, 07, 08, 11, 12, 15, 18, 19, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 33, 34, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56 ve 57) bulunurken, ikinci grupta *D. dipsaci* nematodu olmayan örnekler (03, 04, 09, 10, 13, 14, 16, 17, 20, 22, 23, 28, 30, 31, 32, 35, 36, 40 ve 58) yer almıştır. Dendogram incelendiğinde de 58 adet nematod örneğinden moleküler taramalar sonucunda 39 tanesinin *Ditylenchus dipsaci* nematodu olduğu saptanmıştır. Morfolojik taramalar ile *D. dipsaci* olarak seçilen 58 nematod örneğinden 19 tanesinin moleküler olarak *D. dipsaci* olmadığı oluşturulan dendogram sonucunda da ortaya konmuştur.

H05 - H06 primeri *D. dipsaci*' nin normal ırkının ayrımının sağlanması amacıyla kullanılmıştır. H05 - H06 primer seti ile yapılan moleküler tarama sonucunda elde edilen bant profilleri neticesinde oluşturulan dendogram sonucunda moleküler taramaları yapılan nematod örnekleri iki gruba ayrılmıştır. Birinci grupta yer alan 58 adet nematod örneğinden beklenen büyüklükte (242 bp' de) bant veren 19 tanesinin (01, 06, 07, 11, 12, 18, 19, 21, 25, 27, 33, 37, 39, 42, 48, 51, 53, 54 ve 56) *Ditylenchus dipsaci* ' nin normal ırkı olduğu ortaya konmuştur.

Bu tez çalışmasında, moleküler tür teşhisinde kullanılan SSR ve SCAR (DitNF1 - rDNA2, PF1 - PR1, PF2 - PR2, DdpS1 - rDNA2, H05 - H06, 18S - 26S, DipU F - Dip1 R, DipU F - DipU R, DIT2 F - DIT2 R ve DIT5 F - DIT5 R) markörleri ile oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu kapsamda, öncelikle morfolojik ve morfometrik özelliklere göre *Ditylenchus* spp. olarak seçilen 58 adet nematod örneğinden moleküler tür teşhisi yapılarak 39 tanesinin dokuz primer çifti bakımından *D. dipsaci* olduğu, H05 - H06 primer setine göre ise bu örneklerden 19' unun *D. dipsaci*' nin normal ırkı olduğu saptanmıştır. Sarımsak üretimine büyük zarar veren nematodların moleküler olarak tür teşhisi çalışmalarının yapılması, bu zararlıya karşı alınabilecek önlemlerin ve mücadelenin ilk ve en önemli basamağını oluşturmaktadır. Ayrıca moleküler teşhislerin morfolojik ve morfometrik tür teşhisi çalışmalarına göre daha kesin ve güvenilir sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Bu bağlamda, SSR ve SCAR markörleri ile ülkemizde nematodlara yönelik daha sonra yapılabilecek olan tür teşhisi çalışmalarında güvenilir ve kesin sonuçlar alınabileceği ortaya konmuştur.

Sonuç olarak, ülkemizde şu ana kadar nematod popülasyonlarının tür teşhisi yalnızca morfolojik ve morfometrik kriterler göz önüne alınarak yapılmaktaydı. Ancak sadece morfolojik gözlemler sonucunda yapılan tür teşhisi çalışmaları her zaman doğru ve güvenilir sonuç vermemektedir. Bu tez çalışmasında SSR ve SCAR markörleri ile gerçekleştirilen moleküler karakterizasyon ile morfolojik ve morfometrik tür teşhisine göre çok daha güvenilir ve kesin sonuçlar elde edilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- Abrantes, I.M., Vieira dos Santos, M.C., Luci, I., Conceição, P.M., Cunha, M.J. ve Santos, M.S.N., 2004. Biochemical and Molecular Characterization of Plant-Parasitic Nematodes. *Phytopathologia Mediterranea*, 43, 232-258.
- Anonim, 2017a. Sarımsak Yetiştiriciliği. <http://www.tarimsalistatistik.com/tr-TR/Sayfa/sarimsak-yetistiriciligi> (Erişim Tarihi: 14.08.2017).
- Anonim, 2017b. Nematoloji. <http://nematoloji.blogspot.com.tr> (Erişim Tarihi: 02.09.2017).
- Anonim, 2018. DendroUPGMA: A Dendrogram Construction Utility. <http://genomes.urv.cat/UPGMA> (Erişim Tarihi: 14.05.2018).
- Artık, N. ve Poyrazoğlu, E. S., 1994. Kastamonu Sarmısağının (*Allium sativum* L.) Kimyasal Bileşiminin Belirlenmesi Üzerine Araştırma. *Gıda*, 19(1), 3-9.
- Ayaz, E. ve Alpsoy H.C., 2007. Sarımsak (*Allium sativum*) ve Geleneksel Tedavide Kullanımı. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 31(2), 145-149.
- Bruns, T.D., Vilgays, T.J. ve Taylor, J.W., 1991. Fungal Molecular Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22, 525-564.
- Bora, T. ve Karaca, İ. 1970. Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi. *Ege Üniversitesi Yardımcı Ders Kitabı, Yayın*, (167).
- Chizhov, V.N., Borisov, B.A. ve Subbotin, S.A., 2010. A New Stem Nematode, *Ditylenchus weischeri* sp. n. (Nematoda: Tylenchida), A Parasite of *Cirsium arvense* (L.) Scop. In the Central Region of the Non-Chernozem Zone of Russia. *Journal of Nematology*, 18 (2), 95-102.
- Dahlman, M., Danell, E. ve Spatafora, J.W., 2000. Molecular Systematics of Craterellus: Cladistic Analysis of Nuclear LSU rDNA Sequence Data. *Mycological Research*, 104(4), 388-394.
- Dikici, A., Yavuzaslanoglu, E. ve Elekcioğlu, İ.H., 2014. Soğan Sak Nematodu (*Ditylenchus dipsaci*) (Kühn, 1857) (*Tylenchida: Anguinidae*)' nun Karaman İlinde Soğan (*Allium cepa* L.) Bitkisinde Populasyon Değişiminin Araştırılması. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 7 (1), 20-23.
- Douda, O., Marek, M., Zouhar, M. ve Rysanek, P., 2013. Insights into the Structure and Phylogeny of the 28S rRNA Expansion Segments D2 and D3 of the Plant-Infecting Nematodes from the Genus *Ditylenchus* (Nematoda: Anguinidae). *Phytopathologia Mediterranea*, 52 (1), 84-97.
- Esmaeili, M., Heydari, R., Castillo, P. ve Palomares-Rius, J.E., 2017. Molecular and Morphological Characterisation of *Ditylenchus persicus* n. sp. (Nematoda: Anguinidae) from Kermanshah Province, Western Iran. *Nematology*, 19(2), 211-223.
- Esquibet, M., Bekal, S., Castagnone-Sereno, P., Gauthier, J-P., Rivoal, R. ve Caubel, G., 1998. Differentiation of Normal and Giant *Vicia faba* Populations of the Stem Nematode *Ditylenchus dipsaci*: Agreement Between RAPD and Phenotypic Characteristics. *Heredity*, 81, 291-298.

- Esquibet, M., Grenier, E., Plantard, O., Andaloussi, A. ve Caubel G., 2003. DNA Polymorphism in the Stem Nematode *Ditylenchus dipsaci*: Development of Diagnostic Markers for Normal and Giant Races. *Genome*, 46, 1077-1083.
- Evlice, E. ve Bayram, Ş., 2012. A Survey of Potato Fields for Root-knot Nematode in Central Anatolia. *31th International Symoisum of the European Society of Nematologists*, p. 128, Adana.
- Evren, M., Apan, M. ve Albayram, C., 2006. Sarımsağın Antimikrobiyel Özellikleri. *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, s. 689, Bolu.
- FAO, 2016. Faostat. <http://www.fao.org/faostat/en> (Erişim Tarihi: 09.08.2017).
- Holterman, M., Wurff, A., Elsen, S., Megen, H., Bongers, T., Holovachov, O. ve Helder, J.B.J., 2006. Phylum-Wide Analysis of SSU rDNA Reveals Deep Phylogenetic Relationships among Nematodes and Accelerated Evolution towards Crown Clades. *Molecular Biology and Evolution*, 23(9),1792-1800.
- Hooper, D.J., 1986. Extraction of Free Living Stages from Soil. In: Southey, J. F. (Ed.). *Laboratory Methods For Work with Plant and Soil Nematodes*. London.
- Hyman, B.C. ve Whipple, L.E., 1996. Application of Mitochondrial DNA Polymorphism to *Meloidogyne* Molecular Population Biology. *Journal of Nematology*, 28, 268-276.
- İbret, B. Ü., 2005. Türkiye’ deki Sarımsak Tarımı Ve Taşköprü Sarımsağı Üzerine Coğrafi Açidan Bir İnceleme. *Marmara Coğrafya Dergisi*, (12), 17-50.
- Jeszke, A., Budziszewska, M., Dobosz, R., Stachowiak, A., Protesewicz, D., Wieczorek, P., ve Obreńska-Stęplowska, A. 2014. A Comparative and Phylogenetic Study of The *Ditylenchus dipsaci*, *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus gigas* Populations Occurring in Poland. *Journal of Phytopathology* 162, 61–67.
- Kepenekçi, İ., 2012. Taksonominin Tarihçesi. *Nematoloji Bitki Paraziti ve Entomopatojen Nematodlar*, İlker Kepenekçi. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Eğitim Yayın ve Yayınlar Dairesi Başkanlığı, Ankara, s. 467-469.
- Kepenekçi, İ., 2014. Türkiye Ayrıntılı Nematoloji Bibliyografyası 1934-2014. Siyasal Kitabevi, Ankara.
- Kerkoud, M., Esquibet, M., Plantard , O., Avrillon, M., Guimier, C., Franck, M., Le’chappe’, J. ve Mathis, R., 2007. Identification of *Ditylenchus* Species Associated with Fabaceae Seeds Based on a Specific Polymerase Chain Reaction of Ribosomal DNA-ITS Regions. *European Journal of Plant Pathology*, 118, 323-332.
- Kılıçoğlu, Ç.M. ve Özkoç, İ., 2008. Fungal Sistematikteki Moleküler Gelişmeler. Samsun, *OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23(1), 65-72.
- Kühn J, 1857. Über das Vorkommen von Anguillulen in Erkrankten Blütenköpfen von *Dipsacus fullonum* L. *Z. Wiss Zool Abt A*, 9, 129-137.
- Lee, S.B. ve Taylor, J.W., 1992. Phylogeny of Five Funguslike Protoctistan Phytophthora Species, Inferred from The Internal Transcribed Spacers of Ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 636-653.

- Madani, M., Tenuta, M., Chizhov, V.N., Sergei, A. ve Subbotin, S.A., 2015. Diagnostics of Stem and Bulb Nematodes, *Ditylenchus weisheri* and *D. dipsaci* using PCR with Species-Specific Primers. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 37(2), 212-220.
- Marek, M., Zouhar, M., Douda, O., Mazakova, J. ve Rysanek, P., 2010. Bioinformatics-Assisted Characterization of The ITS1-5.8S-ITS2 Segments of Nuclear rRNA Gene Clusters and Its Exploitation in Molecular Diagnostics of European Crop-Parasitic Nematodes of the Genus *Ditylenchus*. *Plant Pathology*, 59, 931-943.
- Marek, M., Zouhar, M., Rysanek, P. ve Havranek, P., 2005. Analysis of ITS Sequences of Nuclear rDNA and Development of a PZR-based Assay for The Rapid Identification of The Steam Nematode *Ditylenchus dipsaci* (Nematoda: Anguinidae) in Plant Tissues. *Helminthologia*, 42(2), 49-56.
- Mollov, D. S., Subbotin, S.A. ve Rosen, C., 2012. First report of *Ditylenchus dipsaci* on garlic in Minnesota. *Plant Disease*, 96(11), 1707-1707.
- Nei, M. ve Li, W., 1979. Mathematical Model for Study The Genetic Variation in Terms of Restriction Endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 74, 5267-5273.
- Pethybridge, S.J., Gorny, A., Hoogland, T., Jones, L., Hay, F., Smart, C. ve Abawi, G., 2016. Identification and Characterization of *Ditylenchus*. *Tropical Plant Pathology*, 41(3), 193-197.
- Powers T.O. ve Fleming, C.C., 1998. Biochemical and Molecular Characterization. In: The Physiology and Biochemistry of Free-Living and Plant-Parasitic Nematodes. Editörs: Perry, R.N., Wright, D.J. ve Wallingford, UK: CAB International, 335-379.
- Qiao, Y., Zaidi, M., Badiss, A., Hughes, B., Celetti, M.J. ve Yu, Q., 2013. Intra-Racial Genetic Variation of *D. dipsaci* Isolated from Garlic in Ontario as Revealed by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35(3), 346-353.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, US: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Leblebici, E., Görk, G. ve Bekat, L., 2000 Tohumlu Bitkiler Sistematiği, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, No: 116, İzmir.
- Sturhan, D. ve Brzeski, M.W., 1991. Stem and Bulb Nematodes, *Ditylenchus* spp.. *Manual of Agricultural Nematology*. Nickle, W.R., New York: Marcel Dekker Publications.
- Sturhan, D. ve Subbotin, S.A., 2008. *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus dipsaci*, Diagnostics. *EPPO Bulletin*, 38, 363-373.
- Subbotin, S.A., Madani, M., Krall, E., Sturhan, D. ve Moens, M., 2005. Molecular Diagnostics, Taxonomy and Phylogeny of the Stem Nematode *Ditylenchus dipsaci* Species Complex Based on the Sequences of the Intertranscribed Spacer-rDNA. *Phytopathology*, 95, 1308-1315.
- Şahin, E., 2010. Orta Anadolu Buğday Alanlarında Önemli Bitki Paraziti Nematodların Belirlenmesi ve Tahıl Kist Nematodu *Heterodera filipjevi* nin Biyolojisi ile Mücadelesi Üzerine Çalışmalar. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana.

- Taşkın, T. ve Tan, A., 2009. Herbaryum Hazırlama Teknikleri. Teknik Broşür, No: 4, ETAE Matbaası, İzmir.
- TÜİK, 2017. Bitkisel Üretim İstatistikleri. <http://www.tuik.gov.tr> (Erişim Tarihi: 30.06.2018).
- Vovlas, N., Troccoli, A., Palomares-Rius, J. E., De Luca, F., Cantalapiedra Navarrete, C., Liébanas, G. ve Castillo, P. 2016. A New Stem Nematode, *Ditylenchus oncogenus* n.sp.(Nematoda: Tylenchida), Parasitizing Sowthistle From Adriatic Coast Dunes in Southern Italy. *Journal of Helminthology*, 90(2), 152-165.
- Vovlas, N., Troccoli, A., Palomares-Rius, J. E., De Luca, F., Liébanas, G., Landa, B. B.ve Castillo, P., 2011. *Ditylenchus gigas* n. sp. Parasitizing Broad Bean: A New Stem Nematode Singled out from the *Ditylenchus dipsaci* Species Complex Using a Polyphasic Approach with Molecular Phylogeny. *Plant Pathology*, 60(4), 762-775.
- Vrain T.C. ve McNamara, D.G., 1994. Potential for the Identification of Quarantine Nematodes by PCR. *Bulletin OEPP*, 24, 453-458.
- Vrain, T.S., Wakarchuk, D.A., Levesque, A.C. ve Hamilton, R.I., 1992. Interspecific rDNA Restriction Fragment Length Polymorphism in The *Xiphinema Americanum* Group. *Fundamental and Applied Nematology*, 16, 563-573.
- Waeyenberge, L., Ryss, A., Moens, M., Pinochet, J. ve Vrain, T.C., 2000. Molecular Characterisation of 18 *Pratylenchus* Species Using rDNA Restriction Fragment Length Polymorphism. *Nematology*, 2(2), 135-142.
- Walker, J.T. ve Wilson, J.D., 1960. The Separation of Nematodes from Soil by a Modified Baermann Funnel Technique. *Plant Dis. Rept.*, 44, 94-97.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. ve Taylor. J., 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. *Academic Press*, San Diego, p. 315-322.
- Whitehead, A.G. ve Hemming, J.R., 1965. A Comparison of Some Quantitative Methods of Extracting Small Vermiform Nematodes From Soil. *Annals of Applied Biology*, 55, 25-38.
- Yavuzaslanoglu, E. ve Dikici, A., 2013. Soğan-Sak Nematodu (*Ditylenchus dipsaci*) (Kühn, 1857) (Tylenchida: Anguinidae)' nun Karaman İlinde Soğan (*Allium cepa* L.) Üzerinde Mevsimler Populasyon Değişimi. 1. *Ulusal Zooloji Kongresi*, Nevşehir.
- Yavuzaslanoglu, E., Ateş Sönmezoğlu, Ö., Genç, N., Akar, Z. ve Terzi, B., 2018. Molecular characterization of *Ditylenchus dipsaci* on Onion in Turkey. *European Journal of Plant Pathology*, 151(1), 195-200.
- Yu, Q., Tenuta, M. ve Sun, Fengcheng, S., 2017. The Genus *Ditylenchus* (Tylenchida: Anguinidae) in Canada, 32nd ESN Symposium, p. 167, 28 August - 1 September, Braga, Portugal.
- Zouhar, M., Douda, O., Dlouhy, M., Jana, L., Manasova, M. ve Stejskal, V., 2016. Fumigation of Garlic Seed: a Tool for Eradication of *Ditylenchus dipsaci*. 32nd ESN Symposium, p. 300, 28 August - 1 September, Braga, Portugal.

Zouhar, M., Marek, M., Douda, O., Mazakova, J. ve Rysanek, P., 2007. Conversion of Sequence-Characterized Amplified Region (SCAR) Bands into High-Throughput DNA Markers Based on RAPD Technique for Detection of the Stem Nematode *Ditylenchus dipsaci* in Crucial Plant Hosts. *Plant Soil Environment*, 53(3), 97-104.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Zeki Mutlu AKAR

Doğum Tarihi ve Yeri: 1991 Yenimahalle / ANKARA

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Telefon : +90 554 604 69 91

e-mail : zekimutluakar@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Karamanoğlu Mehmedbey Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı	2015-2018
Lisans	Karamanoğlu Mehmedbey Üniversitesi Kamil Özdağ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2010-2014
Lise	Yenimahalle Endüstri Meslek Lisesi Elektronik Bölümü / Görüntü ve Ses Sistemleri	2006-2009

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2007	Alpler Yemek MİTAŞ Yemekhanesi	Garson
2014	Ankara Onkoloji Hastanesi	Mikroeliza Cihaz Teknisyeni
2014-2015	Flamingo Pastane & Cafe	Garson

Yayınlar

1. Yavuzaslanoglu, E., Ates Sönmezoğlu, Ö., Genç, N., **Akar, Z.** ve Terzi, B., **2018**. Molecular characterization of *Ditylenchus dipsaci* on Onion in Turkey. *European Journal of Plant Pathology*, 151, 195-200.
2. **Akar, Z.M.**, Genç, N., Ateş Sönmezoğlu, Ö., Yavuzaslanoglu, E., **2016**. Molecular Identification of Stem and Bulb Nematode (*Ditylenchus dipsaci*) on Garlic in Turkey. *32nd ESN Symposium*, s. 282, 28 August - 1 September, Braga, Portugal.
3. **Akar, Z.M.**, Genç, N., Ateş Sönmezoğlu, Ö., Yavuzaslanoglu, E., **2017**. Molecular Characterization of Stem and Bulb Nematode (*Ditylenchus dipsaci*) on Garlic in Turkey. *2nd International Balkan Agriculture Congress*, s. 367, 6-18 May, Tekirdag, Turkey.
4. Genç, N., Ateş Sönmezoğlu, Ö., Yavuzaslanoglu, E., **Akar, Z.M.**, **2017**. Identification of Stem and Bulb Nematodes (*Ditylenchus dipsaci*) in Onion Plants by PZR Technique. *2nd International Balkan Agriculture Congress*, s. 348, 6-18 May, Tekirdag, Turkey.
5. **Akar, Z.M.**, Yavuzaslanoglu, E., Genç, N., Ateş Sönmezoğlu, Ö., **2017**. Molecular Identification of *Ditylenchus dipsaci* Nematode Isolated from Garlic in Turkey. *2nd International Mediterranean Science and Engineering Congress*, s. 519, 25-27 October, Adana, Turkey.
6. Genç, N., Yavuzaslanoglu, E., **Akar, Z.M.**, Ateş Sönmezoğlu, Ö., **2017**. Optimization of Multiplex PCR for Molecular Characterization of *Ditylenchus dipsaci*. *2nd International Mediterranean Science and Engineering Congress*, s. 363, 25-27 October, Adana, Turkey.
7. **Akar, Z.M.**, Genç, N., Ateş Sönmezoğlu, Ö., Yavuzaslanoglu, E., **2018**. Molecular Characterization of *Ditylenchus dipsaci* n. sp. from Turkey. *1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Eurasian Bio Chem 2018)*, s. 367, 26-27 April, Ankara, Turkey.
8. Terzi, B., Genç, N., **Akar, Z. M.**, Yıldırım, A. Ve Ateş Sönmezoğlu, Ö., **2018**. Multiplex PCR for Indentification of Drought Tolerance on Wheat Genotypes. *1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018)*, s. 361, 26-27 April, Ankara, Turkey.

9. Akar, Z.M., Genç, N., Terzi, B., Yavuzaslanoğlu, E. ve Ateş Sönmezoğlu, Ö., **2018.** Molecular Characterization of ITS Regions of *Ditylenchus dipsaci* Isolated From Garlic. *IV. International Agriculture Congress*, 05-08 July, Nevşehir, Turkey.

10. Çevik, E., Terzi, B., Akar, Z.M. ve Ateş Sönmezoğlu, Ö., 2018. The Use of Molecular Markers for Drought Tolerance in Wheat. *IV. International Agriculture Congress*, 05-08 July, Nevşehir, Turkey.

Görev Aldığı Projeler

TÜBİTAK 1001 Projesi - Proje No: 215O468, **Proje Bursiyeri.** 2016 - 2018.

Katıldığı Kongreler

1. 32nd ESN Symposium, 28 August - 1 September 2016, Braga, Portugal.
2. 2nd International Balkan Agriculture Congress, 6-18 May 2017, Tekirdağ, Turkey.
3. 2nd International Mediterranean Science and Engineering Congress, 25-27 October 2017, Adana, Turkey.
4. 1st International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Eurasian Bio Chem 2018), 26-27 April 2018, Ankara, Turkey.
5. IV. International Agriculture Congress, 05-08 July 2018, Nevşehir, Turkey.