

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**ÇELTİK BEYAZ UÇ NEMATODU, *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942
(Aphelenchida: Aphelenchoididae)'NUN REAL-TİME PCR İLE TANISI VE
ÇELTİK TOHUMLARININ BULAŞMA DURUMUNUN NİCEL ANALİZİ**

Elvan SERT ÇELİK
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

AĞUSTOS 2019

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**ÇELTİK BEYAZ UÇ NEMATODU, *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942
(Aphelenchida: Aphelenchoididae)'NUN REAL-TİME PCR İLE TANISI VE
ÇELTİK TOHUMLARININ BULAŞMA DURUMUNUN NİCEL ANALİZİ**

Elvan SERT ÇELİK
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

AĞUSTOS 2019

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇELTİK BEYAZ UÇ NEMATODU, *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942
(Aphelenchida: Aphelenchoididae)'NUN REAL-TİME PCR İLE TANISI VE
ÇELTİK TOHUMLARININ BULAŞMA DURUMUNUN NİCEL ANALİZİ**

Elvan SERT ÇELİK
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından FDK-
2018-3248 nolu proje ile desteklenmiştir.**

AĞUSTOS 2019

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇELTİK BEYAZ UÇ NEMATODU, *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942
(Aphelenchida:Aphelenchoididae)'NUN REAL-TİME PCR İLE TANISI VE
ÇELTİK TOHUMLARININ BULAŞMA DURUMUNUN NİCEL ANALİZİ

ELVAN SERT ÇELİK

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 21/08./2010... tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

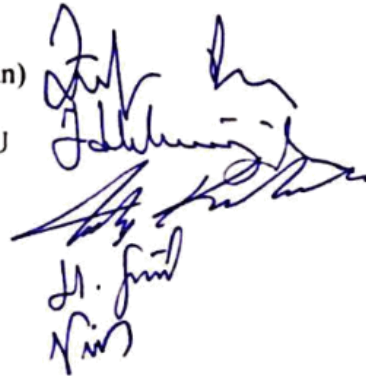
Prof. Dr. Zübeyir DEVRAN (Danışman)

Prof. Dr. İbrahim Halil ELEKCİOĞLU

Prof. Dr. Galip KAŞKAVALCI

Prof. Dr. Uğur GÖZEL

Dr. Öğr. Üyesi Fatih DAĞLI



ÖZET

ÇELTİK BEYAZ UÇ NEMATODU, *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 (Aphelenchida:Aphelenchoididae)'NUN REAL-TİME PCR İLE TANISI VE ÇELTİK TOHUMLARININ BULAŞMA DURUMUNUN NİCEL ANALİZİ

Elvan SERT ÇELİK

Doktora Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zübeyir DEVRAN

Ağustos 2019; 57 sayfa

Çeltik, dünya nüfusunun %50'den fazlası için özellikle de gelişmekte olan ülkelerin temel besin kaynağıdır. Çeltik beyaz uç nematodu, *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 çeltikte ekonomik düzeyde verim kaybına neden olmaktadır. European Plant Protection Organization (EPPO/OEPP)'a göre, *A. besseyi* 1981 yılından beri karantina listesinde bulunmaktadır. *Aphelenchoides besseyi* tohum kaynaklı bir nematod olduğu için bulaşık olmayan çeltik alanlarına hızla yayılmaktadır. Bu nedenle *A. besseyi*'nin hızlı ve doğru tanımlanması nematodun kontrolü ve mücadelesi için gereklidir.

Bu çalışmada, *A. besseyi*'nin small subunit rDNA bölgesi kullanılarak bir TaqMan prob geliştirilmiş ve moleküler tanımlaması yapılmıştır. Geliştirilen TaqMan probu tüm *A. besseyi* popülasyonlarında amplifikasyon eğrisi ve eşik döngüsü (Ct değeri) değerleri vermiş, diğer *Aphelenchoides* spp. ve diğer bitki paraziti nematodlarında beklendiği gibi amplifikasyon eğrisi oluşturmamıştır.

TaqMan probu ile *A. besseyi*'nin genomik DNA'sının seri dilüsyonları sonucu 0.0005 pg DNA miktarına ve plazmid DNA'sının ise seri dilüsyonları sonucu 9.3×10^1 gen kopya sayısına kadar belirlenebilmiştir. *Aphelenchoides besseyi*'nin tüm yaşam dönemleri ve DNA izolasyonu yapılmadan *A. besseyi* bireyleri TaqMan probu ile tespit edilmiştir. Bulaşık çeltik dokularından *A. besseyi*, TaqMan probu ile başarılı bir şekilde tespit edilmiştir. Ayrıca real-time PCR yöntemiyle, bulaşık çeltik tohumlarında ve kavuzlarında bulunan *A. besseyi* sayısının tahmin edilebileceği bir skala geliştirilmiştir. Sonuçlar, real-time PCR ile *A. besseyi*'nin hızlı ve doğru şekilde tanımlanabileceğini ve nicel analizinin yapılabileceğini göstermiştir. Bulgular tohum sertifikasyonunda, karantina uygulamalarında ve ıslah çalışmalarında kullanılabilir.

ANAHTAR KELİMELER: *Aphelenchoides besseyi*, çeltik, Real-time PCR

JÜRİ: Prof. Dr. Zübeyir DEVRAN

Prof. Dr. İbrahim Halil ELEKCİOĞLU

Prof. Dr. Galip KAŞKAVALCI

Prof. Dr. Uğur GÖZEL

Dr. Öğretim Üyesi Fatih DAĞLI

ABSTRACT

DETECTION AND QUANTIFICATION OF RICE WHITE TIP NEMATODE, *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 (Aphelenchida:Aphelenchoididae) FROM RICE

Elvan SERT ÇELİK

PhD Thesis in Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Zübeyir DEVRAN

August 2019; 57 pages

Rice is essential food source for more than %50 of world population, particularly for developing countries. Rice white tip nematode, *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 causes economically yield losses in rice. *Aphelenchoides besseyi* has been on the quarantine list since 1981, according to the European Plant Protection Organization (EPPO/OEPP). Since rice white tip nematode is a seed-borne pathogens, it spreads rapidly by means of infected seeds. Therefore, rapid and accurate identification of *A. besseyi* is necessary for effective control of nematode.

In this study, a TaqMan probe assay based on small subunit rDNA region of *A. besseyi* was developed to identify *A. besseyi*. As a result, all *A. besseyi* populations showed an amplification curve and Ct values as expected using the TaqMan but the probe did not show any amplification curve from other related *Aphelenchoides* spp. species and plant-parasitic nematodes.

Dilutions series of genomic DNA obtained from one *A. besseyi* juvenil was detected until 0.0005 pg genomic DNA and low detection limit of plasmid DNA was until 9.3×10^1 gene copies. All developmental stages of *A. besseyi* were detected using TaqMan probe. In addition, The TaqMan assay was directly identified alive *A. besseyi* without DNA isolation and infected rice tissues. We developed a scala for estimate of *A. besseyi* quality in rice seed and paddy using real-time PCR assay. Results showed rapid and accurate identification and quantification of *A. besseyi*. Findings can be used for seed certification and quarantine approaches.

KEYWORDS: *Aphelenchoides besseyi*, rice, Real-time PCR

COMMITTEE: Prof. Dr. Zübeyir DEVRAN

Prof. Dr. İbrahim Halil ELEKCİOĞLU

Prof. Dr. Galip KAŞKAVALCI

Prof. Dr. Uğur GÖZEL

Asst. Prof. Dr. Fatih DAĞLI

ÖNSÖZ

Pirinç, besin kaynağı açısından buğdaydan sonra ikinci sırada yer alan en önemli tahıldır. Çeltik beyaz uç nematodu, *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942, önemli karantina organizmalarından biridir ve çeltiklerde önemli zararlara neden olmaktadır. *Aphelenchoides besseyi* tohumla taşınan bir patojen olduğu için bulaşık olmayan çeltik alanlarına hızla yayılmaktadır. Bu nedenle *A. besseyi*'nin hızlı ve doğru tanımlanması nematodun kontrolü için gereklidir. Bu çalışmada, *A. besseyi*'nin small subunit rDNA bölgesini kullanılarak bu nematoda iyi TaqMan prob geliştirmek ve bulaşık çeltik tohumunda *A. besseyi* miktarını real-time PCR yöntemiyle hızlı, hassas ve güvenilir şekilde belirlemek amaçlanmıştır.

Bu tez kapsamında bana çalışma fırsatı veren, çalışma için gerekli tüm olanakları sağlayan, maddi ve manevi olarak desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Zübeyir DEVRAN'a,

Trakya bölgesinden çeltik örneklerinin toplanmasında bana yardımcı olan Doç. Dr. Adnan TÜLEK'e (Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Edirne), diğer *Aphelenchoides* türlerini göndererek çalışmamı yardımcı olan Dr. Gerrit KARSSSEN (National Plant Protection Organization, Wageningen Nematode Collection, Netherlands)'e,

Doktora çalışmam süresince real-time PCR'ın optimizasyonunda ve klonlama çalışmalarında bana yardımcı olan Metin CEYLAN ve Bahtiyar YILMAZ'a,

Tez çalışmam boyunca bana yardımlarını esirgemeyen bölümümüz Nematoloji Zir. Yüksek Müh. Tefik ÖZALP'a, Zir. Yüksek Müh. Serap ÖÇAL'a ve Zir. Yüksek Müh. İbrahim MISTANOĞLU'na,

Hayatımın her aşamasında maddi ve manevi desteklerini hissettiğim, sevgili eşim Nihat ÇELİK'e ve biricik kızım Bade Nur ÇELİK'e, kıymetli annem Cennet SERT, babam Hacı Hasan SERT ve kardeşlerim Emine SÜVARİ ve Emre SERT'e teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
AKADEMİK BEYAN.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	4
2.1. <i>Aphelenchoides besseyi</i> Hakkında Genel Bilgiler.....	4
2.1.1. <i>Aphelenchoides besseyi</i> 'nin tarihçesi.....	4
2.1.2. <i>Aphelenchoides besseyi</i> 'nin taksonomisi ve morfolojisi.....	4
2.1.3. <i>Aphelenchoides besseyi</i> 'nin biyolojisi ve belirtileri.....	6
2.1.4. <i>Aphelenchoides besseyi</i> 'nin beslenme şekli.....	7
2.1.5. <i>Aphelenchoides besseyi</i> 'nin ekonomik önemi.....	8
2.1.6. <i>Aphelenchoides besseyi</i> 'nin konukçuları.....	9
2.1.7. <i>Aphelenchoides besseyi</i> 'nin yayılışı.....	10
2.1.8. <i>Aphelenchoides besseyi</i> 'nin mücadelesi.....	12
2.1.8.1. Kültürel mücadele.....	12
2.1.8.2. Kimyasal mücadele.....	14
2.1.8.3. Karantina önlemleri.....	14
2.2. Nematodların tanı ve tespitine yönelik metodlar.....	14
2.2.1. Nematodların tanı ve tespitinde morfolojik yöntem.....	14
2.2.2. Nematodların tanı ve tespitinde moleküler yöntem.....	15
3. MATERYAL VE METOT.....	18
3.1. Materyal.....	18
3.1.1. Nematod popülasyonlarının elde edilmesi.....	18
3.2. Metot.....	18
3.2.1. Nematod ekstraksiyonu.....	18
3.2.2. DNA izolasyonu.....	19
3.2.3. DNA Process Control Kit.....	19

3.2.4. Klasik PCR.....	20
3.2.5. Primerlerin ve probun tasarlanması	20
3.2.6. Tasarlanan primerlerin spesifikliğinin geleneksel PCR’da testlenmesi.....	20
3.2.7. Real-time PCR	20
3.2.7.1. Real-time PCR’ın optimizasyonu	21
3.2.7.2. Probun spesifikliğinin optimizasyonu.....	21
3.2.7.3. En düşük DNA miktarının tespiti	21
3.2.7.4. Farklı biyolojik dönemlerinin tespiti	22
3.2.7.5. <i>Aphelenchoides besseyi</i> ’nin doğal bulaşık çeltik parçalarından tespiti	22
3.2.7.6. DNA izolasyonsuz doğrudan <i>Aphelenchoides besseyi</i> ’nin tespiti	23
3.2.7.7. <i>Aphelenchoides besseyi</i> ’nin diğer <i>Aphelenchoides</i> türleri ile birlikte olduğunda tespiti.....	24
3.2.8. <i>Aphelenchoides besseyi</i> ’nin nicel analizi	25
3.2.9. Propidium Mono Azide ve Reagent D kullanılarak <i>Aphelenchoides</i> <i>besseyi</i> ’nin canlı/ölü ayrımının yapılması	25
3.2.10. Verilerin analizi.....	26
4. BULGULAR.....	28
4.1. <i>Aphelenchoides besseyi</i> Popülasyonlarının Geleneksel PCR ile Doğrulanması	28
4.2. Geliştirilen Primerlerin Spesifikliğinin Geleneksel PCR ile Tespiti.....	28
4.3. TaqMan Probun Spesifikliğinin Tespiti	29
4.4. TaqMan Probun Hassasiyetinin Tespiti	30
4.4.1. En düşük DNA miktarının tespiti.....	30
4.4.1.1. Genomik DNA’nın tespiti.....	30
4.4.1.2. Plazmid DNA’nın tespiti.....	31
4.4.2. Farklı biyolojik dönemlerinin tespiti.....	32
4.4.3. Doğrudan bulaşık çeltik parçalarından <i>Aphelenchoides besseyi</i> ’nin tespiti	32
4.4.4. DNA izolasyonsuz <i>Aphelenchoides besseyi</i> ’nin real-time PCR’da tespiti	33
4.4.5. <i>Aphelenchoides</i> türleri arasından <i>Aphelenchoides besseyi</i> ’nin tespiti	34

4.5. <i>Aphelenchoides besseyi</i> 'nin Nicel Analizi	34
4.6. <i>Aphelenchoides besseyi</i> 'nin Canlı/Ölü Ayrımında PMA ve Reagent D'nin Karşılaştırılması.....	41
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇLAR	46
7. KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “Çeltik Beyaz Uç Nematodu, *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 (Aphelenchida: Aphelenchoididae)’nun Real-Time PCR ile Tanısı ve Çeltik Tohumlarının Bulaşma Durumunun Nicel Analizi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

21/08/2019

Elvan SERT ÇELİK



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

SD	Serbestlik derecesi
μM	Mikromolar
pg	Pikogram

Kısaltmalar

dNTP	Deoxynucleotide triphosphate
J	Juvenil
RFLP	Restriksiyon Fragment Length Polymorphism

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Çeltik beyaz uç nematodunun genel görünüşü	5
Şekil 2.2. <i>Aphelenchoides besseyi</i> 'nin dünyada yayılışı.....	12
Şekil 2.3. <i>Aphelenchoides besseyi</i> 'nin Türkiye'de yayılışı.....	12
Şekil 2.4. Real-time PCR'da amplifikasyon eğrisinin fazları.....	16
Şekil 2.5. Real-time PCR'da kullanılan kimyasal boyalar ve problemler	17
Şekil 3.1. Marmara Bölgesi'nden örneklerin toplandığı il ve ilçeler.....	18
Şekil 3.2. <i>Aphelenchoides besseyi</i> ekstraksiyon aşamaları a) Çeltik numuneleri b) Kavuz numuneleri c) Baermann funnel d) Örneklerin mezura aktarımı.....	19
Şekil 3.3. <i>Aphelenchoides besseyi</i> 'nin farklı biyolojik dönemleri a) Havuç diski b) Havuç diski üstünde larvaları c) Yumurta d) Dişi e) Erkek.....	22
Şekil 3.4. Doğal bulaşık çeltik parçalarından <i>Aphelenchoides besseyi</i> 'nin DNA izolasyonu	23
Şekil 3.5. a) <i>Aphelenchoides besseyi</i> 'nin plate yerleştirilmesi b) Real-time reaksiyonunun plate içine aktarımı	24
Şekil 3.6. <i>Aphelenchoides besseyi</i> 'nin real-time PCR'da tespiti	25
Şekil 3.7. PMA ve Reagent D uygulamasında a) Işığa maruz bırakma b) Uygulama sonrasında tüplerin içindeki sıvının renk değişimi	26
Şekil 4.1. AbF5/AbR5 primerleri ile PCR ürünü.....	28
Şekil 4.2. Geliştirilen PCR primerleri ile PCR a) AbF11/AbR11 primerleriyle elde edilen PCR ürünleri b) AbF11/AbF22 primerleriyle elde edilen PCR ürünleri.	28
Şekil 4.3. <i>Aphelenchoides besseyi</i> 'nin spesikliğinin real-time PCR'da tespiti.....	29
Şekil 4.4. <i>Aphelenchoides besseyi</i> DNA'sının qPCR'da 1/10 oranında seyreltilmesi sonucu elde edilen değerler, a) Amplifikasyon eğrisi b) Standart eğri.....	30
Şekil 4.5. <i>Aphelenchoides besseyi</i> plazmid DNA'sının qPCR'da 1/10 oranında seyreltilmesi sonucu elde edilen değerler, a) Amplifikasyon eğrisi b) Standart eğri	31
Şekil 4.6. <i>Aphelenchoides besseyi</i> 'nin biyolojik dönemlerinin amplifikasyon eğrisi	32
Şekil 4.7. <i>Aphelenchoides besseyi</i> 'nin DNA izolasyonu olmadan real-time PCR'da tespiti.....	33
Şekil 4.8. Grup 1'in a) amplifikasyon eğrisi ve b) standart eğri	35
Şekil 4.9. Grup 2'nin a) Amplifikasyon eğrisi b) Standart eğri	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Mısır’da kaydedilen <i>Aphelenchoides besseyi</i> popülasyonu ile Christie (1942), Allen (1952) ve Fortuner (1970)’in kayıt ettiği <i>Aphelenchoides besseyi</i> popülasyonunun karşılaştırılması.....	6
Çizelge 2.2. Çeltik beyaz uç nematodunun konukçusu olan funguslar	8
Çizelge 2.3. Çeltik beyaz uç nematodunun konukçusu olan bitkiler ve tespit edildiği ülkeler	10
Çizelge 2.4. Uluslararası karantina düzenlemelerinde yer alan bitki paraziti nematod türleri ve ülke sayısı (Lehman 2002).....	11
Çizelge 3.1. Geliştirilen primerlerin ve probun tasarlanması.....	20
Çizelge 4.1. Geliştirilen primerler ve probun optimizasyon koşulları.....	29
Çizelge 4.2. <i>Aphelenchoides besseyi</i> ’nin biyolojik dönemlerinin Ct değerleri	32
Çizelge 4.3. Bulaşık dokudan elde edilen <i>Aphelenchoides besseyi</i> ’nin Ct değerleri.....	33
Çizelge 4.4. <i>Aphelenchoides besseyi</i> ’nin karışık örneklerin içinden qPCR ile tespiti ...	34
Çizelge 4.5. Marmara Bölgesi’nden toplanan çeltik örneklerinde <i>Aphelenchoides besseyi</i> miktarı.....	37
Çizelge 4.6. <i>Aphelenchoides besseyi</i> ’nin Ct değerlerine göre oluşturulmuş bulaşma skalası.....	39
Çizelge 4.7. Marmara Bölgesi’nden toplanan kavuz örneklerinde <i>Aphelenchoides besseyi</i> miktarı.....	39
Çizelge 4.8. <i>Aphelenchoides besseyi</i> ’nin canlı-ölü karşılaştırması için elde edilen Ct değerleri.....	41

1. GİRİŞ

Çeltik, Buğdaygiller (Poaceae) familyasında *Oryza* cinsine ait olup coğrafik olarak ~2° Güney- 40° Kuzey enlem aralıklarında yetişebilen bir bitkidir (Xiong 2011). *Oryza* cinsine ait 2'si kültür (*Oryza sativa* L. ve *Oryza glaberrima* Steud.) ve 21'i yabani olmak üzere toplam 23 adet türü bulunmaktadır (Jena 2010). Kültürü olan iki tür 2n=24 kromozomlu kendine döllen diploid bir bitki iken yabaniler ise hem diploid (2n=24) hem de tetraploidtir (2n=48) (Poehlman 1987). *Oryza glaberrima*'nın anavatanı Nijer nehrinin deltasıdır. *Oryza sativa*'nın anavatanı ise Güney Asya'daki Himalaya etekleri ve güneydoğu Çin'dir (Portères 1956; Chang 1976).

Oryza sativa'nın morfolojik ve fizyolojik karakterleri ile coğrafik adaptasyonundaki farklılıklarına göre indica (tropikal), japonica (ılıman) ve javanica (intermediet) gibi üç ekotipi adlandırılmıştır (Glaszman ve Arraudeau 1986). Indica tipi, uzun boylu, zayıf saplı, çok kardeşlenen, kavuzları kısa ve sık tüylü, fotoperiyoda duyarlı, kolay dane dökken ve pirinç daneleri piştiğinde biçimini korumaktadır. Hindistan, Srilanka, Tayland, Malezya ve kuzey doğuya doğru orta Çin'de yoğun olarak yetiştirilmektedir. Japonica tipi, kısa-geniş ve uzun seyrek tüylü dane, dane dökmeye daha dayanıklı, daha az kardeşlenmeye sahip, çok yapraklı, fotoperiyoda duyarsız ve daha düşük amilaz içeriğinden dolayı dane piştiğinde lapalaşmaktadır. Kore, Japonya, Güneydoğu Asya'dan kuzeydoğu Çin'e kadar yayılım göstermektedir. Ayrıca, Avrupa, Kaliforniya ve yüksek rakıma sahip bölgelerde de yetiştirilebilmektedir. Javanica tipi ise uzun boylu, kalın saplı, az kardeşlenen, dane dökmeye dayanıklı, geniş tüysüz dane, fotoperiyoda hassas ve dane piştiğinde şeklini korumaktadır. Endonezya, Filipinler, Tayvan ve Japonya'da yayılım göstermektedir (Feng vd. 2017; OECD 1999; Zhu vd. 2004).

Çeltiğin besin madde içeriğinde, protein, karbonhidrat, fosfor, demir, kalsiyum, sodyum, potasyum, B1 (Thiamine), B2 (Riboflavin), B3 (Nikotinik asit) ve E (Tocopherol) vitaminleri bulunmaktadır (Juliano 1985). Çeltik, tahıllar arasında en yüksek enerji ve hazmedilebilir protein içeriğiyle dünya nüfusunun beslenmesinde temel gıda maddesi olarak adlandırılmaktadır (Verma ve Shukla 2011).

Dünyada pirinç tüketimi, yıllık kişi başına 50 kg'dan 60 kg'a kadar yükselmiş olup, 2030 yılına kadar, artmakta olan dünya nüfusunun gıda ihtiyaçlarını karşılamak için mevcut üretilenden %40 daha fazla pirinç üretilmesine ihtiyaç duyulacağı tahmin edilmektedir (Khush 2005; IRRI 2017). Bu artan talebi karşılayabilmek için üretim ve verim potansiyelinin artırılması gerekmektedir.

Dünyada çeltik üretimi yaklaşık 740.961.445 tondur. En çok üretim yapan ilk üç ülke sırasıyla Çin (211.090.813 ton), Hindistan (158.756.871ton) ve Endonezya (77.297.509) dır. Türkiye ise 920.000 ton ile 30. sırada yer almaktadır (FAO 2016). Ülkemizde, Marmara ve Karadeniz bölgeleri çeltik üretiminde önemli rol oynamaktadır.

Çeltik üretiminde verimi sınırlandıran en önemli faktörlerin başında hastalık ve zararlılar bulunmaktadır (Mev vd. 1993; Bridge vd. 1990). Çeltikte zarar yapan nematodlar *Ditylenchus angustus*, *Heterodera oryzicola*, *Hirschmanniella* spp., *Meloidogyne graminicola*'dir (Bridge vd. 1990; Khuong 1987; Prasad 1987). *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942, çeltikte önemli derecede ekonomik kayıplara

neden olup, ABD’de %40-50, Hindistan’da %20-60, Japonya’da %14.5-46.7, Rusya’da %41-71, Tayvan’da %29-46, ve Türkiye’de %5.4-57.9 verim kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Atkins ve Todd 1959; Huang 1959; Nishizawa ve Yamamoto 1951; Tikhonova 1966; Rao vd. 1985; Tülek vd. 2014). *Aphelenchoides besseyi*’ye karşı yapılacak mücadelede öncelikle nematodun hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanması önemlidir. Nematodların tanımlanmasında da çoğunlukla morfolojik ve morfometrik karakterler incelenerek yapılmaktadır. *Aphelenchoides* türleri de çoğunlukla morfolojik olarak ışık mikroskobu yardımıyla tanımlanmaktadır. Fakat *Aphelenchoides* türlerinin morfolojik karakterleri birbirlerine çok benzediğinden *A. besseyi*’nin teşhisinde zorlanılmaktadır. Ayrıca, morfolojik teşhis yoğun emek ve zaman gerektirmekte ve uzmanlaşmış taksonomistlere de ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde bu zorlukları aşmak için biyokimyasal ve PCR’a bağlı yöntemler kullanılmaktadır (Powers vd. 1997).

İbrahim vd. (1994), ilk kez SDS-PAGE elektroforezi kullanarak, *A. besseyi*’nin farklı bölgeden elde edilen üç farklı popülasyonunun, diğer *Aphelenchoides* türlerinin ve *Ditylenchus angustus*’un esteraz enzim deseninin stabil ve karakteristik olup-olmadığı üzerine yürütülen çalışmada, her bir tür için esteraz enziminin karakteristik olduğu, *A. besseyi*’nin üç popülasyonunda benzer bant oluşturduğunu fakat iki popülasyonunda ekstra zayıf bir bant oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Daha sonra İbrahim vd. (1994), PCR ile *Aphelenchoides* türlerinin ve *D. angustus*’un rDNA’larının bir bölgesini çoğaltmışlar ve 6 adet kesim enzimi kullanarak *A. besseyi* haricinde diğer *Aphelenchoides* türlerini başarılı bir şekilde tanımlamışlardır. Devran vd. (2017), *A. besseyi*’nin SSU rDNA (small subunit rDNA) bölgesinden geliştirdikleri türe özgü primerler ile nematodu tohumdan elde etmeden doğrudan olarak bulaşık tohum, kavuz ve çeltikten tanımlamışlardır. Sanchez-Monge vd. (2017), mtCOI bölgesinden tasarladıkları primerler ile dört önemli *Aphelenchoides* türünü tanımlayıp, filogenetik haritasını oluşturmuşlardır.

Geleneksel PCR, morfolojik analizlere göre birçok avantajlara sahiptir. Buna karşın kontaminasyon riskinin yüksek olması, zaman alması ve nicel analizinin yapılamaması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bundan dolayı son yıllarda geliştirilmiş olan real-time PCR ile bu sorunlar ortadan kaldırılabilir. Real-time PCR, tek bir tüpün içinde DNA’nın amplifikasyonu gerçekleşirken eş zamanda artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesiyle nicel analiz yapılabilen PCR yöntemidir. Real-time PCR ile, *Globodera pallida* Stone, 1973 (Tylenchida: Heteroderidae) ve *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Skarbilovich, 1959 (Tylenchida: Heteroderidae) (Toyoto vd. 2008), *Meloidogyne* spp. (Zhao vd. 2010; Sapkota vd. 2016), *Rotylenchus reniformis* Linford & Oliveira, 1940 (Tylenchida: Hoplolaimidae) (Sayler vd. 2012), *Anguina* spp. (Li vd. 2015), *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner, 1934) Nickle, 1970 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) (Huang vd. 2010; Ye ve Giblin-Davis 2013) gibi önemli bitki parazit nematodların tanımlanması ve nicel analizi yapılmıştır. Rybarczyk-Mydlowska vd. (2012), SybrGreen floresan boyasını kullanarak *A. besseyi*, *A. fragaria* (Ritzema Bos, 1890) Christie, 1932 (Aphelenchida: Aphelenchoididae), *A. ritzemabosi* (Schwartz, 1911) Steiner & Buhner, 1932 (Aphelenchida: Aphelenchoididae), *A. subtenuis* (Cobb, 1926) Steiner & Buhner, 1932 (Aphelenchida: Aphelenchoididae)’u real-time PCR ile tanımlamışlar ve filogenetik analizini yapmışlardır. SybrGreen floresan boyası sadece çift sarmal DNA’ya bağlanmakta, yeni sentezlenen DNA miktarı arttıkça floresan sinyalde de artış

gözlemlenmektedir. Ayrıca SybrGreen hedef olmayan primer-dimer yapıları da bağlandığından hedef DNA'ya spesifik olmayabilmektedir. Böylelikle, hedef DNA dışında diğer PCR ürünlerinin de ölçümü gerçekleşebilmektedir. Bu nedenle PCR ürününün doğruluğunu kanıtlayabilmek için erime eğrisi (melting curve) analizine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu olumsuzlukları gidermek için real-time PCR çalışmalarında; daha spesifik, güvenilir ve hızlı sonuç veren hedef bölgeye özgü problemlerin (FRET, TaqMan, Scorpion vb.) kullanımı tercih edilmektedir.

Buonicontrò vd. (2018), LSU rDNA (large subunit rDNA) bölgesinden tasarladıkları primerler ve TaqMan probuyla yem bitkilerinde zarar yapan *Aphelenchoides fujianensis* ve *A. besseyi*'yi real-time PCR ile tanımlamışlardır. Fakat LSU rDNA bölgesinden tasarladıkları *A. fujianensis* prob, *A. fujianensis* haricinde bir *A. besseyi* popülasyonunda çapraz reaksiyon gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir. Bu çapraz reaksiyon sebebinin tasarlanan LSU rDNA bölgesinin varyasyonundan kaynaklandığını belirtmişlerdir.

Bu çalışmada kapsamında;

1. SSU rDNA bölgesinden tasarlanan *A. besseyi*'ye özgü primerlerin ve TaqMan probun spesifikliğinin belirlenmesi,
 - a. Farklı *A. besseyi* popülasyonlarının DNA'sı (192 adet),
 - b. *Aphelenchoides besseyi*'nin yakın ve uzak bitki parazit nematod türlerinin DNA'sı real-time PCR'da testlenmesi,
 - c. *Aphelenchoides besseyi*'nin en az DNA miktarının belirlenmesi,
 - d. *Aphelenchoides besseyi*'nin farklı biyolojik dönemlerinin tespiti,
2. Doğal enfekteli çeltik parçalarından *A. besseyi*'nin tespiti,
3. DNA izolasyonu yapılmaksızın doğrudan *A. besseyi*'nin belirlenmesi,
4. *Aphelenchoides* spp. karışımının içinden *A. besseyi*'nin tespiti,
5. Trakya'nın farklı bölgelerinden toplanan çeltik ve kavuz örneklerinde *A. besseyi* miktarının (nicel analizinin) TaqMan probu ile tespiti,
6. *Aphelenchoides besseyi*'nin ölü/canlı ayırımının yapılması için,
 - a. Propidium Mono Azide (PMA)
 - b. Reagent D'nin kullanılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. *Aphelenchoides besseyi* Hakkında Genel Bilgiler

2.1.1. *Aphelenchoides besseyi*'nin tarihçesi

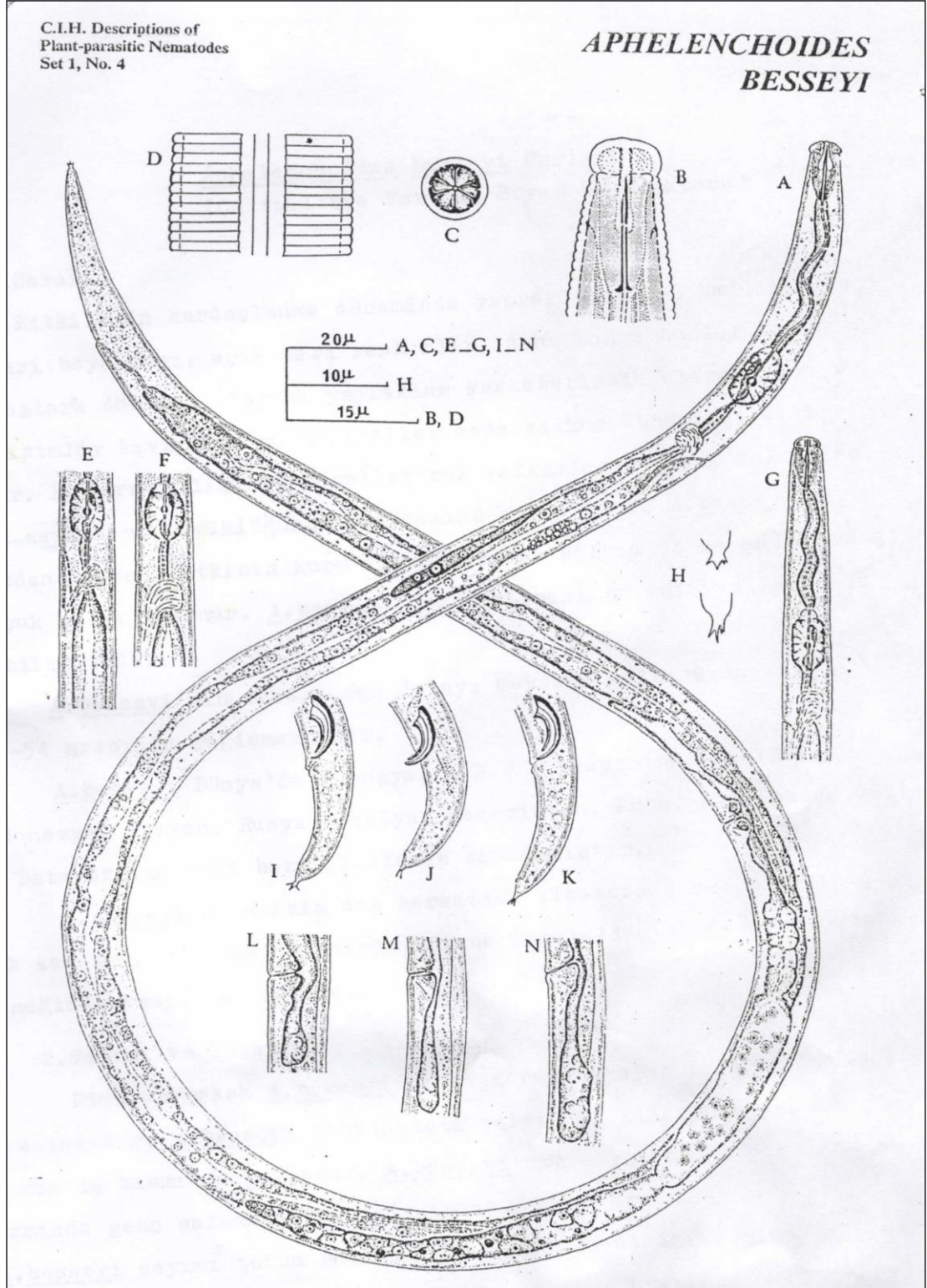
Japonya ve ABD'de *A. besseyi* ilk ortaya çıktığında yapmış olduğu belirtilere göre adlandırılmıştır. Japonya'daki Kyushu (Kumamoto) Bölgesinde, *A. besseyi*'nin yapmış olduğu belirtiler ilk kez Siyah tohum hastalığı (Black grain disease) olarak 1915 yılında Kakuta tarafından tespit edilmiştir (Kakuta 1915). Nakano (1916) aynı hastalığı cin darısında (Italian millet) Kyushu Bölgesi'nde tespit etmiştir. Yoshii (1946)'nin Kyushu bölgesinde çeltikte 'Heart blight' olarak adlandırdığı nematodu, Yokoo (1948) ise *Aphelenchoides oryzae* Yokoo, 1948 olarak detaylı tanımlamıştır. Yoshii ve Yamamoto (1950), Goto ve Fukatsu (1952, 1956), Fukano ve Yokoyama (1951), Nishizawa (1953a, b) ve diğer araştırmacıların yapmış olduğu çeşitli çalışmaları sayesinde *A. besseyi* hakkında birçok bilgiye sahip olunmuştur.

ABD'de ise ilk kez Todd ve Atkins tarafından 1934 yılında fark edilmiş fakat demir ve magnezyum eksikliği olarak tanımlanmışlardır. Cralley (1949), ise bu belirtilerin nematod zararı olduğunu ve Japonya'daki nematoda benzediğini bildirmiştir. Allen (1952), ise *A. oryzae* Yokoo, 1948'i, *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 olarak düzenlemiştir. Fortuner ve Williams (1975), *A. besseyi* hakkında detaylı bir derleme hazırlamışlardır.

2.1.2. *Aphelenchoides besseyi*'nin taksonomisi ve morfolojisi

Aphelenchoides besseyi Aphelenchida takımında, Aphelenchoididae üst familyasında, *Aphelenchoides* cinsinde bulunmaktadır. *Aphelenchoides* cinsine ait toplam 138 adet tür tespit edilmiş (Chanu vd. 2015). Bu türlerin içinde 10'u *Aphelenchoides arachidis* Bos, 1977, *Aphelenchoides bicaudatus* (Imamura, 1931) Filipjev & Schuurmans Stekhoven, 1941, *Aphelenchoides blastophthorus* Franklin, 1952, *Aphelenchoides dalianensis* Cheng, Hou & Lin, 2009, *Aphelenchoides ensete* Swart, Bogale & Tiedt, 2000, *Aphelenchoides nechaleos* Hooper & Ibrahim, 1994, *Aphelenchoides paranechaleos* Hooper & Ibrahim, 1994, *Aphelenchoides saprophilus* Franklin, 1957, *Aphelenchoides sphaerocephalus* Goodey, 1953 ve *Aphelenchoides subtenuis* tarımsal alanlarda sınırlı sayıda bulunurken, *Aphelenchoides fragariae*, *Aphelenchoides ritzemabosi* ve *A. besseyi* ise yaygın olarak bulunmaktadır (Sánchez-Monge vd. 2015). Ayrıca *A. besseyi* dünyada en önemli ilk 10 bitki paraziti nematodu arasında da listelenmiştir (Jones vd. 2013).

Aphelenchoides besseyi'nin erkek ve dişi bireyleri iplik şeklinde olup vücut uzunluğu 0.57–0.88 mm, genişliği ise 14–22 µm arasındadır. Stilet ise genellikle 10–12µm uzunlukta ve dudak bölgesi yuvarlak, hafif boğumludur ve boyundan biraz geniştir. Median oesophagal bulb oval ve lateral alan 4 çizgildir. Boşaltım deliği, genellikle sinir halkasının ön kenarına yakın bulunmaktadır. Kuyruk konik şekilli ve uç kısmında 2-4 parçalı çıkıntı bulunmaktadır. Fiksasyonda erkek bireyin vücudun arka ucu yaklaşık 180° kıvrılırken dişi bireyin vücudu ventral olarak uzanmaktadır (Fortuner 1970) (Şekil 2.1).



Şekil 2. 1. Çeltik beyaz uç nematodunun genel görünüşü A. Dişi, B. Dişide baş, C. Dişide yüz tarafın görünüşü, D. Lateral (yan) alan, E&F. Dişide yemek borusuna ait median bulb ve sinir halkasıyla boşaltım açıklığının pozisyonu, G. Erkekde anterior sonu, H. Dişide yıldız (mucro) şeklindeki kuyruk ucu görünümü, I-K. Erkekde kuyruk sonu, L-N. Vulva sonrası döl yatağı uzantısı (Fortuner 1970)

Amin (2002), Mısır’da yapmış olduğu survey çalışmasında *A. besseyi*’yi tespit etmiştir. Daha sonra dişi ve erkek bireylerin morfolojik özelliklerini ve morfometrik ölçümlerinin doğruluğunu daha önceden kabul edilmiş verilerle karşılaştırmıştır. Mısır popülasyonunun stilet ve spicule uzunluğunun, diğer popülasyonlara göre kısa olduğunu bildirmiştir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2. 1. Mısır’da kaydedilen *Aphelenchoides besseyi* popülasyonu ile Christie (1942), Allen (1952) ve Fortuner (1970)’in kayıt ettiği *Aphelenchoides besseyi* popülasyonunun karşılaştırılması (Amin 2002)

Ölçümler	<i>Aphelenchoides besseyi</i>			
	Mısır popülasyonu	Christie (1942)	Allen (1952)	Fortuner (1970)
Dişi (n)	25	10		20
L (mm)	0.54-0.77	0.66-0.75	0.62-0.88	0.57-0.84
Genişlik (μ)	15-18	17-22	-	-
Stilet uzunluğu(μ)	8.5-13	-	10	10-12.5
A	36-51.2	32-42	38-58	39-53
B	9.7-12.7	10.2-11.4	9-12	9.2-13.1
Ösofagus uzunluğu (μ)	60-68	64-68	-	-
b'	4.7-6.3	-	-	4.06-5.77
c'	15.4-20.1	17-21	15-20	13.8-20.4
Kuyruk uzunluğu (μ)	30-45	36-42	-	-
% V	69.2-74.6	68-70	66-72	68.7-73.6
Erkek (n)	12	10		9
Uzunluk (mm)	0.52-0.66	0.54-0.64	-	0.53-0.61
Genişlik (μ)	15-18	14-17	-	-
Stilet uzunluğu (μ)	9-12	-	-	10.0-12.5
A	33-41.6	36-39	36-47	40.7-46.9
B	8.98-10.6	8.6-8.8	-	8.87-10.7
Ösofagus uzunluğu (μ)	55-67	63-66.4	-	-
b'	3.8-5.1	-	-	3.57-4.91
c'	15.5-22	15-17	14-19	16-20
Kuyruk uzunluğu (μ)	30-39	34-37	-	-
Spicule uzunluğu (μ)	15-18	-	-	18-21

2.1.3. *Aphelenchoides besseyi*'nin biyolojisi ve belirtileri

Çeltikte dormant halde 4. dönem larva ve ergin olarak kışlayan *A. besseyi*, tohumun çimlenmesiyle aktif hale geçer. Bitkinin üst aksamına doğru hareket edip, yapraklarda ve apikal meristemde ektoparazit olarak beslenmeye başlamaktadır (Yoshii ve Yamamoto 1950; Goto ve Fukatsu 1952; Nandakumar vd. 1975). Qui vd. (1991) *A. besseyi*'nin çeltik ekimi gerçekleştiğinden sonra 3 yapraklı dönemde bitkiyi istila ettiğini bildirmişlerdir.

Goto ve Fukatsu (1952), bulaşık çeltikte *A. besseyi*'nin dağılışı ve sayısı üzerine yaptıkları çalışmada; çimlenmiş tohumda çok az nematodun kaldığını, fide döneminde şaşırtılmadan hemen önce hiçbir nematodun bulunmadığını, kardeşlenme döneminde olgunlaşmamış saplarda ya da genç yaprakların kınlarının içinde bulunduğunu gözlemlemişlerdir. Daha sonra bitki büyüdükçe nematod sayısının arttığını, bitkinin kulakçıkları oluştuğunda nematodun kulakçıklarında ve kavuzun dışında toplandığını ve bazılarının çiçeklenmeden önce kavuzun içinde bulunduğunu, çiçeklenme döneminde ise kavuzun dışında nematod sayısının birden azalıp kavuzun içinde arttığını ve çiçeklenmeden sonra da az sayıda nematodun bayrak yaprakta kaldığını bildirmişlerdir. Todd ve Atkins (1958), ise *A. besseyi* çoğunlukla kavuzun iç yüzeyinde nadiren tohumda, çiçekte ve genç yapraklarda bulunduğunu bildirmişlerdir. *Aphelenchoides besseyi* genç yapraklarda kardeşlenme döneminde, kulakçıkların oluşmasından sonra

başakçıklarda ve başakçıklar olgunlaştığında da çoğunlukla kavuzda bulunmaktadır (Yoshii ve Yamamoto 1950). Çeltik bitkisinin kardeşlenme döneminde nematod sayının artmasıyla yaprağın 3-5 cm'lik uç kısmı açık sarıdan beyaza dönüşür ve bu *A. besseyi*'nin en tipik özelliğidir. Daha sonra beyaz uç zamanla kahverengileşir ve parçalanır (Tamura ve Kegasawa 1959). Bulaşık bitkiler geç olgunlaşır, salkımlar küçülür, başakçık sayısı azalır ve çimlenme potansiyeli düşer. Ayrıca bulaşık tüm bitkilerde belirti gözlemlenmeyebilir (Qu 1985). Yoshii ve Yamamoto (1950) bulaşık bitkilerin dörtte üçünün belirti göstermediğini bildirmiştir. Bitki çiçeklenme döneminden önce başakçıklar kınındayken nematodlar çiçeğin içine giriş yapar ve yumurtalıkta, erkek organda, pulcukta ve embriyo'da endoparazit olarak beslenmesini sürdürür (Huang ve Huang 1972). Olgunlaşan danelerde nematodun hareketi yavaşlar, danenin nem içeriği %35 ve altına düştüğünde nematodlarda kuyessens (quiescens) ya da ölüm gözlemlenirken %27'nin altına düşmesi durumunda dehidrasyon meydana gelir (Huang ve Huang 1973). *Aphelenchoides besseyi* bulaşık tohumlarda uzun süre canlı olarak yaşayabilmektedir (Qu 1985). Hatta *A. besseyi* çeltik tohumlarında bir yıl kadar canlılığını sürdürmekte ve 10°C'de su içinde 53 gün yaşayabilmektedir (Qiu vd. 1991). Cralley (1949), çeltik hasatından 8 ay sonra canlı nematodların varlığını bildirmiştir. Yoshii ve Yamamoto (1950) üç yıl depolanmış çeltik tohumlarında canlı nematodların bulunduğunu tespit etmiştir. Ayrıca, *A. besseyi*'nin çeltik arazilerinde yayılmasının nedenini bulaşık tohumların ve fidelerin kullanımından kaynaklandığını bildirmiştir. Todd ve Atkins (1958), 23-24 ay canlı kaldığını tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmalar sonucunda *A. besseyi*'nin en önemli inokulum kaynağının bulaşık çeltik tohumu olduğunu göstermektedir.

2.1.4. *Aphelenchoides besseyi*'nin beslenme şekli

Aphelenchoidoidea üst familyasındaki türler, fungus, böcek paraziti, predatör ve bitki paraziti olarak beslenmesine rağmen *Aphelenchoides* türlerinin çoğunluğu fungusla ve predatör olarak da beslendiği, 14 adet *Aphelenchoides* türünün çeşitli bitki türlerinde bitki paraziti olduğu bildirilmiştir (Kanzaki ve Giblin-Davis 2012; Nickle 1970). Bu bitki parazit türleri içinde en yaygın bulunan *Aphelenchoides* türü ise *A. besseyi*'dir. *Aphelenchoides besseyi* sadece bitkilerde bitki paraziti olmayıp aynı zamanda funguslardaki beslenebilmektedir (Fortuner ve Williams 1975) (Çizelge 2.2). Iyatomi ve Nishizawa (1954), *A. besseyi*'yi *Alternaria citri*, *A. kikuchiana*, *A. brassicae*, *Pyricularia oryzae*, *Cochliobolus miyabeanus*, *Nakataea sigmoidea* (*Magnaporthe salvinii*), *Colletotrichum lagenarium* ve *Phytophthora* sp. üzerinde çoğaltmışlar ve *Alternaria* türlerinde çoğalmanın daha iyi olduğunu tespit etmişlerdir.

Çizelge 2. 2. Çeltik beyaz uç nematodunun konukçusu olan funguslar (Fortuner ve Williams, 1975)

Fungus Adı	Referans
<i>Alternaria</i> sp.	Todd ve Atkins (1958)
<i>Alternaria oleracea</i> Milbrath	Fortuner (1970)
<i>Alternaria tenuis</i> Nees	Sudakova ve Stoyakov (1967)
<i>Curvularia</i> sp	Todd and Atkins (1958)
<i>Curvularia geniculata</i> (Tr. & Earle) Boedijn	Sudakova ve Chernyak (1967)
<i>Fusarium solani</i> (Mart) Sacc.	Huang vd. (1972)
<i>Fusarium</i> sp.	Todd ve Atkins (1958)
<i>Fusarium oxysporum</i> Snyder & Hansen	Sudakova ve Stoyakov (1967)
<i>Helminthosporium</i> sp.	Todd ve Atkins (1958)
<i>Helminthosporium sativum</i> Pam., King & Bakke	Sudakova ve Chernyak (1967)
<i>Nigrospora</i> sp.	Vuong Huu Hai ve Rabarjjoela (1968)

Todd ve Atkins (1958), *A. besseyi*'yi yüzeyi steril olmuş çeltiklerde yetiştirmeye çalışmışlar; fakat kültür ortamında *Alternaria*, *Curvularia*, *Helminthosporium* ve *Fusarium* gibi fungusların gelişimi gerçekleştiğinden, *A. besseyi*'nin çoğaltımında başarısız olmuşlardır. Fakat, Tülek vd. (2009), *A. besseyi*'yi havuç disk kültüründe kitle çoğaltımının başarılı bir şekilde gerçekleştiğini bildirmiştir. Böylelikle bir petri kabında 10.000 adet *A. besseyi*'nin dört ay gibi kısa sürede elde edilmesi sayesinde ıslah ve bitki nematod ilişkisi çalışmalarında gerekli nematod ihtiyacını bu yöntem ile kolaylıkla sağlanabileceği belirtilmiştir.

2.1.5. *Aphelenchoides besseyi*'nin ekonomik önemi

Aphelenchoides besseyi ile bulaşık tohumlukların kullanımı çeltik verimini önemli derecede etkileyerek ekonomik olarak zarara sebep olmaktadır. Japonya'da *A. besseyi*'den kaynaklı verim kaybının %14.5-46.7 arasında olduğu bildirilmiştir (Nishizawa ve Yamamoto 1951). Japonya'da hassas çeşitlerde ise kaybın %60'a kadar çıktığı bildirilirken ABD'de hassas çeşitlerde ise % 17.5, % 4.9 ve % 6.6 verim kaybı bildirilmiştir (Tamura ve Kegasawa 1959 ; Atkins ve Todd 1959). Çin'de, %57, %34 ve %18 oranlarında *A. besseyi* ile bulaşma gözlemlendiğinde meydana gelen verim kayıpları sırasıyla % 44.9, % 34.7 ve % 24.2 olduğu bildirilmiştir (Tsay vd. 1998). Wang vd. (2003), yaptıkları çalışmada Çin'de *A. besseyi*'den dolayı %10-30 verim kaybı olduğunu bildirmiştir. Rusya'da % 80 oranında *A. besseyi* ile bulaşık tohumlar, hassas çeşitlerde % 54 verim kaybı meydana getirdiği belirtilmiştir (Popova 1984). Tülek ve Çobanoğlu (2011), Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde yapmış olduğu verim çalışmalarında hassas Halilbey çeşidinde verim kaybının %57.9 olduğunu saptamıştır. Ayrıca, beyaz uç belirtisi gösteren Halilbey çeşidine ait salkımlardan alınan 100 adet tohum incelenmiş ve ortalama 17.26 adet *A. besseyi*/tohum rapor edilmiş olup bir tohum başına düşen nematod sayısı 1-70 arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Aphelenchoides besseyi'nin çeltik tohumlarında bulaşma oranları farklılıklar göstermektedir. Tanzania'da bulaşık tohumda ortalama 68 adet *A. besseyi* rapor edilmiştir (Taylor vd. 1972). Bangladeş'te depolanmış çeltik tohumlarından, hasat edilmiş salkımlardan ve bitkinin vegetatif kısımlarından toplanan örneklerin çoğunun *A. besseyi* ile bulaşık olduğunu, hassas çeşide ait 100 adet tohumda 273- 1031 adet *A. besseyi* bulunduğunu (Rahman ve Miah, 1989), Brezilya'da ise tohumluk örneklerin

%70'i *A. besseyi* ile bulaşık olup, 100 adet tohumda 10–140 adet *A. besseyi* bulunduğu bildirilmiştir (Huang vd. 1977). Mısırlıoğlu ve Pehlivan (2000), 1997 ve 1998 yıllarında Balıkesir ve Çanakkale illerinde çeltik yetiştirilen alanlarda yapmış olduğu survey çalışması sonucu Balıkesir'deki 8 köyde 21 adet, Çanakkale'de 10 köyde 48 adet örneğin *A. besseyi* ile bulaşık olduğunu tespit etmişlerdir. Toplam örnekler içinde bulaşma oranı %11.75 olarak bildirilmiş ve 10 gram tohumda 1-256 adet *A. besseyi* olduğunu tespit etmişlerdir.

2.1.6. *Aphelenchoides besseyi*'nin konukçuları

Aphelenchoides besseyi'nin geniş konukçu aralığı olduğu bilinmektedir. Yoshii ve Yamamoto (1950) *Setaria viridis* (L.) Beauv (Kirpi darı)'in bulaşık olduğunu, *Panicum sanguinale* L. (Çatal otu) ve *Cyperus iria* L.'nin çok az bulaşık olduğunu, *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv (darıcan)'nin ise *A. besseyi* ile bulaşık olmadığını bildirmiştir. Hai ve Rabarjoela (1968), *Cyperus polystachyus* Rottb. ve *Imperata cylindrica* Beauv'nın *A. besseyi* ile bulaşık olduğu bildirmiştir. Tülek vd. (2014), *Echinochloa crus-galli* (darıcan) ve *Cyperus difformis* L. (kızotu)'in *A. besseyi*'nin konukçusu olup-olmadığını incelemişler ve darıcanın *A. besseyi*'ye konukçuluk yaptığını, kızotunun ise yapmadığını bildirmişlerdir. *Aphelenchoides besseyi*'ye karşı mücadelede konukçuluk yapan bitkilerin tespiti büyük katkı sağlamaktadır. Fortuner ve Williams (1975), *A. besseyi*'nin konukçusu olduğu bitkilerin verilerini bir araya toplayıp bilim dünyasına sunmuştur (Çizelge 2.3).

Çizelge 2. 3. Çeltik beyaz uç nematodunun konukçusu olan bitkiler ve tespit edildiği ülkeler (Fortuner ve Williams 1975)

Bilimsel İsmi	Yaygın İsmi	Ülke	Referans
<i>Allium cepa</i> L.	Soğan	Tayland	Tim 1965
<i>Boehinevia nivea</i> Gaudich.	Hasır	Filipinler	Fortuner 1970
<i>Brassica pekinensis</i> Lour	Çin kabağı	Filipinler	Tim 1965
<i>Chrysanthemum maximum</i> Ram.	Krizantem	Hawai	Sher 1954
<i>Chrysanthemum morifolium</i> Ram.	Krizantem	Hawai	Sher 1954
<i>Coleus blumei</i> Benth.		Hawai	Sher 1954
<i>Cyperus iria</i> L.		Japonya	Yoshii & Yamamoto 1950
<i>Cyperus</i> sp.		Komoro adaları	Vuong Huu Hai 1968
<i>Dahlia variabilis</i> Desf.		Hawai	Sher, 1954
<i>Digitaria adscendes</i> (H.B.K) Henrard		Japonya	Ino, 1971
<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.		Japonya	Yoshii & Yamamoto 1950
<i>Dioscorea trifida</i> L.	Hint yer elması	Guadalup	Kermarrec & Anais 1973
<i>Erechtites praealta</i> Raf.		Hawai	Sher 1954
<i>Ficus elastica</i> Roxb. (var. decora)		A.B.D.	Marlatt 1966
<i>Fragaria chiloensis</i> Duch. (var. Ananassa)	Çilek	A.B.D.	Christie 1942
<i>Glycine hispida</i> Max	Soya fasulyesi	Hawai	Barat vd. 1966a
<i>Hibiscus brachenridgii</i> Gray		Hawai	Raabe & Holtzmann 1966
<i>Hydrangea macrophylla</i> Ser.		Hawai	Sher 1954
<i>Impatiens balsamina</i> L.		Hawai	Sher 1954
<i>Imperata cylindrica</i> Beauv.		Komoro adaları	Vuong Huu Hai & Rabarijoela 1968
<i>Ipomoea batatas</i> Lam.	Tatlı patates	Pakistan	Timm & Ameen 1960
<i>Panicum bisulcatum</i>		Japonya	Tno 1971
<i>Panicum cruss-galli</i> var. Frumentaceum		Japonya	Tno 1971
<i>Pennisetum typhoides</i> Stapf. F.C.E. Hubbard		-	Hashioka 1964
<i>Pluchea odorata</i> Cass.		Hawai	Sher 1954
<i>Polianthes tuberosa</i> L.		Hawai	Holtzmann 1968
<i>Pycreus ploystahyus</i>		Komoro adaları	Vuong Huu Hai & Rabarijoela 1968
<i>Saccharum officinarum</i> L.	Şeker kamışı	Küba	Fernandez & Diaz Silveira 1967
<i>Saintpaulia ionantha</i> Wendl.	Afrika menekşesi	A.B.D.	Allen 1952
<i>Seteria italica</i> Beauv.	İtalyan darısı	Japonya	Yoshii & Yamamoto 1950
<i>Seteria viridis</i> (L.) Beauv.		Japonya	Yoshii & Yamamoto 1950
<i>Sporobolus poiretii</i> (Roem & Schult.)		A.B.D.	Marlatt 1970
<i>Tagetes</i> sp.	Kadife çiçeği	Hawai	Sher 1954
<i>Tithonia diversifolia</i> A.Gray		Hawai	Sher 1954
<i>Torenia fournieri</i> Linden		Hawai	Sher 1954
<i>Vanda</i> sp. x Miss Joaquim	Orkide	Hawai	Allen 1952
<i>Vanda</i> sp. x Rose Marie	Orkide	Hawai	Sher 1954
<i>Vanda</i> sp. x Miss Deum	Orkide	Hawai	Sher 1954
<i>Vanda</i> sp. x Trimeril	Orkide	Hawai	Sher 1954
<i>Vanda</i> sp. x Luma	Orkide	Hawai	Sher 1954
<i>Vanda</i> sp. x Miss Joaquim x Kapoho	Orkide	Hawai	Sher 1954
<i>Zea mays</i> L.	Mısır	Tayland	Tim 1965
<i>Zinnia elegans</i> L.	Zinya	Hawai	Sher 1954

2.1.7. *Aphelenchoides besseyi*'nin yayılışı

Aphelenchoides besseyi tohum kökenli bir zararlı olduğu için çeltik yetiştiriciliği yapılan birçok ülkede bulunduğu kaydedilmiştir. Avrupa Bitki Koruma Organizasyonu (EPPO/OEPP)'na göre *A. besseyi* 1981 yılından itibaren A2 karantina listesinde bulunmaktadır ve 1982 yılında sadece 9 ülkenin karantina listesinde iken, 2002 yılında bu rakam 70 ülkeye çıkarak karantina listesindeki bitki parazit nematod türleri arasında ikinci sırada yer almıştır (Lehman 2002) (Çizelge 2.4).

Çizelge 2. 4. Uluslararası karantina düzenlemelerinde yer alan bitki paraziti nematod türleri ve ülke sayısı (Lehman 2002)

Sıra No	Nematod Türü	Karantina Uygulayan Ülke Sayısı
1	<i>Globodera rostochiensis</i> (Stone) Behrens	106
2	<i>Aphelenchoides besseyi</i> Christie	70
3	<i>Ditylenchus dipsaci</i> (Kühn) Filipjev	58
4	<i>Radolpholus similis</i> (Cobb) Thorne	55
5	<i>Globodera pallida</i> (Wollenweber) Behrens	55
6	<i>Ditylenchus destructor</i> Thorne	53
7	<i>Heterodera glycines</i> Ichinohe	52
8	<i>Aphelenchoides fragariae</i> Ritzema Bos	47
9	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i> (Steiner & Buhner) Nickle	46
10	<i>Xiphenema index</i> Thorne & Allen	42
11	<i>Nacobbus aberrans</i> (Thorne) Thorne & Allen	38
12	<i>Xiphinema americanum</i> Cobb	30
13	<i>Anguina tritici</i> (Steinbuch, 1799) Filipjev	24
14	<i>Heterodera schachtii</i> Schmidt	22
15	<i>Bursaphelenchus cocophilus</i> Cobb	21

Aphelenchoides besseyi'nin kıtalara göre yayılışı Şekil 2.2'de gösterilmiştir (CABI 2018).

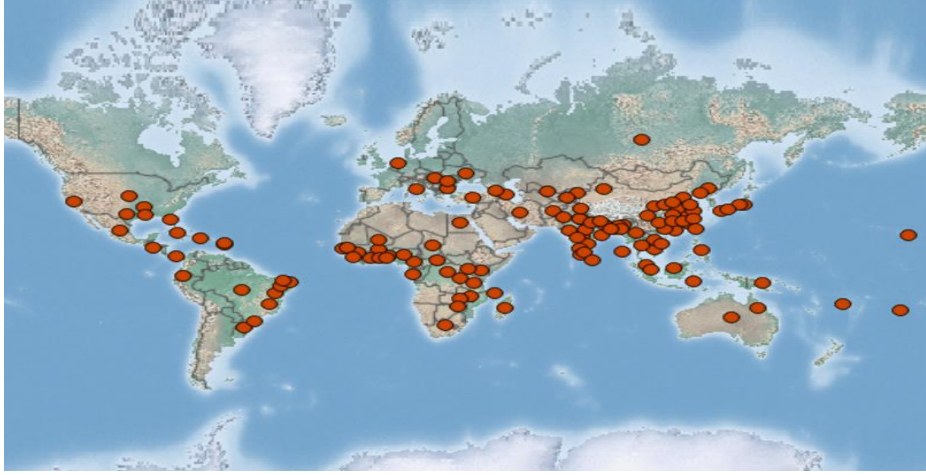
Amerika: Arizona, Arjantin, Brezilya, Dominik, Ekvator, El Salvador, Florida, Guadelup, Hawaii, Kaliforniya, Küba, Louisiana, Panama ve Teksas.

Afrika: Benin, Burkina Faso, Burundi, Çad, Fildişi Sahili, Gabon, Gambiya, Gana, Gine, Güney Africa, Kamerun, Kenya, Komoro, Kongo Cumhuriyeti, Madakascar, Malavi, Mali, Merkezi Afrika Cumhuriyeti, Mısır, Nijerya, Senegal, Sierra Leone, Tanzanya, Togo, Uganda, Zaire, Zambiya ve Zimbabve.

Asya: Afganistan, Azerbaycan, Bangladeş, Çin, Endonezya, Filipin, Gürcistan, Hindistan, İran, İsrail, Japonya, Kamboçya, Kore, Kırgısttan, Laos, Malezya, Myanmar, Nepal, Özbekistan, Pakistan, Singapur, Sri Lanka, Tacikistan, Tayland, Tayvan, Türkiye ve Vietnam.

Avrupa'da: Belçika, Bulgaristan, Fransa, Hollanda, İngiltere, İtalya, Macaristan, Portekiz, Romanya, Rusya, Slovakya ve Ukrayna.

Okyanusya: Avustralya ve Fiji.



Şekil 2. 2. *Aphelenchoides besseyi*'nin dünyada yayılışı (CABI, 2018)



Şekil 2. 3. *Aphelenchoides besseyi*'nin Türkiye'de yayılışı (Karataş vd. 2007; Tülek ve Çobanoğlu 2010)

Türkiye'de ilk kez 1995 yılında İpsala (Edirne) ve Gönen (Balıkesir)'de tespit edilmiştir (Öztürk ve Enneli 1997). Daha sonra yapılan çalışmalarda ülkemizde çeltik tarımı yapılan bazı illere de (Çanakkale, Balıkesir, Çankırı, Çorum, Kırklareli ve Tekirdağ) *A. besseyi*'nin yayıldığı tespit edilmiştir (Mısırlıoğlu ve Pehlivan 2000; Karataş vd. 2007; Tülek ve Çobanoğlu 2010) (Şekil 2.3).

2.1.8. *Aphelenchoides besseyi*'nin mücadelesi

Aphelenchoides besseyi popülasyonunu kontrol altına almak için kültürel ve kimyasal mücadele ile karantina önlemleri yer almaktadır.

2.1.8.1. Kültürel mücadele

a) Dayanıklı çeşit kullanımı: Japonya'da ve ABD'de birçok araştırmacı *A. besseyi*'ye karşı dayanıklı çeşitler üzerinde çalışmalar yapmıştır (Nishizawa ve Yamamoto 1951; Nishizawa 1953a; Goto ve Fukatsu 1956; Atkins ve Todd 1959). Nishizawa (1953a), 1942 -1952 yılları arasında yapmış olduğu arazi çalışmaları sonucu sekiz kültür çeşidinin, Norin No 8, Tozon No 36, 37,38 ve 58, Nankai No 3, Asa-Hi ve Asahi No 1

zarar belirtisi olmadığını, altı kültür çeşidinin, Norin No 6, 37 ve 39, Norin-mochi No 5, Saikai No 37, Nakata Ginbozu, dayanıklı olduğunu, 24 çeşit kültür bitkisinin orta derecede duyarlı ve dokuz tanesinin yüksek derecede duyarlı olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, diğer çeltik çeşitlerinin *A. besseyi*'ye dayanıklılığı, Asa-Hi çeşidindeki dayanıklılık geninin aktarımıyla gerçekleştirildiğini bildirmiştir.

Goto ve Fukatsu (1956), 20 adet kültür bitkisini, bulaşık kavuz parçaları ile inokule ederek testlemiş ve Tozan 38, 3 yıl boyunca belirti göstermemiştir. Norin No 8, Norin-mochi no 5 ve Hatsushimo az belirti gösterirken Asahi No 1, Aichi-Asahi ve Kinai-Omachi No 2 hassaslık göstermiştir.

Atkins ve Todd (1959), ABD'de yetiştirilen Arkrose, Blue Rose, Caloro, Calrose, Colusa, Early Prolife, Kamrose, Lacrosse ve Zenith çeşitlerinin *A. besseyi*'ye çok hassas, Asahi, Blue Bonnet, Blue Bonnet 50, Century 52, Century Patna 231, Fortuna, Improved Blue Bonnet, Nira, Rexoro, Texas Patna, Toro ve TP49 ise dayanıklı olduğunu bildirmiştir.

Rusya'da 1003 adet çeltik çeşidinde yapılan testleme sonucunda 3 çeşit immün, 10 çeşit dayanıklı, 164 çeşit orta dayanıklı ve 826 çeşit hassas bulunmuştur (Popova vd. 1994).

Tülek ve Çobanoğlu (2010), damla sulama uyguladığı çeltik çeşitlerinde 100 gr tohumda Sürek'te 1877.5 adet, İpsala'da 1384.5 adet, Gönen'de 1184.5 adet ve Rocca'da 857 adet *A. besseyi* tespit ederek bu çeşitlerin hassas olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, Krasnodarsky 424 çeşidinde de hiç nematod elde edilmediğini bildirmişlerdir.

b) Sıcak su uygulaması: *Aphelenchoides besseyi* tohum kökenli bir nematod olduğu için tohuma sıcak su uygulamaları yapılmaktadır. Cralley (1949), tohuma 15 dakika 52-53°C sıcaklık uygulamış ve sıcak su uygulamasının *A. besseyi* enfeksiyonunun %75'e kadar düşürdüğünü bildirmiştir.

Yoshii ve Yamamoto (1950; 1951) ilk kez 20°C 16-20 saat boyunca suya batırdıktan sonra 50-52°C'de 5-10 dk suda bekletilmesini sonra çeltik ekimine 60 gün kala kuru tohumları 56-57°C'de 10-15 dk daldırmanın, bütün tohum kökenli zararlı ve hastalıkların öldürdüğünü bildirmiştir.

Todd ve Atkins (1959), tohumu 24 saat ılık suda beklettikten sonra 15 dakika 51-53°C'de bekletmiş ve bu uygulamanın nematodun etki gösterdiğini ve fitotoksik olmadığını bildirmiştir.

Tülek (2010), sıcak su uygulamasının çimlenme ve nematod üzerine etkisini araştırmak için tohumları 3 saat soğuk suda bekletip sonra sıcak suda 50°C'den sıcaklığı 2°C arttırılarak 70°C'ye kadar çıkarmışlar ve 15 dakika boyunca bekletmişlerdir. Elde edilen verilere göre, sıcaklığın 62°C'den 64°C'ye çıktığında çimlenme gücü %94'den %86'ya düştüğünü ve nematodların tamamının 55°C öldüğünü bildirmiştir. Sonuç olarak, tohumların 3 saat soğuk suda bekletildikten sonra 10-15 dk 55-60°C'de sıcak su uygulanmasının yeterli olacağını bildirmişlerdir. Uluslararası Çeltik Araştırma Enstitüsü'nde (IRRI) *A. besseyi*'ye karşı mücadele için tohumluklar 3 saat soğuk suda ve daha sonra 52-57°C sıcak suda 15 dakika bekletilmektedir (Mew ve Misra 1994).

c) **Ekim nöbeti:** *Aphelenchoides besseyi*'nin konukçusu olmayan bitkiler kullanılmaktadır. Kore'de fasulye ile ekim nöbeti yapılarak *A. besseyi* popülasyonu baskı altına alınmaya çalışıldığı rapor edilmiştir (Kim vd. 1996).

2.1.8.2. Kimyasal mücadele

Aphelenchoides besseyi ile mücadelede birçok kimyasal uygulandığını, hatta bazen sıcak su uygulamasıyla birlikte kimyasal kullanıldığına dair birçok çalışma mevcuttur. Yoshii ve Yamamoto (1950), nikotin sülfatı 1/500 oranında bulaşık salkımlara uygulamış ve nematod sayısında ve verimde azalma gözlemlemiştir. Tullis (1951), Zenith ile birlikte Metil bromide, (1.25 lt/1000 ft³) ile 6 saat fumigasyonu sonucunda nematodların hepsinin öldüğünü rapor etmiştir. Nishiazawa (1953c), fidelerin köklerini 24 saat Folidol (parathion-methyl) ile organikfosforlu insektisitlere daldırma sonucu gelişmiş ve uzun bitkilerin, iri kulakçık ve başakçığın meydana geldiğini bildirmiştir. Hatta Gomy ve Kogure (1956) Folidol'un tohumlara sıcaklık uygulamasından daha etkili olduğunu rapor etmiştir. Hoshino ve Togashi (2000), tohumluklara nematisid uygulanmasının *A. besseyi*'ye etkisinin çok az olduğunu rapor etmiştir.

Fungisit, insektisit ve nematisitten oluşan 50 adet kimyasalın laboratuvar koşullarında gerçekleşen uygulamanın arazi koşullarına göre *A. besseyi*'ye daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca tohumun neminin Metil bromide fumigasyonu sırasında nematodun canlılığını etkilediğini rapor etmişlerdir (Atkins ve Todd 1952; Todd ve Atkins 1959).

2.1.8.3. Karantina önlemleri

Aphelenchoides besseyi, ülkemizde, 6968 sayılı Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Kanunu kapsamında 17.08.1995 tarih ve 22377 sayılı resmi gazetede yayımlanarak yürürlüğe giren iç karantinaya tabi zararlılar listesinde yer almaktadır.

2.2. Nematodların tanı ve tespitine yönelik metodlar

2.2.1. Nematodların tanı ve tespitinde morfolojik yöntem

Nematodların tanılanmasında en yaygın kullanılan metodlar, morfolojik ve morfometrik yöntemlerdir. De Man (1880), ilk kez nematodların tanısında morfolojik ölçüm formüllerini belirtmiştir. Günümüzde, 4000'in üzerinde bitki paraziti olan 26.600'den fazla nematod türü tanılanmıştır (Hugot vd. 2001). Nematodların morfolojik tanılanmaları, çeşitli vücut kısımlarından oluşturulan oranlar ve ölçüm sonuçlarının kombinasyonu ile karakterize edilmektedir (Hooper 1986). Fakat, nematodlar küçük vücutlu ve mikroskobik canlılar olduğu için mikroskop altında teşhisinin yapılması zordur (Castagnone-Sereno vd. 2011). Aynı zamanda, nematod türleri arasında morfolojik karakterler birbirine çok yakın olduğu için teşhislerinde hatalar olabilmektedir (Hunt ve Handoo 2009). Ayrıca, nematodların morfolojik tanılanmasında, tecrübeli kişilere ihtiyaç duyulmaktadır (Oliveira vd. 2011).

Allen (1952), *A. besseyi*, *A. fragariae*, *A. ritzemabosi* ve *A. subtenuis* türlerinin teşhis anahtarını yayınlamıştır. Sanwal (1961), 35 adet *Aphelenchoides* türünü iki

gruplu teşhis anahtarını bildirmiştir. Fortuner (1970), 11 adet *Aphelenchoides* türü kuyruktaki mucronun yıldız şekline göre teşhis anahtarını yayınlamıştır. *Aphelenchoides* türlerinin morfolojik karakterleri birbirine çok benzediği için tanılamada karışıklık olmaktadır (Rybarczyk-Mydlowska vd. 2012).

2.2.2. Nematodların tanı ve tespitinde moleküler yöntem

Morfolojik ve morfometrik karakterlere dayalı teşhiste karşılaşılan zorlukların üstesinden gelebilmek için nematodların tanılanmalarında DNA temelli moleküler yöntemler geliştirilmiştir (Blok 2005; Oliveira vd. 2011; Alemu 2014). Türlerin tanımlanmasında, DNA temelli moleküler yöntemlerin kullanımı ve yaygınlaşmasına en büyük katkıyı PCR'ın (Polimeraz zincir reaksiyon) keşfi sağlamıştır.

PCR, genomik DNA'nın, hedef dizilerinin doğrudan çoğaltılma prensibine dayanır (Mullis, 1990). DNA'nın çoğaltımında ortamda bulunan bileşenler ise kalıp DNA, türe özgü primerler, dNTP, magnezyum, Taq DNA polimeraz enzimi, PCR tampon çözeltisi ve sudur. PCR, denatürasyon (DNA zincirinin açılması), annealing (Primerlerin tek zincirli DNA'ya bağlanması), extension (Primerlerin uzaması) olmak üzere üç reaksiyon aşamasından oluşan döngüden meydana gelir. İlk aşama olan denatürasyonda, çift sarmal DNA yüksek sıcaklık (92-95°C) ile tek zincirli yapıya dönüşür. İkinci aşamada sıcaklık 37-65°C'ye düşürülerek primerlerin tek zincirli DNA'ya bağlanması sağlanır. Son aşamada ise sıcaklık 72°C'ye çıkartılıp, reaksiyonun içindeki Taq DNA polimerazı sayesinde tek zincirli DNA'ya bağlanan primerlerin uzaması sağlanır (Watson vd. 1992).

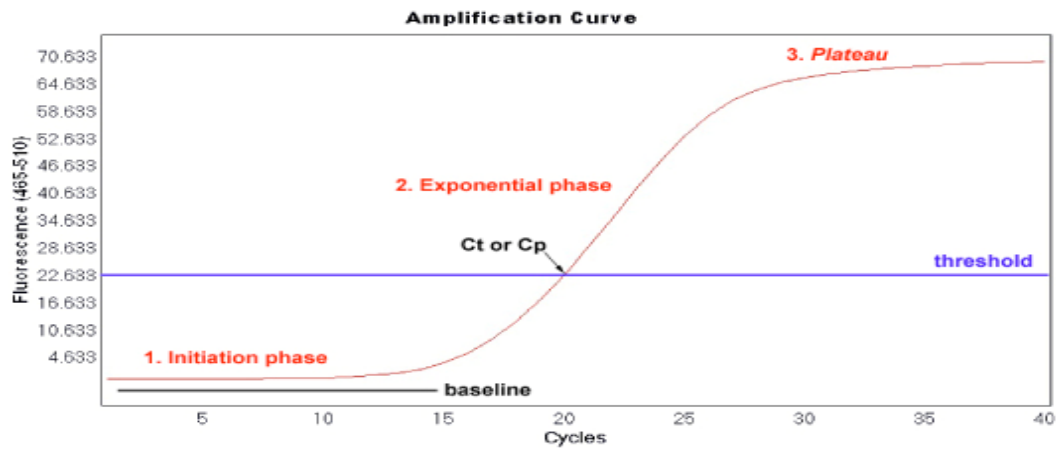
PCR reaksiyonları sonucu elde edilen ürünlerin görüntülenmesi jel elektroforezinde gerçekleşir. Jel elektroforezi, nükleik asit ve proteinlerin molekül ağırlığı ve miktarının saptanmasında kullanılan bir yöntemdir (Vesterberg 1989). Ayrıca, PCR ürünlerinin görüntülenmesinde yaygın olarak agaroz jel elektroforezi ya da poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) kullanılmaktadır. Agaroz jeldeki DNA'nın konumu ise etidyum bromür yardımıyla ultraviyole ışık altında görüntülenmesiyle belirlenmektedir (Sambrook vd. 1989a)

Nematodların tanılanmasında farklı moleküler metodlar kullanılmaktadır (Powers ve Harris, 1993; Uehara vd. 1999; Floyd vd. 2002; Esquibet vd. 2003). Bu yöntemlerden biri olan PCR-RFLP'dir. Bu yöntem ile rDNA geninde bulunan internal transcribed spacer (ITS) bölgesi kullanılarak, *Heterodera*, *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Bursaphelenchus* ve *Aphelenchoides* cinslerini içeren birçok bitki paraziti nematodun tanılanmasında uygulanmıştır (Subbotin ve Moens 2006). İbrahim vd. (1994a), ITS ve 5.8S gen bölgesini seçip, PCR-RFLP yöntemi kullanarak sekiz *Aphelenchoides* türünü tanılamaya çalışmışlardır. Kullandıkları Alu I kesim enzimi *A. besseyi* haricinde diğer türlerin ayırımında başarılı olduğu bildirilmişlerdir. ITS bölgesinde kodlar bulunmamaktadır ve türler arası varyasyonda avantajlı bir bölgedir. Fakat popülasyonlar arasında ITS dizilerinin varyasyonun ayrıntılı bilinmesi şart olduğundan, rDNA ve mitokondriyal genlerde kodlanmış bölgelerin, tanılama amaçlı seçilmesi önerilmektedir (Rybarczyk-Mydlowska vd. 2012). Dört *Aphelenchoides* türü için mtCOI (mitokondriyal DNA'nın sitokrom oksidaz subunit I), 18S ve 26S rDNA bölgesindeki primer dizileri kullanılarak, klasik PCR yöntemiyle tanılanması ve filogenetik haritasının elde edilmesi amaçlanmıştır. Sonuç olarak, hepsinin birbirine yakın sonuçlar

verdiği ve bu bölgelerin dört önemli *Aphelenchoides* türünün tanılanmasında güvenilir şekilde kullanılabilceği bildirilmiştir (Sanchez-Monge vd. 2017). Ayrıca, Devran vd. (2017), SSU rDNA bölgesinden tasarladıkları primerleri, geleneksel PCR yöntemiyle, doğrudan bulaşık çeltik parçalarından DNA izolasyonu yaparak, *A. besseyi*'yi başarılı bir şekilde tanımlamışlardır.

Geleneksel PCR'in avantajı nematoddan elde edilen çok küçük miktarda genomik DNA'nın belli bir bölgesi, çok kısa sürede milyarlarca çoğaltılarak tanılanabilmekte ve elde edilen verilerin spesifik ve güveniliridir. Klasik PCR'in en büyük dezavantajı kontaminasyon riskinin yüksek olması ve PCR ürününün görüntülenmesinde kullanılan boyanın toksik olmasıdır. Bu olumsuzluklardan dolayı, son yıllarda, real-time PCR yönteminin klasik PCR'a göre kullanım alanları yaygınlaşmaya başlamıştır. Çünkü real-time PCR'da elde edilen sonuçlar amplifikasyon ile eş zamanda ortaya çıkarak, geleneksel PCR'a göre daha hızlı ve güveniliridir. Bu teknoloji ayrıca floresan kantitatif RT-PCR, kantitatif-kinetik PCR, homojen PCR ve qPCR gibi isimlerle de anılmaktadır (Higuchi 1993; Giuliatti vd. 2001; Wei vd. 2001). Patojenlerin tespitinde, gen ekspresyonunda, DNA hasarı ve metilasyon tespitinde ve genotiplemede kullanılmaktadır (Klein 2002; Cheng vd. 2004).

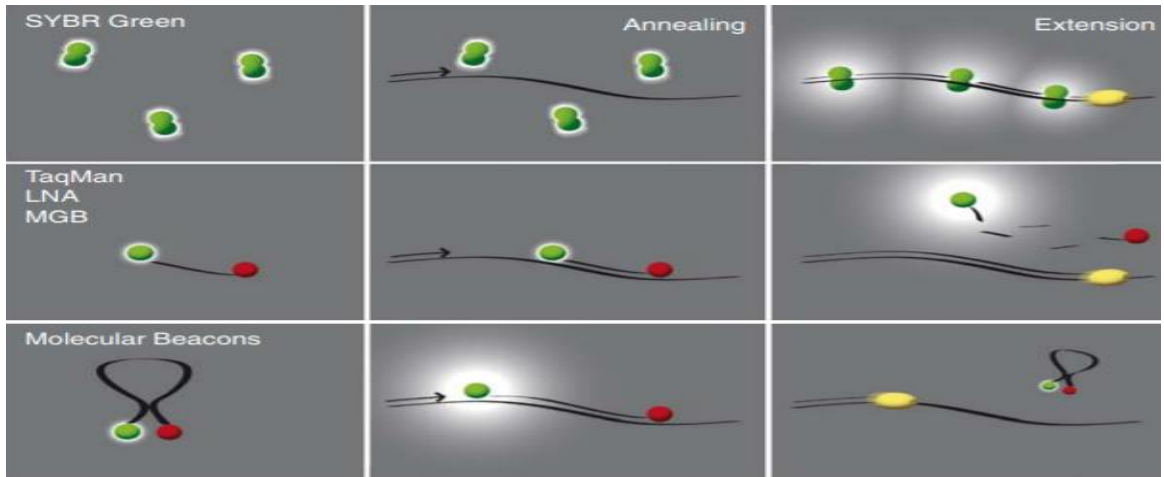
Real-time PCR'da Ct (Cycle threshold) ya da Cp (Cross point) hesaplanmasında başlangıç fazı, logaritmik faz ve plato faz olmak üzere üç ayrı fazın logaritmik fazına göre değerlendirilmektedir. Başlangıç fazı (Initiation phase), saptanabilir oranda PCR ürününün ortaya çıkmadığı, birkaç döngü süren arka plan fazıdır. Logaritmik faz (Exponential phase), ürün miktarının saptanabilir en alt düzeye gelmesiyle başlar. Üssel faz ya da ekspanansiyal faz olarakta bilinmektedir. Ürün miktarı her döngüde bir önceki miktarın iki katına çıkar. Ürünler üslü şekilde çoğalır. Denklemi ise, $T_n = T_0(E)^n$ (T_n : n döngüsünde hedef dizinin ulaştığı miktar, T_0 : Hedefin ilk başlangıç miktarı, E: Amplifikasyon etkinliği). Son faz olan plato fazında (Plateau) ise reaksiyon ortamında enzim, primer ve nükleotitler tükenir ve ürünlerin birbirleriyle eşleşmesi gibi nedenlerden reaksiyon durur (Şekil 2.4). Logaritmik fazın başında kantitasyonun yapılması, inhibitör miktarını, reaksiyon koşulları ve amplifikasyon etkinliği çok az etkinlenmektedir (Bustin vd. 2009).



Şekil 2. 2. Real-time PCR'da amplifikasyon eğrisinin fazları (Anonymous 1)

Real-time PCR’da amplifikasyon esnasında ürünlerin tespiti çeşitli kimyasallar kullanarak yapılabilmektedir. Bu kimyasallar diziye özgü olmayan ve olan şeklinde iki gruba ayrılmaktadır. Diziye özgü olmayan kimyasallar (Sybr Green I, EvaGreen R, LC Green, Yoyo-I, LC Green ve Bebo) çift sarmal DNA’nın ikinci oluşuna bağlanır (Şekil 2.6). PCR başladığında yeni sentezlenen DNA miktarının artmasıyla boyanın sinyalinde artış meydana gelir ve erime eğrisi analizi yapılarak reaksiyon ölçülür. DNA’ya bağlanan boyalar içinde en fazla Sybr Green I kullanılmaktadır (Schneeberger vd. 1995). *Aphelenchoides* türleri de Sybr Green I boyası kullanılarak real-time PCR’da tanımlanmıştır (Rybarczyk-Mydlowska vd. 2012). Fakat DNA’ya bağlanan boya ların en büyük dezavantajı ise spesifik olmayan PCR ürünlerine ve primer dimer yapılar a bağlanabilmesidir.

Diziye özel olan kimyasallarda ise problemler kullanılmaktadır. Florofor denilen ve belirli dalga boyundaki ışıkla uyarıldığında floresan ışımaya yayabilme özelliğine sahip sentetik oligonükleotitlere prob denilmektedir. Prob çoğaltılmış olan ürünün tamamına değil, ürün içindeki özgül bir bölgeye bağlanır. Hedef bölgenin varlığı dolaylı yoldan gösterilmiş olur (Costa vd. 2004; Holland vd. 1991). Hibridizasyon problemleri (FRET), Hidroliz problemleri (TaqMan prensibi), Moleküler Beacon (moleküler firketeler) ve Minor oluğa bağlanan (Minor groove binding-MGB) prob formatları bulunmaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2. 3. Real-time PCR’da kullanılan kimyasal boyalar ve problemler (Gašparič vd. 2010)

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Nematod popülasyonlarının elde edilmesi

Marmara Bölgesi'ndeki Tekirdağ, Kırklareli ve Edirne illerinde çeltik yetiştirilen arazilerden toplam 94 adet çeltik ve 94 adet kavuz örneği toplanıp polietilen torbalara konulmuş ve gerekli etiket bilgileri yazıldıktan sonra örneklerin bulaşık olup-olmadığının incelenmesi amacıyla Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'ndeki Nematoloji Laboratuvarı'na getirilmiştir (Şekil 3.1).

Aphelenchoides ritzemabosi, *A. subtenuis* ve *A. fragariae* türlerine ait larva ve erginler Dr. Gerrit Karssen (National Plant Protection Organization, Wageningen Nematode Collection, Hollanda), *A. besseyi* ve *Anguini tritici* ise Doç. Dr. Adnan Tülek (Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Edirne)'den temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan diğer nematod türleri ise (*M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. luci*, *P. neglectus* ve *P. thornei*) bölümümüz Nematoloji Laboratuvarı'mızın kültür koleksiyonundan sağlanmıştır.



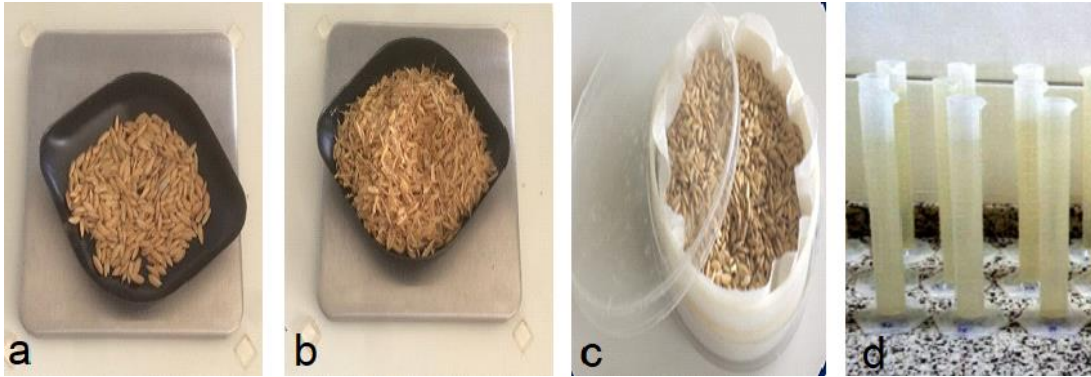
Şekil 3. 1. Marmara Bölgesi'nden örneklerin toplandığı il ve ilçeler (Tülek ve Çobanoğlu 2010)

3.2. Metot

3.2.1. Nematod ekstraksiyonu

Toplanan örneklerden *A. besseyi*'yi elde etmek için geliştirilmiş Baermann Funnel yöntemi kullanılmıştır (Hooper 1986). Bu yöntemde; çeltik örneklerinden 10 gr, kavuz örneklerinden ise 5 gr tartılıp 15 cm genişliğinde 2.5 cm yüksekliğinde plastik petri kaplarının içindeki eleklerin yüzeyindeki filtre kağıdının üstüne aktarılmıştır. Petri kaplarının içindeki örnekler ıslanmaya kadar piset kullanılarak su aktarılmıştır. Nematodların suya geçebilmesi için örnekler petri kaplarında 48 saat bekletilmiştir. Süre sonunda petri kabı içerisinde su 100 ml'lik plastik mezürlere aktarılmış ve

nematodların dibe çökmesi için 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra 100 ml'lik su üstten alınarak 10 ml'ye düşürülmüş ve falcon tüplere aktarıldıktan sonra 4-6 saat bekletilmiştir. Tekrardan falcon tüpteki su üstten mikropipet yardımıyla 100 µl su kalana kadar çektilmiştir. En sonunda falcon tüpün içindeki 100 µl su iyice karıştırılıp tüm miktar lam üzerine konulduktan sonra üzerine ışık mikroskobu altında *A. besseyi*'nin bulunup bulunmadığına bakılmış ve bulunan örneklerin de sayımı yapılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3. 2. *Aphelenchoides besseyi* ekstraksiyon aşamaları **a)** Çeltik numuneleri **b)** Kavuz numuneleri **c)** Baermann funnel **d)** Örneklerin mezura aktarımı

3.2.2. DNA izolasyonu

Örneklerimizden DNA izolasyonu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Oryza sativa'nın taze yapraklarından DNA izolasyonu Wizard Magnetic Kit (Promega Corporation, USA) kullanılarak yapılmıştır.

3.2.3. DNA Process Control Kit

Real-time PCR'da kullanılan tüm 50 µl'lik DNA örneklerin içine internal kontrol amaçlı 5 µl DNA process working solution (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) eklenmiştir. Daha sonra toplam hacim 20 µl olacak şekilde 5 µl DNA, 500 nM her bir forward primer (AbF11) ve reverse primerden (AbR22), 200 nM prob AbPr, 1 µl control DNA detection (Cy5 etiketli probe), 4 µl LightCycler® 480 Probe Master Mix ve 8,8 µl su (LightCycler® 480 Probe Master PCR grade) solusyonu hazırlanmıştır. Real-time PCR programı, ön denatürasyon aşaması 95°C 10 dk, daha sonra 35 döngüde denatürasyon 95°C'de 10 s, bağlanma 60°C'de 30 s ve uzama 72°C'de 1 s, en son uzama aşamasında 40°C'de 30s belirlenmiştir.

Process Control Kit nükleaz-resistant DNA içermektedir. DNA izolasyon aşamasından önce ve sonra da örneklerin içine eklenebilmektedir. DNA izolasyonunda ve real-time PCR uygulama aşamasında DNA'dan meydana gelebilecek hataların ortaya çıkarabildiği için pozitif kontrol amaçlı kullanılmıştır. Çalışmamızda bulaşık

dokulardan doğrudan DNA izolasyonu aşamasında ve toplanan *A. besseyi* popülasyonlarında pozitif kontrol amaçlı kullanılmıştır.

3.2.4. Klasik PCR

Elde edilen *A. besseyi* DNA'ları ve *A. fragariae*, *A. subtenuis*, *A. ritzemabosi*, Devran vd. (2017)'nin tasarladıkları *A. besseyi*'ye özgü spesifik primerleri (AbF5/AbR5) ile kontrol edilmiştir (Çizelge 3.1). Her bir örnek için 2.5 µL DNA, 2.5 µL 10X PCR buffer, 200 µM dNTP, 0,4 µM her bir primer için, 1unit Taq DNA polymerase (Fermentas, Vilnius, Lithuania) ve distile sudan oluşan toplam 25 µL'lik reaksiyon haciminde ve SimpliAmp™ Thermal Cyclerda (Applied Biosystems, CA, USA) yapılmıştır. PCR ürünleri, %1.5'lik agaroz jelde 1X TAE buffer yardımıyla 60 voltta 45 dk yürütülmüştür. Etidyum bromür (0.5 µL/ml) ile boyandıktan sonra ultraviyole ışığı altında örneklerde bantlar gözlemlenmiştir.

3.2.5. Primerlerin ve probun tasarlanması

Tüm *Aphelenchoides* cinsi SSU rDNA dizilimi GenBank'tan alınmıştır. Geneious yazılımı (Biomatters Ltd.) kullanılarak bu dizilimlerden primerler ve probe tasarlanmıştır (Çizelge 3.1). Çalışmada kullandığımız TaqMan prob için raportör boya Fluorescein amidit (FAM), baskılayıcı boya Blackberry Quencher (BBQ) (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany) seçilmiştir. Ayrıca probun spesifikliğini arttırmak için LNA (Locked Nucleic Asit) ile modifiye edilmiştir.

Çizelge 3. 1. Geliştirilen primerlerin ve probun dizileri

Primer/Probe Adı	Primer/Probe Tipi	Dizilimi (5'-3')
AbF11	Forward primer	CGTCTTAACGGGCGTCACT
AbR11	Reverse primer	GCTTATGAACTCGAATCCACAA
AbR22	Reverse primer	TCAGTCGTAAGACCCGCCTT
AbPr	Probe	FAM-TTT+CGGGCCTTCG+GGTCGGTGAT- BBQ

+ LNA:Locked Nükleik Asit

3.2.6. Tasarlanan primerlerin spesifikliğinin geleneksel PCR'da testlenmesi

Tasarlanan primerlerin spesifik olup-olmadığı öncelikle klasik PCR ile testlenmiştir. PCR karışımın toplam hacmi 25 µl olacak şekilde her bir örnek için 2.5 µL DNA, 2.5 µL 10X PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0,4 µM her bir primer için, 1unit Taq DNA polymerase (Fermentas, Vilnius, Lithuania) ve distile sudan oluşan reaksiyon hazırlanmıştır. Çalışmada SimpliAmp™ Thermal Cycler PCR cihazı ile 94 °C'de 3 dk, daha sonra 94 °C'de 30 sn, 54 °C'de 30 sn ve 72°C'de 30 sn 35 döngü ve 72°C'de 7 dk olarak PCR döngüsü gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri, %1.5'lik agaroz jelde 1X TAE buffer yardımıyla 60 voltta 45 dk yürütülmüştür. Etidyum bromür (0.5 µL/ml) ile boyandıktan sonra ultraviyole ışığı altında görüntülenip fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.7. Real-time PCR

Aphelenchoides besseyi'nin tanılanması ve nicel analizi LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) real-time PCR cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.2.7.1. Real-time PCR'in optimizasyonu

Tasarlanan forward primeri AbF11 önce reverse primeri AbR11 ile daha sonra diğer reverse primeri AbR22 olmak üzere iki kombinasyon yapılarak, *A. besseyi*'yi real-time PCR'da tanımlaması ve Ct değerleri incelenmiştir. Hazırlanan reaksiyonun toplam hacmi 20 µl olacak şekilde, 5 µl DNA, 500 nM her bir primer için (AbF11/AbR11 ya da AbF11/AbR22), 200 nM probe AbPr, 10 µl LightCycler® 480 Probe Master (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) ve 3,8 µl su (LightCycler® 480 Probe Master PCR grade) içeren reaksiyon oluşturulmuştur.

Aphelenchoides besseyi'yi tanımlamada etkin olan primer çifti seçildikten sonra üç farklı real-time PCR programı testlenerek real-time PCR çalışma koşulu belirlenmiştir. Bu doğrultuda hazırlanan üç farklı real-time PCR programı aşağıda belirtilmiştir.

Koşul 1. Ön denatürasyon aşaması 95°C 10 dk, daha sonra 45 döngüde denatürasyon 95°C'de 10 s, bağlanma 63°C'de 30 s ve uzama 72°C'de 1 s, en son uzama aşamasında 40°C'de 30s belirlenmiştir.

Koşul 2. Ön denatürasyon aşaması 95°C 10 dk, daha sonra 45 döngüde denatürasyon 95°C'de 10 s, bağlanma 60°C'de 30 s ve uzama 72°C'de 1 s, en son uzama aşamasında 40°C'de 30s belirlenmiştir.

Koşul 3. Ön denatürasyon aşaması 95°C 10 dk, daha sonra 35 döngüde denatürasyon 95°C'de 10 s, bağlanma 60°C'de 30 s ve uzama 72°C'de 1 s, en son uzama aşamasında 40°C'de 30s belirlenmiştir.

Her reaksiyon için oluşan amplifikasyon eğrisi LightCycler® 480 SW 1.5.1 yazılımıyla elde edilmiştir.

3.2.7.2. Probonun spesifikliğinin optimizasyonu

Aphelenchoides besseyi'nin tanımlanmasında primerlerin ve probun türe özgü olup-olmadığının belirlenmesi amacıyla 192 adet *A. besseyi* popülasyonunun DNA'ları, *A. besseyi*'ye yakın olan *A. fragariae*, *A. ritzemabosi* and *A. subtenuis* türlerinin DNA'ları ve uzak olan *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. luci*, *P. neglectus*, *P. thornei* ve *A. tritici*'nin DNA'ları ile birlikte testlenmiştir. Denemede negatif kontrol olarak distile su, kalıp DNA olarak da çeltik DNA'sı kullanılmıştır.

3.2.7.3. En düşük DNA miktarının tespiti

Aphelenchoides besseyi'nin en düşük DNA miktarının tespit edilebilmesi amacıyla iki farklı yöntem uygulanmıştır.

Genomik DNA'nın Seyreltilmesi

Bir adet *A. besseyi* larvasından elde edilen genomik DNA Qubit 3 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) ile ölçülmüştür. Daha sonra *A. besseyi* DNA'sı real-time PCR'da tespit edilemeyecek miktara kadar 1/10 oranında seyreltilmiştir. DNA konsantrasyonları ile Ct değerleri arasında ilişki araştırılmıştır. Böylelikle tek bir

larvanın genomik DNA'sından en küçük DNA miktarının belirlenmesi real-time PCR'da gerçekleştirilmiştir.

Plasmid DNA'nın Seyreltilmesi

Bir adet *A. besseyi* larvasının genomik DNA'sı elde edildikten sonra AbF11 ve AbR22 primerleriyle klasik PCR yapılmıştır. PCR ürünü %1.5'lik agaroz jelde 1X TAE buffer yardımıyla 60 voltta 45 dk yürütülmüş ve daha sonra jelden kesilmiştir. PCR Purification Kit (NorgenBiotekCorp., Thorold, Canada) ile DNA saflaştırılmıştır. DNA'lar pGEM-T Easy Vector System II (Promega, Southampton, UK) plasmidine klonlanmıştır. Klonlanan plasmid *Escherichia coli* JM109 hücrelerine ısı şok yöntemiyle aktarılmıştır (Sambrook vd. 1989b). Mavi ve beyaz klon seçimi yapılarak beyaz renkli koloniler seçilmiş ve amfisilin (100 µl/mg), X-gal ve Iptg içeren Luria broth ortamında bir gece 37°C'de inkübe edilmiştir. Elde edilen hücrelerin plasmid DNA ekstraksiyonu Plasmid MiniPrep Kit (NorgenBiotekCorp., Thorold, Canada) ile yapılmıştır. Klonlanan plasmid DNA'sı ABI PRISIM BigDye sekans kiti (Applied Biosystems, Foster City, CA) ile sekans edilmiş. Elde edilen sekans verileri GenBank'ta *A. besseyi*'nin SSU rDNA bölgesindeki ait diziler ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen plasmid DNA'sının konsantrasyonu Nanodrop 2000c spektrofotometre (Thermo Fischer Scientific) ile ölçülmüştür. Daha sonra 1/10 oranında plasmid DNA'sı seyreltilip *A. besseyi*'nin tanımlanmasında kullanılacak en düşük kopya sayısı hesaplanmıştır. SSU rDNA kopya sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

SSU rDNA kopya sayısı= [DNA(ng) miktarı X 6.02X10²³]/[Çift iplik sayısı(660) X (baz uzunluğu (bp)+plasmid uzunluğu(bp)]

3.2.7.4. Farklı biyolojik dönemlerinin tespiti

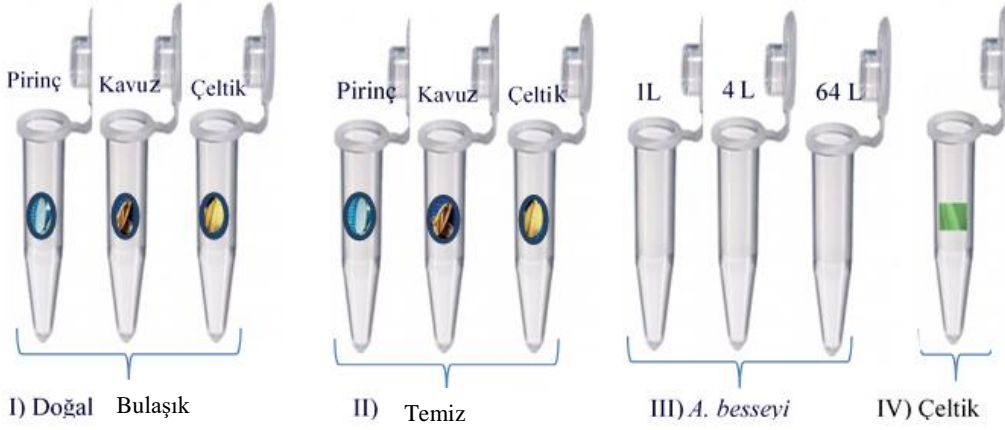
Aphelenchoides besseyi'nin larvası, dişi ve erkek bireyi 1 adet olacak şekilde eppendorf tüplerine fırça kılı yardımıyla yakalama (fishingleme) yöntemiyle aktarılmıştır (Şekil 3.3). *Aphelenchoides besseyi*'nin yumurtası ise havuç kültüründe yetiştirilen ortamdan mikropipet ile eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Daha sonra tüm dönemlerin DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA'lar 3 tekerrürlü olarak real-time PCR'da yürütülmüştür.



Şekil 3.3. *Aphelenchoides besseyi*'nin farklı biyolojik dönemleri a) Havuç diski b) Havuç diski üstünde larvaları c) Yumurta d) Dişi e) Erkek

3.2.7.5. *Aphelenchoides besseyi*'nin doğal bulaşık çeltik parçalarından tespiti

Örneklerin DNA izolasyonu, nematod ekstraksiyonu yapılmadan doğrudan bulaşık çeltik parçalarından Devran vd. (2017) geliştirdikleri metoda göre elde edilmiştir. Her bir örnekten DNA'ların elde edilmesi aşağıdaki Şekil 3.4'de gösterilmiştir.



Şekil 3. 4. Doğal bulaşık çeltik parçalarından *Aphelenchoides besseyi*'nin DNA izolasyonu

I. Bulaşık pirinç, kavuz ve çeltikten birer adet alınıp, her biri ayrı eppendorf tüplerinin içine yerleştirilmiştir. Örneklerin DNA izolasyonu DNeasy Blood& Tissue Kit ile yapılmıştır.

II. Temiz pirinç, kavuz ve çeltikten birer adet alınıp, her biri ayrı eppendorf tüplerinin içine yerleştirilmiştir. Örneklerin DNA izolasyonu DNeasy Blood& Tissue Kit ile yapılmıştır.

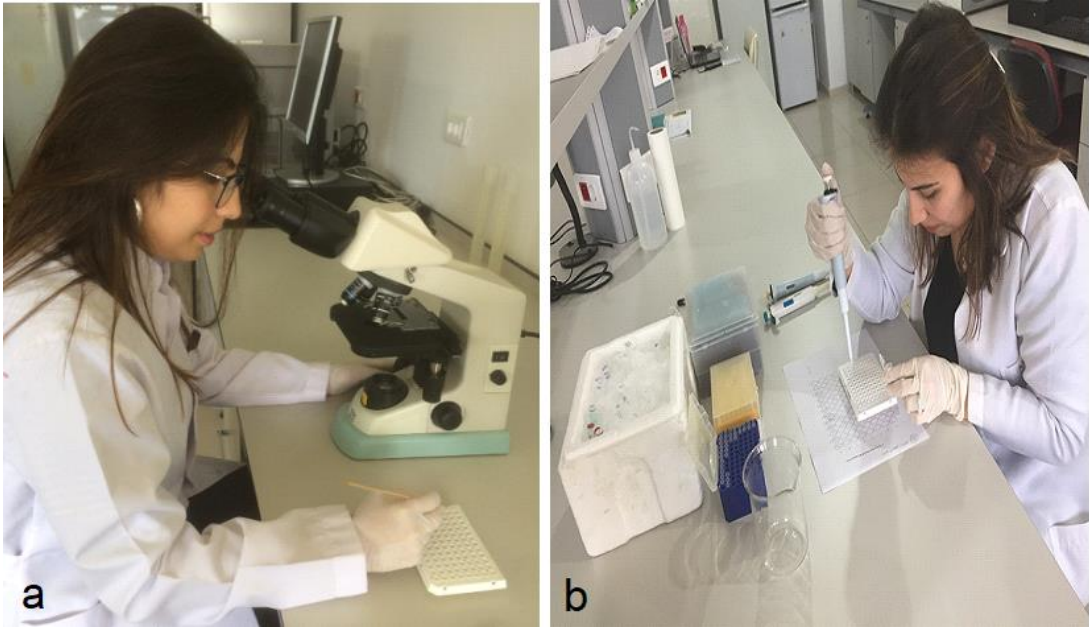
III. Farklı sayılarda *A. besseyi* juvenillerinin (1L, 4L ve 64L) her biri ayrı eppendorf tüplerinin içine yerleştirilmiştir. Örneklerin DNA izolasyonu DNeasy Blood& Tissue Kit ile yapılmıştır.

IV. Çeltik bitkisinden elde edilmiş bir parça taze yaprak eppendorf tüpünün içine yerleştirilmiştir. DNA izolasyonu Wizard Magnectic Kit ile yapılmıştır.

DNA'lar real-time PCR çalışmasında kullanılmıştır ve deneme 4 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.7.6. DNA izolasyonsuz doğrudan *Aphelenchoides besseyi*'nin tespiti

DNA izolasyonu yapmadan doğrudan canlı *A. besseyi* larvasının real-time PCR'da tespit edilip edilemeyeceği araştırılmıştır. Böylelikle geliştirilmiş Baermann funnel tekniği ile canlı *A. besseyi* larvaları elde edilmiştir. Elle fırça kılı ile yakalama yöntemiyle 1 adet ve 2 adet *A. besseyi* larvası real-time PCR 96'lık platedeki kuyucukların içine aktarılmış ve her bir örneğin içine 15 µl real-time master mix solüsyonu eklenmiş ve real-time PCR yapılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3. 5. a) *Aphelenchoides besseyi*'nin plate yerleştirilmesi b) Real-time reaksiyonunun plate içine aktarımı

3.2.7.7. *Aphelenchoides besseyi*'nin diğer *Aphelenchoides* türleri ile birlikte olduğunda tespiti

Aphelenchoides besseyi, *A. fragariae*, *A. ritzemabosi* ve *A. subtenuis*'un DNA'larından 5 µl'lik miktarlar alınıp solusyonlar hazırlanmıştır. Karışım solusyonları için aşağıdaki gibi 7 farklı kombinasyon yapılmıştır. Daha sonra real-time PCR işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.6.).

I. *A. besseyi* + *A. fragariae*,

II. *A. besseyi* + *A. ritzemabosi*,

III. *A. besseyi* + *A. subtenuis*,

IV. *A. besseyi* + *A. fragariae* + *A. ritzemabosi*,

V. *A. besseyi* + *A. fragariae* + *A. subtenuis*,

VI. *A. besseyi* + *A. ritzemabosi* + *A. subtenuis*,

VII. *A. besseyi* + *A. fragariae* + *A. ritzemabosi* + *A. subtenuis*.



Şekil 3. 6. *Aphelenchoides besseyi*'nin real-time PCR'da tespiti

3.2.8. *Aphelenchoides besseyi*'nin nicel analizi

Bulaşık olduğu bilinen çeltik ve kavuz örneklerindeki *A. besseyi* miktarının belirlenebilmesi amacıyla regresyon eğrisi denklemi oluşturulmuştur. Optimum regresyon eğrisi denklemi elde edebilmek için iki farklı grup oluşturulmuştur.

1. Grupta, *A. besseyi*'nin herhangi bir döneminden toplanmış 1, 2, 8, 16, 32 ve 64 adet nematod ayrı ayrı eppendorf tüplerinin içine aktarılıp DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

2. Grupta ise *A. besseyi* sayıları; 1, 2, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ve 1000 adet olacak şekilde toplanıp eppendorf tüplerin içine aktarılmış ve DNA izolasyonu yapılmıştır.

Bu DNA örneklerinin real-time PCR'da oluşan Ct değerlerine göre korelasyon katsayısı ve real-time PCR etkinliği ($E = [10^{-1/\text{slope}} - 1]$) hesaplanmış ve en iyi sonucu veren grup bulaşık dokulardaki *A. besseyi* sayısının tahmin edilmesinde kullanılmıştır.

3.2.9. Propidium Mono Azide ve Reagent D kullanılarak *Aphelenchoides besseyi*'nin canlı/ölü ayrımının yapılması

Farklı sıcaklıklara maruz kalmış *A. besseyi*'nin canlı ve ölü olduğunu tespit etmek amacıyla Propidium Mono Azide (PMA, Biotium, Kaliforniya, ABD) ve Reagent D (Biotecon, Postdam, Almanya) kimyasalları real time PCR'da etkinlikleri kontrol grubuna göre karşılaştırılmıştır.

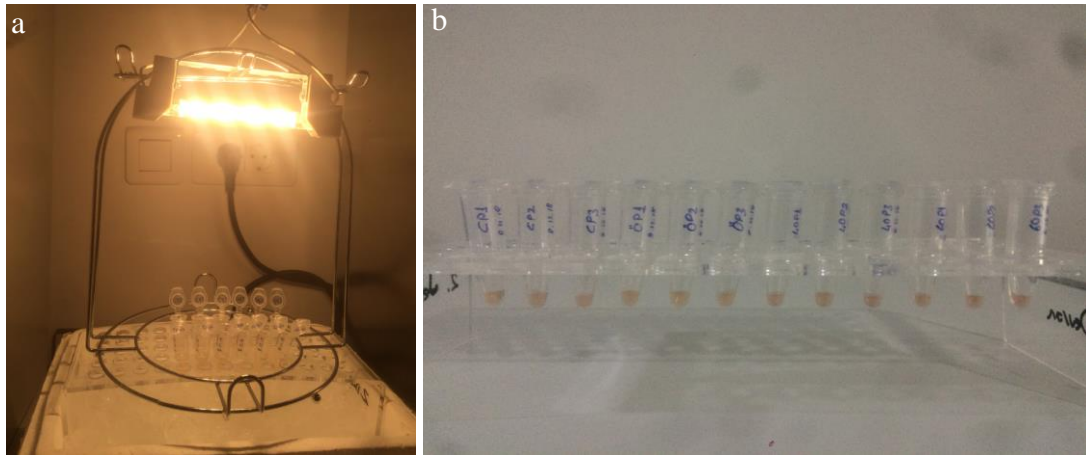
Eppendorf tüplerin içinde 50 adet canlı *A. besseyi* (larva ve ergin) bulunan örnekler, canlı ve ölü (oda sıcaklığında (20°C) normal olarak ölen) olarak farklı sıcaklıklarda (40°C ve 60°C) sıcak su banyosunda 15 dk kalacak şekilde hazırlanmıştır.

Daha sonra bu örnekler, yukarıda belirtilen kimyasallara ayrı ayrı maruz bırakılmıştır. Aynı sayıda örnekler ise kontrol amaçlı olarak; aynı sıcaklıklarda ve sürelerde tutulmuş fakat herhangi bir kimyasal uygulanmamıştır. Böylece dört grubtan oluşan deneme deseni oluşturulmuştur. Kimyasalların karşılaştırılması için üç farklı uygulama yapılmıştır. Bunlar ise;

a) PMA uygulaması: Canlı ve canlı-ölü karışımı yaklaşık 20 µl'lik Eppendorf tüplerin içine 2,65 µl'lik (50 µM) PMA solüsyonu eklenmiştir. Ekleme sırasında çekme-bırakma yapılarak solüsyon karıştırılmıştır. Karanlık oda da 30 dk boyunca karıştırılarak bekletilmiştir. Daha sonra 650W'lık led ışığa 20 cm uzaklıkta örnekler 30 dk boyunca ara sıra karıştırılarak maruz kalmıştır. En son aşamada 8000 rpm'de 5 dk santrifuj yapıp 3.2.2'de belirtildiği gibi DNA izolasyonu yapılmıştır.

b) Reagent D uygulaması: Canlı ve canlı-ölü karışımı yaklaşık 20 µl'lik Eppendorf tüplerin içine 300 µl Reagent D solüsyonu pipetle çekme bırakma yapılarak aktarılmıştır. Karanlık oda da 30 dk boyunca karıştırılarak bekletilmiştir. Daha sonra 650W'lık led ışığa 20 cm uzaklıkta örnekler 30 dk boyunca ara sıra karıştırılarak maruz kalmıştır. En son aşamada 8000 rpm'de 5 dk santrifuj yapıp 3.2.2'de belirtildiği gibi DNA izolasyonu yapılmıştır.

c) Kontrol: Canlı ve canlı-ölü karışımı yaklaşık 20 µl'lik Eppendorf tüplerin içine hiçbir solüsyon eklenmemiş, kontrol amaçlı doğrudan 3.2.2'de belirtildiği gibi DNA izolasyonu yapılmıştır.



Şekil 3. 7. PMA ve Reagent D uygulamasında **a)** Işığa maruz bırakma **b)** Uygulama sonrasında tüplerin içindeki sıvının renk değişimi

Yapılan üç uygulama sonrası elde edilen genomik DNA'lar, real-time PCR işlemine tabi tutulup, elde edilen Ct değerleri kontrol grubuna göre karşılaştırılmıştır. Böylelikle *A. besseyi*'nin canlı-ölü ayırımında etkili olan kimyasalın tespiti yapılmıştır.

3.2.10. Verilerin analizi

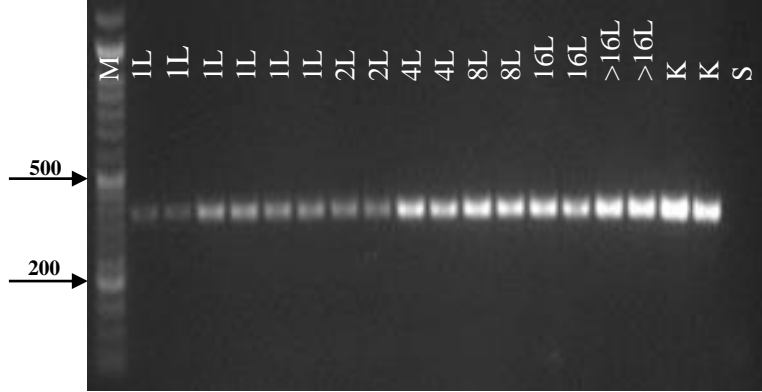
Real-time PCR sonucu elde edilen verilerin ortalamalarının ve standart hatasının hesaplanması için LightCycler 480 cihazındaki veriler pdf dosyasına dönüştürülerek

temin edilmiştir. Ct değerlerinin ortalaması varyans analizine tabi tutulmuştur. SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC) istatistiksel analiz programı kullanılmıştır. Ortalamalar arasında fark olup-olmadığı $p=0.05$ seviyesine göre Tukey's çoklu karşılaştırma testine göre değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. *Aphelenchoides besseyi* Popülasyonlarının Geleneksel PCR ile Doğrulanması

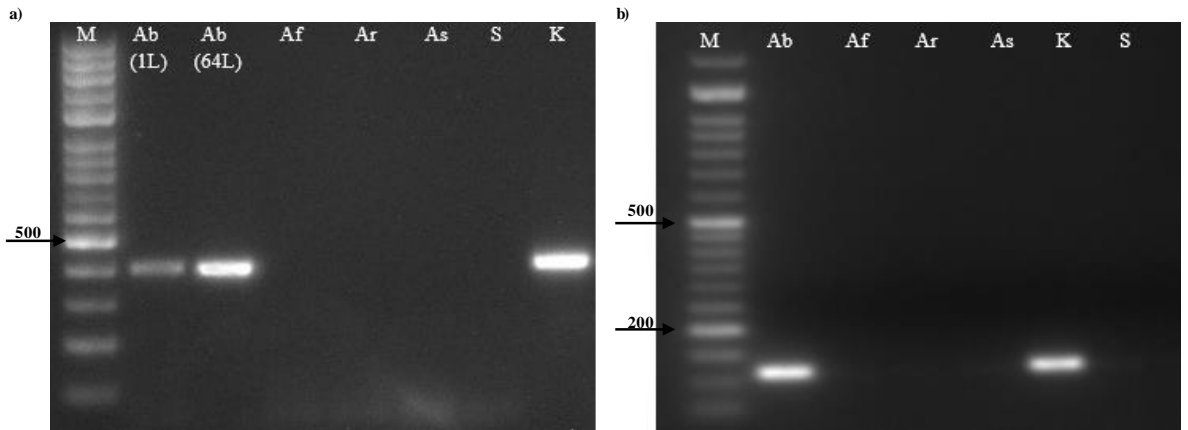
Çeltik arazilerinden toplanmış olan tüm örneklerin *A. besseyi* olup-olmadığı AbF5/AbR5 primerleri (Devran et al. 2017) kullanılarak doğrulanmıştır. Bunun için adı geçen primer seti *A. besseyi*'de beklenen 340 bp'da bant verirken *A. besseyi*'ye yakın türler olan *A. fragariae*, *A. subtenuis* ve *A. ritzemabosi*'de beklendiği gibi PCR ürünü vermemiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4. 1. AbF5/AbR5 primerleri ile PCR ürünü M: Moleküler markör (100 bp DNA ladder, abm), L: *Aphelenchoides besseyi* larvası, K: Kontrol, S: Su

4.2. Geliştirilen Primerlerin Spesifikliğinin Geleneksel PCR ile Tespiti

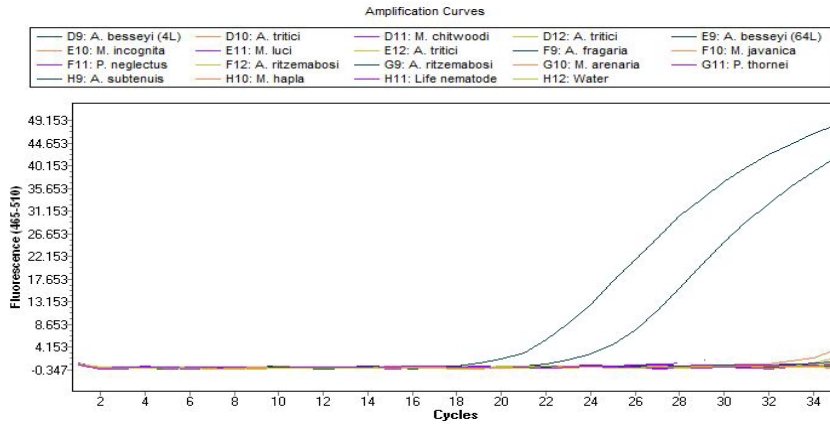
Bu çalışma kapsamında tasarlanan *A. besseyi*'ye özgü AbF11/AbR11 primerleriyle 400 bp PCR ürünü elde edilirken, AbF11/ AbF22 primerleriyle 125 bp DNA bandı elde edilmiştir. Beklendiği gibi *A. fragariae*, *A. subtenuis*, *A. ritzemabosi* bant elde edilmemiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. Geliştirilen PCR primerleri ile PCR a) AbF11/AbR11 primerleriyle elde edilen PCR ürünleri b) AbF11/AbF22 primerleriyle elde edilen PCR ürünleri. M: Moleküler Markör (100 bp DNA ladder GeneAll (a) ve abm (b), Ab: *Aphelenchoides besseyi*, Af: *Aphelenchoides fragariae*, Ar: *Aphelenchoides ritzemabosi*, As: *Aphelenchoides subtenuis*

4.3. TaqMan Probu Spesifikliğinin Tespiti

Aphelenchoides besseyi örnekleri, yakın türler olan, *A. fragariae*, *A. ritzemabosi* and *A. subtenuis* ile uzak türler olan, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*, *M. luci*, *P. neglectus*, *P. thornei* ve *A. tritici*'ye ait DNA'lar AbF11/AbR11 ve AbF11/AbR22 primerleri ile AbPr TaqMan probu ile ayrı ayrı real-time PCR yapılmış ve oluşan amplifikasyon eğrilerinin Ct değerleri belirlenmiştir. Geliştirilen AbF11/AbR22 primer seti, AbF11/AbR11 primer setine göre TaqMan probu kullanıldığında *A. besseyi* örneklerinde daha spesifik sonuç verdiği için AbF11/AbR22 primer setleri seçilmiştir (Şekil 4.3). AbF11/AbR22 primer setlerinin AbPr TaqMan probu ile optimizasyon koşulları Çizelge 4.1'de belirtilmiştir.



Şekil 4. 3. *Aphelenchoides besseyi*'nin spesikliğinin real-time PCR'da tespiti

Çizelge 4. 1. Geliştirilen primerler ve probun optimizasyon koşulları

Türler	Eşik Döngüsü (Ct) Değeri		
	Koşul 1	Koşul 2	Koşul 3
	Sıcaklık 63 °C	Sıcaklık 60 °C	Sıcaklık 60°C
	Döngü	Döngü	Döngü
	45	45	35
<i>A. besseyi</i> (4 L)	27.89	26.10	24.78
<i>A. besseyi</i> (16 L)	20.73	21.88	21.33
<i>A. fragaria</i> (5 L)	-	-	-
<i>A. ritzemabosi</i> (5 L)	37.35	37.14	-
<i>A. subtenuis</i> (5 L)	-	-	-
<i>A. tritici</i>	-	-	-
<i>M. incognita</i>	-	-	-
<i>M. javanica</i>	-	-	-
<i>M. arenaria</i>	-	-	-
<i>M. hapla</i>	-	-	-
<i>M. chitwoodi</i>	-	-	-
<i>M. luci</i>	-	-	-
<i>P. neglectus</i>	-	-	-
<i>P. thornei</i>	-	-	-
<i>Oryza sativa</i>	-	-	-

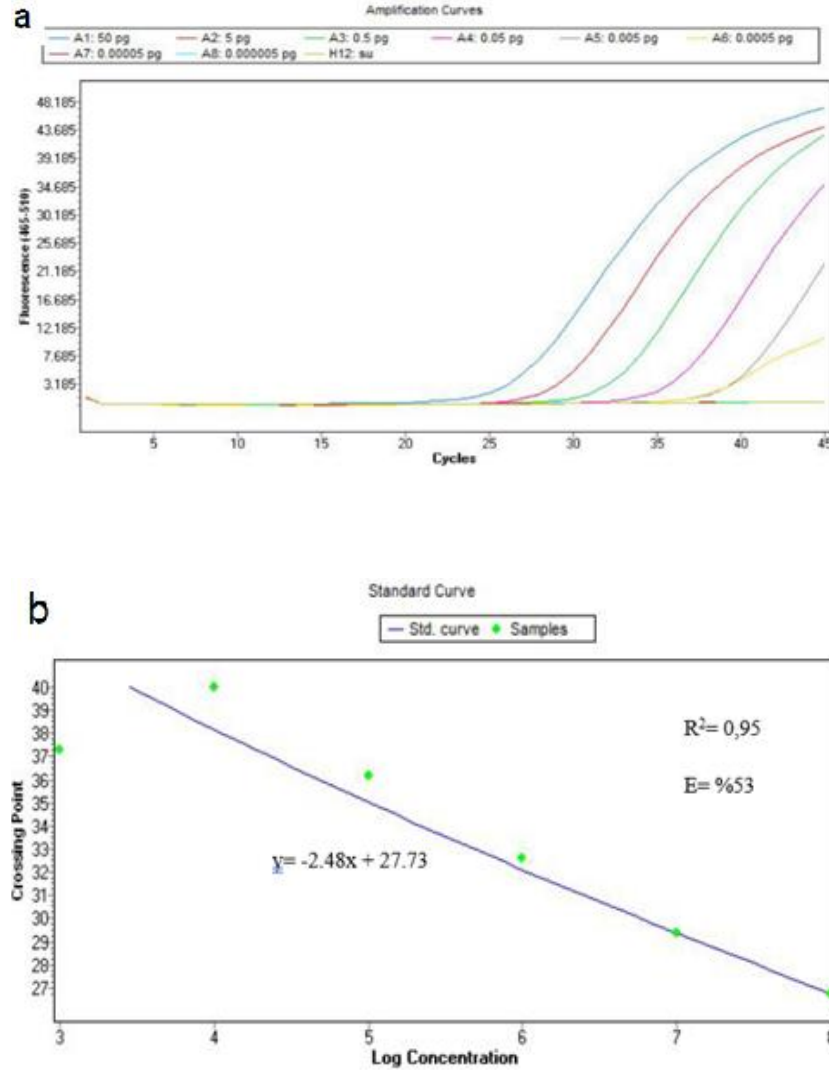
- Amplifikasyon eğrisi görülmemiştir. L: Larva, Ct: Eşik döngüsü

4.4. TaqMan Probenin Hassasiyetinin Tespiti

4.4.1. En düşük DNA miktarının tespiti

4.4.1.1. Genomik DNA'nın tespiti

Tek *A. besseyi* larvasından elde edilmiş 50 pg'luk genomik DNA'nın 1/10 oranında seyreltilmesi sonucunda Ct değerleri 29.55(±0.10)-39.11(±.89) arasında elde edilmiştir. Amplifikasyon eğrisi ve standart eğrisi Şekil 4.4 a, b'de belirtilmiştir.

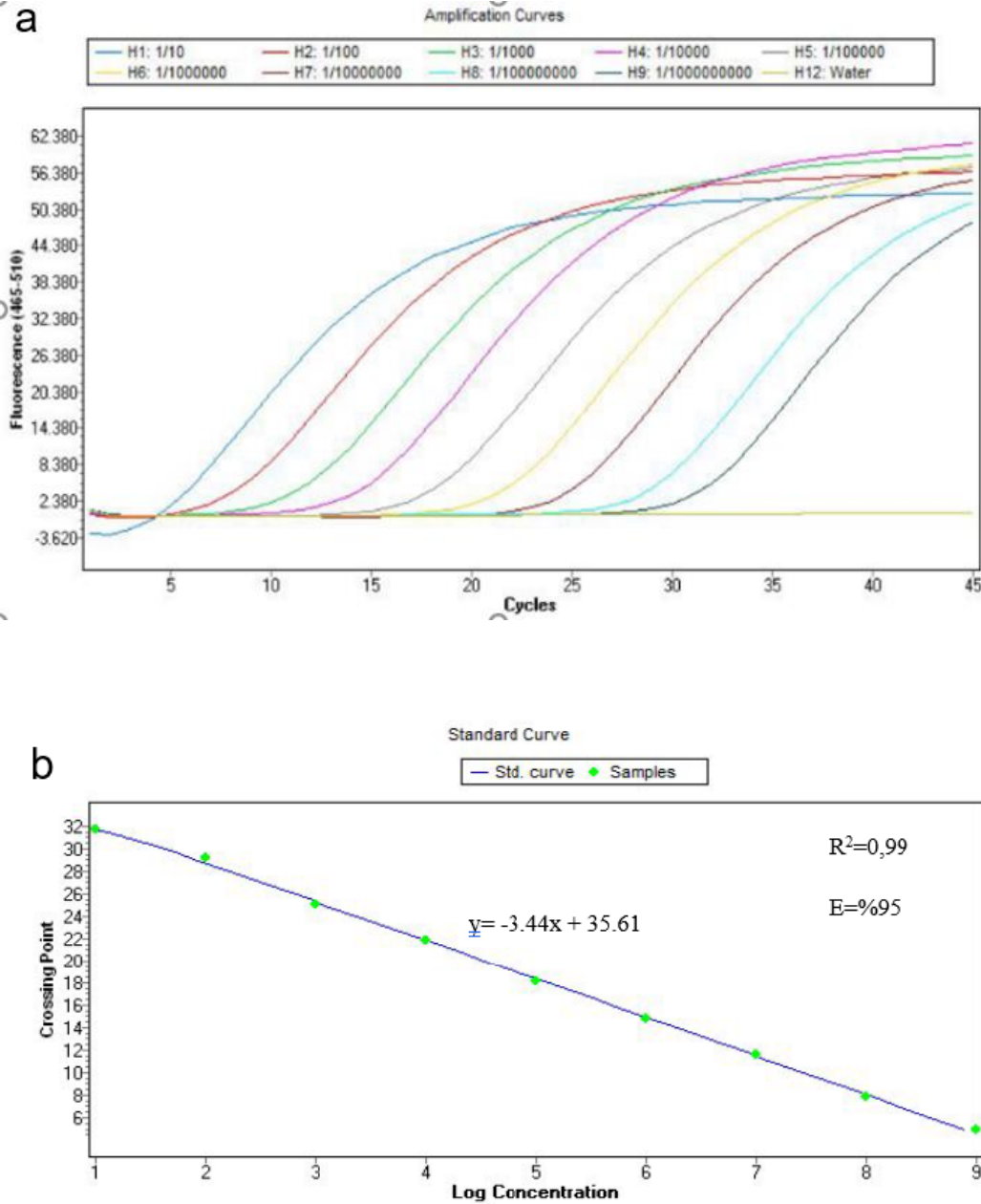


Şekil 4. 4. *Aphelenchoides besseyi* DNA'sın qPCR'da 1/10 oranında seyreltilmesi sonucu elde edilen değerler, **a**) Amplifikasyon eğrisi **b**) Standart eğri

Tek bir *A. besseyi* genomik DNA'sı 0.0005 pg'a kadar real-time PCR'da tespit edilebilmektedir. Ct değerlerine göre elde ettiğimiz standart eğrinin denklemi $y = -2.48x + 27.73$, korelasyon katsayısı (R^2) 0.95 ve real-time PCR etkinliği (E) %53 olduğu tespit edilmiştir.

4.4.1.2. Plazmid DNA'nın tespiti

Tek bir *A. besseyi* DNA'sından klonlanan plazmid DNA (9.3×10^{10})'nın Ct değerleri $5.00(\pm 0.0)$ - $31.61(\pm 0.04)$ arasında elde edilmiştir (Şekil 4.5 a, b)

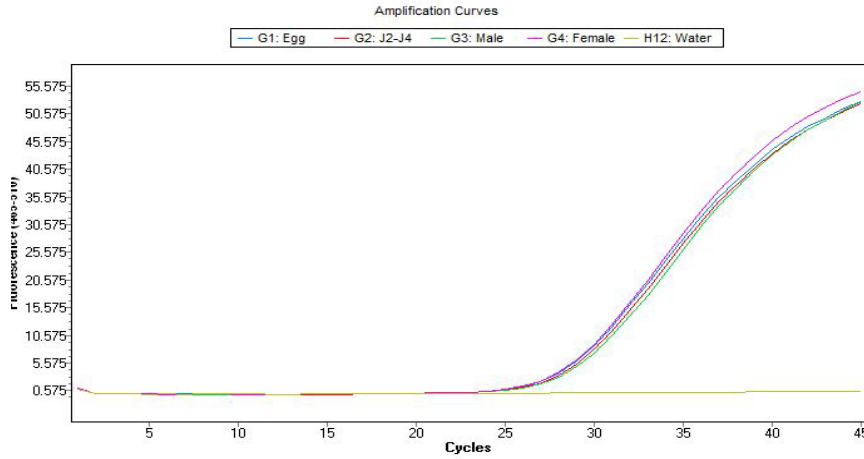


Şekil 4. 5. *Aphelenchoides besseyi* plazmid DNA'sının qPCR'da 1/10 oranında seyreltilmesi sonucu elde edilen değerler, a) Amplifikasyon eğrisi b) Standart eğri

Plazmid DNA'nın en küçük SSU rDNA gen kopya sayısı 9.3×10^1 olarak tespit edilmiştir. Amplifikasyon eğrisi sonucu oluşan standart eğrinin denklemi $y = -3.44x + 35.61$, korelasyon katsayısı 0.99 ve PCR etkinliği %99 olarak bulunmuştur.

4.4.2. Farklı biyolojik dönemlerinin tespiti

Aphelenchoides besseyi'nin 1'er adet yumurta, larva, erkek ve dişi bireylerinin real-time PCR'da hızlı şekilde tanımlanıp-tanımlanamayacağı incelenmiştir. Sonuç olarak, *A. besseyi* tüm yaşam dönemlerinde amplifikasyon eğrisi gözlemlenmiş, ortalama Ct değerleri sırasıyla ise 28.00 (± 0.34), 28.20 (± 0.27), 29.38 (± 0.38), 27.86 (± 0.39) olarak bulunmuştur (Şekil 4.6). Elde edilen Ct değerleri karşılaştırıldığında herhangi bir istatistiksel fark bulunmamıştır. Sonuç olarak, *A. besseyi*'nin herhangi bir biyolojik döneminde tanımlanması yapılabilmektedir (Çizelge 4.2)



Şekil 4. 6. *Aphelenchoides besseyi*'nin biyolojik dönemlerinin amplifikasyon eğrisi

Çizelge 4. 2. *Aphelenchoides besseyi*'nin biyolojik dönemlerinin Ct değerleri

<i>A. besseyi</i>	Eşik döngüsü (Ct)			Ort.* \pm SE
	Deneme 1	Deneme 2	Deneme 3	
Yumurta	28.20	27.35	28.46	28.00 \pm 0.34 a
Larva (L2-L4)	28.16	27.77	28.69	28.20 \pm 0.27 a
Erkek	30.15	28.99	29.01	29.38 \pm 0.38 a
Dişi	27.85	27.19	28.54	27.86 \pm 0.39 a

*Aynı sütunda bulunan ortalamaların aynı harfler arasında fark önemli değildir (P=0.05, Tukey's F test)
SE: Standart hata

4.4.3. Doğrudan bulaşık çeltik parçalarından *Aphelenchoides besseyi*'nin tespiti

Doğrudan çeltik dokularından elde edilen *A. besseyi* DNA'sı real-time PCR'da çalışma sonucu bulaşık ve pozitif kontrolde amplifikasyon eğrisi gözlemlenirken negatif kontrolde ve temiz çeltik parçalarında ve çeltik bitkisinin DNA'sında herhangi bir amplifikasyon eğrisi gözlemlenmemiştir. Elde edilen Ct değerleri sırasıyla 29.27 (± 1.25), 23.64 (± 0.59), 28.00 (± 2.14), 27.81 (± 0.20), 27.38 (± 0.51) ve 21.50 (± 0.26) olarak bulunmuştur.

Çizelge 4. 3. Bulaşık dokudan elde edilen *Aphelenchoides besseyi*'nin Ct değerleri

Örnekler	Eşik döngüsü (Ct) Değeri				Ort.* ± SE
	Deneme 1	Deneme 2	Deneme 3	Deneme 4	
<i>A. besseyi</i> (1 L)	27.58	27.34	27.58	28.37	27.81 ± 0.20 ab
<i>A. besseyi</i> (4 L)	26.10	27.11	27.89	28.43	27.38 ± 0.51 ab
<i>A. besseyi</i> (64 L)	21.88	21.70	20.73	21.68	21.50± 0.26 c
Bulaşık Dane	31.01	31.41	28.68	25.99	29.27 ± 1.25 a
Bulaşık Kavuz	24.21	24.74	23.59	22.01	23.63 ± 0.59 bc
Bulaşık Çeltik	26.86	26.92	34.10	24.11	28.00 ± 2.14 ab
Temiz Dane	-	-	-	-	-
Temiz Kavuz	-	-	-	-	-
Temiz Çeltik	-	-	-	-	-
<i>Oryza sativa</i>	-	-	-	-	-

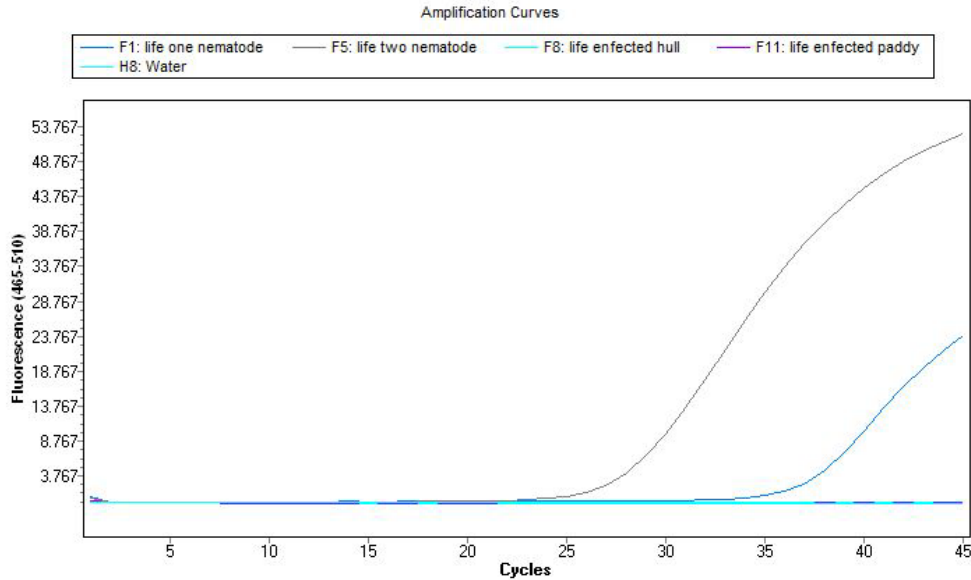
SE: Standard hata

* Aynı sütunda bulunan ortalamaların aynı harfler arasında fark önemli değildir (P=0.05, Tukey's F test).

- Amplifikasyon eğrisi görülmemiştir.

4.4.4. DNA izolasyonu yapılmadan *Aphelenchoides besseyi*'nin real-time PCR'da tespiti

Nematod bireylerinden DNA izolasyonu yapılmadan *A. besseyi*'nin canlı larvalarının tespiti yapılmıştır. Elde edilen verilere göre, canlı 1 adet nematodun Ct değeri 37.18, canlı 2 adet nematodun Ct değeri ise 34.19 olarak bulunmuştur (Şekil 4.7).

**Şekil 4. 7.** *Aphelenchoides besseyi*'nin DNA izolasyonu yapılmadan real-time PCR'da tespiti

Bulaşık çeltik dokularının DNA izolasyonu yapılmadan *A. besseyi*'nin tespiti içinde real time PCR yapılmıştır. Fakat sistem çalışmamıştır. Çünkü real-time PCR'ın çalışma prensibinde floresans ışınması sonucu Ct değeri okuma gerçekleştiği için bulaşık çeltik dokularının ışığı absorbe etmesinden kaynaklı Ct değerleri elde edilememiştir.

4.4.5. *Aphelenchoides* türleri arasından *Aphelenchoides besseyi*'nin tespiti

Aphelenchoides besseyi'nin DNA'sı diğer yakın türler ile birleştirilmiş ve real time PCR yapılmıştır. Karışık popülasyonlar arasında *A. besseyi* tanımlanmıştır. Tasarlanan probun *A. besseyi*'ye spesifik olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4. 4. *Aphelenchoides besseyi*'nin karışık örneklerin içinden qPCR ile tespiti

Örnekler	Eşik döngüsü (Ct)
<i>A. besseyi</i>	24.22
<i>A. fragariae</i>	-
<i>A. ritzemabosi</i>	-
<i>A. subtenuis</i>	-
<i>A. besseyi</i> + <i>A. fragariae</i>	22.79
<i>A. besseyi</i> + <i>A. ritzemabosi</i>	22.94
<i>A. besseyi</i> + <i>A. subtenuis</i>	22.84
<i>A. besseyi</i> + <i>A. fragariae</i> + <i>A. ritzemabosi</i>	25.04
<i>A. besseyi</i> + <i>A. fragariae</i> + <i>A. subtenuis</i>	24.94
<i>A. besseyi</i> + <i>A. ritzemabosi</i> + <i>A. subtenuis</i>	24.89
<i>A. besseyi</i> + <i>A. fragariae</i> + <i>A. ritzemabosi</i> + <i>A. subtenuis</i> .	22.77

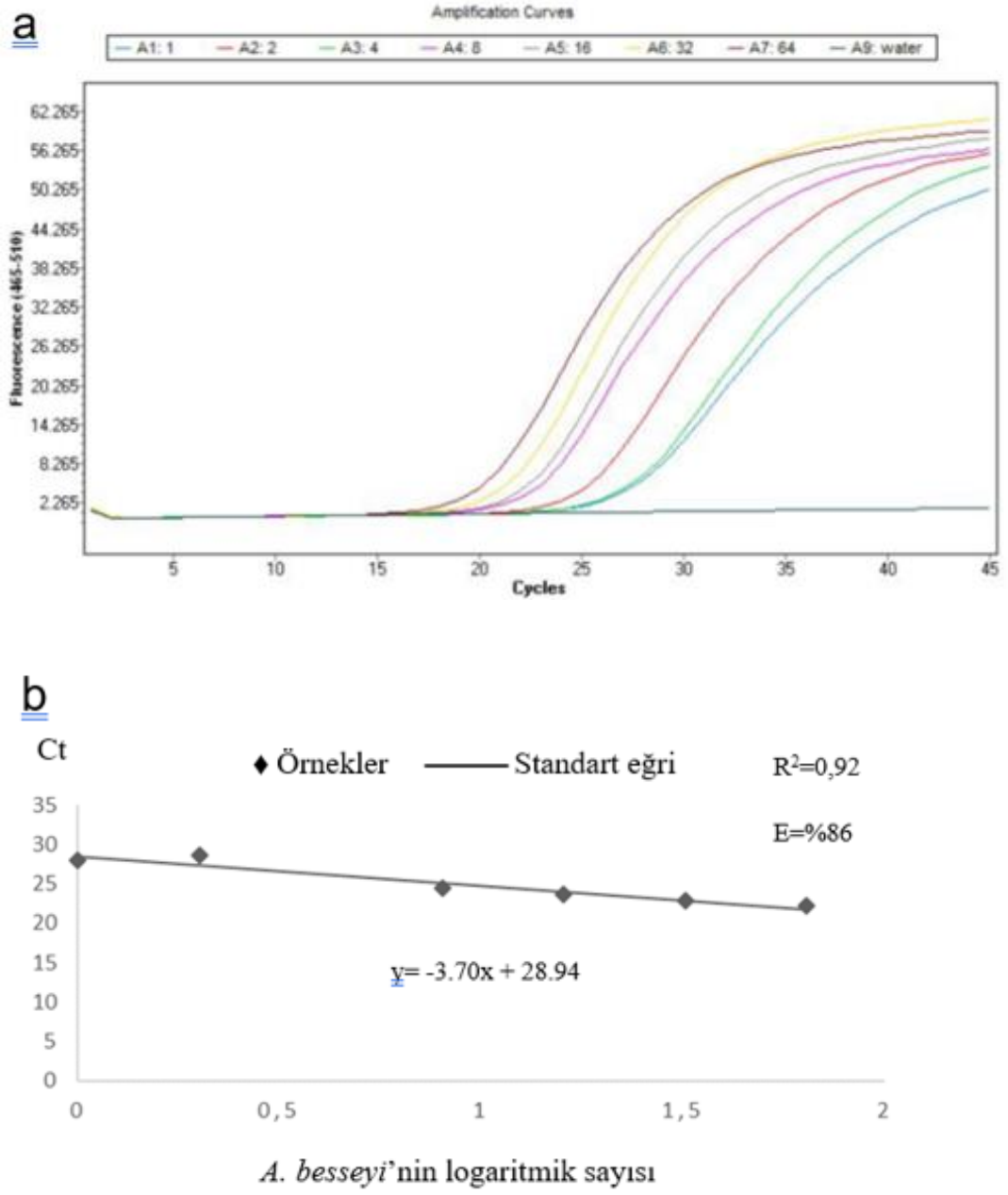
- Amplifikasyon eğrisi görülmemiştir

4.5. *Aphelenchoides besseyi*'nin Nicel Analizi

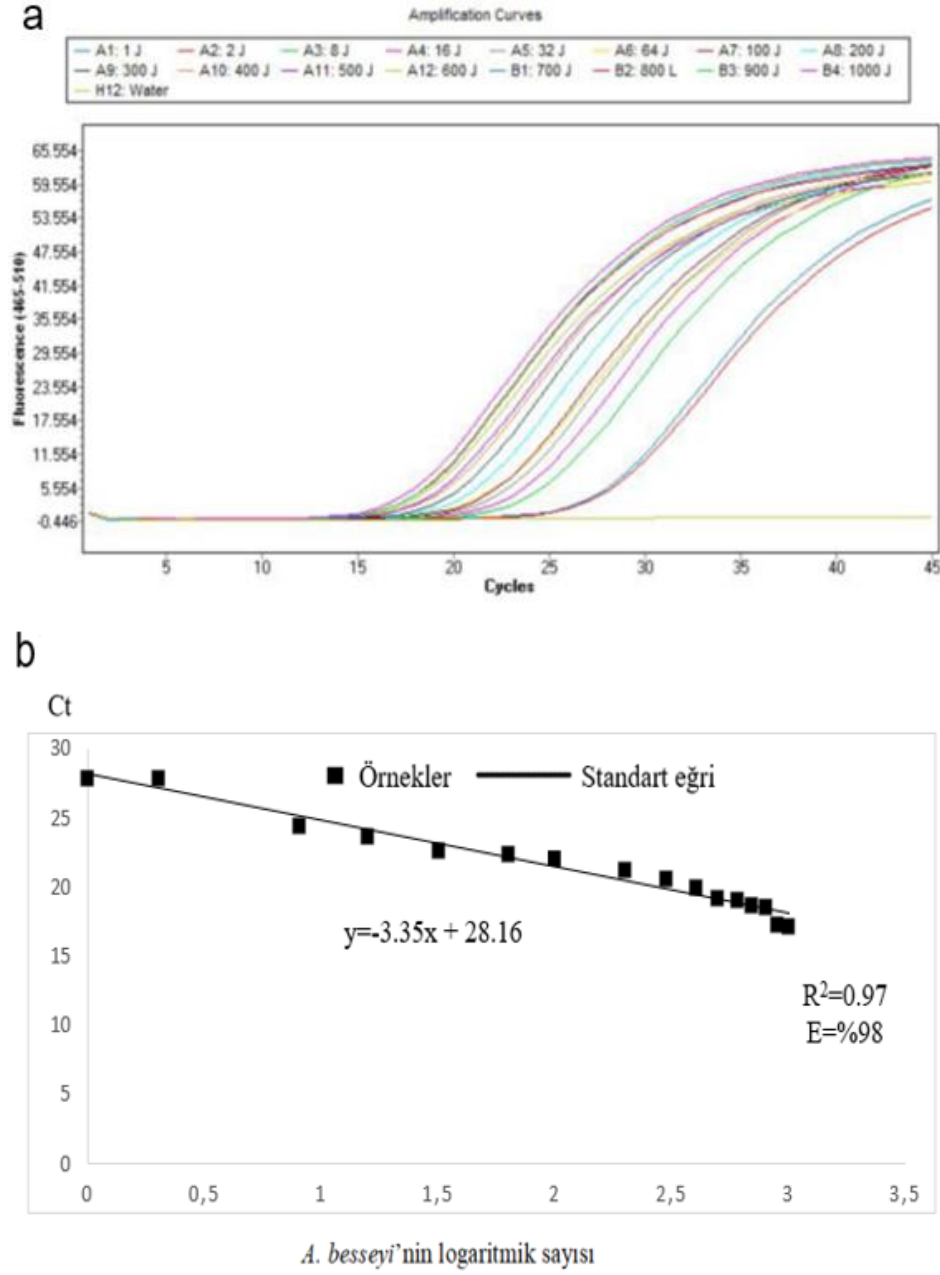
Marmara Bölgesi'nden toplanmış çeltik ve kavuz örneklerinde *A. besseyi* sayının tahmin edilmesini sağlayacak standart eğrinin denklemi için iki farklı grup çalışılmıştır.

1. Grup:1, 2, 8, 16, 32 ve 64 adet larvanın Ct değerleri sırasıyla 27.93(±2.23), 27.80(±0.18), 24.68(±0.14), 23.75(±0.37), 22.80(±0.30) ve 22.32(±0.36) olarak elde edilmiştir. Bu verilere göre elde edilen regresyon doğrusu $y=-3.70x+28.94$, korelasyon katsayısı $R^2=0.92$, qPCR etkinliği ise %86 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.8 a, b).

2. Grupta: 1, 2, 8, 16, 32, 64, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 ve 1000 adet *A. besseyi* larvalarının Ct değerleri ise sırasıyla, 27.87(±0.17), 27.83(±0.15), 24.39(±0.21), 23.72(±0.34), 22.66(±0.17), 22.35(±0.49), 22.04(±0.02), 21.19(±0.35), 20.52(±0.57), 19.91(±0.57), 19.25(±0.38), 18.97(±0.50), 18.63(±0.50), 18.48(±0.30), 17.29(±0.97) ve 17.18(±0.64) elde edilmiştir. Regresyon doğrusu $y=-3.35x+28.16$, korelasyon katsayısı $R^2=0.97$, qPCR etkinliği %98 olduğu bulunmuştur (Şekil 4.9 a, b). Negatif kontrolde herhangi bir amplifikasyon değeri elde edilmemiştir.



Şekil 4. 8. Grup 1'in a) amplifikasyon eğrisi ve b) standart eğri



Şekil 4. 9. Grup 2'nin a) Amplifikasyon eğrisi b) Standart eğri

Grup 1 ve Grup 2 analizleri sonucu edilen veriler karşılaştırıldığında Grup 2'nin rekrasyon eğrisinin denklemini kavuzda ve çeltikte *A. besseyi* sayılarını tahmin etmede kullanılmasına karar verilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.5'de ve 4.7'da verilmiştir.

Çizelge 4. 5. Marmara Bölgesi'nden toplanan çeltik örneklerinde *Aphelenchoides besseyi* miktarı

No	Tür	Konukçu/Çeşit	Orijin	Morfol. sayım (10 gr çeltik)	Real-time PCR			
					Ct-1	Ct-2	Ort. Ct	LDL*
1		Çeltik/ Bilinmeyen	İpsala, Edirne	1	31.35	32.82	32.08	0.06
2		Çeltik/ Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
3		Çeltik / Cameo	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
4		Çeltik /Luna	İpsala, Edirne	4	28.90	28.46	28.68	0.69
5		Çeltik / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	3	27.22	32.62	29.92	0.29
6		Çeltik / Krasnador	Rusya	-	-	-	-	-
7		Çeltik / Luna	Kadındurma köyü/ Meriç, Edirne	-	-	-	-	-
8		Çeltik / Luna	Kadındurma köyü/Meriç, Edirne	1	31.27	33.13	32.20	0.06
9		Çeltik / Kale	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	-	-	-	-	-
10		Çeltik / Kale	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	-	-	-	-	-
11		Çeltik / Luna	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	-	-	-	-	-
12		Çeltik / Luna	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	-	-	-	-	-
13		Çeltik / Osmancık	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	-	-	-	-	-
14		Çeltik / Osmancık	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	2	31.32	32.59	31.95	0.07
15		Çeltik / Bilinmeyen	Arnavutköy/Meriç, Edirne	5	31.25	32.34	31.79	0.08
16		Çeltik / Bilinmeyen	Arnavutköy/Meriç, Edirne	-	-	-	-	-
17		Çeltik / Yatkın	Akıncılar köyü/Meriç, Edirne	-	-	-	-	-
18		Çeltik / Yatkın	Akıncılar köyü/Meriç Edirne	1	30.99	33.67	32.33	0.05
19		Çeltik / Yatkın	Karakasım/ Merkez, Edirne	1	31.53	32.8	32.16	0.06
20		Çeltik / Yatkın	Karakasım/ Merkez, Edirne	9	27.94	27.17	27.55	1.51
21		Çeltik / Luna	Karakasım / Merkez, Edirne	3	31.29	32.8	32.04	0.06
22		Çeltik / Luna	Karakasım/ Merkez, Edirne	-	-	-	-	-
23		Çeltik / Luna	Meriç, Edirne	-	-	-	-	-
24		Çeltik / Luna	Meriç, Edirne	-	-	-	-	-
25		Çeltik / Bilinmeyen	Balaban köy/ Merkez, Edirne	-	-	-	-	-
26		Çeltik / Bilinmeyen	Balaban köy/ Merkez, Edirne	-	-	-	-	-
27		Çeltik / Yatkın	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	15	23.90	24.25	24.07	16.57
28		Çeltik / Yatkın	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	14	23.69	23.84	23.76	20.50
29		Çeltik / Çakmak	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	7	26.66	28.30	27.48	1.59
30		Çeltik / Çakmak	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	-	-	-	-	-
31	A. besseyi	Çeltik / Yatkın	Hayrabolu, Tekirdağ	-	-	-	-	-
32		Çeltik / Yatkın	Hayrabolu, Tekirdağ	2	31.60	32.61	32.10	0.06
33		Çeltik / Yatkın	Hayrabolu, Tekirdağ	-	-	-	-	-
34		Çeltik / Yatkın	Hayrabolu, Tekirdağ	4	30.33	31.79	31.06	0.13
35		Çeltik / Luna	Hayrabolu, Tekirdağ	1	31.95	32.97	32.46	0.05
36		Çeltik / Luna	Hayrabolu, Tekirdağ	-	-	-	-	-
37		Çeltik / Osmancık	Hayrabolu, Tekirdağ	-	-	-	-	-
38		Çeltik / Osmancık	Hayrabolu, Tekirdağ	1	31.35	32.64	31.99	0.07
39		Çeltik / Bilinmeyen	Pehlivan köyü, Kırklareli	-	-	-	-	-
40		Çeltik / Bilinmeyen	Pehlivan köyü, Kırklareli	1	31.12	32.69	31.90	0.07
41		Çeltik /Osmancık	Pehlivan köyü, Kırklareli	1	30.72	32.50	31.61	0.09
42		Çeltik /Osmancık	Pehlivan köyü, Kırklareli	3	27.64	30.78	29.21	0.48
43		Çeltik / Yatkın	Tevfikine/ İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
44		Çeltik / Yatkın	Tevfikine/ İpsala, Edirne	2	31.57	32.84	32.20	0.06
45		Çeltik / Yatkın	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	-	-	-	-	-
46	Çeltik / Yatkın	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	4	28.91	27.08	27.99	1.12	
47	Çeltik / Bilinmeyen	Pehlivan köyü, Kırklareli	2	31.18	30.92	31.05	0.13	
48	Çeltik / Bilinmeyen	Pehlivan köyü, Kırklareli	-	-	-	-	-	
49	Çeltik / Cameo	Görece/Uzunköprü, Edirne	2	30.46	30.11	30.28	0.23	
50	Çeltik / Cameo	Görece/Uzunköprü, Edirne	29	23.85	23.46	23.65	22.11	
51	Çeltik / Bilinmeyen	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	5	28.57	27.13	26.01	4.36	
52	Çeltik / Bilinmeyen	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	4	30.85	30.89	30.87	0.15	
53	Çeltik /Osmancık	Erhaniye/Keşan, Edirne	-	-	-	-	-	
54	Çeltik /Osmancık	Erhaniye/Keşan, Edirne	-	-	-	-	-	
55	Çeltik / Cameo	Kadriye, Merkez/ Edirne	2	31.51	31.35	31.43	0.10	
56	Çeltik / Cameo	Kadriye/ Merkez, Edirne	3	30.78	30.55	30.66	0.17	
57	Çeltik / Cameo	Balabanköy/Uzunköprü, Edirne	1	30.48	30.57	30.52	0.19	
58	Çeltik / Cameo	Balabanköy/Uzunköprü, Edirne	4	28.75	28.36	28.55	0.76	
59	Çeltik / Unknown	Pehlivan köyü, Kırklareli	1	31.16	31.25	31.20	0.12	
60	Çeltik / Unkown	Pehlivan köyü, Kırklareli	1	31.29	31.18	31.23	0.12	
61	Çeltik / Kızıltan	Sığircık/Uzunköprü, Edirne	-	-	-	-	-	
62	Çeltik / Kızıltan	Sığircık/Uzunköprü, Edirne	1	30.48	30.64	30.56	0.19	
63	Çeltik / Cameo	Uzunköprü, Edirne	1	26.93	26.93	26.93	2.32	

Çizelge 4. 5.'in devamı

No	Tür	Konukçu/Çeşit	Orijin	Morfol. sayım (10 gr çeltik)	Real-time PCR			
					Ct-1	Ct-2	Ort. Ct	LDL*
64		Çeltik / Osmancık	Uzunköprü, Edirne	2	28.04	27.68	27.86	1.22
65		Çeltik / Vasko	Uzunköprü, Edirne	1	30.86	30.97	30.91	0.15
66		Çeltik / Vasko	Uzunköprü, Edirne	-	-	-	-	-
67		Çeltik / Cameo	Keşan, Edirne	2	29.01	27.71	28.36	0.87
68		Çeltik / Yatkın	Keşan, Edirne	1	30.55	30.97	30.76	0.16
69		Çeltik / Osmancık	Keşan, Edirne	-	-	-	-	-
70		Çeltik / Cameo	Karpuzlu/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
71		Çeltik / Yatkın	Karpuzlu/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
72		Çeltik / Yatkın	Karpuzlu/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
73		Çeltik / Yatkın	Karpuzlu/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
74		Çeltik / Cameo	Pehlivan köyü, Kırklareli	8	25.39	26.54	25.96	4.52
75		Çeltik / Krasnador	Rusya	1	29.10	28.84	28.97	0.57
76		Çeltik / Luna	Paşaköy/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
77		Çeltik / Luna	Paşaköy/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
78		Çeltik / Cameo	Yeni karpuzlu/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
79		Çeltik / Cameo	Koyuntepe/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
80		Çeltik / Luna	Koyuntepe/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
81		Çeltik / Luna	Koyuntepe/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
82		Çeltik / Luna	Yeni Karpuzlu/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
83	A. besseyi	Çeltik / Luna	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
84		Çeltik / Luna	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
85		Çeltik / Luna	Paşaköy/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
86		Çeltik / Luna	Kadıondurma/Meriç, Edirne	-	-	-	-	-
87		Çeltik / Ülfet	Karpuzlu/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
88		Çeltik / Luna	Paşaköy/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
89		Çeltik / Luna	Türkmen/ Keşan, Edirne	-	-	-	-	-
90		Çeltik / Luna	Orhaniye/Merkez, Edirne	-	-	-	-	-
91		Çeltik / Luna	Karpuzlu/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
92		Çeltik / Yatkın	Karpuzlu/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
93		Çeltik / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
94		Çeltik / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
95		Çeltik / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
96		Çeltik / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
89	Çeltik / Luna	Türkmen/ Keşan, Edirne	-	-	-	-	-	
90	Çeltik / Luna	Orhaniye/Merkez, Edirne	-	-	-	-	-	
91	Çeltik / Luna	Karpuzlu/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
92	Çeltik / Yatkın	Karpuzlu/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
93	Çeltik / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
94	Çeltik / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
95	Çeltik / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
96	Çeltik / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	

- Amplifikasyon eğrisi görülmemiştir

*LDL: Low detection limit

Toplanan 96 adet çeltik örneği morfolojik olarak mikroskop altında incelendiğinde 41 adet örneğin *A. besseyi* ile bulaşık olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Bulaşık örneklerden elde edilen DNA'ların hepsinde real-time PCR'da amplifikasyon eğrisi oluşmuştur. Aynı zamanda, pozitif kontrolde de amplifikasyon eğri oluşurken negatif kontrolde herhangi bir amplifikasyon eğri gözlemlenmemiştir. Real-time PCR'da elde edilen Ct değerlerinin ortalamalarından en düşük nematod miktarı (LDL) 0.05-22.11 arasında bulunmuştur. Ayrıca, elde edilen Ct değerlerine göre düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç seviyeden oluşan skala değeri oluşturulmuştur (Çizelge 4.6). Bu skala değerine göre 38 adet örnek düşük bulaşık seviyesi gösterirken 3 adet örnek orta derecede bulaşık göstermiştir.

Çizelge 4. 6. *Aphelenchoides besseyi*'nin Ct değerlerine göre oluşturulmuş bulaşma skalası

Seviye	Ct değeri	Nematod sayısı
Düşük	40.00-24.81	1-10
Orta	21.47-24.80	11-99
Yüksek	17.00-21.46	≥100

Toplanan 96 adet kavuz örneği morfolojik olarak mikroskop altında incelendiğinde 54 adet örneğin *A. besseyi* ile bulaşık olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7). Bulaşık örneklerden elde ettiğimiz DNA'larda ve pozitif kontrolde amplifikasyon eğrisi oluşmuştur. Beklendiği gibi negatif kontrolde ise amplifikasyon eğrisi gözlemlenmemiştir. Real-time PCR'da elde edilen Ct değerlerinin ortalamalarından en düşük nematod miktarı (LDL) 0.20- 221.95 arasında tespit edilmiştir. Skalaya göre 43 adet örneğin düşük seviyede, 7 adet örneğin orta seviyede, 4 adet örneğin de yüksek seviyede bulaşık olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4. 7. Marmara Bölgesi'nden toplanan kavuz örneklerinde *Aphelenchoides besseyi* miktarı

No	Tür	Konukçu/Çeşit	Orijin	Morfol. sayım (5 gr kavuz)	Real-time PCR			
					Ct-1	Ct-2	Ort. Ct	LDL*
1		Kavuz/ Bilinmeyen	İpsala, Edirne	1	30.01	30.04	30.02	0.27
2		Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	2	25.04	27.62	26.33	3.50
3		Kavuz / Cameo	İpsala, Edirne	7	24.22	26.11	25.16	7.80
4		Kavuz / Luna	İpsala, Edirne	10	24.87	25.69	25.28	7.20
5		Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	6	25.57	26.00	25.78	5.11
6		Kavuz / Krasnador	Rusya	5	25.94	26.24	26.09	4.14
7		Kavuz / Luna	Kadıdondurma köyü/ Meriç, Edirne	1	26.35	28.84	27.59	1.47
8		Kavuz / Luna	Kadıdondurma köyü/Meriç, Edirne	-	-	-	-	-
9		Kavuz / Kale	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	8	24.74	24.83	24.78	10.17
10		Kavuz / Kale	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	-	-	-	-	-
11		Kavuz / Luna	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	3	26.61	26.04	26.32	3.52
12		Kavuz / Luna	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	-	-	-	-	-
13		Kavuz / Osmancık	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	2	26.29	26.47	26.38	3.32
14		Kavuz / Osmancık	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	1	26.93	27.72	27.32	1.77
15		Kavuz / Bilinmeyen	Arnavutköy/Meriç, Edirne	3	27.19	27.85	27.52	1.55
16		Kavuz / Bilinmeyen	Arnavutköy/Meriç, Edirne	2	26.91	26.55	26.73	2.67
17		Kavuz / Yatkın	Akıncılar köyü/Meriç, Edirne	3	26.70	26.95	26.82	2.50
18	A. besseyi	Kavuz / Yatkın	Akıncılar köyü/Meriç Edirne	-	-	-	-	-
19		Kavuz / Yatkın	Karakasım/ Merkez, Edirne	-	-	-	-	-
20		Kavuz / Yatkın	Karakasım/ Merkez, Edirne	34	23.17	23.46	23.31	27.94
21		Kavuz / Luna	Karakasım / Merkez, Edirne	1	27.64	28.11	27.87	1.21
22		Kavuz / Luna	Karakasım/ Merkez, Edirne	-	-	-	-	-
23		Kavuz / Luna	Meriç, Edirne	-	-	-	-	-
24		Kavuz / Luna	Meriç, Edirne	5	25.22	26.12	25.67	5.53
25		Kavuz / Bilinmeyen	Balaban köy/ Merkez, Edirne	14	23.25	23.90	23.57	23.36
26		Kavuz / Bilinmeyen	Balaban köy/ Merkez, Edirne	-	-	-	-	-
27		Kavuz / Yatkın	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	145	20.11	20.49	20.30	221.95
28	Kavuz / Yatkın	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	120	21.16	21.25	21.20	119.15	
29	Kavuz / Çakmak	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	1	27.72	28.33	28.02	1.09	
30	Kavuz / Çakmak	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	8	25.49	25.16	25.32	7.01	
31	Kavuz / Yatkın	Hayrabolu, Tekirdağ	1	29.86	30.16	30.01	0.28	
32	Kavuz / Yatkın	Hayrabolu, Tekirdağ	-	-	-	-	-	
33	Kavuz / Yatkın	Hayrabolu, Tekirdağ	2	27.51	27.89	27.70	1.37	
34	Kavuz / Yatkın	Hayrabolu, Tekirdağ	1	26.87	28.28	27.57	1.49	
35	Kavuz / Luna	Hayrabolu, Tekirdağ	1	27.85	27.94	27.89	1.19	
36	Kavuz / Luna	Hayrabolu, Tekirdağ	-	-	-	-	-	
37	Kavuz / Osmancık	Hayrabolu, Tekirdağ	-	-	-	-	-	
38	Kavuz / Osmancık	Hayrabolu, Tekirdağ	3	27.71	27.74	27.72	1.34	

Çizelge 4.7.'nin devamı

No	Speci	Konukçu/Çeşit	Orijin	Morfol. sayım (5 gr kavuz)	Real-time PCR			
					Ct-1	Ct-2	Ort. Ct	LDL*
39		Kavuz / Bilinmeyen	Pehlivanköy, Kırklareli	-	-	-	-	-
40		Kavuz / Bilinmeyen	Pehlivanköy, Kırklareli	-	-	-	-	-
41		Kavuz / Osmançık	Pehlivanköy, Kırklareli	2	26.03	26.96	26.49	3.14
42		Kavuz / Osmançık	Pehlivanköy, Kırklareli	-	-	-	-	-
43		Kavuz / Yatkın	Tevfikine/ İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
44		Kavuz / Yatkın	Tevfikine/ İpsala, Edirne	5	26.74	26.82	26.78	2.58
45		Kavuz / Yatkın	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	3	27.09	26.82	26.95	2.28
46		Kavuz / Yatkın	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	2	27.42	27.83	27.62	1.44
47		Kavuz / Bilinmeyen	Pehlivanköy, Kırklareli	-	-	-	-	-
48		Kavuz / Bilinmeyen	Pehlivanköy, Kırklareli	-	-	-	-	-
49		Kavuz / Cameo	Görece/Uzunköprü, Edirne	33	23.75	23.08	23.41	26.08
50		Kavuz / Cameo	Görece/Uzunköprü, Edirne	2	26.30	26.78	26.54	3.04
51		Kavuz / Bilinmeyen	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	4	26.20	26.00	26.10	4.12
52		Kavuz / Bilinmeyen	Solarlı köyü/ Uzunköprü, Edirne	1	26.32	28.79	27.55	1.51
53		Kavuz / Osmançık	Erhaniye/Keşan, Edirne	-	-	-	-	-
54		Kavuz / Osmançık	Erhaniye/Keşan, Edirne	2	29.86	30.80	30.33	0.22
55		Kavuz / Cameo	Kadriye, Merkez, Edirne	4	26.20	26.90	26.55	3.02
56		Kavuz / Cameo	Kadriye/ Merkez, Edirne	2	26.40	27.34	26.87	2.42
57		Kavuz / Cameo	Balabanköy/Uzunköprü, Edirne	1	30.12	30.81	30.46	0.20
58		Kavuz / Cameo	Balabanköy/Uzunköprü, Edirne	1	27.74	28.85	28.29	0.91
59		Kavuz / Bilinmeyen	Pehlivanköy, Kırklareli	-	-	-	-	-
60		Kavuz / Bilinmeyen	Pehlivanköy, Kırklareli	1	29.06	30.04	29.55	0.38
61		Kavuz / Kızıltan	Siğircık/Uzunköprü, Edirne	-	-	-	-	-
62		Kavuz / Kızıltan	Siğircık/Uzunköprü, Edirne	1	29.71	30.65	30.18	0.24
63		Kavuz / Cameo	Uzunköprü, Edirne	75	22.02	21.98	22.00	68.99
64		Kavuz / Osmançık	Uzunköprü, Edirne	4	25.54	25.24	25.37	6.71
65		Kavuz / Vasko	Uzunköprü, Edirne	3	29.48	30.17	29.82	0.31
66		Kavuz / Vasko	Uzunköprü, Edirne	-	-	-	-	-
67		Kavuz / Cameo	Keşan, Edirne	29	24.06	24.05	24.05	16.80
68		Kavuz / Yatkın	Keşan, Edirne	6	25.49	25.63	25.56	5.97
69		Kavuz / Osmançık	Keşan, Edirne	6	27.20	26.62	26.91	2.36
70	A. besveyi	Kavuz / Cameo	Karpuzlu/İpsala, Edirne	324	18.02	19.93	18.97	2.74
71		Kavuz / Yatkın	Karpuzlu/İpsala, Edirne	37	22.49	23.15	22.82	1.59
72		Kavuz / Yatkın	Karpuzlu/İpsala, Edirne	202	20.63	20.76	20.69	169.18
73		Kavuz / Yatkın	Karpuzlu/İpsala, Edirne	57	22.64	22.49	22.56	46.78
74		Kavuz / Cameo	Pehlivanköy, Kırklareli	5	26.93	26.05	26.49	3.15
75		Kavuz / Krasnador	Rusya	9	25.60	25.33	25.46	6.37
76		Kavuz / Luna	Paşaköy/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
77		Kavuz / Luna	Paşaköy/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
78		Kavuz / Cameo	Yeni karpuzlu/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
79		Kavuz / Cameo	Koyuntepe/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-
80	Kavuz / Luna	Koyuntepe/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
81	Kavuz / Luna	Koyuntepe/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
82	Kavuz / Luna	Yeni Karpuzlu/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
83	Kavuz / Luna	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
84	Kavuz / Luna	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
85	Kavuz / Luna	Paşaköy, /İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
86	Kavuz / Luna	Kadındondurma/Meriç, Edirne	-	-	-	-	-	
87	Kavuz / Ülfet	Karpuzlu/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
88	Kavuz / Luna	Paşaköy/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
89	Kavuz / Luna	Türkmen/ Keşan, Edirne	-	-	-	-	-	
90	Kavuz / Luna	Orhaniye/Merkez, Edirne	-	-	-	-	-	
91	Kavuz / Luna	Karpuzlu/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
92	Kavuz / Yatkın	Karpuzlu/İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
93	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
94	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
95	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
96	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
97	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
98	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
99	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
100	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
101	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
102	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
103	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
104	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
105	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
106	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
107	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
108	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
109	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
110	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
111	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
112	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
113	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
114	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
115	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
116	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
117	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
118	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
119	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
120	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
121	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
122	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
123	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
124	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
125	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
126	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
127	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
128	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
129	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
130	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
131	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
132	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
133	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
134	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
135	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
136	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
137	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
138	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
139	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
140	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
141	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
142	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
143	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
144	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
145	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
146	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
147	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
148	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
149	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
150	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
151	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
152	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
153	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
154	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
155	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
156	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
157	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
158	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
159	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
160	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
161	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
162	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
163	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
164	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
165	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
166	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
167	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
168	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
169	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
170	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
171	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
172	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
173	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
174	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
175	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
176	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
177	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
178	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
179	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
180	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
181	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
182	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
183	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
184	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
185	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
186	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
187	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
188	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
189	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
190	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
191	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
192	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
193	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
194	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
195	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
196	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
197	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
198	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
199	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	
200	Kavuz / Bilinmeyen	İpsala, Edirne	-	-	-	-	-	

4.6. *Aphelenchoides besseyi*'nin Canlı/Ölü Ayrımında PMA ve Reagent D'nin Karşılaştırılması

Real-time PCR'da elde edilen Ct değerlerine göre *A. besseyi*'nin canlı-ölü ayrımında grup içi ve gruplar arası istatistiksel olarak ($p=0.05$) farklılıkların olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). Buna göre canlı bireylerden elde edilmiş genomik DNA'ların Ct değerleri incelendiğinde kontrol ve PMA uygulanan örneklerde farklılık gözlemlenmezken Reagent D'nin kontrole göre farklı olduğu tespit edilmiştir. Oda sıcaklığında doğal olarak ölen ve 60°C sıcak suya maruz bırakılan bireylerden elde edilen kontrolün Ct değerleri, reagent D ve PMA'ya göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Sıcak suya (40°C) maruz bırakılan *A. besseyi*'nin larvalarının kontrol ve Reagent D uygulaması sonucu elde edilmiş Ct değerleri PMA uygulamasının Ct değerine göre yüksek bulunmuştur.

Reagent D solüsyonu grup içinde örnekler arasında karşılaştırıldığında ise 60°C sıcak suya maruz bırakılan örneğin Ct değeri canlı örneğin Ct değerinden daha yüksek iken doğal olarak ölen örneğin Ct değerlerinden düşük çıktığı tespit edilmiştir. Canlı örneğin Ct değeri ile 40°C sıcak suya maruz bırakılan örneğin Ct değeri arasında herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir.

PMA solüsyonu uygulanan canlı ve 40°C sıcak suya maruz bırakılan örneklerin arasında herhangi bir farklılık gözlemlenmemişken bu örnekler ile ölü ve 60°C sıcak suya maruz bırakılan örnekler arasında önemli bir farklılık tespit edilmiştir.

Kontrol grubundaki örnekler arasında ise herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Çizelge 4. 8. *Aphelenchoides besseyi*'nin canlı-ölü karşılaştırması için elde edilen Ct değerleri

<i>Aphelenchoides besseyi</i> (50 adet)	Reagent D	PMA	Kontrol
Canlı	19.79 B ^x c ^y	20.44 AB ^x b ^y	20.80 A ^x a ^y
Ölü ¹	23.79 A a	23.29 A a	21.30 B a
40°C ²	20.04 AB c	19.80 B b	20.46 A a
60°C ²	22.60 A b	22.83 A a	21.45 B a

^x Aynı satır içerisinde ayrı büyük harf alan ortalamalar arasındaki fark Tukey's ($P=0.05$) testine göre önemli bulunmuştur.

^y Aynı sütun içerisinde ayrı küçük harf alan ortalamalar arasındaki fark Tukey's ($P=0.05$) testine göre önemli bulunmuştur.

¹ Oda sıcaklığında (20°C) normal ölüm gerçekleşen bireyler

² Sıcak su banyosunda sıcaklığa maruz bırakılan bireyler

5. TARTIŞMA

Aphelenchoides besseyi tohum kökenli karantina zararlısı olup, çeltikte önemli derecede ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Bundan dolayı, *A. besseyi* ile yapılacak mücadelenin başarısı için, hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanması önemlidir. Bu çalışmada Trakya bölgesinde çeltik yetiştirilen alanlardan toplanan *A. besseyi* popülasyonları moleküler yöntemler (geleneksel PCR ve real time PCR) kullanılarak tanımlanmış ve ayrıca çeltik tohumlarında *A. besseyi*'nin nicel analizi yapılmıştır.

Aphelenchoides besseyi popülasyonlarını moleküler düzeyde tanımlamak için farklı stratejiler izlenmiştir. Bunun için öncelikle Devran vd. (2017) tarafından geliştirilen *A. besseyi*'ye özgü primer setleri kullanılmıştır. Çeltik alanlarından toplanıp analize alınan tüm örneklerin *A. besseyi* olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar, Devran vd (2017) bulguları ile uyumluluk göstermiştir. Moleküler çalışmalarda diğer *Aphelenchoides* türleri (*A. fragariae*, *A. subtenuis* ve *A. ritzemabosi*) kontrol amaçlı olarak analizlere dahil edilmiştir. Bu çalışma kapsamında bir diğer yaklaşım olarak *A. besseyi*'nin SSU rDNA bölgesinden tasarlanan yeni primerler ile de aynı şekilde örnekler analize alınmıştır. *A. besseyi* popülasyonlarında beklenen DNA bantları elde edilmiş, yakın türlerde ise PCR ürünü elde edilmemiştir. Geleneksel PCR sonucu Trakya Bölgesi çeltik yetiştirilen alanlardan *A. besseyi* olduğu şüphesi ile toplanan tüm örneklerin çeltik beyaz uç nematodu olduğu moleküler olarak teyit edilmiştir.

Çeltik beyaz uç nematodu popülasyonlarının moleküler olarak tanımlanması için başka bir yöntem olarak TaqMan prob sistemine bağlı real time PCR kullanılmıştır. Bu kapsamda *A. besseyi*'nin SSU rDNA bölgesinden tasarlanan TaqMan probu kullanılarak popülasyonların amplifikasyon eğrisi ve Ct değerleri elde edilmiştir. Bu çalışma için iki farklı primer seti, 3 farklı real time PCR döngüsünde çalışılmıştır. Elde edilen Ct değeri ve amplifikasyon eğrilerine göre, AbF11/Abr22 primer setinin en iyi sonucu verdiği ve bu primer setinin real time Koşul 3 protokolünde çalıştığı belirlenmiştir. Rybarczyk-Mydlowska vd. (2012), *A. besseyi*, *A. fragariae*, *A. ritzemabosi* ve *A. subtenuis* türlerini SYBR Green I boyası kullanarak real-time PCR ile tanımlamışlardır. Fakat DNA'ya spesifik olarak bağlanmayan (SYBR Green I boyası vb.) boyalar ile yapılan real-time PCR yöntemi, TaqMan real-time PCR yöntemine göre daha spesifik tanımlama gerçekleştirmemektedir (La Paz vd. 2007; Sayler vd. 2012). Bu yüzden, TaqMan real-time PCR yöntemi bitki parazit nematodların tanımlanmasında son yıllarda yaygın şekilde kullanılmaktadır (Cao vd. 2005; François vd. 2007; Huang vd. 2010). Bu çalışma sonucu geliştirilen TaqMan prob, tüm *A. besseyi* popülasyonlarında beklenen amplifikasyon eğrisi oluşturmuş, diğer yakın türler ve uzak türlerde herhangi bir eğri oluşturmamıştır. Sonuçlar, geliştirilen TaqMan probun *A. besseyi*'ye özgü olduğunu göstermiştir.

Aphelenchoides besseyi, *Aphelenchoides* türleri arasında SSU rDNA bölgesinden tasarlanan primerler ve TaqMan probuyla real-time PCR'da hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmıştır. Buonicontro vd. (2018), çim alanlarından elde ettikleri *A. fujianensis* ve *A. besseyi*'yi, LSU rDNA bölgesinden elde edilmiş primerler ve TaqMan probuyla real-time PCR'da tanımlamışlardır. Fakat *A. fujianensis* primer/prob seti *A. fujianensis* haricinde bir *A. besseyi* popülasyonunda çapraz reaksiyon meydana geldiğini ve sebebinin de tasarlanan LSU rDNA bölgesinin varyasyonundan kaynaklandığını bildirmiştir. Daha önceki çalışmalarda, SSU rDNA bölgesi korunmuş bir bölge olduğu,

türler arası varyasyonun az olduğu ve *Aphelenchoides* türlerinin tanımlanmasında ve filogenetik haritasının çıkarılmasında yeterli olduğu bildirilmiştir (Chizhov vd. 2006; van den Elsen vd. 2009; Rybarczyk-Mydlowska vd. 2012). Başka bir çalışmada, mtCOI bölgesinden tasarlanan primerlerin dört önemli *Aphelenchoides* türünün tanımlanmasında ve filogenetik haritasının oluşturulmasında başarılı olduğu rapor edilmiştir (Sanchez-Monge vd. 2017). Bu çalışmada, real time PCR kullanılarak, SSU rDNA bölgesinden tasarlanan probun, Marmara Bölgesi'nde bulunan *A. besseyi* popülasyonlarının tanımlanmasında hızlı ve güvenilir sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Real-time PCR yöntemiyle, *A. besseyi*'nin tek larvadan elde edilmiş genomik DNA'dan belirlenen en düşük DNA miktarı 0.0005 pg olarak belirlenmiştir. Böylelikle tek bir larvadan elde edilecek genomik DNA'nın *A. besseyi*'nin tanımlanmasında yeterli olduğu tespit edilmiştir. François vd. (2007), TaqMan denemesiyle *Bursaphelenchus xylophilus*'un en düşük genomik DNA'sını 1 pg'a tespit ederken, Cao vd. (2005) ve Huang vd. (2010) en düşük genomik DNA'sının 0.01 ng kadar belirlenebileceği bildirmiştir. Sapkoto vd. (2016), *Meloidogyne hapla*'nın, TaqMan denemesiyle tespit edilebilecek en düşük genomik DNA'nın 0.5 pg olduğu bildirilmiştir. *Meloidogyne chitwoodi* ve *M. fallax* ise en düşük genomik DNA miktarı 100 fg olarak belirlenmiştir (Ziljstra ve van Hoof 2006). Bu sonuçlar, tek bir larvadan elde edilecek genomik DNA'nın, real-time PCR yönteminde tanımlamak için yeterli olduğunu göstermiştir.

Plazmide aktarılmış *A. besseyi*'nin en düşük gen kopya sayısı 9.3×10^1 olarak hesaplanmıştır. Li vd. (2015), yaptıkları çalışmada, *Anguina pacificae*'nin ITS bölgesinin gen kopya sayısı en düşük 1.25'e kadar tespit edilmiştir. Plazmid DNA'nın seri seyreltmelerin sonucunda elde edilen korelasyon katsayısı ve PCR etkinliği, genomik DNA'ya göre daha iyi sonuçlar vermiştir. Çünkü plazmid DNA'sının konsantrasyonu genomik DNA'nın konsantrasyonuna göre daha yoğundur. Fakat yapılan çalışmalar incelendiğinde klonlanan genomik DNA'dan miktar tahmini yapabilmek için çalışılan materyalin tek hücreli bir canlı olması gerekmektedir. Çünkü klonlanan genomik DNA'nın nicel analizinde kullanılan formül gen sayısı üzerinden sonuç vermektedir. Böylelikle prokaryotik canlıların tek hücreden meydana gelmesinden dolayı bu formülden ortamdaki canlının miktarı kolaylıkla hesaplanabilmektedir. Fakat nematodlar gibi ökaryotik canlıların tespitinde gen kopya sayısı üzerinden miktar tahmininin yapılması kesin sonuç veremeyeceğinden bireylerden elde edilen genomik DNA'ların seri seyreltmelerinden nematodun en düşük DNA miktarının tahmini yapılmaktadır. Bununla birlikte genomik DNA kullanılarak en düşük DNA miktarının tahmininin en büyük dezavantajı ise DNA izolasyonu aşamasında elde edilecek genomik DNA miktarının istenilen konsantrasyonlarda olmamasıdır.

Birçok bitki parazit nematodlarının tanımlanması çoğunlukla ergin bireylerde (dişi ve erkek) bulunan morfolojik karakterlere göre yapılmaktadır. Fakat nematod popülasyonlarında, larva dönemindeki birey sayısı diğer biyolojik dönemlerdeki bireylere göre fazla miktarda bulunmaktadır (Carneiro vd. 2014). Bu durum morfolojik tanımlamada kullanılacak materyal sayısını sınırlamaktadır. Ayrıca *Aphelenchoides* türlerinin morfolojik karakterleri birbirlerine çok benzediği için *A. besseyi*'nin morfolojik olarak tanımlanmasında zorlanılmaktadır (Hunt 1993). Buna karşın moleküler yöntemler nematodun tüm biyolojik dönemlerine uygulanabilmektedir. Bu çalışmada *A. besseyi*'nin farklı biyolojik dönemleri (yumurta, larva, erkek ve dişi) real

time PCR yöntemiyle başarılı bir şekilde tanımlanmıştır. Yürütülen başka bir çalışmada, *Ditylenchus destructor*, *P. neglectus* ve *B. xylophilus*'un farklı yaşam dönemlerinin real time PCR yöntemiyle belirlendiği bildirilmiştir (Cheng vd. 2015; Yan vd. 2013; Huang vd. 2010). Elde edilen sonuçlar, diğer araştırmacıların yapmış olduğu çalışmalar ile uyumlu olduğu görülmüştür. Böylelikle *A. besseyi*'nin herhangi bir dönemi kullanılarak hızlı ve doğru tanımlanması mümkün olabilecektir. Bu durum türün doğru mücadelesine imkân sunabilecektir.

Çeltik arazilerinden toplanan örneklerden *A. besseyi* elde etmek için geliştirilmiş Baermann funnel yöntemi başarıyla kullanılmaktadır. Fakat bu yöntem zaman alıcı ve yoğun iş gücü gerektirmektedir. Ayrıca bu yöntemde sadece larvalar ve erginler elde edilebilmektedir. Bu olumsuzlukların üstesinden gelebilmek için bulaşık dokudan Devran vd. (2017) tarafından yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem ile doğrudan dokulardan *A. besseyi* moleküler olarak tanımlanmıştır. Bu çalışma kapsamında Devran vd. (2017) geliştirdiği yöntem real time PCR çalışmasında kullanılmıştır. Böylelikle bulaşık bir adet dane, kavuz ve çeltik'ten doğrudan *A. besseyi* örnekleri real-time PCR'da 1 saat 15 dk içinde hızlıca tanımlanmıştır. Böylelikle geliştirilmiş Baermann funnel tekniğine ihtiyaç duyulmadan *A. besseyi*'nin varlığı hızlı, hassas ve doğru bir şekilde TaqMan prob ile belirlenmiştir. Zijlstra ve van Hoof (2006), *M. fallax* ve *M. chitwoodi* doğrudan patates yumrularından real-time PCR yöntemi ile tanımlanmıştır. Cheng vd. (2015), toprakta ve sarımsak kabuğunda bulunan *D. destructor*'u real-time PCR ile nicel miktarını belirlemiştir. Başka bir çalışmada ise *B. xylophilus*, doğal bulaşık odun parçalarının içinden real-time PCR ile tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçların önceki çalışmalar ile uyumlu olduğu görülmüştür. Ayrıca, karantina zararlısı türlerle mücadelede, hızlı ve doğru şekilde tanımlanma oldukça önemli olduğundan, bulaşık dokulardan doğrudan real time PCR yöntemiyle tanımlama, diğer moleküler yöntemlere göre zaman bakımından da tasarruf sağlayacağı görülmektedir.

Çeltik beyaz uç nematodu, hem kavuzda hem de danede bulunmaktadır (Todd ve Atkins 1958). Bu çalışmada TaqMan prob kullanılarak kavuz, çeltik ve danenin Ct değerleri karşılaştırılmıştır. Kavuz DNA'sının Ct değerleri, çeltiğin ve danenin Ct değerlerinden oldukça düşük bulunmuştur. Bu bulgular *A. besseyi*'nin en çok kavuzda bulunduğu real time yöntemiyle doğrulanmıştır. Tülek ve Çobanoğlu (2011), yapmış oldukları çalışmada *A. besseyi*'nin %97'sinin kavuzda, %3'ünün de kargoda (kavuzu alınmış dane) bulunduğunu bildirmişlerdir. Moleküler bulguların, geleneksel sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür. Bu bilgiler nematodun moleküler tanımlanması için çeltiğin hangi kısmının kullanılmasının daha avantajlı olduğu belirlenmiştir.

Nematodun farklı biyolojik dönemlerinden DNA izolasyonu yapılmadan moleküler tanımlanması üzerine sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada DNA izolasyonu yapılmadan canlı tek bir larvadan *A. besseyi* real-time PCR ile tanımlanmıştır. Nowaczyk vd. (2008), tek bir kisti (*Globedera rostochiensis* ve *G. artemisiae*) pipet ucuyla ezdikten sonra DNA izolasyonu yapmaksızın real-time PCR ile tanımlanabileceği bildirmiştir. Bu sonuçlar, genomik DNA elde etmek için harcanacak zamandan ve masraftan tasarruf ederek, doğrudan real-time PCR yöntemiyle hızlı bir şekilde tanımlama yapılabileceğini göstermiştir. Bu bulgular doğrudan nematod türlerinin real time PCR ile tanımlanmasında kullanılabilecektir.

Marmara Bölgesi'nden 2017 yılında toplanan çeltik örneklerinin % 49.5'nin *A. besseyi* ile bulaşık olduğu moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. Bulaşık kavuzda *A. besseyi*'nin bulaşıklık oranı % 56.3 iken çeltikte bulaşma oranı % 42.7 olduğu tespit edilmiştir. Tülek ve Çobanoğlu (2010) Marmara Bölgesi'nden yapmış oldukları survey çalışmasında, 2007 yılında toplam 90 örnekte % 18.8, 2008 yılında toplam 62 örnekte % 43 *A. besseyi* ile bulaşık olduğunu bildirmişlerdir. Moleküler sonuçlar son 10 yıllık zaman diliminde *A. besseyi*'nin yaygınlığının artmış olduğunu göstermektedir. Nematodun tohum kökenli bir zararlı olması hızlı bir şekilde yayıldığını göstermektedir. Bu yüzden, *A. besseyi*'nin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanması etkili ve başarılı mücadele için önemli olduğunu görülmektedir.

Aphelenchoides besseyi'nin bulaşık kavuzda ve çeltikte miktarının tahmin edilmesi tohumluk olarak kullanılacak materyaller için oldukça önemlidir. Bu amaç kapsamında, iki farklı grubun regresyon doğrusu oluşturulmuştur. Bu iki gruptan en iyi korelasyon katsayısı ve PCR etkinliği veren Grup 2'nin regresyon doğrusu seçilmiştir. Bu regresyon doğrusuna göre, elde edilen Ct değerleri kullanılarak, kavuzda ve çeltikte bulunan *A. besseyi* miktarı hesaplanmıştır. Ct değerlerine göre *A. besseyi*'nin miktarının tahmin edilmesini sağlayan enfeksiyon skalası geliştirilmiştir. Bu enfeksiyon skalası, *A. besseyi* miktarlarına göre düşük, orta ve yüksek olarak üç gruba ayrılmıştır. Li vd. (2015), real-time PCR yöntemiyle oluşturdukları regresyon doğrusundan *Anguina* türlerinin miktarını hesaplamışlardır. Elde edilen verilere göre ise Marmara Bölgesi'nde *A. besseyi*'nin enfeksiyonu çoğunlukla düşük olduğu, çok az örnekte ise yüksek olduğu belirlenmiştir.

Aphelenchoides besseyi bulaşık tohumlarda dormant halde 4. dönem larva ve ergin halde bulunmaktadır. Yapılan çalışmada üç yıl depolanmış çeltik tohumlarında da canlı nematodların varlığı tespit edilmiştir (Yoshii ve Yamamoto 1950; Nandakumar vd. 1975). Bu yüzden *A. besseyi*'ye karşı bir mücadele yöntemi olarak tohumlara sıcak su uygulaması yapılmaktadır. Tülek (2010), 55-60°C'de 15 dk sıcak su uygulamasına tabi tutulan tohumlarda *A. besseyi* bireylerinin öldüğünü rapor etmişlerdir. Sıcak su uygulaması sonucu nematodların canlılığının tespiti mikroskop altında incelenerek yapılabilmektedir. Fakat bu yöntem uzun zaman almakta ve yoğun emek gerektirmektedir. Bu yüzden, bu çalışmada *A. besseyi* bireylerinin ölü veya canlı olup-olmadıklarını belirlemek için real-time PCR'a bağlı bir yöntemin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bunun için real-time PCR uygulama öncesi ölü/canlı organizmanın ayırımında kullanılan Reagent D ve PMA kimyasalları kullanılmıştır. Reagent D ve PMA ölü bireylerin hücrelerine girip DNA'ya fotokimyasal olarak bağlanmaktadır. Real-time PCR sonucuna göre, PMA ve Reagent D'nin Ct değerleri kontrole göre daha yüksek değerlerde elde edilmiştir. Gruplar arasında değerlendirildiğinde her iki kimyasalın da etkili olduğu tespit edilirken grup içi değerlendirmede ise en iyi sonuçları PMA uygulanan örneklerde gözlemlendiği tespit edilmiştir. Christoforou vd. (2014), PMA'nın patates kist nematodunda sıcaklık uygulaması sonrası ölümlerin ayırımının başarılı şekilde gerçekleştiğini bildirmiştir. Elde edilen sonuçlar, bu kimyasalların *A. besseyi* bireylerinin ölü veya canlı ayırımında kullanılabileceğini göstermiştir

6. SONUÇLAR

Dünyada tarımsal üretimin %70'inden fazlasını tahıl ürünleri oluşturmakta ve pirinç, buğdaydan sonra en çok tüketilen ikinci tahıl ürünüdür (Fageria 2007; FAO 2017). Fakat, son yıllarda dünyada pirinç tüketimi, yıllık kişi başına 50 kg'dan 60 kg'a kadar yükselmiştir. 2030 yılına kadar artmakta olan dünya nüfusunun gıda ihtiyaçlarını karşılamak için mevcut üretilenden %40 daha fazla pirinç üretilmesine ihtiyaç duyulacağı tahmin edilmektedir (Khush 2005; IRRI 2017). Bu artan talebi karşılayabilmek için verim potansiyelini arttırmak ve hastalık etmenleri ve zararlıların neden olduğu kayıpları azaltmak gerekmektedir. Çeltikte ekonomik kayıplara neden olan etmenlerin en önemlilerinden birisi de *A. besseyi*'dir. Bu nematodun neden olduğu verim kayıpları Çin'de %10-30, Hindistan'da %20, ABD'de %4.9-17.5, Rusya'da %41-71, Türkiye'de ise %7.8-52.1 olarak rapor edilmiştir (Atkins ve Todd 1959; Tikhonova 1966; Muthukrishnan 1974; Wang 2003; Tülek vd. 2015).

A. besseyi tohumla taşındığı için dünyada çeltik üretimi yapılan çoğu bölgede yaygın olarak bulunmaktadır. *A. besseyi*, 1982 yılında sadece 9 ülkenin karantina listesinde yer alırken 2002 yılında ise 70 ülkenin karantina listesine alınmıştır (Lehman 2002). Çeltik beyaz uç nematodunun yayılımı sınırlandırabilmek ve etkin bir şekilde mücadele edebilmek için *A. besseyi*'nin hızlı, doğru ve güvenilir bir şekilde tanısını sağlayacak moleküler yöntemin geliştirilmesi gerekmektedir. Rybarczyk-Mydlowska vd. (2012), SYBR Green floresan boyası kullanarak *A. besseyi*, *A. fragaria*, *A. ritzemabosi* ve *A. subtenuis*'u real-time PCR ile tanımlamışlardır. SybrGreen floresan boyası sadece çift sarmal DNA'ya bağlandığından yeni sentezlenen DNA miktarı arttıkça floresan sinyalin artışına sebep olmaktadır. SYBR Green hedef olmayan primer-dimer yapılarına da bağlandığından bazı çalışmalarda hedef DNA'ya spesifik olmayabilmektedir. Böylelikle, hedef DNA dışında diğer PCR ürünlerinin de ölçümü gerçekleştirilebilmektedir. Bu nedenle amplifikasyonun doğruluğunu kanıtlayabilmek için melting curve (erime eğrisi) analizine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu olumsuzlukları gidermek için real-time PCR çalışmalarında daha spesifik, güvenilir ve hızlı sonuç veren hedefe özgü problemlerin (FRET, TaqMan, Scorpion vb.) kullanımı tercih edilebilmektedir (La Paz vd. 2007; Saylor vd. 2012). Buonicontro vd. (2018), LSU rDNA bölgesinden tasarlanan probu kullanarak real-time PCR ile *A. fujianensis* ve *A. besseyi*'yi tanımlamışlardır. Fakat *A. fujianensis* primer/prob seti, *A. besseyi* popülasyonunda çapraz reaksiyon gerçekleştirmiştir. Bu durumun primerler ve probun tasarlandığı LSU rDNA bölgesinin varyasyonundan kaynaklandığını belirtmişlerdir. Bu olumsuzlukların üstesinden gelmek için *A. besseyi*'nin tanımlanmasında SSU rDNA bölgesinden primer ile TaqMan prob tasarlanmış ve çalışmalarda tekrarlı sonuç vermiştir.

Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre tasarlanan TaqMan prob seti *A. besseyi*'yi hem tür içi hem de türler arasındaki bitki paraziti nematodlardan doğru, hassas ve hızlı bir şekilde ayırt edebildiğini göstermiştir. Ayrıca bu TaqMan probu; *A. besseyi*'yi 0.0005 pg DNA'ya kadar tanımladığı, nematodun bütün biyolojik dönemlerinde belirlendiğini ve nematod ekstraksiyonu yapmadan bulaşık çeltik parçalarından tanımlayabildiği gösterilmiştir. Böylelikle tasarlanan TaqMan probu ile *A. besseyi* real-time PCR kullanılarak hızlı, hassas ve güvenilir bir şekilde tanımlanabilecektir.

Real-time PCR yöntemi kullanılarak, bulaşık çeltik ve kavuzda bulunan *A. besseyi* miktarı ilk kez bu çalışmada hesaplanmıştır. Böylelikle nematodların mikroskop altında sayımı gerçekleşmeden *A. besseyi*'nin miktarının hesaplanması standart eğri denklemine göre yapılarak ve enfeksiyon seviyesi de geliştirilen enfeksiyon skalasıyla değerlendirilebilecektir. Böylelikle *A. besseyi*'ye karşı yapılacak mücadele için strateji geliştirilmesine katkı sağlanmış olacaktır.

Aphelenchoides besseyi bireylerinin canlı-ölü ayrımında PMA ve Reagent D solüsyonları etkili bulunmuştur. Bu kimyasallar kullanılarak bulaşık çeltik ve kavuzlarda *A. besseyi* bireylerinin ölü veya canlı olup-olmadıkları belirlenebilecektir.

Sonuç olarak, *A. besseyi* tohum kökenli önemli bir karantina zararlısı olduğu için doğru zamanda mücadelesi önemlidir. Bu çalışma kapsamında geliştirilen TaqMan probu, karantina kurumlarında, tohum sertifikasyonunda ve ıslah çalışmalarında bu türün hızlı ve doğru tanımlanmasında etkin şekilde kullanılabilir. Tohumların bu nematod ile bulaşık olup-olmadığı moleküler olarak belirlenerek temiz alanlara yayılmasının önüne geçilebilecektir.

7. KAYNAKLAR

- Alemu, N. 2014. Review on nematode molecular diagnostics: From bands to barcode. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 4 (27): 1-26.
- Allen, M.W. 1952. Taxonomic status of the bud and leaf nematodes related to *Aphelenchoides fragariae* (Ritzoma Bos. 1891). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 19 (2): 108-120.
- Amin, W.A. 2002. *Aphelenchoides besseyi* (Christie, 1942) on rice: A new record in Egypt. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5: 297-298.
- Anonymous 1: What is a Cq (Ct) value? [Son erişim tarihi: 02.05.2019]
- Atkins, J.G. and Todd, E.H. 1952. Laboratory screening of chemicals for control of rice white tip. [Abs.]. *Phytopathology*, 42: 21.
- Atkins, J.G. and Todd, E.H. 1959. White tip disease of rice. III. Yield tests and varietal resistance. *Phytopathology*, 49 (4): 189-191.
- Blok, V.C. 2005. Achievements in and future prospects for molecular diagnosis of plant parasitic nematodes. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27 (2):176-185.
- Bridge, J., Luc, M. and Plowright, R.A. 1990. Nematode parasites of rice. In: Luc, M., Sikora, R.A. and Bridge, J. (Eds.), *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. CAB International, UK, pp. 69–108.
- Buonicontra D.S., Roberts D.M., Oliveira M.G., Blok V.C., Neilson R. and Oliveira R.D.D.L. 2018. A rapid Diagnostic for Detection of *Aphelenchoides besseyi* and *A. fujianensis* Based on Real-Time PCR. *Plant Disease*, 102 (3): 519-526.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J. and Wittwer, C.T. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55 (4): 611-622.
- CABI, 2018. Data sheet on *Aphelenchoides besseyi* (rice leaf nematode). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/6378> [Son erişim tarihi 12.12.2018].
- Cao, A.X., Liu, X.Z., Zhu, S.F. and Lu, B.S. 2005. Detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, using a real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, 95 (5): 566-571.
- Carneiro, R.M.D.G., Correa, V.R., Almeida, M.R.A., Gomes, A.C.M.M., Deimi, A.M., Castagnone-Sereno, P. and Karssen, G. 2014. *Meloidogyne luci* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising different crops in Brazil, Chile and Iran. *Nematology*, 16 (3): 289-301.
- Castagnone-Sereno, P., Skantar, A. and Robertson, R. 2011. Molecular Tools for Diagnostics. In: Jones, J., Gheysen, G. and Fenoll, C. (Eds.) *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 443-464.
- Chang, T.T. 1976. The Origin, Evolution, Cultivation, Dissemination and Diversification of Asian and African Rices. *Euphytica*, 25 (1): 425-441.

- Chanu, L.B., Mohilal N., Victoria L. and Shah M.M. 2015. Eight known species of *Aphelenchoides* nematodes with description of a new species from Manipur, India. *Journal of Parasitic Disease*, 39 (2): 225–233.
- Cheng, J., Zhang, Y. and Li, Q. 2004. Real-time PCR genotyping using displacing probes. *Nucleic Acids Research*, 32 (7): e61-e61.
- Cheng, Z., Toyota, K. and Yamashita, K. 2015. Development of real-time PCR primers specific to the garlicdamaging potato rot nematode *Ditylenchus destructor* to quantify its density in soil and outer skin of garlic. *Nematological Research (Japanese Journal of Nematology)*, 45 (2): 93-99.
- Chizhov, V.N., Chumakova, O.A., Subbotin, S.A. and Baldwin, J.G. 2006. Morphological and molecular characterization of foliar nematodes of the genus *Aphelenchoides*: *A. fragariae* and *A. ritzemabosi* (Nematoda: Aphelenchoididae) from the Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences. *Russian Journal of Nematology*, 14 (2): 179-184.
- Christie, J.R. 1942. A Description of *Aphelenchoides besseyi* n. sp. the summer- drawf nematode of strawberries, with commence on the identify of *Aphelenchoides subtenuis* (Cobb, 1962) and *Aphelenchoides hodsoni* (Goodey, 1935). *Proceeding of Helminthological Society of Washington*, 9: 82-84.
- Christoforou, M., Pantelides, I.S., Kanetis, L., Ioannou, N. and Tsaltas, D. 2014. Rapid detection and quantification of viable potato cyst nematodes using qPCR in combination with propidium monoazide. *Plant Pathology*, 63 (5): 1185-1192.
- Costa, J.M., Ernault, P., Olivi, M., Gaillon, T. and Arar, K. 2004. Chimeric LNA/DNA probes as a detection system for real-time PCR. *Clinical Biochemistry*, 37 (10): 930–932.
- Cralley, E.M. 1949. White tip of rice. *Phytopathology*, 39.
- De Man, J.G. 1880. Die Eingheimischen, frei in der reinen erde und im süßen wasser lebends Nematoden. *Tijdschrift der Nederlandsche Dierkundige Vereeniging*, 5: 1-104.
- Devran, Z., Tülek, A., Mıstanoğlu, İ., Çiftçiğil, T.H. ve Özalp, T. 2017. A rapid molecular detection method for *Aphelenchoides besseyi* from rice tissue. *Australasian Plant Pathology*, 46 (1): 43-48.
- Esquibet, M., Grenier, E., Plantard, O., Fouad Abbad Andaloussi, A.F. and Caubel, G. 2003. DNA polymorphism in the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*: development of diagnostic markers for normal and giant races. *Genome*, 46 (6): 1077–1083.
- Fageria, N.K. 2007. Yield Physiology of Rice. *Journal of Plant Nutrition*, 30 (6): 843–879.
- FAO, 2016. Production. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> [Erişim: 02.11.2018].
- Feng, F., Li, Y., Qin, X., Liao, Y. and Siddique, K.H. 2017. Changes in Rice Grain Quality of Indica and Japonica Type Varieties Released in China from 2000 to 2014. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1863.

- Floyd, R., Abebe, E., Papert, A. and Blaxter, M. 2002. Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology*, 11 (4): 839–850.
- Fortuner, R. 1970. On the morphology of *Aphelenchoides besseyi* Christie, (1942) and *A. siddiqi* n.sp. (Nematoda, Aphelenchidea). *Journal of Helminthology*, 44 (2): 141–152.
- Fortuner, R. and Orton Williams, K.J. 1975. Review of the Literature on *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942, the nematode causing ‘White tip’ disease in rice. *Helminthological Abstract. Series B: Plant Nematology*, 44 (1): 1-40.
- François, C., Castagnone, C., Boonham, N., Tomlinson J., Lawson, R., Hockland, S., Quill, J., Vieira, P., Mota, M. and Castagnone-Sereno, P. 2007. Satellite DNA as a target for TaqMan real-time PCR detection of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. *Molecular Plant Pathology*, 8 (6): 803–809.
- Fukano, H. and Yokoyama, S. 1951. Studies on the White tip rice plants, with special reference to the damage and varietal resistance. *Kyushu Agriculture Research*, 8: 88-90.
- Glaszmann, J.C. and Arraudeau, M. 1986. Rice plant type variation, “japonica” “javanica” relationships. *Rice Genetic Newsletter*, 3: 41-43.
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. and Mathieu, C. 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25 (4): 386-401.
- Gomy, M. ve Kogure, M. 1956. Effect of Folidol on the control of the rice white tip nematode. *Proceedings of the Kanto-Tosan Plant Protection Society*, 3: 20-21.
- Gašparič, M.B., Tengs, T., La Paz, J.L., Holst-Jensen, A., Pla, M., Esteve, T., Žel, J. and Gruden, K. 2010. Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396 (6): 2023-2029.
- Goto, K. and Fukatsu, R. 1952. Studies on the white tip of rice plants. II. Number and distribution of the nematode on the affected plants. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 16: 57-60.
- Goto, K. and Fukatsu, R. 1956. Studies on the white tip of rice plants. III. Analysis of varietal resistance and its nature. *Bulletin of the National Institute of Agricultural Science*, 6: 123-129.
- Hai V. H. and Rabarijoela, P. 1968. Note préliminaire sur la présence des nématodes parasites du riz à Madagascar: *Aphelenchoides besseyi* Christie 1942, *Ditylenchus angustus* (Butler 1913) Filipjev 1936. *L'Agronomie Tropicale. Série 1, Riz et Riziculture et Cultures Vivrières Tropicales*, 23 (10): 1025-1048.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology*, 11 (9): 1026.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R. and Gelfand, D.H. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease

- activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88 (16): 7276-7280.
- 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. Her Majesty's Stationary Office, London, pp. 5–30.
- Hoshino, S. and Togashi, K. 2000. Effect of water-soaking and air draying on survival of *Aphelenchoides besseyi* in *Oryza sativa* seeds. *Journal of Nematology*, 32: 303-308.
- Huang, Y.P. 1959. White tip disease of rice in Taiwan. *Plant Protection Bulletin, Taiwan*, 1 (4): 1-4.
- Huang, C.S. and Huang, S.P. 1972. Bionomics of white-tip nematode, *Aphelenchoides besseyi* in rice florets and developing grains. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 13: 1-10.
- Huang, C.S. and Huang, S.P. 1973. "Effect of dehydration on *Aphelenchoides besseyi*." [Abstract] In: International Congress of Plant Pathology (2nd), Minneapolis, Minnesota, Sept. 5-12, 1973. Abstracts of papers, St. Paul, Minnesota, U.S.A.: American Phytopathological Society Inc., No. 0551.
- Huang, C.S., Cupertino, F.P. and Martinelli, N.M. 1977. Incidence of white tip nematode, *Aphelenchoides besseyi*, in stored rice seed from Central-West Brazil, *Pans*, 23 (1): 65-67.
- Huang, L., Ye, J.R., Wu, X.Q., Xu, X.L., Sheng, J.M. and Zhou, Q.X. 2010. Detection of the pine wood nematode using a real-time PCR assay to target the DNA topoisomerase I gene. *European Journal of Plant Pathology*, 127 (1): 89-98.
- Hugot, J.P., Baujard, P. and Morand, S. 2001. Biodiversity in helminths and nematodes as a field of study: An overview. *Nematology*, 3 (3): 199-208.
- Hunt, D.J. 1993. Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae: Their systematics and bionomics. Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Hunt, D. and Handoo, Z. 2009. Taxonomy, identification and principal species. In: Perry RN, Moens M, Star JL, editors. Root Knot Nematodes. 1st ed. London: CABI International; pp. 55-88.
- Ibrahim, S.K., Perry, R.N. and Hooper, D.J. 1994. Use of esterase and protein patterns to differentiate two new species of *Aphelenchoides* on rice from other species of *Aphelenchoides* and from *Ditylenchus angustus* and *D. myceliophagus*. *Nematologica*, 40 (2): 267-275.
- Ibrahim, S.K., Perry, R.N., Burrows, P.R. and Hooper, D.J. 1994. Differentiation of species and populations of *Aphelenchoides* and of *Ditylenchus angustus* using a fragment of ribosomal DNA. *Journal of Nematology*, 26 (4): 412–421.
- IRRI, 2017. <http://irri.org/rice-today/trends-in-global-rice-consumption>. [Son erişim tarihi 05.10.2017].
- Iyatomi, K. and Nishizawa, T. 1954. Artificial culture of the strawberry nematode, *Aphelenchoides fragariae* and the rice White tip nematode, *Aphelenchoides besseyi*. *Japanese Journal of Applied Zoology*, 19: 8-15.

- Jena, K.K. 2010. The Species of the genus *Oryza* and transfer of useful genes from wild species into cultivated rice, *O. sativa*. *Breeding Science*, 60 (5): 518–523.
- Jones, J.T., Haegeman, A., Danchin, E.G.J., Gaur, H.S., Helder, J., Jones, M.G.K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J.E., Wesemael, W.M.L. and Perry, R.N. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14 (9): 946–961.
- Juliano, B.O. 1985. Rice Chemistry and Technology. 2 nd ed. St. Paul, MN, USA, AACC International, 774 pp.
- Kakuta, T. 1915. On black grain diseases of rice. *Journal of Plant Protection, Tokyo*, 2: 214-218.
- Kanzaki, N. and Giblin-Davis, R. 2012. Chapter 7: Aphelenchoidea. In: Manzanilla-Lopez R. & Mendoza, N. (Eds.), Practical Plant Nematology. Biblioteca Básica de Agricultura, Guadalajara, México, pp. 161–208.
- Karatas, S.E., Aktas M. and Kepenekci, I. 2007. A study of taxonomic characteristics, intensities and prevalence of plant parasitic nematode species in rice plants in Çankırı and Çorum districts. *Proceedings of the Second Plant Protection Congress of Turkey*, p:253.
- Khuong, N.B. 1987. *Hirschmanniella* spp in rice fields of Vietnam. *Journal of Nematology*, 19 (1): 82– 84.
- Khush, G.S. 2005. What it will take to Feed 5.0 Billion Rice consumers in 2030. *Plant Molecular Biology*, 59 (1): 1-6.
- Kim, J.I., Han, S. C. and Choi, D. R. 1996. Investigation of plant parasitic nematodes in paddy-upland rotation. *RDA Journal of Agricultural Science*, 38: 387-391.
- Klein, D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in molecular medicine*, 8 (6): 257-260.
- La Paz, J.L., Esteve, T. and Pla, M. 2007. Comparison of real-time PCR detection chemistries and cycling modes using mon810 event-specific assays as model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (11): 4312-4318.
- Lehman, P. 2002. Uluslararası karantina düzenlemelerinde yer alan nematod türleri ve ülke sayısı. <http://nematode.unl.edu/regnemas.htm>. [Son erişim tarihi: 05.10.2017].
- Li, W., Yan, Z., Nakhla M.K. and Skanter, A.M. 2015. Real-Time PCR for detection and identification of *Anguina funesta*, *A. agrotis*, *A. tritici* and *A. pacificae*. *Plant Disease*, 99 (11): 1584-1589.
- Mev, T.W., Alvarez, A.M., Leach, J.E. and Swings, J. 1993. Focus on bacterial blight of rice. *Plant Disease*, 77 (1): 5–12.
- Mew, T.W. and Misra, J.K. 1994. A Manuel of Rice Seed Health Testing, International Research Institute, Manila, Philippines.
- Mısırlıoğlu, P. ve Pehlivan, E. 2000. Distribution of white tip nematode (*Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942) in the rice fields of Balıkesir and Çanakkale provinces. *Proceedings of the Fourth Entomology Congress of Turkey*, Pp. 561-568.

- Mullis, K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262 (4): 56-61.
- Muthukrishnan, T.S., Rajendran, G. and Chandrasekaran, J. 1974. Studies on the white-tip nematode of rice, *Aphelenchoides besseyi* in Tamil Nadu. *Indian Journal of Nematology*, 4 (2): 188-193.
- Nakano, I. 1916. On the sterility of the spikelet disease of Italian millet. *Journal of Plant Protection, Tokyo*, 3: 33-36.
- Nandakumar, C., Prasad, J.S. Rao Y.O. and Rao. J. 1975. Investigation on the white-tip nematode, *Aphelenchoides besseyi* Christie 1942 of rice (*Oryza sativa* L.). *Indian Journal of Nematology*, 5 (1): 62-69.
- Nickle, W. 1970. A taxonomic review of the genera of the Aphelenchoidea (Fuchs, 1937) Thorne, 1949 (Nematoda: Tylenchida). *Journal of Nematology*, 2 (4): 375-392.
- Nishizawa, T. and Yamamoto, S. 1951. Studies on the varietal resistance of rice plant to the nematode disease "Senchu Shingare Byo". II. A test of the leading varieties and part of breeding lines of rice plant in Kyoshu. *Kyushu Agriculture Research*, 8: 91-92.
- Nishizawa, T. 1953a. Studies on the varietal resistance of rice plant to the rice nematode disease 'Senchu Shingare Byo'(VI). *Bulletin of the Kyushu Agricultural Experimental Station*, 1 (3): 339-349.
- Nishizawa, T. 1953b. On the relation between the rice nematode disease 'white tip' and the stem of rot of rice plants. *Japanase Journal of Phytopathology*, 17 (3-4): 137-140.
- Nishizawa, T. 1953c. On the prevention of the rice nematode disease, "Senchu shingare byo" by Folidol. *Botyu Kagaku (Scientific Insect Control)*, 18: 1-6.
- Nowaczyk, K., Dobosz, R., Kornobis, S. and Obrepalska-Steplowska, A. 2008. TaqMan Real-time PCR-based approach for differentiation between *Globodera rostochiensis* (golden nematode) and *Globodera artemisiae* species. *Parasitology Research*, 103 (3): 577-581.
- OECD, 1999. Consensus Document on the Biology of *Oryza sativa* (Rice). Report no: ENV/JM/ MONO (99)26. OECD Enviromental Health and Safetly Publications, Paris.
- Oliveira, C.M.G., Monteiro, A.R. and Blok, V.C. 2011. Morphological and molecular diagnostics for plant parasitic nematodes: Working together to get the identification done. *Tropical Plant Pathology*, 36 (2): 65-73.
- Öztürk, G. ve Eneli, S. 1997. Türkiye'de çeltiklerde ilk kez saptanan Çeltik beyaz uç nematodu, *Aphelenchoides besseyi* Christie (Aphelenchida: Aphelenchoidiae). *Türk Entomoloji Derneği*, 21 (2): 129-132.
- Poehlman, J.M. 1987. Breeding Field Crops. Third Edition, WA Publishing Company Inc. Westport Connecticut.

- Popova, M.B. 1984. Principal factors determining the intensity and pathogenicity of *Aphelenchoides besseyi* infestation on rice. *Byulleten'Vsesoyuznogo Instituta Gel'mintologii im. KI Skryabina*, 36: 39-41.
- Popova, M.B., Zelensky, G.L. and Subbotin, S.A. 1994. An assessment of resistance in cultivars of *Oryza sativa* L. to *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942. *Russian Journal of Nematology*, 2 (1): 41-44.
- Portères, R. 1956. Taxonomie Agrobotanique des Riz cultivés *O. sativa* L. et *O. glaberrima* Steudel. *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, 3 (7): 341-384.
- Powers, T. O. and Harris, T. S. 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 25 (1): 1-6.
- Powers, T.O., Todd, T.C., Burnell, A.M., Murray, P.C.B., Fleming, C.C., Szalanski, A.L., Adams, B.A. and Harris, T.S. 1997. The internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes. *Journal of Nematology*, 29 (4): 441-450.
- Prasad, J.S., Panwar, M.S. and Rao, Y.S. 1987. Nematode problems of rice in India. *International Journal of Pest Management*, 33 (2):127-136.
- Qiu, T.X., Yand, M.F. and Lu, Q. 1991. Study on the occurrence, regulation and control of *Aphelenchoides besseyi*. *Zhejiang-Nongye Kexue*, 6: 290-292.
- Qu, S.H.1985. Rice Diseases. Second Edition, Part VII. Disease Caused by Nematodes. Commonwealth Agricultural Bureau, UK, 337-346 pp
- Rahman, M.L. and Miah S.A. 1989. Occurrence and distribution of white tip disease in deepwater rice areas in Bangladesh. *Revue Nématology*, 12 (4): 351-355.
- Rao, Y.S., Prasad, J.S. and Panwar, M.S. 1985. Nematode pests of rice in India. *Non-insect Pest and Predators*, 65-71.
- Rybarczyk-Mydlowska, K., Mooyman, P. van Megen, H., van den Elsen, H., Vervoort, M., Veenhuizen, P., van Doorn, J., Dees, R., Karssen, G. Bakker, J. and Helder, J. 2012. Small subunit ribosomal DNA-based phylogenetic analysis of foliar nematodes (*Aphelenchoides* spp.) and their quantitative detection in complex DNA backgrounds. *Phytopathology*, 102 (2): 1153-1160.
- Sánchez-Monge, A., Flores, L., Salazar, L., Hockland, S. and Bert, W. 2015. An updated list of the plants associated with plant-parasitic *Aphelenchoides* (Nematoda: Aphelenchoididae) and its implications for plant-parasitism within this genus. *Zootaxa*, 4013 (2): 207-224.
- Sánchez-Monge A., Janssen T., Fang Y., Couvreur M., Karssen, G. and Bert W. 2017. mtCOI successfully diagnoses the four main plant-parasitic *Aphelenchoides* species (Nematoda: Aphelenchoididae) and supports a multiple origin of plant-parasitism in this paraphyletic genus. *European Journal of Plant Pathology*, 148 (4): 853-866.
- Sanwal, K.C. 1961. A key to the species of the nematode genus *Aphelenchoides* Fischer, 1894. *Canadian Journal of Zoology*, 39 (2): 143-148.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989a. Gel Electrophoresis of DNA. In: Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., Eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Chapter 6, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989b. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2 nd ed. NY, USA; Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sapkota, R., Skantar, A.M. and Nicolaisen, M., 2016. A TaqMan real-time PCR assay for detection of *Meloidogyne hapla* in root galls and in soil. *Nematology*, 18 (2): 147-154.
- Sayler, R.J., Walker, C., Goggin, F., Agudelo, P. and Kirkpatrick, T. 2012. Conventional PCR detection and real time PCR quantification of reniform nematodes. *Plant Disease*, 96 (12): 1757-1762.
- Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F. and Zeillinger, R. 1995. Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *Genome Research*, 4 (4): 234-238.
- Subbotin, S.A. and Moens, M. 2006. Molecular Taxonomy and Phylogeny. In: Perry, R. N. and Moens, M. (Eds.), *Plant Nematology*. CABI Head Office, Wallingford, UK, pp. 33-58.
- Tamura, I. and Kegasawa, K. 1959. Studies on the ecology of the rice nematode, *Aphelenchoides besseyi* Christie. III. The injured features of the rice plant and the population density of nematodes found in the unhulled rice grain with special reference to the type of the nursery bed. *Japanese Journal of Ecology*, 9 (1): 1-4.
- Taylor, D. P., Ngundo, B. N. and Othieno, S. M. 1972. Tanzania, rice white tip nematode. *FAO Plant Protection Bulletin*, 20 (2): 41-42.
- Toyota, K., Shirakashi, T., Sato, E., Wada, S. and Min, Y.Y. 2008. Development of a real-time PCR method for the potato-cyst nematode *Globodera rostochiensis* and the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Soil Science and Plant Nutrition*, 54 (1): 72-76.
- Tikhonova, L.V. 1966. *Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942 (Nematoda, Aphelenchoididae) on rice and method of control. *Zoologicheskii Zhurnal*, 45: 1759-1766.
- Todd, E.H. and Atkins, J.G. 1958. White tip disease of rice I. Symptoms, laboratory culture of nematodes and pathogenicity test. *Phytopathology*, 48 (11): 632-637.
- Todd, E.H. and Atkins, J. G. 1959. White tip disease of rice. II. Seed treatment studies. *Phytopathology*, 49 (4): 184-188.
- Tsay T.T., Cheng, Y.H., Teng, Y.C., Lee, M.D., Wu, W.S. and Lin, Y.Y. 1998. Bionomic and control of rice white tip disease nematode, *Aphelenchoides besseyi*. *Plant Protection Bulletin (Taipei)*, 40 (3): 277-286.
- Tullis, E.C. 1951. Control of seed-borne nematode of rice by fumigation with methyl bromide. *Progress Report, Texas Agricultural Experiment Station*, no.1453, p 4.
- Tülek, A., Kepenekci, I., Cobanoglu, S., Hekimhan, H., Devran, Z., Melik, B. and Elekcioglu, H.I. 2009. A new culturing method for the rice white tip nematode,

- Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942, on carrot discs. *Russian Journal of Nematology*, 17 (2): 143.
- Tülek, A. 2010. Trakya Bölgesi çeltik ekim alanlarında çeltik beyaz uç nematodu (*Aphelenchoides besseyi* Christie, Aphelenchida: Aphelenchoididae)'nın yaygınlık durumu ve bazı mücadele yöntemleri üzerine araştırmalar. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 157 s.
- Tülek, A. and Cobanoğlu, S. 2010. Distribution of the rice white tip nematode, *Aphelenchoides besseyi*, in rice growing areas in Thrace region of Turkey, *Nematologia Mediterranea*, 38 (2): 215-217.
- Tülek, A. ve Çobanoğlu, S. 2011. Effect of white-tip nematode (*Aphelenchoides besseyi* Christie) on yield and yield component in rice cultivar Halilibey. The Fourth Plant Protection Congress, ss. 9, 28-30 Haziran, Kahramanmaraş.
- Tülek, A., Ates, S.S., Akın, K., Surek, H., Kaya, R. and Kepenekci, İ. 2014. Determining yield losses in rice cultivars resulting from rice white tip nematode *Aphelenchoides besseyi* in field condition. *Pakistan Journal of Nematology*, 32 (2): 149-154.
- Tülek, A., Kepenekci, İ., Elekçioğlu, İ.H. and Çobanoğlu, S. 2014. Investigation of hosting status of barnyard grass [*Echinochloa crus galli* (L.)] and small flower umbrella sedge (*Cyperus difformis* L.) to rice white tip nematode (*Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942) in rice growing areas of Turkey. *Munis Entomology & Zoology*, 9 (2): 804-809.
- Tülek, A., Kepenekci, İ., Çiftçigil, T.H., Surek, H., Akın, K. and Kaya, R. 2015. Reaction of some rice cultivars to the white tip nematode, *Aphelenchoides besseyi*, under field conditions in the Thrace region of Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 39 (6): 958-966.
- Uehara, T., Kushida, A. and Momota, Y. 1999. Rapid and sensitive identification of *Pratylenchus* spp. using reverse dot blot hybridization. *Nematology* 1 (5): 549-555.
- van den Elsen, S., Holovachov, O., Karssen, G., van Megen, H., Helder, J., Bongers, T., Bakker, J., Holterman, M. and Mooyman, P. 2009. A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. *Nematology*, 11 (6): 927-950.
- Verma, D.K. and Shukla, K. 2011. Nutritional Value of Rice & Their Importance. *Journal of Indian Farmers' Digest*, 44 (1): 21-35.
- Vesterberg, O. 1989. History of Electrophoretic Methods. *Journal of Chromatography A*, 480: 3-19.
- Wang, Z.M., Zhou, F.M., Lu, Y.L., Lu, H.F., Lu, X.L., Xu, M.B., Chen, Z.Y., Liu, Y.F. and Wei, W. 2003. The causes of small grains and erect ears of rice and its control countermeasures in Jiangsu province. *Jiangsu Agricultural Science*, 5: 1-6.
- Watson, J.D., Watson, J., Gilman, M., Witkowski, J.A., Witkowski, J. and Zoller, M. 1992. The polymerase chain reaction In: Recombinant DNA. Second Edition. New York.

- Wei, C., Saller, D.N. and Sutherland, J.W.H. 2001. Detection and quantification by homogeneous PCR of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *Clinical chemistry*, 47 (2): 336-338.
- Xiongs, Z.Y., Zhang, S.J., Ford-Lloyd, B.V., Jin, X., Wu, Y., Yan, H.X., Liu, P., Yang, X. and Lu, B.R. 2011. Latitudinal Distribution and Differentiation of Rice Germplasm: Its Implications in Breeding. *Crop Science*, 51 (3): 1050–1058.
- Yan, G., Smiley, R.W., Okubara, P.A., Skantar, A.M. and Reardon, C.L. 2013. Developing a real-time PCR assay for detection and quantification of *Pratylenchus neglectus* in soil. *Plant Disease*, 97 (6): 757-764.
- Ye, W. and Giblin-Davis, R.M. 2013. Molecular characterization and development of real-time PCR assay for pine-wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Parasitaphelenchidae). *PLoS ONE*, 8 (11): e78804.
- Yokoo, T. 1948. ‘*Aphelenchoides oryzae*’ Yokoo n.sp. a nematode parasitic to rice Plant. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 13: 40-43.
- Yoshii, H. 1946. Nematode heart blight of rice. A preliminary report. *Agriculture and Horticulture Japan*, 19: 981-982.
- Yoshii, H. and Yamamoto, S. 1950. A rice nematode disease ‘Senchu Shingare Byo’. I. Symptoms and pathogenic nematode. II. Hibernation of *Aphelenchoides oryzae*. III. Infection course of the present disease. IV. Prevention of the present disease. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 9: 209-222; 223-233; 289-292; 293-310.
- Yoshii, H. and Yamamoto, S. 1951. On some methods for the control of rice nematode of rice nematode disease. *Science Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 12: 123-131.
- Zijlstra, C. and van Hoof, R.A. 2006. A multiplex real-time polymerase chain reaction (TaqMan) assay for the simultaneous detection of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax*. *Phytopathology*, 96 (11): 1255-1262.
- Zhao, Y., Ruan, W., Yu, L., Zhang, J., Fu, J., Shain, E. B., Huang, X. and Wang, J. 2010. Combining maxRatio analysis with real-time PCR and its potential application for the prediction of *Meloidogyne incognita* in field samples. *Journal of Nematology*, 42 (2): 166-172.
- Zhu, Z., Chen, N., Wang, D., Zhang, X., Yao, Q., Min, J. and Liao, X. 2004. Analysis on variation and difference for rice quality traits among different types of rice. *Zhongguo Shuidao Kexue*, 18: 315–320.

ÖZGEÇMİŞ

ELVAN SERT ÇELİK
elvannn_20@hotmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora	Akdeniz Üniversitesi
2013-2019	Fen Bilimleri, Bitki Koruma Bölümü, Antalya
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2010-2013	Fen Bilimleri, Bitki Koruma Bölümü, Antalya
Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
2005-2009	Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Çanakkale

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi
2010-2019	Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Antalya

ESERLER

A. Science Citation Index (SCI) ve Science Citation Index-Expanded (SCI-E) Tarafından Taranan Dergilerde Yayımlanan

1. Çelik, E.S. and Devran, Z. 2019. Identification and quantification of *Aphelenchoides besseyi* from rice using qPCR. *European Journal Plant Pathology*, 154 (3): 691-703. doi: 10.1007/s10658-019-01692-4.

2. Sert Çelik, E., Özalp, T., Mıstanoğlu, İ. and Devran, Z. 2019. Identification of plant-parasitic nematodes associated with cut flowers. *Journal of Plant Disease Protection*. doi: 10.1007/s41348-019-00235-7.

B. Science Citation Index (SCI) ve Science Citation Index-Expanded (SCI-E) Dışındaki Uluslararası İndekslerde Taranan Dergilerde Yayınlanan Makaleler

1. Dağlı, F., İkten, C., Sert, E. and Bölücek, E. 2012. "Susceptibility Of Tomato Borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) Populations from Turkey to 7 Different Insecticides in Laboratory Bioassay", *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 42: 305-311.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. Özalp, T., Sert Çelik, E., Özkaynak E. and Devran, Z. 2019. Host Suitability of Pepper Genotypes to Mi-1 Virulent Root-Knot Nematodes. 17th EUCARPIA Meeting on Capsicum and Eggplant. 11-13th September, Avignon, France,-p.

2. Sert Çelik, E. and Devran, Z. 2019. Comparison of propidium mono azide and reagent D for differentiation of live vs. dead *Aphelenchoides besseyi* using Real-time PCR. 1st International Molecular Plant Protection Congress. 10-13 April, Adana, Turkey, -p

3. Özalp, T., Sert Çelik, E., Devran Z., 2019. The efficiency of molecular markers linked to *N* and *Me* genes in peppers. 1st International Molecular Plant Protection Congress. 10-13 April, Adana, Turkey.-p.

4. Sert Çelik, E., Özalp, T., Mıstanoğlu, İ. and Devran, Z. 2018. Identification of plant parasitic nematodes in cut flower growing areas in Antalya. 6th ASM International Congress of Agriculture and Environment, 11-13 October, Antalya, Turkey, 31 p.

5. Ergin, A.U., Aygün, M., Sak, R., Özalp, T., Sert Çelik, E. And Devran, Z. 2018. Effects of some pesticides to *Mi-1* Virulent *Meloidogyne javanica*. 6th ASM International Congress of Agriculture and Environment, 11-13 October, Antalya, Turkey, 32 p.

6. Sert Çelik, E. and Devran, Z. 2018. Development of the novel TaqMan assay for identification and quantification of *Aphelenchoides besseyi* from rice. 33th Symposium of the European Society of Nematologists (ESN) Conference, 9-13 th September, Gent, Belgium, 253 p.

7. Sert Çelik, E. 2017. Determination of Sublethal Effects of Some Insecticides on Pupae of Tomato Leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick)(Lepidoptera:Gelechiidae)" International Conference Agriculture, Forest, Food, Sciences and Technologies, Nevşehir, Türkiye, 15-17 Mayıs 2017, cilt. -, 157 p.

8. Sert Çelik, E. and Kanlı, B. 2017. Effects of Some Insecticide on Eggs of Tomato Leaf Miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae)” International Conference Agriculture, Forest, Food, Sciences and Technologies, Nevşehir, Türkiye, 15-17 Mayıs, cilt. -, 563 p.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. Sert Çelik, E. and Devran, Z. 2018. Çeltikte *Aphelenchoides besseyi*'nin Hızlı Tanımlanması için TaqMan Metodunun Geliştirilmesi. Türkiye VII. Bitki Koruma Kongresi, 14-17 Kasım, Muğla, Türkiye, ss. 24.

2. Aygün, M., Ergin, A.U., Sak, R., Özalp, T., Sert Çelik, E. and Devran, Z. 2018. *Mi-1* Virü lent *Meloidogyne javanica*'ya bazı biyolojik preparatların nematisidal etkileri. Türkiye VII. Bitki Koruma Kongresi, 14-17 Kasım, Muğla, Türkiye, ss. 193.

3. Özalp, T., Öçal, S., Sert Çelik E. and Devran, Z. 2017. Kök-ur Nematodlarına Karşı Bazı Biber Genotiplerinin Tepkileri. XIII. Uluslararası Katılımlı Ekoloji ve Çevre Kongresi, Türkiye, 12-15 Eylül, Edirne, ss. 421.

4. Sert Çelik, E., Kanlı B. and Dağlı, F. 2013. Domates Güvesi, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) Larvalarına Karşı Bazı İnektisitlerin Etkinliklerinin Belirlenmesinde Kullanılan İki Farklı Biyoessey Yönteminin Karşılaştırılması. Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, 3-5 Şubat, Antalya, ss. 69.

5. Sert Çelik, E., Tunç, İ. and Şahin, İ. 2013. Bazı İnektisitlerin Domates Güvesi, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) Üzerinde Sublethal Etkileri” Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, 3-5 Şubat, Antalya, cilt.-, ss.14.

6. Sert E. and Genç, H. 2009. Farklı Yöntemler Kullanılarak Zeytin Sineği (*Bactrocera oleae* Gmelin.)' nin Genomik DNA Ekstraksiyonları. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi, 15-18 Temmuz, Van, ss. 41.