

## 1. GİRİŞ

Nematodlar, Dünya üzerinde çok sayıda ve her yerde bulunabilen genetik olarak çeşitlenmiş çok hücreli organizmalardır (Chen et al., 2004). Bugüne kadar tatlı ve tuzlu su ortamı, karasal habitatlar, omurgalı ve omurgasız canlılarda parazit olanları kapsayan yaklaşık 26.000 nematod türü tanımlanmıştır (Chilton et al., 2003). Boyutlarının küçük olması, kapalı habitatlarda bulunmaları ve çok fazla değişmeyen morfolojileri nedeni ile bu grubun büyük bölümü hakkında fazla bilgi mevcut değildir. Nematod çeşitliliğinin artışında genetik izolasyon veya homostazisin, diğer hayvanlar ve bitkilerle konak ilişkisi sonucu ortaya çıkan ekolojik ilişkilerin etkili olduğu tahmin edilmektedir (Chen et al., 2004).

Yaklaşık 3.000 tanımlanmış nematod türü konak olarak böcekleri kullanmaktadır. Bunlar böceklerle foresizden, zorunlu türe özgü parazitizme kadar değişebilen ilişkiler içerisindedirler (Chen et al., 2004). Dünya üzerinde muhtemelen 4-6 milyon böcek türü vardır. Bunların çoğu hayat evrelerinin büyük bölümünü nematod gelişimi ve üremesine uygun olan nemli ortamlarda geçirmektedir. Nematodlar ilişkide oldukları böceklerle eş zamanlı olarak gelişerek yayılımlarını sağlarlar. Eğer böceklerin sadece %10'u bir nematod türü ile ilişki içerisinde olsa bu böceklerle ilişkili yaklaşık 500.000 nematod türünün var olduğu anlamına gelmektedir.

Nematodların yaşayabildiği ortamlara yönelik ilginç bir örnek; incir (*Ficus*) ile incirlerde polinasyonu sağlayan arılar arasındaki mutualistik ilişkiye kendi hayat sikluslarını sığdırmış olan *Schistonchus* (Aphelenchoididae) ve *Parasitodiplogaster* (Diplogasteridae) cinsine ait nematodlardır. Nematodların, incir meyvesi ve incir polinatör arısı arasındaki varlıkları son yıllarda keşfedilmiştir. Dünyada oldukça yeni olan bu konu ile ilgili ülkemizde hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma kapsamında ülkemizde incir türlerinin yetiştiği Ege, Akdeniz, Karadeniz, Güneydoğu Anadolu, İç Anadolu, Marmara ve Doğu Anadolu bölgelerinde bulunan incirler ve

incir polinatör arıları ile ilişkili nematod türlerinin tespiti ve dağılımları belirlenmeye çalışılmıştır.

## **1. 1. Genel Bilgi**

### **1. 1. 1. Nematodlar**

Nematodlar, nemli topraklarda, deniz ve tatlısu gibi bentik habitatlarda, pek çok bitki ve hayvan üzerinde yaygın olarak bulunan tür ve birey sayısı bakımından çok zengin bir hayvan grubudur (Ruppert et al., 2004). Büyüklükleri çok değişik olan bu hayvanların en küçükleri (*Anguilla*-0,5mm) bir milimetreyi aşmadığı halde kaşalot balinası plasentasında yaşayan *Placentonema gigantea*'nın dişisi 8-9mm kalınlığında ve 8 metre uzunluğunda olabilmektedir (Koppenhöfer, 2000).

Nematodlarda üreme, sinir, sindirim, kas ve boşaltım sistemleri bulunmaktadır, ancak özelleşmiş bir solunum ve dolaşım sistemleri bulunmamaktadır (Koppenhöfer, 2000). Enine kesitleri yuvarlaktır. Ön uçları her zaman yuvarlak, arka uçları ise sivri ya da çatalıdır. Segmentsiz, pseudosölomlu canlılardır. Serbest yaşayan türlerinde zaman zaman tutunma ya da yapışma borucukları, daha sık olarak da genellikle ön tarafta konumlanmış kol şeklinde uzantılar vardır (Demirsoy, 2001).

Vücut yüzeyleri esnek bir kutikula ile örtülüdür. Rektum dişilerde anüs, erkeklerde kloak ile dışa açılır (Viglierchio, 1991). Çoğunlukla ince olan epidermis, yanlarda ve bir de sırt ile karının orta çizgileri yönünde kalınlaşır, bu suretle vücut çeperinin dört yerinde nematodların tipik özelliğini oluşturan sırt, karın ve yan çizgilerini meydana getirir (Hazır, 2002; Ruppert et al., 2004).

Genellikle ayrı eşeylidirler. Erkekler boylarının daha küçük olması ve arka uçlarının karın tarafına doğru kıvrılması ile dişilerden ayrılırlar. Erkeklerde üreme sistemi, ventralde yerleşmiş olan rektumdan kloaka açılır. Bir ya da iki testisleri vardır. Spermlerinin çekirdek zarı ve kamçısı yoktur. Spermler amipsi hareket

ederler. Çiftleşme organları bir çift spiküldür. Ayrıca sklerotize olmuş, çiftleşmede rol oynayan gubernakulum adı verilen bir yapıya sahiptirler. Özel kaslar ile bu yapılar hareket ettirilir, dişi eşey açıklığını açık tutar ve yan yana gelerek spermlerin aktarılacağı bir kanal oluştururlar (Brusca and Brusca, 2002; Ruppert et al., 2004). Bazı familyalarda (Heterorhabditidae, Strongylidae) erkek hayvanların arka uçları bursa diye adlandırılan şemsiye şeklinde kese meydana getirir. Dişilerde bir ya da iki ovaryum vardır. Bunlar ventral olarak ve vücudun orta kısmından vulva ile dışarı açılırlar (Kaya and Stock, 1997; Brusca and Brusca, 2002). Nematodlar çoğunlukla ovipardırlar. Döllenme her zaman vücut içerisinde olur. Embriyonik gelişme yumurta zarları içinde gerçekleşir. Yumurtadan çıkmadan önce genç evrede 1-2 deri değişimi olur. Erginler deri değiştirmez (Viglierchio, 1991). Nematodların gelişiminde juvenil ve ergin olmak üzere iki belirgin evre ayırt edilir. Juvenil evre kendi içerisinde 4 safhadan oluşmaktadır. Bunlar J1-J2-J3-J4 dır. Nematodlarda rejenerasyon yeteneği yoktur (Ruppert et al., 2004).

Merkezi sinir sistemi, ön bağırsağı çepeçevre kuşatan, sinir halkası “nerve ring” ile bununla ilişkili olan gangliyonlardan oluşmuştur. Sinir halkasından genellikle bir çift sinir kökü taşıyan sinir şeridi çıkar, bunlardan birisi karın tarafından arkaya doğru, diğeri ise sırt tarafında sırt karinası boyunca uzanır (Ruppert et al., 2004).

Duyu organları vücudun ön kısmında yoğunlaşmışlardır ve papilla ile kıl şeklindeki sillerden meydana gelir. Ayrıca bir çift yan duyu çukuru ‘**amphida**’ vardır. Kuyruk tarafındaki organları da **papiller** ve **phasmida** denilen duyu çukurlarını andıran yapılardan oluşmuştur. Papilla ve phasmid sayı ve dizilimleri tür teşhisinde kullanılır (Hominick et al., 1997; Kaya and Stock, 1997).

Ağız, stoma, özofagus, bağırsak, rektum ve anüsten oluşan gelişmiş bir sindirim sistemleri vardır (Koppenhöfer, 2000; Brusca and Brusca, 2002). Sindirim kanalı düz bir boru şeklinde bütün vücut boyunca uzanır. Ağız açıklığı, vücudun ön tarafında en uçta bulunur ve 3 ya da 6 dudak ve papillerle kuşatılır. Ağız boşluğu

kutikula ile kaplıdır. Bu boşlukta karmaşık yapılı kutikular çıkıntılar, öne doğru uzamış ve zehir bezleri ile donatılmış dişler ya da öne doğru uzatılabilen delici dikenler taşırlar. Ön bağırsağı kaslı yapıda, orta bağırsak torba gibi ve kassız, son bağırsak ise kısadır. Besinler enerji ve yeni dokuların oluşumu için kullanılır. Enerji kaynağı olarak glikojeni kullanırlar (Viglierchio, 1991).

Nematodların vücut duvarında boyuna kaslar bulunur dairesel kaslar yoktur (Brusca and Brusca, 2002). Bu canlı grubunun kas tipi her zaman eğik çizgilidir. Kas hücreleri kendilerine en yakın bulunan orta çizgi (sırt ya da karın çizgisi) içindeki sinirlere uzantılar gönderirler. Hayvanlar aleminde bu yalnız nematodlara has bir özelliktir. Nematoda türlerinin hareketi, yılanların tipik hareketine benzer. Sırt ve karın tarafındaki boyuna kasların ardışık kasılmalarıyla, yilankavi hareketler ortaya çıkar. Bu tarz hareket birçok türe yüzme yeteneği kazandırmasına karşın, daha çok nesnelere üzerinde sürünme hareketi yapmalarını sağlar (Demirsoy, 2001).

Boşaltım sistemleri protonefridyum ve alev hücresi içermez. Serbest yaşayan türlerde karın tarafında bulunan ‘**Rennet bezi**’, parazit türlerde ‘H ya da U’ şeklindeki yanal kanal sistemi bulunur. Boşaltım sistemi turgor basıncını da ayarlar. Azotlu atıkları amonyum, üre ve ürik asit formuna çevirebilir. Nemli ortamda azotlu atıklar amonyum formunda atılır (Viglierchio, 1991; Demirsoy, 2001).

### **1. 1. 1. 1. Nematodlarda Tür Teşhisi**

#### **Moleküler Yöntemler**

Nematodların yeterince tanımlayıcı morfolojik karakterlerinin olmaması nedeniyle tür düzeyinde ayrımları oldukça zordur. Kladistik morfolojik karakterlerin yokluğu aynı zamanda evrimsel akrabalıkları ile ilgili çalışmaları da engellemektedir. (Chilton et al., 2003). Günümüzde bu sebepten dolayı morfolojik yöntemlere ilave olarak moleküler tanımlama teknikleri geliştirilmiştir. Moleküler yöntemler, morfolojik bulguları desteklemesi bakımından da yararlıdır (Burgermeister et al.,

2005). Günümüzde nematodların ribozomal ve mitokondriyal genomları moleküler düzeydeki tür tanımlanmalarında ve filogenetik akrabalıklarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Chilton et al., 2003).

Mitokondriyal DNA (mtDNA), nematodların sistematik ve populasyon genetiği çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle birbirine çok yakın türlerin arasındaki ilişkiyi belirlemek için tercih edilen iyi bir yoldur (Blouin et al., 1998). Mitokondriyal genom küçük, genellikle dairesel ve anadan gelmektedir. Nükleer genoma göre daha hızlı ve bağımsız olarak evrimleşir (Kennedy, 2001).

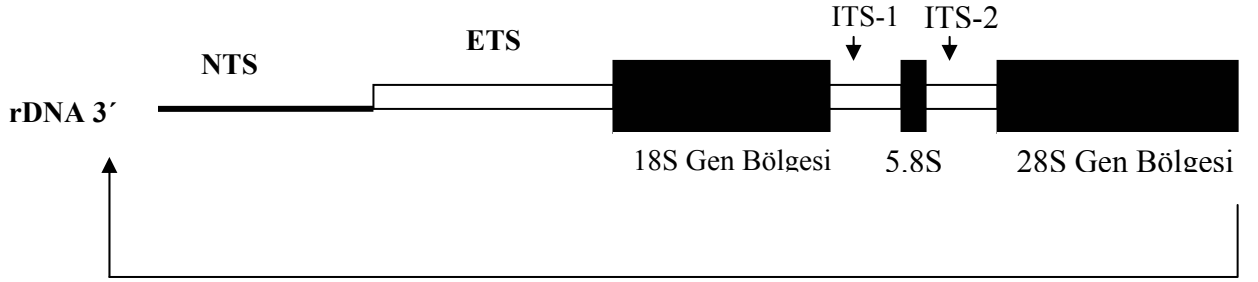
Nükleer ribozomal RNA (rRNA) genleri nematodların cins ve familya seviyesinde ayırımında çok yararlı iken birbirine çok yakın akrabalıkları çözmede yetersiz kalmaktadır (Blouin et al., 1998).

DNA üzerinde yer alan rRNA genleri ve onunla ilişkili bölgelerin hepsine birden ribozomal DNA (rDNA) denir. Nükleer rDNA tür tanımlaması veya soy belirlenmesi çalışmalarında uygun bir hedef bölgedir. Ökaryotik organizmaların rDNA'sı geniş bir multigen ailesidir. Multigenler arka arkaya tekrar eden gen dizileridir. Bu gen dizileri transkripsiyon birim kopyaları ve transkripsiyona uğramayan bölgelerden oluşur (Hillis and Dixon, 1991) ve özel kromozomlarda kümeler halinde bulunurlar (Kennedy, 2001).

Ökaryotik canlılarda rDNA iki “**internal transcribed spacers**” (ITS-1 ve ITS-2) ile 18S, 5.8S ve 28S genlerine ayrılır. Ayrıca 18S geninin yanında “**external transcribed spacer**” (ETS) yer alır. rDNA'nın bitişik tekrarlanan birimleri birbirinden “nontranscribed spacer” (NTS) ile ayrılır (Hillis and Dixon, 1991) (Şekil 1).

Çekirdeğe ait ribozomal RNA (rRNA)'nın özellikle 28S alt ünitesinin D2/D3 “**expansion**” segmentleri ile “**internal transcribed spacer**” (ITS) bölgeleri nematodların tür ayırımında kullanılmaktadır (Giblin-Davis et al., 2003).

Ökaryotlarda ribozomal RNA (rRNA)'nın büyük alt ünitesi (LSU)'ni oluşturan 5.8 S ve 28S genleri ribozom fonksiyonu için gerekli olduğu düşünülen ve nispeten korunmuş dizileri ihtiva eder. Ökaryotlarda rRNA LSU'da 12 tane çok değişken bölge vardır. Bunlar “**divergent domains**”(D) veya “**expansion segments**” olarak isimlendirilmiştir. D domainleri arasında büyüklük ve sekans bakımından önemli bir değişim miktarı olsa da bazı domainlerin ikincil yapıları oldukça korunmuştur. D domainleri arasındaki sekans değişimi son zamanlardaki evrimsel olayları çözmeyi yararlı hale getirir. Çünkü bu bölgeler çok yavaş bir evrimsel değişim gösterip çok zaman önce birbirinden uzaklaşmış organizmaların filogesinin oluşturulmasına olanak sağlar (Chilton et al., 2003)



Şekil 1. rDNA Genel Yapısı (Hillis & Davis, 1986)

### Morfometrik Yöntemler

Morfoloji, nematod türlerinin tanımlanmasında kullanılan standart yöntemlerden birisidir (Ryss et al., 2005). Morfometrik ölçümlerde kullanılan karakterler: toplam vücut uzunluğu (nematodun baş kısmı ile kuyruk sonuna kadar olan uzaklık), maksimum vücut genişliği (nematodun vücudunun orta kısmının enine genişliği) (dişilerde vulvadaki vücut genişliği), baştan özofagus kaidesine olan uzaklık, kuyruk uzunluğu (anal açıklık ile kuyruğun sonuna kadar olan mesafe), anüs genişliği (anal açıklığın olduğu yerdeki vücut genişliği), stylet uzunluğu (bazal lob ile uç kısım arasındaki mesafe) (Aphelenchida ordosu için), lateral bölgedeki yanal kanal çizgilerinin sayısı, “a” oranı (toplam vücut uzunluğunun maksimum vücut

genişliğine oranı), “b” oranı (toplam vücut uzunluğunun özofagus uzunluğuna oranı), “c” oranı (toplam vücut uzunluğunun kuyruk uzunluğuna oranı), “c<sup>1</sup>” oranı (toplam vücut uzunluğunun anüs genişliğine oranı) dır. Erkek nematodlar için spikül uzunluğu, genital papillaların sayısı ve dizilimleri göz önüne alınır. Ayrıca dişi nematodlar için vulva ile anüs arasındaki mesafe, post-uterin kesenin uzunluğu (PUS), bu kesenin uzunluğunun vulvadaki vücut genişliğine ve vulva-anüs arasındaki mesafeye oranları da ölçülmektedir (Giblin-Davis, 1993; Vovlas and Larizza, 1996; Hominick et al., 1997; Kaya and Stock, 1997; De Crappeo and Giblin-Davis, 2001).

Nematodların diğer bitkiler ve hayvanlarla ilişkileri oldukça yaygındır. Bitki ve bitki polinatörleri arasındaki ilişkiye örnek olarak incir (*Ficus spp.*) ve incir polinatör arıları, avize ağacı (*Yucca spp.*) ve avize ağacı güveleri ve küre çiçekleri (globeflower) ile *Chiastocheta* sinekleri arasındaki ilişki verilebilir (Chen et al., 2004).

Nematodlardaki en açık beraber türleşme örneklerinden biri *Ficus* (Moraceae) cinsinin şaşırtıcı ve bir o kadar da ilginç döngüsü ile beraber gerçekleşmektedir. *Ficus* (Moraceae) ve bu cins ile mutualistik ilişki içerisindeki polinatör arıların (Agaonidae) döngüsü oldukça iyi bilinmektedir. Bu döngüden daha az bilinen *Schistonchus* (Aphelenchoididae) ve *Parasitodiplogaster* (Diplogasteridae) cinslerine ait nematodların polinatör arıları vektör olarak kullandıkları türe özgü ilişkidir (Giblin-Davis et al 1995).

### **1. 1. 2. İncir (*Ficus*)**

Bu cins, dünya çapında en çok tropikal ve subtropikal ormanlarda olmak üzere 750 tür odunsu bitkiye sahiptir (Berg, 1989). Çalimsı, tırmanıcı, yarı sucul, ve ağaç formunda olabilen incir türleri özel çiçek durumları ve polinasyon mekanizmaları ile tanınırlar (Berg, 1990). *Ficus*, Moraceae familyasının en geniş cinsidir. Bu familya latex, stipul ve üniseksüel çiçek durumu ile tanınır (Weiblen,

1999). Fossil bulgulardan elde edilen veriler (Weier, et. al., 1974; Collinson, 1989) *Ficus* formlarının ortaya çıkışının günümüzden 50 milyon yıl önce Orta-Eosen' e kadar uzandığını göstermektedir (Poinar and Herre, 1991).

*Ficus* genusunun sistematığı;

**Kingdom:** Plantae

**Division:** Magnoliopsida

**Ordo:**Urticales

**Familya:**Moraceae

**Genus:** *Ficus*

şeklindedir (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Magnoliopsida>).

*Ficus* cinsi; üreme sistemi, dal ve yaprak formları ile çiçek durumları göz önüne alınarak dört alt cinse ayrılmıştır (Weiblen, 1999).

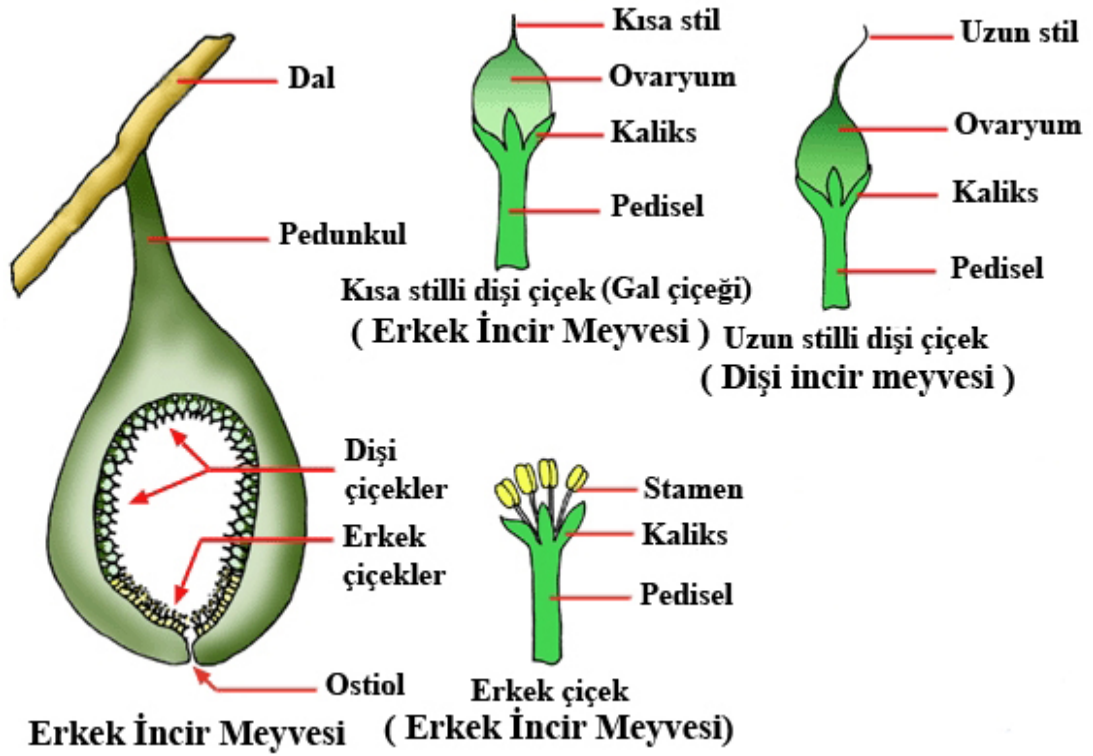
- UROSTIGMA: Monoik ve her dem yeşil türleri içerir. Meyveleri aksil gösterir.
- PHARMACOSYCEA: Bu gruptakiler de monoik türlere sahiptir, meyveleri aksil gösterir.
- SYCOMORUS: Monoik türlerdir. Meyveler dal ve gövde üzerinde gelişir.
- FICUS: Dioik türlere sahiptir ve meyvelerinde aksil durumu gözlenir.

İncirin dıştan görünüşü etli bir meyveye benzemektedir (Berg, 1990). Bütün *Ficus* türleri çok farklı gelişim şekilleri göstermelerine rağmen tüm türler çiçek durumları ile tanınırlar. İncir meyveleri kapalı, dar bir reseptakulum ve içerisine dizilmiş pek çok tek ovaryumlu dişi çiçekler ile erkek çiçeklerden oluşur (Hossart-McKey et. al. 1994). Dişi çiçekler yapı olarak stil, ovaryum, kaliks ve pediselden oluşur. Stil, uzun ve kısa olmasına göre ikiye ayrılmaktadır. Dişi çiçekler meyvenin iç yüzeyini kaplamaktadır ve sayıları yüzlerle ifade edilmektedir. Erkek çiçekler ise stamen, kaliks ve pedisel kısımlarından oluşmaktadır ve meyvenin ostiolünün iç



çeperinde yer almaktadırlar (Kjellberg et al. 1987; Weiblen, 1999; <http://waynesword.polomar.edu>).

Morfolojik olarak incirler meyvedeki dişi ve erkek çiçeklerin düzenlenişine göre monoik ve ginodioik olarak ikiye ayrılırlar. İncir ve incir polinatör arıları arasındaki karşılıklı etkileşimden dolayı ginodioik türler fonksiyonel olarak dioiktir (Berg, 1989, Weiblen et al 1995). Monoik türler hermafrodizm gösterir, hem dişi hem de erkek çiçekler aynı meyvede bulunmaktadır. Bununla beraber dişi çiçeklerde uzun ve kısa stile sahip olanlar yine aynı meyvededir. Monoik incirlerin çiçek durumunda çiçekler birkaç tabaka oluştururlar. Kısa pediselli çiçekler uzun stile sahipken, uzun pediselli çiçekler kısa stillidir (Ganeshaiyah et al 1995; Nefdt and Compton, 1996). Dioik türlerde ise ağaçlar erkek ve dişi olarak cinsiyet durumu göstermektedir. Erkek ağaçların meyvelerinde yalnız kısa stilli ovaryumlu dişi çiçekler ve erkek çiçekler bulunurken, dişi ağaçlarda sadece uzun stilli ovaryuma sahip dişi çiçek taşıyan meyveler vardır (Şekil 2). Dişi ağaçların meyvelerinde erkek çiçek bulunmamaktadır. Kısa stilli dişi çiçeklere aynı zamanda **gall** çiçeği de denmektedir (Aksu ve Özcan, 2000). Polinatör arıların yaptığı polinasyon sırasında erkek meyvelerin dişi çiçeklerinde tohum gelişimi engellendiği için yalnız dişi ağaçların dişi çiçeklerinde tohum gelişimi görülmektedir. Bu duruma ginodioiklik denmektedir. *Ficus* cinsinde monoikliğin atasal olduğu ve ginodioikliğin bundan köken aldığı tahmin edilmektedir (Chen et al., 2004).



Şekil 2. İncir meyvesinin genel yapısı (<http://waynesword.polomar.edu>).

*Ficus* türlerinin yaklaşık 500'ü Asya, Avustralya ve Malezya'da bulunmaktadır. Bunların çoğu ginodioiktir. Bu bilgilerden yola çıkarak ginodioikliğin evriminde o bölgeleri merkez alarak yayıldığını ve Avustralya, Madagaskar ve Afrikada'daki monoik türlerle yarışarak zaman içinde onlarla yer değiştirdiği düşünülmektedir. Neotropiklerde hiç ginodioik tür yoktur ve sadece Afrika'da 10 tür vardır (Berg, 1989).

*Ficus* cinsine ait yine ginodioik bir tür olan *Ficus carica*'nın anavatanı sayılan ülkemizde de geniş alanlarda tarımı yapılmaktadır. Başta Ege bölgesi olmak üzere Akdeniz, Karadeniz, Güneydoğu Anadolu, Marmara ve İç Anadolu bölgelerinde yayılım göstermektedir. Dünya üzerinde de subtropik iklimle sahip hemen her yerde yetişebilmektedir. Geniş ekolojik uyum yeteneği sayesinde de Orta Asya, Güney Avrupa, Kuzey Afrika (Akdeniz kıyı şeridi), Amerika ve Avusturalya

da yayılış alanı bulmuştur. Ülkemizde ginodioik bir tür olan *Ficus carica*'nın 272 dişi ve 58 erkek incir çeşidi yetişmektedir (Aksoy ve Şahin, 2001) .

*Ficus carica* yıllık ortalama sıcaklığın 18-20°C olduğu yerlerde yetişmektedir. Ağustos-Eylül aylarında ise özellikle dişi ağaçlar, daha yüksek sıcaklıklar istemektedir (30°C). İncir ağaçlarının ülkemizdeki türler ve çeşitler için optimal yağış istekleri 625mm dir. Toprak istekleri yönünden çok seçici değildirler. Derin kumlu-killi, organik maddece zengin ve kireçli topraklarda yetişebilmektedirler. Toprağın pH sı yönünden 6-7.8 olan nötr toprakları tercih ederler. *Ficus carica* türü hem dişi hem de erkek ağaçlar için bir yıl boyunca üç farklı meyve oluşturmaktadır. Erkek ağaçlar için bu meyveler oluşum sırasına göre ilek (profichi), ebe (mame), boğa (mammoni) şeklinde adlandırılmaktadır. İlek meyveleri çeşitler arasında farklılık olsa da Mart-Haziran ayları arasında beş safhadan oluşan olgunlaşma sürecini tamamlamaktadır. Ebe meyvesi ise Haziran – Eylül ayları arasında gelişmektedir. Kış meyvesi olan boğa da ebe meyvesini takiben Ağustos ayı ile beraber ortaya çıkmaya başlayıp bahara kadar erkek ağaçlar üzerinde kalmaktadır. Dişi ağaçlar ise ilkbahar meyvesi (yellop), yaz meyveleri (iyilop) ve son lop diye adlandırılan yaz sonunda dallar üzerinde görülmeye başlayan meyveleri oluştururlar. Dişi ağaçlar döllenme biyolojileri yönünden 3'e ayrılmaktadır (Aksoy ve Şahin, 2001).

1. Döllenmeye gerek duymadan partenokarpi yoluyla meyve verenler
2. Meyve vermesi için mutlaka döllenmesi gerekenler.
3. İlkbahar meyveleri için döllenmeye gereksinim duyup, yaz meyveleri için döllenmeye gereksinim duymayanlar

*Ficus* cinsi fonksiyonel dioiklik için eşsiz bir örnektir. Fonksiyonel dioiklik, çiçek gelişimini kontrol eden genetik faktörler ile tohum oluşumu üzerine polinatör larvanın etkisi sonucu ortaya çıkmaktadır (Valdeyron and Lloyd, 1979). Bu cinste cinsiyet tayininin genetik yönü, yenebilen bir incir türü olan *Ficus carica* ile yapılan çaprazlama çalışmaları ile ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalarda cinsiyet tayininin bir

çift homolog kromozom üzerinde lokalize olmuş aleller tarafından kontrol edildiği düşünülmüştür. *Ficus carica*'da dişi çiçeklerde kısa stil, dominant bir aleldir ve 'G' ile ifade edilir. Dişi çiçeklerin uzun stile sahip olma durumu resesif bir alel ile ifade edilir, 'g' ile gösterilir. Erkek çiçek oluşumu ile ilgili genetik mekanizmada ise erkek çiçek oluşumu ile ilgili alel dominanttır ve 'A' ile gösterilir. Erkek çiçek oluşumunun baskılanması ise resesiftir ve 'a' ile gösterilir. Dominant G ve A genleri bir kromozom üzerinde bulunmaktadır. 'g' ve 'a' genleri ise homolog kromozomlar üzerinde bulunurlar. *Ficus carica*'da erkek ağaçlar her zaman homozigot GA/GA veya heterozigot GA/ga genotipine sahiptirler. Dişi ağaçların genotipi ise sadece homozigot ga/ga dır ( Valdeyron and Lloyd, 1979).

**Çizelge 1. *Ficus carica*'nın Genotipik Özellikleri (Valdeyron and Lloyd, 1979).**

YUMURTADAN GELEN GAMETLER	POLENLERDEN GELEN GAMETLER	
	Homozigot Erkek Ağaçtan (GA/GA) Sadece GA	Heterozigot Erkek Ağaçtan (GA/ga) GA veya ga
Homozigot Erkek İncir(GA/GA) Sadece GA	GA/GA	GA/ga, GA/GA
Heterozigot Erkek İncir(GA/ga) GA veya ga	GA/GA, GA/ga	GA/GA, GA/ga(2), ga/ga
Dişi İncir(ga/ga) Sadece ga	GA/ga	GA/ga, ga/ga

İncir meyvesinin gelişimi sırasında gerek monoik gerekse dioik türlerinde beş safha ayırt edilmektedir. Bunlar A, B, C, D, E safhalarıdır. İncir ve incir polinatör arıları arasındaki etkileşimler bitkiler ve onların polinatörleri arasındaki en iyi bilinen karşılıklı dayanışma örneğidir (Bronstein, 1992). Polinatör arıların yumurtadan erginliğe kadar olan gelişim safhası ile incirlerdeki polinasyon ve tohum oluşumu meyvenin B, C ve D safhaları boyunca meydana gelmektedir (Giblin-Davis et al., 1995).

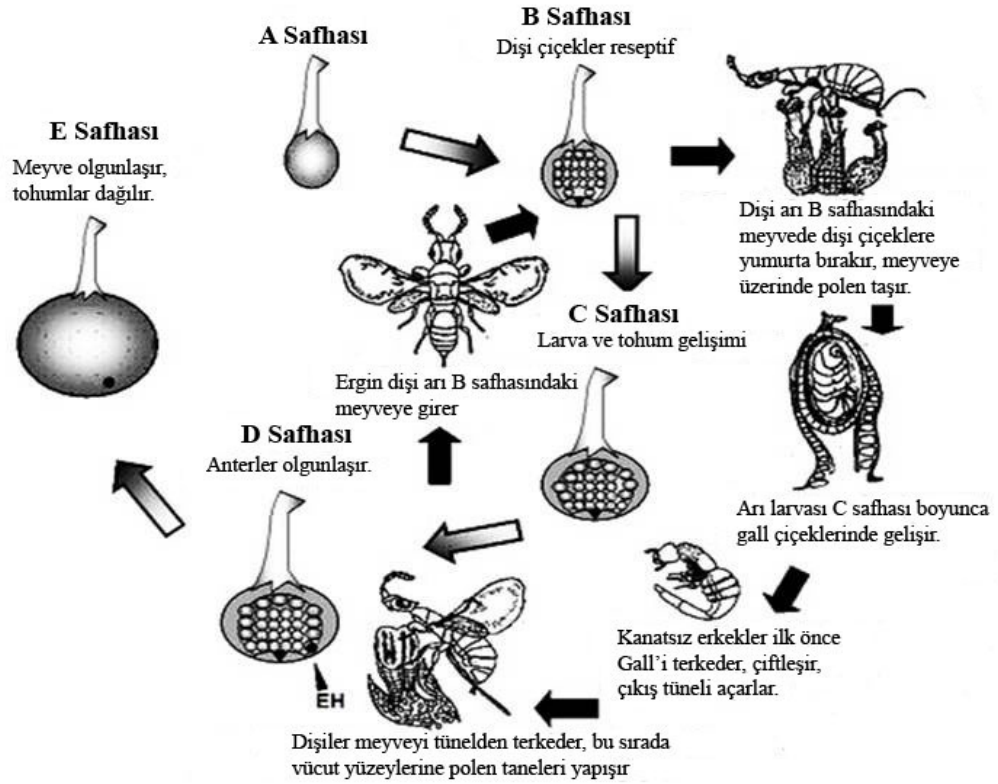
İncir polinatör arıları Agaonidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) familyasının içinde olup, *Ficus* cinsine ait türlerin meyveleri ve çiçekleri ile yakından ilişkili olan birkaç yüz parazitik arı türünü içerir (Boucek, 1988). Bitki-Böcek ilişkileri içinde, *Ficus* (Moraceae) ve onun türe özgü Chalcid arıları ile aralarındaki ilişki bitki-böcek arasındaki zorunlu mutualizme yönelik en dikkat çekici örneklerden birini teşkil etmektedir. Son yıllarda DNA sekansları veya moleküler ve morfolojik verilerin kombinasyonu ile yapılmış çalışmalar ile incir ve incir polinatör arılarının filogenileri tahmin edilmeye çalışılmıştır. Eldeki sonuçlar incir polinatör arıları ile incir arasındaki mutualizmin bir defada olduğunu göstermektedir. Machado ve arkadaşları DNA sekans ayrımını kullanarak halen mevcut bir cins olan *Pegascapus*'un 25 milyon yıllık fosil formları ile yaptıkları çalışmalarda mutualizmin yaklaşık 87 milyon önce ortaya çıktığını ileri sürmektedir (Cook and Rasplus, 2003). Birkaç istisna olmakla beraber (Rasplus, 1996), dünya çapında 750 incir türünün her biri (Berg, 1989) özelleşmiş bir biçimde polen yayılımı ve polinasyonu için yalnızca tek bir tür mutualistik arıya bağlıdır (Rasplus et al., 1998). Polinatör arı türlerini tanımlamak oldukça zordur. Bugün ilişkili oldukları *Ficus* cinsi 750 den fazla türle temsil edilirken, Agaonidae familyasına ait ancak 300 polinatör arı türü tespit edilebilmiştir. *Ficus* başlı başına bir cins olup dört alt cinse sahip iken polinatör arıları kapsayan Agaonidae familyası bugün 6 subfamilya'ya bağlı 76 cins ve 757 tür ile temsil edilmektedir (Weiblen, 2002).

**Agaonidae familyasının tanımlayıcı özellikleri:**

- 1) Ön kanatlardaki marjinal damar, kanadın anteriorü yönünde sağa doğru açılır. (%80)
- 2) İncir (*Ficus* spp.) ile ilişkilidirler. (%100)
- 3) Orta bacakların femur ve tibiaları, ön ve arka bacakların femur ve tibialarından daha incedir. (%85)
- 4) Dişiler uzamış bir yapıdadırlar, bazen oldukça uzun bir ovopozitöre sahiptirler. (%99)
- 5) Erkeklerin kanatları oldukça küçük veya yoktur, mandibuller kavga etmek için genişlemiş ve gelişmiştir. (%95) (Wiebes, 1982).

Agaonidae familyasının bireyleri her zaman incir (*Ficus*) ile ilişki halindedir. Pek çoğu incir türleri için polinatör rolü oynarken (Agaoninae), geri kalan diğer gruplar polinatörlerin parazitoidi veya gall dokularının şeklini değiştiren türleri içermektedir. İncirler ve onlarla ilişkili polinatör Agaoninae türleri, incir çiçeklerinin sadece uygun olan arı türü ile polinasyon yapabilmesinden dolayı tümüyle birbirine bağlıdırlar. Hiçbir polinatör arı türü uygun incir dışında çoğalmasını devam ettiremez. Akrabalık bağı o yüzden çok yakındır ve her iki grup muhtemelen çok yaygın atasal incir ve polinatörünün torununa sahiptir (Wiebes, 1982). Dişi Agaoninae incir arısı, normalde incire ostiolden içeri girmektedir. Bu aşamada kanatlarını, sıklıkla da anten ve bacak parçalarını kaybederler (Wiebes, 1982, Valentine and Walker, 1983). Bu dişiler diğer incirlerden polen taşıyıp bu sayede incir içindeki meyvelerin polinasyonunu sağlamaktadır. İncire girdikten sonra o meyvenin içinde ölürler. Polenler, torakslarındaki polen cepleri (Wiebes, 1976), ön ayaklarındaki corbicula denen yapılar (Ramirez, 1969), abdomen ile toraks arasındaki bölgedeki membranın segmentleri arasındaki kıvrımlar, antenler veya sindirim sistemi ile taşınabilir (Boucek, 1988). Dişi arılar, dişi incir çiçeklerine yumurta bırakır. Polinatör arının larvası gelişir ve bu larva, ovaryumun içinde pupaya girer. Larvalar bu esnada gal çiçeği içerisinde hiperplastik bitki dokusu ile beslenirler (Vovlas and Larizza, 1996). İlk olarak kanatsız erkekler buldukları ovaryumları

terk ederler. Bunlar henüz ovaryumlardan dışarıya çıkmamış olan dişileri döllerler ve daha sonra güçlü mandibulleri ile incir meyvesinin dışına doğru bir koridor, yani çıkış yolu açarlar. Döllenen ve polen yüklü dişiler bu koridordan meyveyi terk ederler (Wiebes, 1979) (Şekil 3). Polinatör arılarda ergin öncesi evreler Agaoninae familyasında *Blastophaga psenes* türü için oldukça açık bir şekilde tanımlanmıştır. Bu türün depoladığı yumurtalar oval ve bir ucunda uzun bir filamente sahiptir. Birincil larval evre basit, yarı saydam ve 13 segmentlidir. Olgunlaşan larva güçlü bir şekilde kıvrılır, mezo ve metatoraks segmentlerinin her biri hafif kalkık, yuvarlak ventrolateral yumrulara sahiptir. *Blastophaga psenes*, incir polinatör arıları içinde yenen incir *Ficus carica*'nın polinasyonundaki önemli rolü nedeniyle muhtemelen en iyi bilinen örnektir (Aksu ve Özcan, 2000). Ayrıca Epichrysomallinae subfamilyasına ait bazı türler incir çiçeklerinde deformasyona sebep olarak polinatör rolü üstlenebilmektedir. Yine Scoecinae, Sycophaginae ve Otitesellinae subfamilyalarına ait türler de incirin üreme ile ilgili olmayan kısımlarında deformasyonlara sebep olabilmekte veya polinasyon yapan türler üzerinde parazitoid olabilmektedir (Weiblen, 2002).



Şekil 3. İncir ve İncir Polinatör Arıları arasındaki hayat döngüsü (Giblin-Davis et al 1995).

Bir incir türü 30 farklı polinatör olmayan incir waspına konaklık edebilmektedir. Polinatör olmayan wasplar incirde meydana getirdikleri değişikliklere göre gruplara ayrılmaktadır.

- Genişlemiş gall çiçeği oluşumuna neden olan parazitoidler: Bu Agaonidlerden daha büyüktür ve polinasyondan önce meyvenin dışına yumurta bırakırlar. Bunlar büyük ve geniş gall çiçeği oluşumuna sebep olurlar (veya büyük gall çiçeklerinde parazitlik yaparlar) ve bu nedenle çok az sayıdaki meyvede az sayıda olurlar.
- Küçük gall çiçeği oluşumuna neden olan parazitoidler: Bu gruptakiler meyvenin dışından uzun ovopozitörleri aracılığıyla incir içerisine yumurta bırakırlar. Çoğunlukla yumurtlama işi polinasyondan sonra olur. Fakat arılar polinatörler ile büyüklük olarak aynı ölçülerdedir. Bunlar çok sayıda meyvede ve oldukça fazla olabilirler (Cook and Rasplus, 2003).



Bu grupta tanımlanmış en iyi örnek *Ficus carica* ile ilişkili kleptoparazitik tür *Philotrypesis caricae* Hass (Hymenoptera: Chalcididae) dir. *P. caricae* dişileri *B. psenes* larvalarının buldukları gal çiçeklerine meyve dışından içeriye uzun ovopozitörleri ile yumurta bırakırlar. Yumurtadan çıkan kleptoparazit larvaları hiperplastik bitki dokusu üzerinden beslenirler. Aynı gall çiçeğini kullanan *B. psenes* larvaları daha hızlı gelişim gösteren *P. caricae* ile olan beslenme yarışını kaybeder ve ölürlür. *P. caricae* larvası gelişimini tamamlar ve erkekler buldukları gall çiçeklerini terk edip, dişilerle çiftleşirler. Dişiler daha sonra yeni bir döngüyü tamamlamak için yeni bir meyveye geçerler. Meyve üzerine konan dişiler uzun ovopozitörlerini meyve ostiolünden içeriye uzatarak gall çiçeklerine yumurta bırakırlar. Bu döngüde *P. caricae*, *Ficus carica*'nın polinasyonunda hiçbir rol oynamamaktadır (Grandi, 1985)

- İç parazitler: Yalnızca Eski Dünya'da görülen, polinatörler ile aynı ölçülerde olup incire giren parazitoidlerdir. Bu gruptaki türlerde çok az sayıda bulunmuştur. Fakat üredikleri zaman çok sayıda olabilmektedirler (Cook and Rasplus, 2003).

İncir olgunlaştığı zaman çevreye ergin dişi polinatör arıları çeken hoş kokulu kimyasallar yaymaktadırlar (Hossart-McKey et al., 1994). Bir kez incir keşfedilince, arılar incir meyvesinin apeksinde bulunan dar ostiolden geçerek, kapalı reseptekuluma girerler. Meyve bu sırada B safhasındadır. A safhasındaki meyvelerde belirgin bir dişi veya erkek çiçek oluşumu görülmemektedir. B safhasında incir meyvesinin içinde dişi çiçekler olgunlaşmıştır ve polinasyona hazırdır. Dişi çiçeklerin ovaryumlarının uçları açıktır. Erkek çiçekler ise bu safhada henüz olgunlaşmamıştır. Morfolojik olarak incelediğinde incir meyvesinin ostiolü birbirine sıkıca kenetlenmiş pullarla kapalıdır. Meyve B safhasındayken bu pullar gevşek bir hal alır ve bu sayede arılar içeriye kolaylıkla girebilmektedir. Meyvenin içine giren dişi polinatör arılar üzerlerinde veya polen keselerinde getirdikleri polenler ile bu sayede polinasyonu sağlarlar, aynı zamanda ovaryumlara yumurtalarını bırakmaktadırlar. Yumurtlayan dişiler daha sonra ölür. Yumurtlamada her zaman

ovaryumlara tek bir yumurta bırakılmaktadır. Meyve C safhasına geçtiğinde tohum ve arı larvaları da gelişimlerine devam etmektedir. Bu sırada erkek çiçekler de gelişmeye başlamışlardır, ostiolleri pullarla örtülmüştür. D safhasına geldiği zaman tohum ve arı larvaları gelişimlerini tamamlamıştır. Aynı zamanda ostiolün iç kısmına dizilmiş olan erkek çiçeklerin stamenleri de olgunlaşmış olup bol miktarda polen ihtiva etmektedir. D safhasında buldukları ovaryumları ilk önce ergin erkek polinatör arılar terk eder. Erkek polinatör arılar daha ovaryumlarını terk etmemiş olan ergin dişileri döledikten sonra güçlü mandibulleri ile dışarıya doğru bir tünel açıp meyvenin dışına çıkarlar. Çiftleşmiş dişiler ovaryumu terk ettikten sonra bu tüneli kullanarak dış ortama çıkarlar. Erkek arıların kanatları yoktur. Dişiler meyveyi terk ederken ostiolün iç kısmındaki stamenlerden polenler ile yüklenirler. Daha sonra bu dişiler yeni bir döngü için başka bir meyve aramaya başlarlar. Son safha olan E de ise meyve ve tohumlar olgunlaşmıştır ve bu safhadaki meyveler kuşlar veya memeliler tarafından tüketilmektedir. Bu sayede tohum yayılması da sağlanmaktadır (Giblin-Davis et al., 1995) (Şekil 3). İncir meyvesinin geçirdiği beş safhanın süresi türler arasında farklılık gösterebilmektedir. Örneğin monoik türlerden *Ficus aurea*'da A safhası bir hafta sürebildiği gibi, bu safha dormant halde 8-9 ay kadar da sürebilir. Dormansi kalkınca meyve 2 gün içinde B safhasına geçmektedir. B safhası 2 gün sürmektedir. Hemen ardından gelen C safhası ise *F. aurea* için 29-43 gün arasında değişmektedir. Başka bir monoik tür olan *Ficus laevigata*'da 23-33 gün arasındadır. 1-2 gün süren D safhasının ardından *F. aurea*'da E safhası 5-34 gün sürebilmektedir (Giblin-Davis et al., 1995) . Polinatörlerin polen taşıma şekilleri türler arasında çeşitlilik gösterir. Yaklaşık olarak *Ficus* türlerinin 1/3nde pasif polinasyon görülmektedir (Kjellberg, 2001). Pasif polinasyon görülen *Ficus* türleri ile ilişkili polinatör arılarda polen taşımaya yönelik belli bir adaptasyon bulunmamaktadır. Bu incir türleri bolca polen üretmektedirler ve arılar buldukları ovaryumları terk ederken polenler de anterlerden serbest bırakılmaktadır. Arılar çıkışa doğru ilerlerken stamenlere sürtünüp vücut yüzeylerine polen yapışmaktadır (Weiblen, 2002). *Ficus* cinsinde geri kalan türlerde ise aktif polinasyon görülür. Meyveyi terk etmeden önce aktif polinatör arılar anterlerden torakslarında bulunan polen kesesi denen özel yapılara polen yükleyip meyveyi o şekilde terk ederler. Yeni

bir meyveye girdikleri zaman polenleri keselerinden çıkartıp stigmalara depo ederler (Frank, 1984; Greff and Compton, 1996).

İncir ve incir polinatör arıları ile ilişkili nematodların hayat döngüsü de arının yumurta bırakmak için girdiği B safhasındaki meyvelerle başlamaktadır. Dominik kehribarı fosillerinde incir polinatör arısı ile nematodu (*Diplogasteridae: Parasitodiplogaster*) arasındaki ilişkiye ait ipuçları atasal bir döngünün incir ve incir polinatör arısı arasındaki polinasyon mutualizminin evriminden önce gelişmiş olabileceğini göstermektedir (Giblin-Davis et al., 2004). *Schistonchus* ve *Parasitodiplogaster* cinslerine ait nematodlar, dişi polinatör arıların hemosolünde meyveden meyveye taşınmaktadır.

*Parasitodiplogaster* cinsine ait nematodlar polinatör arılar üzerinde parazitlik yapmaktadır. Parazitizm serbest yaşayan veya böceklerle foretik ilişki içinde bulunan *Diplogasteridae* familyasında nadir görülür (Giblin-Davis et al., 2005). *Parasitodiplogaster* cinsinde görülen parazitizmin serbest yaşayan foretik atalarından köken aldığı tahmin edilmektedir (Giblin-Davis et al., 2004). Şimdiye kadar Panama ve Afrika'da incirlerde polinatör wasplarda parazitlik yapan 11 *Parasitodiplogaster* türü tanımlanmıştır (Poinar, 1979; Poinar and Herre, 1991). *Parasitodiplogaster* infektif evre nematodları (J3), polinatör waspların hemosolünde meyveden meyveye taşınmaktadır. Polinatör arı meyveye girip gall ovaryumlarına yumurta bırakırken bu esnada J3 evredeki infektifler hala arı hemosolündedirler. Arı yumurtlamayı bitirdikten sonra nematodlar, J3 evresinden J4 evresine gelişir ve polinatör arıyı da öldürerek kadavradan meyve boşluğuna geçerler. Meyve boşluğunda gelişimlerini tamamlayıp ergin hale gelirler. Erkek ve dişi nematodlar çiftleştikten sonra dişiler, yumurtalarını incir meyvesinin dokusuna bırakırlar. Yumurtadan çıkan J2 evre nematodlar tekrar döngüyü tekrarlayıp erişkin hale gelirler. Bu sırada meyve C safhasını tamamlar. D safhasında, dişi arılar gall çiçeklerini terk etmeden infektif evre nematodlar böcek hemosolüne geçerek yeni bir döngü için arı ile meyveden ayrılırlar (Giblin-Davis et al., 1995).

*Schistonchus* cinsi 0,6-0,8 mm uzunluğunda olan orta boylu nematodlardır. Kutikulları ince, pürüzsüz, halka biçimlidir. Sefalik bölge kavisli veya yuvarlaktır (Şekil 4). Stylet güçlü-sert, 21-24 µm uzunluğunda ve bazalinde yumruları vardır. Procorpus belirgin bir biçimde kısa, silindirik, post-median valve tabakaları ile güçlü, ovoid bir median bulb'a bağlıdır. Dorsal özofagal bez lobu iyi gelişmiştir. Vulva ince, protuberant dudaklı ve vücudun yaklaşık %65-70'lik kısmında arka bölgede konumlanmıştır. Vagina, anterior yönlü konumlanmıştır. Genital doku monoprodelfiktir veya iki yönde uzanmıştır. Gelişen oositler çoğunlukla bir veya iki sıralıdır. Post uterine dokusu, vücut eninin uzunluğundan daha kısadır. Kuyruk orta uzunlukta, konoid, uca doğru incelen ve mukro net tiptedir. Erkeklerin kuyruk bölgesi keskin biçimde kıvrıktır. Spikül, gül dikenli biçiminde ve ucu çengel şeklindedir. Spermatozoa flagellalıdır. Kuyruk papilleri üç parçalıdır: Birisi rostrumun yanında ve anal bölgenin önünde, ikincisi adanal bölgede ve üçüncüsü kuyruk ucuna yakın bulunur. Kuyruk kısa, konoid ve mukro nettir. Yanal bölgelerin kütikulu, son papil ile kuyruk ucu arasında, ventralinde hafifçe kalınlaşır (Şekil 5). Fakat bu terminal bursa olarak kabul edilmemektedir (De Crappeo and Giblin-Davis, 2001).

*Schistonchus* ve *Parasitodiplogaster* cinslerinin sistematigi (Chen et. al, 2004);

Phylum: Nematoda

Classis: Secernentea

Ordo: Aphelenchida

Subordo: Aphelenchina

Superfamilya: Aphelenchoideoidea

Familya: Aphelenchoididae

Genus: *Schistonchus*

Phylum: Nematoda

Classis: Secernentea

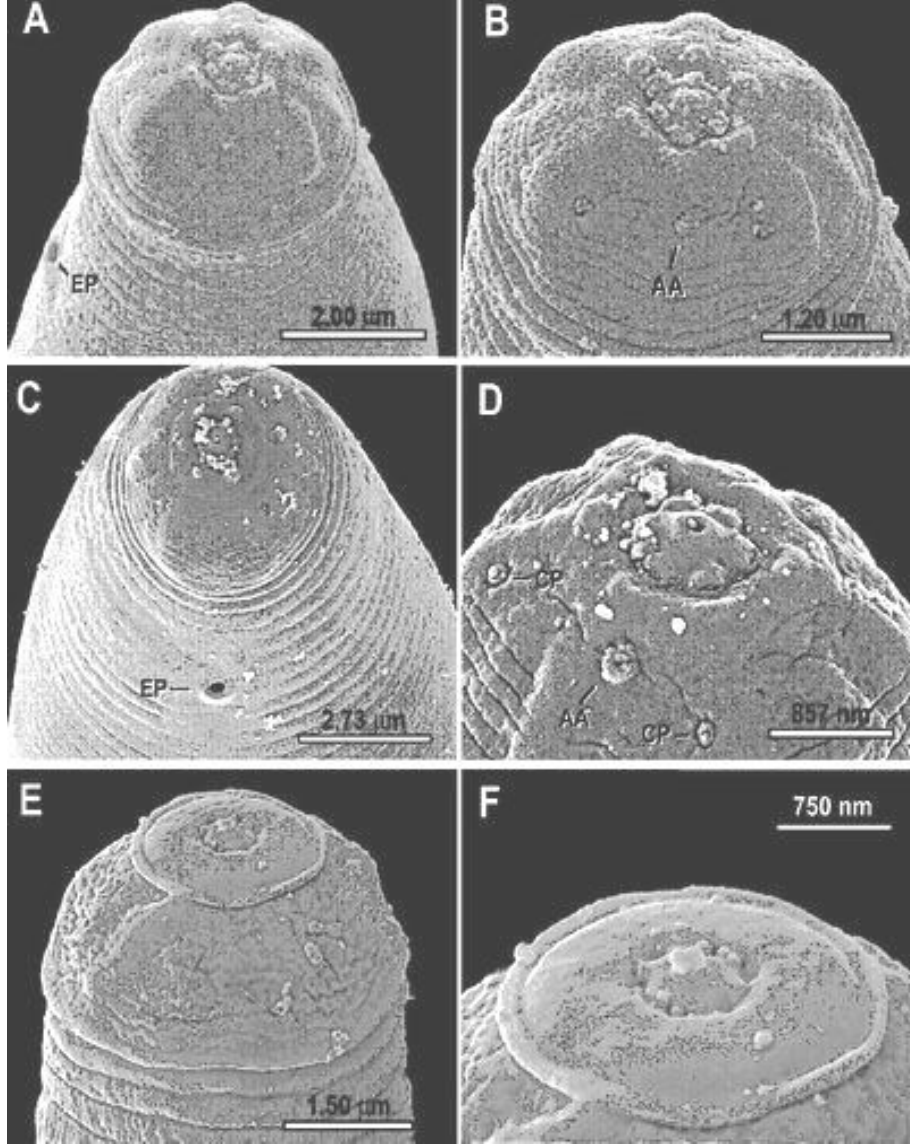
Ordo: Diplogasterida

Subordo: Diplogasterina

Superfamilya: Diplogasteroidea

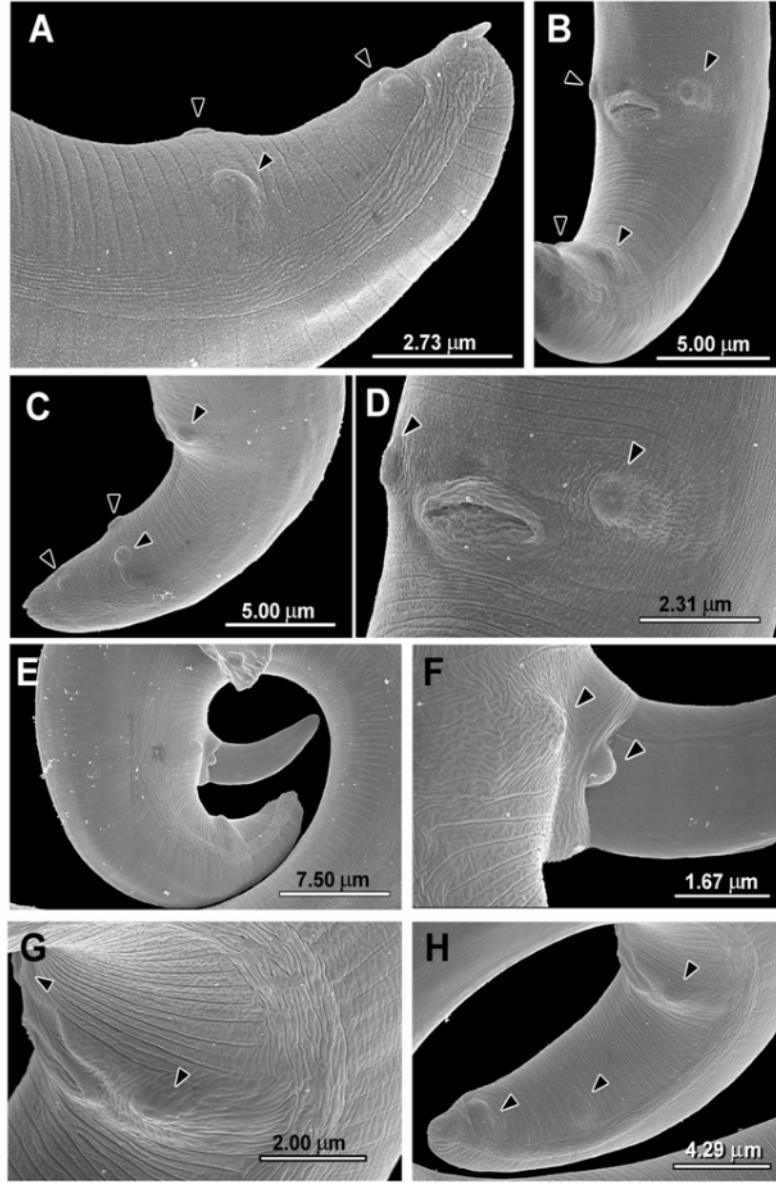
Familya: Diplogastridae

Genus: *Parasitodiplogaster*



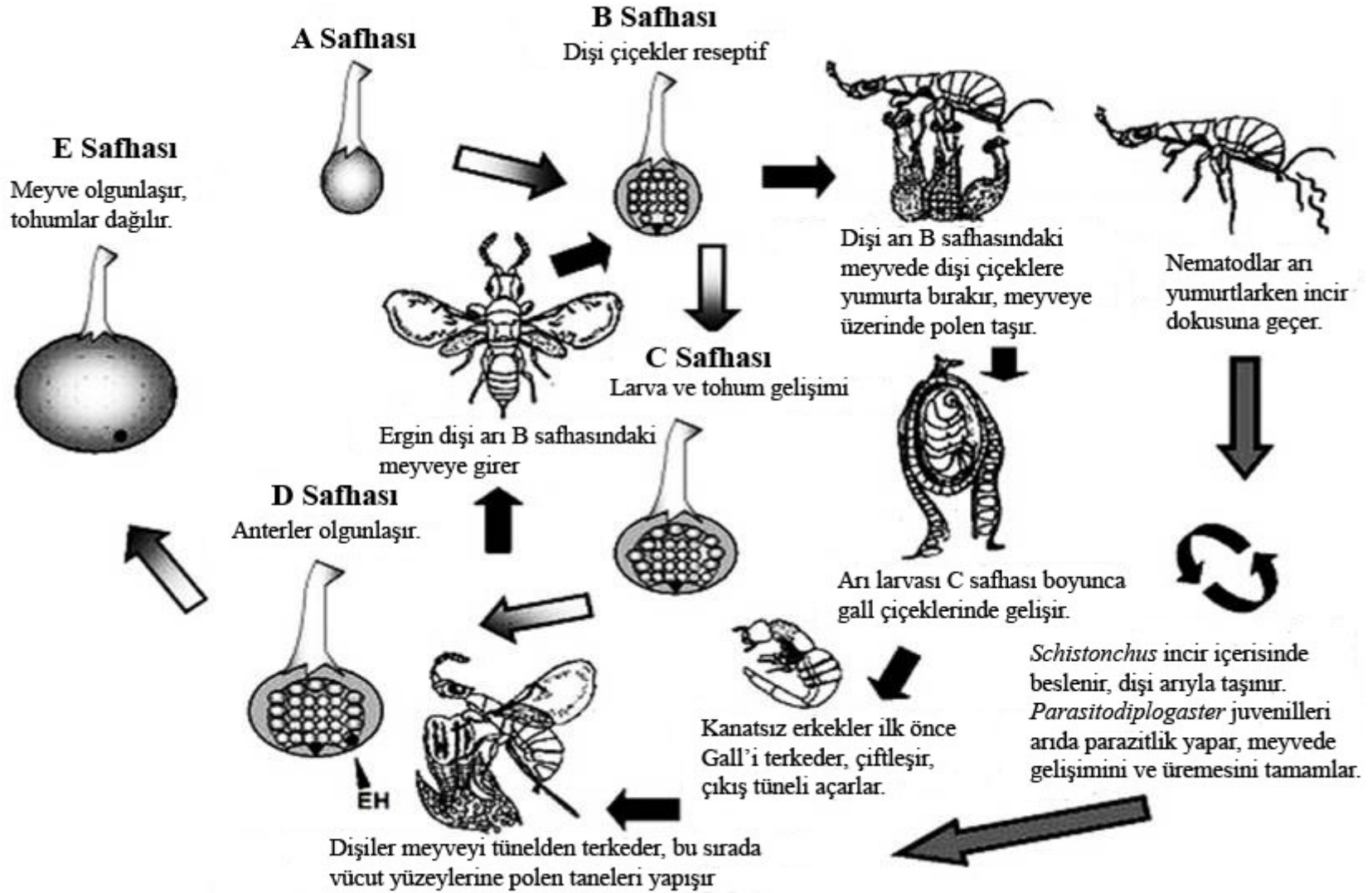
Şekil 4. Bazı *Schistonchus* türlerinin baş bölgesinin elektron mikroskop görüntüleri.

(A-B *Schistonchus aureus* ♀, C-D *S. laevigatus* ♀, E-F *S. caprifici* ♀) (De Crapeo and Giblin-Davis, 2001).



Şekil 5. Bazı *Schistonchus* türlerinin kuyruk papillerinin elektron mikroskop görüntüleri (A-D, *Schistonchus aureus*, E-H, *S. laevigatus*) (De Crappeo and Giblin-Davis, 2001).

*Schistonchus* cinsine ait nematodlar incir polinatör arıları ile foretik bir ilişki içindedirler. Ergin dişi arıların hemosolünde, entomojen dişi nematodlar taşınır. Polinatör arılar B safhasındaki incir meyvesine girip yumurtalarını gall çiçeklerine bırakırken nematodlar da bu esnada arıyı terk etmektedir. Bir önceki meyvede çiftleşip gelen entomojen dişi nematodlar yumurtalarını meyve dokusuna bırakırlar. Yumurtadan çıkan J2 infektif evre juveniller sırasıyla J3, J4 ve erişkin erkek ile dişi nematod haline gelirler. *Schistonchus* cinsi nematodlar incir meyvesine geçince olgunlaşmamış erkek çiçek dokusu ve çiçek parenkima dokusu ile beslenirler (Giblin-Davis et al., 1995). İncir meyvesinde yaptıkları parazitlik ile meyve dokusunda nekrozlara sebep olurlar. Erişkin erkek ve dişi nematodlar tekrar çiftleşir. Aynı döngü birkaç kez tekrarlanır. Bu sırada meyve B safhasındayken gall çiçeklerine bırakılan arı yumurtalarından çıkan arı larvaları da C safhası boyunca hiperplastik çiçek dokusu ile beslenerek gelişimlerine devam etmektedirler (Vovlas and Larizzo, 1996). Meyve D safhasına geldiğinde çiftleşmiş dişi nematodlar, dişi polinatör arılar gall çiçeklerini terk etmeden arıların anüs ve diğer vücut açıklıklarından girerek hemosolüne geçerler. Yeni nesil polinatör dişi arılar meyveyi terk ederken nematodlar da başka bir meyveye döngüyü tekrarlamak üzere taşınmış olurlar (Giblin-Davis et al., 1995) (Şekil 6).



Şekil 6. İncir, incir polinatör arıları ve ilişkili oldukları nematodlar arasındaki hayat döngüsü (Giblin-Davis et al., 1995).



## 2. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma kapsamında ülkemizde incir (*Ficus*) bitkisinin yayılım gösterdiği Ege, Akdeniz, Karadeniz, Güneydoğu Anadolu, İç Anadolu, Doğu Anadolu ve Marmara bölgelerinde arazi çalışmaları yapılmış ve incir örnekleri toplanmıştır. Erkek incirlerde yılın her dönemi ağaçlarda meyve bulunduğu için mevsim faktörü çok fazla önem taşımamaktadır. Arazi çalışmaları Mart 2004'de başlayıp yıl boyunca ve 2005 yılında da devam etmiştir. Örnekleme yapılırken her bir ağaçtan 10-12 adet meyve toplanmıştır. Aynı zamanda örnek alınan incir bitkisinden de ağacın tür teşhisinin yapılabilmesi için küçük bir dal örneği ile 5-6 adet taze yaprak örneği alınmıştır (Şekil. 7). İncir meyveleri, dal ve yaprak örnekleri her ağacın ayrı olacak şekilde kağıt torbalar içerisine konup etiketlenmiştir. Etiketlin üzerinde örneğin alındığı bölgenin ismi, kod numarası ve toplandığı tarih bulunmaktadır. Ayrıca meyvesi toplanan her ağacın bulunduğu yerin GPS koordinatları kaydedilmiştir. Örnek alınırken iki ayrı noktadaki ağaçlar arasında en az 40 km mesafe olmasına dikkat edilmiştir. Alınan örnekler incelenmek üzere laboratuvara getirilinceye kadar serin bir yerde muhafaza edilmiştir. Bunun için 50 litrelik buzluklar kullanılmıştır (Giblin-Davis et al., 1995).

Laboratuvara getirilen örnekler aynı ağaçtan 1-2 meyve olacak şekilde petri kaplarına yerleştirilmiş ve bistüri yardımıyla küçük birkaç parçaya ayrılmıştır. Meyveler tamamen parçalanmadan önce bistüri ile ikiye bölünerek hangi safhada oldukları belirlenip kaydedilmiştir. D safhasındayken disekte edilmiş meyvelerde bulunan ergin polinatör arı ve kleptoparazit örnekleri de tür teşhisinde kullanılmak üzere %95 etil alkol içeren eppendorf tüplerine aktarılmıştır. İncir örneklerinden nematodları elde etmek için petrolere bir miktar distile su eklenerek 10-15 dakika beklenmiştir (Şekil 8) (Giblin-Davis et al., 1995; De Crappeo and Giblin-Davis, 2001.). Bu sayede nematodların suya çıkması sağlanarak daha sonra bunlar fırça kılı takılı bir çubuk yardımıyla toplanıp 5µl 1XTE (10 mM Tris, 1 mM EDTA PH= 7.5 ) içeren eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Bu tüplerdeki örnekler DNA analizinde kullanılacak örneklerdir. Ayrıca morfolometrik ölçümlerini yapmak için kalıcı

preparatlarda kullanılmak üzere 60-70 kadar nematod, içerisinde Ringer' s solusyonu (9 gr NaCl, 0.4 gr KCl, 0,4 gr CaCl<sub>2</sub>, 0.2 gr NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1 lt distile su) bulunan cam tüplere aktarılmıştır. Pozitif çıkan her ağaçtan ikişer tüp nematod örneği DNA analizi için alınmıştır. Moleküler analizler için alınan her tüpe cinsiyet ayırt etmeden en az 50 nematod aktarılmıştır. Tüplere çok sayıda nematod aktarılmasının sebebi boyut olarak oldukça küçük olan incir nematodlarının tüpten tüpe aktarımı sırasında olabilecek kayıplardan dolayıdır. Eppendorf tüplerine aktarılan nematod örnekleri DNA ekstraksiyonuna kadar -20<sup>0</sup>C'de saklanmıştır.



**Şekil 7. Araziden meyve örneklerinin toplanması**



Şekil 8. Petrilerde dilimlenmiş incir meyveleri

## 2. 1. Nematod Örneklerinden DNA İzolasyonu:

Bu tez çalışmasında nematod örneklerinden DNA izolasyonu için, Yen ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntem bazı değişiklikler uygulanarak kullanılmıştır (Yen et al., 1992).

Tüplere alınan 5-10 nematod örneğine aşağıdaki basamaklar uygulanarak DNA izole edilmiştir.

1. 5- 10 tane nematod örneği, 1.5 ml. hacimdeki mikrofüj tüpüne alınır.
2. Nematod örnekleri üzerine 500 µl'ye tamamlayacak kadar TE (10 mM tris-1 mM EDTA) tamponu Proteinaz-K ve lizis tamponu eklenir.

Lizis Tamponu:

- . -%10 SDS: 80µl
- 10 mg/ml Proteinaz K: 3µl
- 1N NaCl: 90µl ve TE Buffer: 500µl' ye tamamlayacak kadar.

3. Karışım, 56°C'de 90 dakika inkübasyona bırakılır.
4. Tüplere, karışım hacminin yarısı kadar fenol, yine yarısı kadar kloroform eklenir ve tüpler karıştırılır.
5. 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj uygulanır.
6. Üst safha yeni tüpe alınarak üzerine %100 etanol eklenir.
7. 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj uygulanır.
8. %100 etanol atılır ve presipite olmuş DNA, %70 etanolla yıkanır.
9. %70 etanol atılır ve DNA, 50 µl distile suda çözülür (Yen et al., 1992).

### **Özgül Gen Bölgelerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Amplifikasyonu:**

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), bir gen ya da DNA bölgesinin, bu bölgeye ait kalıp ve uygun primerler yardımıyla *in vitro* olarak çoğaltılması işlemidir. Kary Mullis ve arkadaşlarının ortaya atılan; Saiki ve arkadaşlarının (1988) geliştirilen bu yöntem, çok değişik kaynaklardan izole edilen DNA materyalinin belirli bir kısmının çoğaltılmasını sağlamaktadır.

Polimeraz zincir reaksiyonunun her basamağı 3 evreden oluşmaktadır.

#### a) Denatürasyon :

Çift sarmal DNA bu aşamada yüksek sıcaklığa maruz kalınca, sarmalları bir arada tutan hidrojen bağları açılarak tek sarmal DNA haline geçer.

#### b) Primerlerin bağlanması (annealing):

Çoğaltılması istenen bölgeye spesifik primer adı verilen oligonükleotidler DNA tek sarmalı üzerinde komplementer oldukları bölgelere bağlanır.

#### c) Primerlerin uzatılması (Extention):

PCR reaksiyon karışımı içerisinde yer alan dNTP, MgCl<sub>2</sub> ve Taq polimeraz enzim tamponu, Taq polimeraz enziminin spesifik primerin bağlı olduğu kalıp DNA'yı, 70-75 °C arasında bir sıcaklıkta çoğaltması için gerekli tüm maddeleri içermektedir.

Kalıp DNA'ya bağılı primerler enzim tarafından bu maddeler kullanılarak uzatılır. Yeni oluşan sarmal bir sonraki döngü için kalıp görevi görür (Saiki et al., 1988).

Bu tez çalışması kapsamında incelenen nematod örneklerinin moleküler analizi için, 759 baz çifti uzunluğunda olan rRNA 28S büyük alt biriminin D2D3 gen bölgesi ve 627 baz çifti uzunluğundaki mitokondriyal DNA sitokrom oksidaz I (mtCOI) gen bölgesi kullanılmıştır. Bu bölgelere ait amplifikasyonlar, aşağıda verilen özgül primer setleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyon yöntemi ile yapılmıştır. (Giblin-Davis et al., 2005; Ye, 2006)

28S büyük alt biriminin D2D3 gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan primer seti şu şekildedir:

D2a 5'- ACAAGTACCGTGAGGGAAAGT-3'

D3b 5'-TGCGAAGGAACCAGCTACTA-3'

Mitokondriyal DNA sitokrom oksidaz I gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan primer seti ise şu şekildedir:

COI-FI 5'-CCTACTATGATTGGTGGTTTTGGTAATTG-3'

COI-R2 5'- GTAGCAGCAGTAAAATAAGCACG-3'

Polimeraz zincir reaksiyonu ( PCR ) için, aşağıdaki karışım hazırlanır:

10x PCR tamponu	10 µl.
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	7.5 µl.
dNTP (25 mM)	1 µl.
Primer 1(direkt)	1µl
Primer 2 (revers)	1µl.
dH <sub>2</sub> O	100 µl.ye kadar
<b>Toplam Hacim</b>	<b>100 µl.</b>

\* Primerlerin tamamı, mikrolitresinde 100 pikomol bulunacak şekilde çözülmüştür.

Yukarıdaki karışıma 10 µl DNA eklenip karıştırıldıktan sonra tüp, termal döngü aletine yerleştirilmiş ve 95°C'de 4 dakikalık denatürasyon programı başlatılmıştır. Bu ilk denatürasyonun iki amacı vardır. Birinci amaç, kalıp DNA'nın tamamen denatüre edilmesi; ikinci amaç ise reaksiyon tüpünde bulunabilecek muhtemel proteinlerin denatüre edilerek reaksiyona engel teşkil etmemelerini sağlamaktır. Denatürasyon bittikten sonra, hot start reaksiyonu için sıcaklık 85°C'de iken tüpe 25 ünite Taq DNA polimeraz eklenmiş ve 30 döngüden oluşan PCR programı başlatılmıştır:

95°C'de 1 dakika

64°C'de 1 dakika

72°C'de 1 dakika.

30 döngüden sonra, bir kez aşağıdaki son uzama basamağı uygulanmış ve amplifikasyon tamamlanmıştır:

72°C'de 7 dakika.

Polimeraz zincir reaksiyonundan elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiş ve daha sonraki aşamada otomatik dizi analizi yöntemi ile örneğe ait DNA dizisi belirlenmiştir.

DNA örneklerinin tür teşhislerinde kullanılan otomatik DNA dizi analizi yöntemi Amerika Birleşik Devletleri, Florida Üniversitesinde Prof. Dr. Robin Giblin-Davis ve Dr. Weimin Ye tarafından yapılmıştır. Bu amaçla amplifikasyon işlemleri tamamlanan örnekler Florida Üniversitesine gönderilmiştir.

## **2. 2. Nematod Örneklerinin Morfometrik Ölçümleri**

Elde edilen nematodlardan sekans analizi yapılmış izolatların morfometrik analizlerinin de yapılabilmesi için kalıcı preparatları hazırlanmıştır. Bunun için erkek ve dişi nematodlar kullanılmıştır (Vovlas and Larizza, 1996; Giblin-Davis and De Crapeo, 2001). Toplanan nematodlar önce Ringer's solusyonu içerisine alınmış ve

daha sonra 60°C' lik su banyosunda 2 dakika süre ile bekletilerek nematodların cansız hale gelmeleri sağlanmıştır. Sonraki aşamada ise nematodlar TAF (Triethanolaminformalin) içerisine alınmışlardır. Daha sonraki safhalarda nematodlar solution I (20ml %95 lik etanol, 1ml gliserin, 79ml distile su) ve solution II (5ml gliserin, %95 lik 95 ml etanol) ile muamele edilmiştir. Morfometrik ölçümlerinin yapılabilmesi için en son olarak gliserin yöntemi uygulanmıştır (Kaya and Stock, 1997; Hazır, 2002). Ölçümler Leica IM50 model ölçüm modülü ve bilgisayar bağlantılı görüntülü mikroskop kullanılarak yapılmıştır.

Morfometrik ölçümlerde kullanılan ortak kriterler: toplam boy uzunluğu, vücut genişliği, spikül uzunluğu, anüs genişliği, kuyruk uzunluğu, mucro, stylet uzunluğu, baştan özofagusun kaidesine olan uzaklık (ES), baştan boşaltım deliğine olan uzaklık (EP), baştan sinir halkası sonuna olan uzaklık (NR) (Vovlas and Larizza, 1996; Hominick et al., 1997; Kaya and Stock, 1997; De Crappeo and Giblin-Davis and 2001).

### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

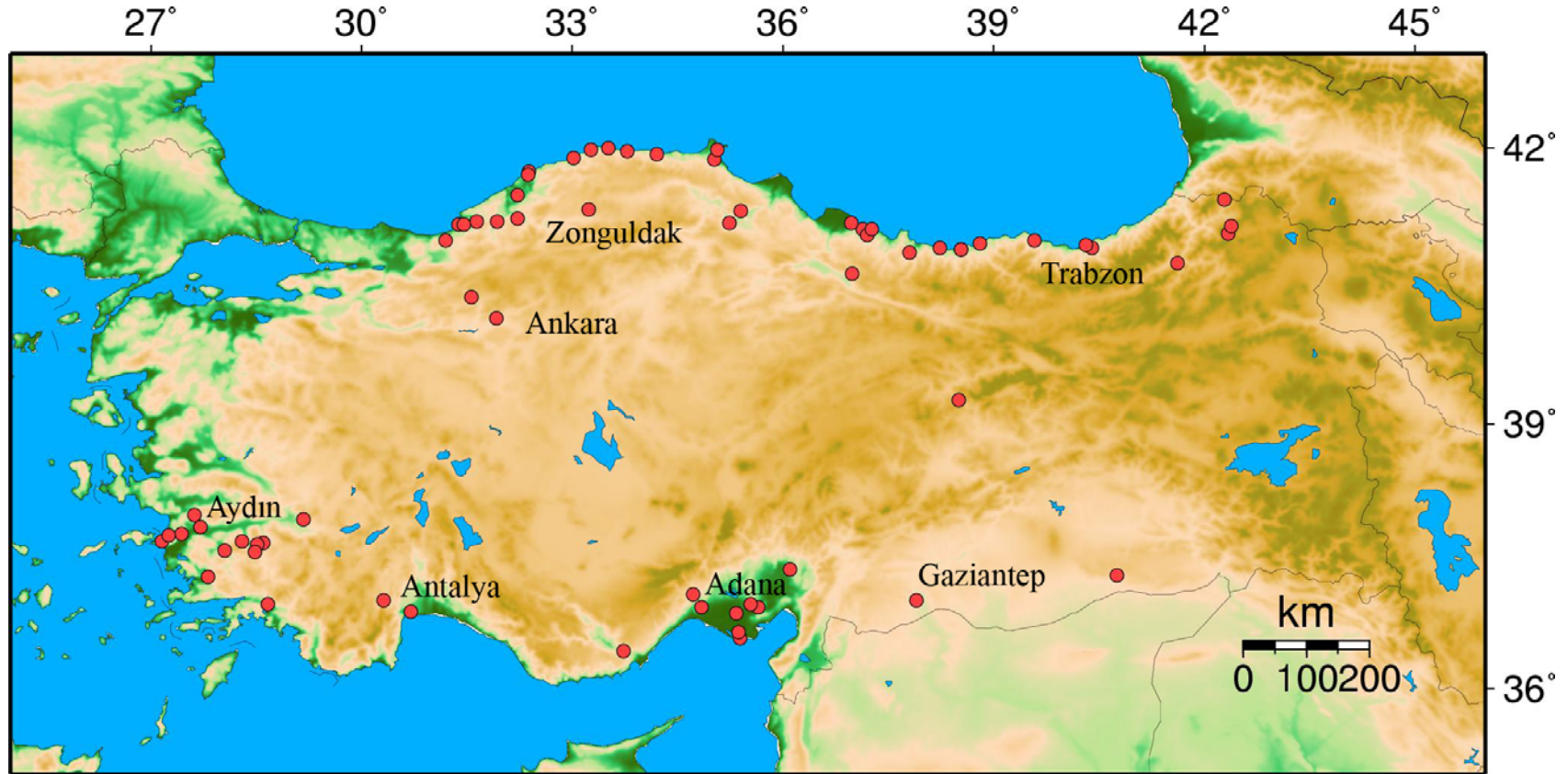
#### 3. 1. Araştırma Bulguları

Yapılan bu çalışma sonucunda ülkemizde incirin yayılış gösterdiği Ege, Akdeniz, Karadeniz, Güneydoğu Anadolu, İç Anadolu, Doğu Anadolu ve Marmara bölgelerinden toplam 308 farklı ağaçtan meyve ve dal örneği alınmıştır. 150 örnekte nematoda rastlanmıştır (Şekil 9). Örnek alınan bölgeler ve örnek sayıları aşağıda verilmiştir (Çizelge 2, Şekil 10). Toplanan dal ve meyve örnekleri üzerinden yapılan morfolojik gözlemler incir türünün *Ficus carica* olduğunu göstermiştir. Yapılan morfometrik ve moleküler analizler sonucu elde edilen tüm nematodların bir tek türe; *Schistonchus caprifici*'ye ait olduğu belirlenmiştir. Nematod bulunan meyvelerde ergin ya da larva formunda polinatör arılara ve kleptoparazitlere de rastlanmıştır. Yapılan incelemeler nematodların C ve D safhasındaki meyvelerde fazla sayıda bulunduğunu göstermiştir.

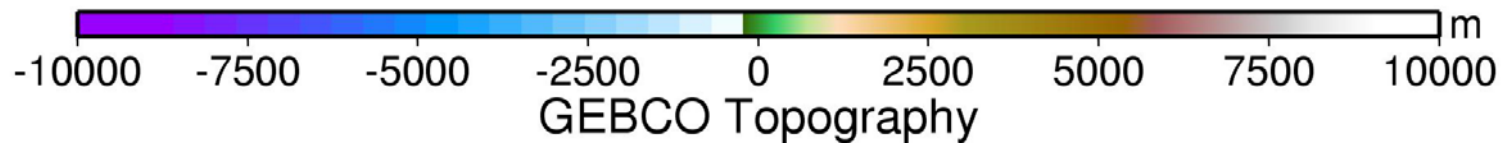
Çizelge 2. Bölgelere göre örnek alınan ve nematod bulunan ağaç sayıları

BÖLGE	Toplam Örnek Sayısı	Nematod Bulunan Örnek Sayısı	Bulunma Oranı (%)
Akdeniz Bölgesi	159	61	38
Doğu Anadolu	2	1	50
Ege Bölgesi	50	42	84
Güneydoğu Anadolu	15	4	26
İç Anadolu	5	4	80
Karadeniz Bölgesi	75	36	48
Marmara Bölgesi	2	2	100

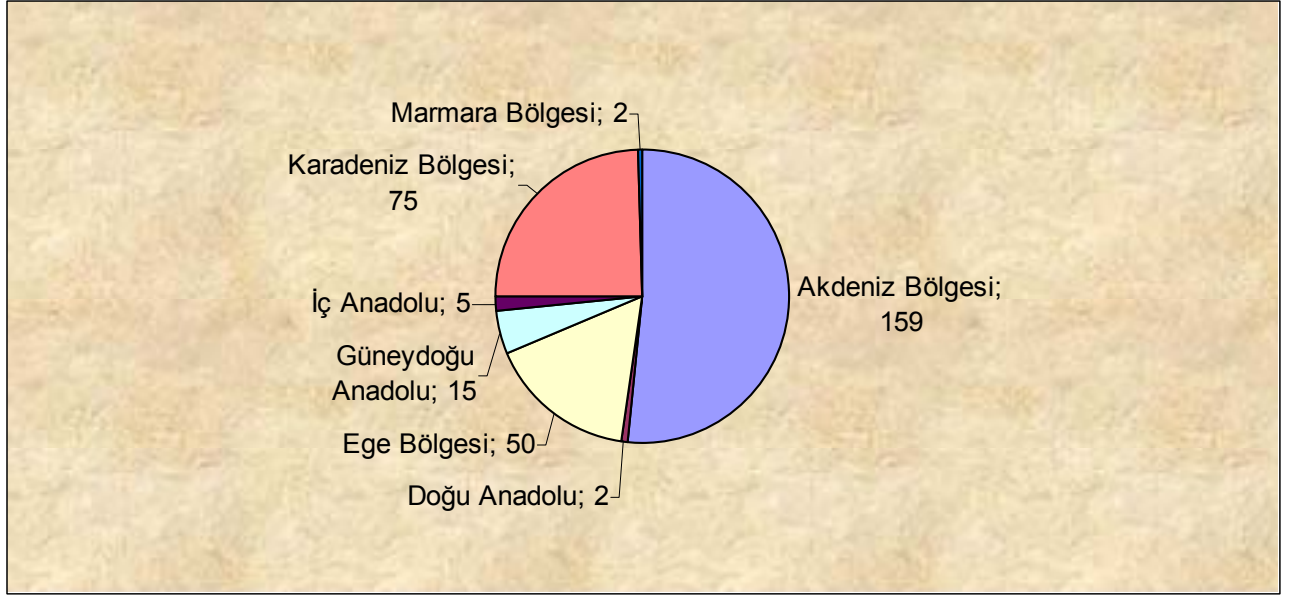




GMT 2006 Jul 28 02:41:03 seaturtle.org/maptool Projection: Mercator



Şekil 9. Toplanan incirlerden nematod elde edilen bölgeler



Şekil 10. Toplam örnek sayısının bölgelere göre dağılımı

Kalıcı preparatları yapılarak morfometrik ölçümleri gerçekleştirilen dişi ve erkek nematodların ölçüm sonuçları çizelge 3'te verilmiştir.

Çizelge 3. *Schistonchus caprifici* Populasyonlarının Morfometrik Ölçüm Sonuçları (µm)

(n=20)	Dişi Bireyler	Erkek Bireyler
<b>Toplam boy uzunluğu</b>	601.2	426.5
<b>Vücut genişliği</b>	22.75	21.70
<b>Spikül uzunluğu</b>	-	20.20
<b>Anüs genişliği</b>	20.64	19.30
<b>Kuyruk uzunluğu</b>	43.25	21.80
<b>Mucro</b>	-	0.66
<b>Stylet uzunluğu</b>	22.47	22.60
<b>ES (Baştan özofagusun kaidesine olan uzaklık)</b>	59.3	54.6
<b>EP (Baştan boşaltım deliğine olan uzaklık)</b>	82.9	48.5
<b>NR (Baştan sinir halkası sonuna olan uzaklık)</b>	42.45	38.32

Dişi nematodların genel vücut yapısı ile erkek nematodların özellikle spikül şekli türler için karakteristik ve belirleyici özelliklere sahip olduğundan bunların mikroskop altındaki görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 11).



*Schistonchus caprifici* erkeğinin  
kuyruk ve spikül yapısı (100x)



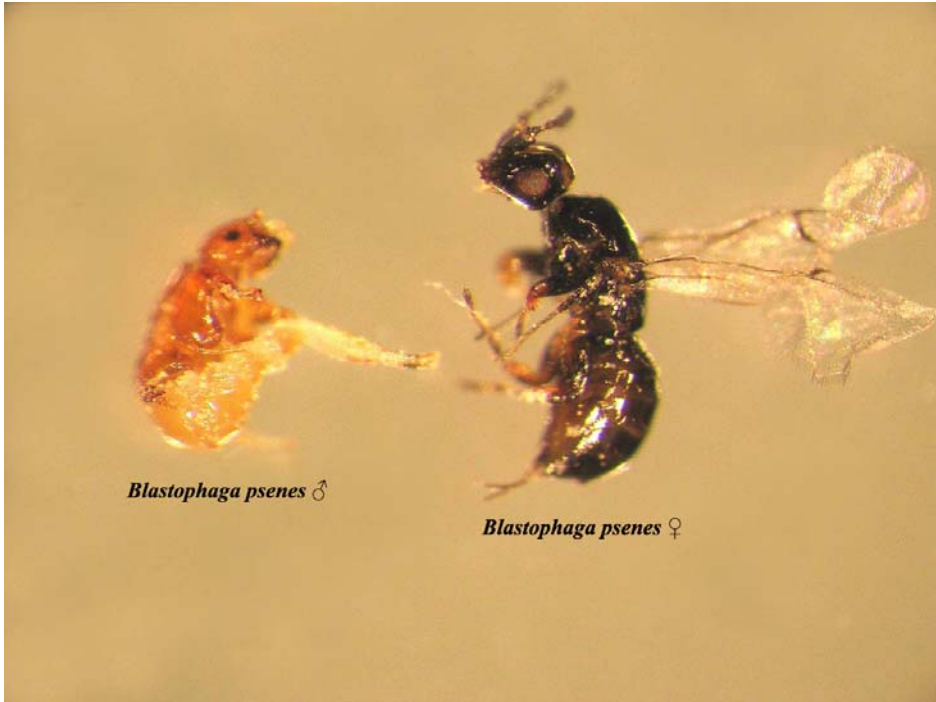
*Schistonchus caprifici*  
dişisinin genel görünüşü (40x)

Şekil 11. *Schistonchus caprifici* ♂, ♀ bireylerin ışık mikroskobu görüntüsü

Yapılan alışmalar sonucunda *Ficus carica* ile ilişkili olan polinatör arıların *Blastophaga psenes* oldukları tespit edilmiştir (şekil 12 ve 13).



şekil 12. *Ficus carica* bitkisi ve incir meyvesinden çıkış yapan polinatör arılar.



şekil 13. Meyve örneklerinde bulunan polinatör arı *Blastophaga psenes* ♂♀ bireyleri (30x)

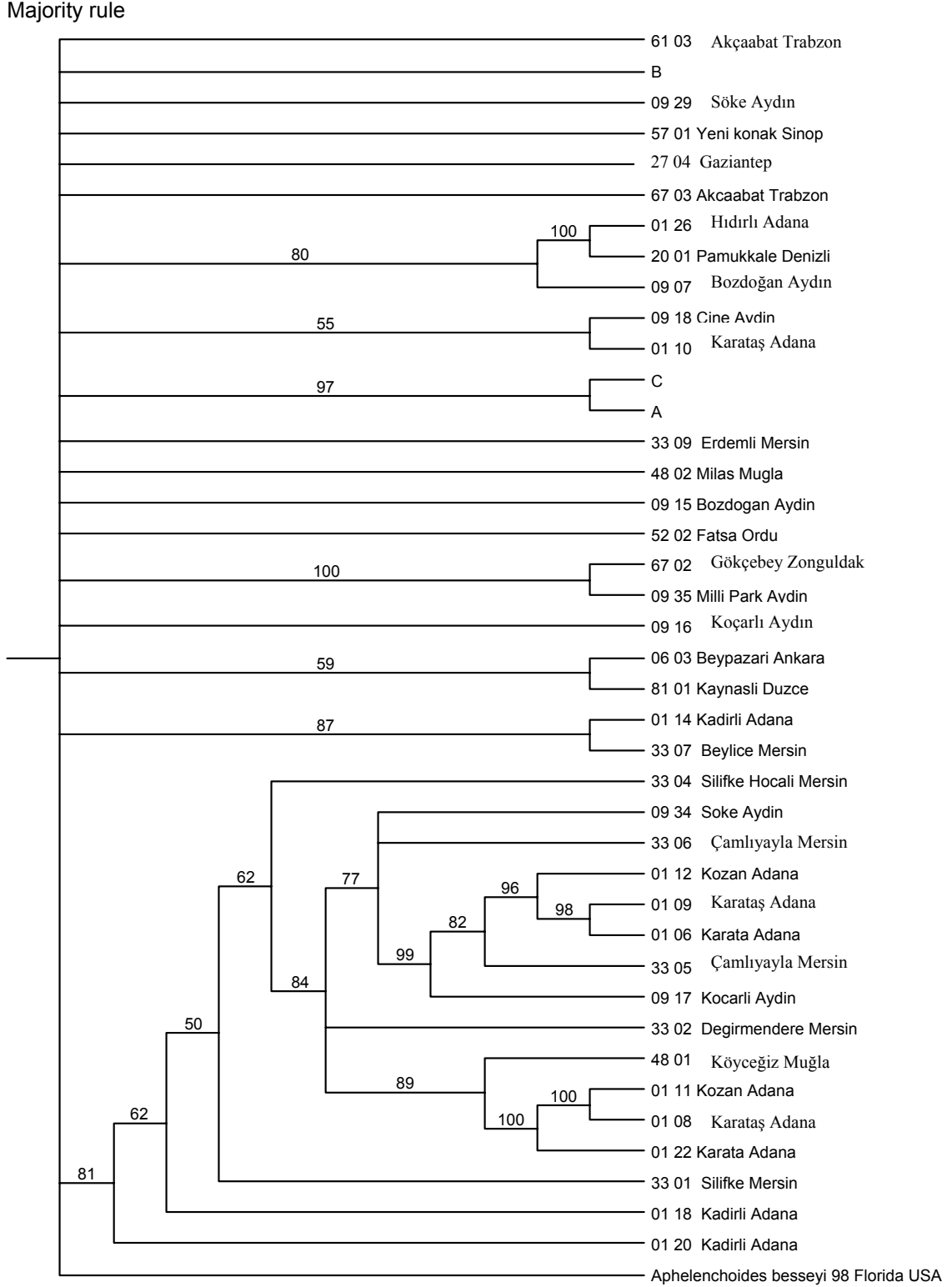
Ayrıca ülkemizdeki incir meyvelerinde *Blastophaga psenes* dışında kleptoparazitik bir tür olan *Philotrypesis caricae*'lerin de varlığı tespit edilmiştir. (Şekil 14).



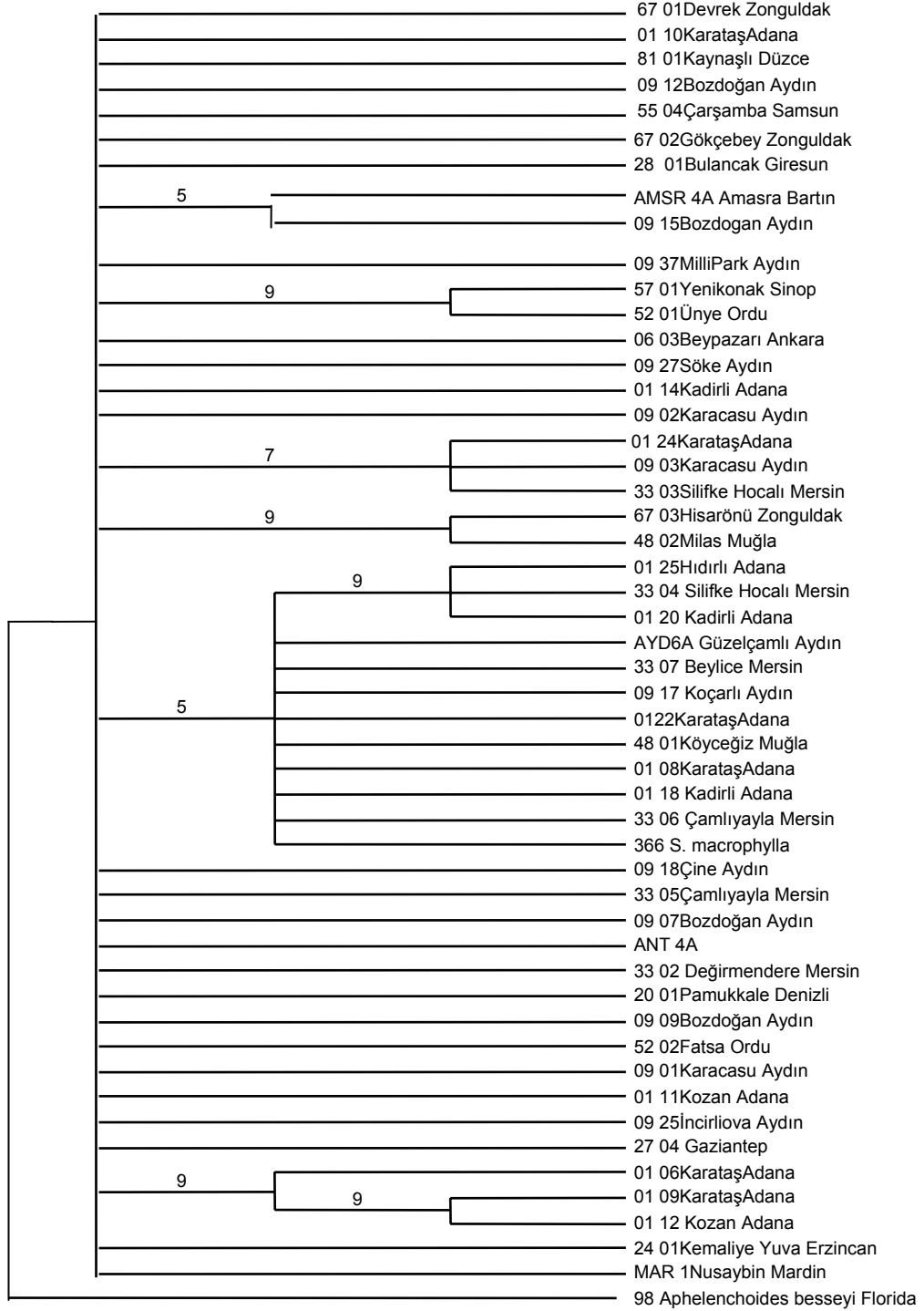
Şekil 14. Meyve örneklerinde bulunan kleptoparazit *Philotrypesis caricae* ♀ (30x).

Moleküler analizlerde kullanılan 28S rRNA D2D3 dizi analizleri ve mitokondrial sitokrom oksidaz I (mt COI) sekansları sonucu elde edilen filogenetik ağaçlar ülkemizdeki incir ve polinatör arılarla ilişkili olan nematodların tek bir türe ait olduğunu göstermiştir (Çizelge 4 ve 5).

**Çizelge 4. Nematod örneklerinin mitokondrial Sitokrom Oksidaz I (mtCOI) dizi analizine göre oluşturulmuş Bayesian filogenetik ağaç**



**Çizelge 5. Nematod örneklerinin 28S rRNA D2-D3 dizi analizine göre oluşturulmuş Bayesian filogenetik ağaç**



### 3. 2. Tartışma

Türkiye, hem eski zamanlarda hem de modern dönemde insanların severek tükettikleri bir meyve olan yenilebilir incirin yayılım merkezi olarak kabul edilmektedir (Aksoy ve Şahin, 2001). Bu çalışma, Türkiye'deki ekonomik değeri olan ve büyük ölçekte üretimi yapılan *Ficus carica* meyvelerinde bulunan nematod populasyonlarının moleküler ve morfolojik yöntemler kullanılarak türlerinin belirlenmesi ve ülkemizdeki dağılımlarının tespit edilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bugüne kadar yapılan hiçbir çalışmada örnek sayısı bu kadar fazla olan ve tüm ülke çapında gerçekleştirilmiş bir araştırma bulunmamaktadır. Yapılan çalışmaların büyük bölümünde sadece morfolojik özelliklere bakılarak ve morfometrik ölçümler kullanılarak nematodlarda tür teşhisleri yapılmıştır (Vovlas et al., 1992). Bu çalışmada ise hem morfolojik ve morfometrik hem de 28S rRNA D2D3 bölgeleri ve mitokondrial DNA sitokrom oksidaz I (mtCOI) dizi analizleri bir arada kullanılmıştır. Çünkü çok fazla ayırt edici morfolojik özelliğe sahip olmayan nematodların tür teşhisinde morfolojik yöntemlerin kullanılması yanlış sonuçlar verebilmektedir. Bu nedenle son yıllarda moleküler yöntemler ağırlık kazanmıştır (Chilton et al., 2003; Giblin-Davis et al., 2005).

*Bursaphelenchus* cinsi (Süperfamilya: Aphelenchoidoidea) ile yapılan daha önceki çalışmalarda 3 farklı genetik bölge (18S rRNA küçük alt ünitesinin tamamına yakın bölümü, 28S rRNA büyük alt ünitesinin D2D3 bölgeleri ve Mitokondrial DNA COI bölgesi) (Ye et al., 2006; Giblin-Davis et al., 2005) kullanılarak nominal türler ve geleneksel morfoloji ve bazı çiftleştirme çalışmalarına dayanarak keşfedilmiş yeni nematod türleri incelenmiştir. D2D3 sekans verileri tür ayrımı ve filogenetik geçmişi ortaya çıkarmak için en geçerli yöntem iken; mtCOI'nin populasyon seviyesindeki çalışmalar için en yararlı yöntem olduğu bulunmuştur (Giblin-Davis et al., 2005). Bu nedenle Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden toplanan *Ficus carica* meyvelerindeki nematodların çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla bu yöntemler kullanılmıştır.



Bu çalışmada, Giblin-Davis, Davies, Ye and Thomas (Unpubl. Data) tarafından daha önce Avustralya, Florida, Costa Rica ve Panama'dan elde edilen 30 dan safhala *Schistonchus* izolatının D2D3 moleküler analiz sekans sonuçları ve olası kardeş ve dış grupların belirlenmesi amacıyla Clustal W kullanılmıştır.

Güney Avusturalya'nın Adelaide tip lokalitesindeki *Ficus macrophylla*'dan elde edilen *Schistonchus macrophylla*, Türkiye'deki *Ficus carica*'dan elde edilen *Schistonchus caprifici*'ye en yakın kardeş grup olarak belirlenmiştir. Burada Aphelenchoididae familyasındaki *Aphelenchoides besseyi* türü, *Schistonchus* cinsine en yakın dış grup olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.5). Diğer tanımlanmış *Schistonchus* türleriyle karşılaştırıldıklarında, *S. caprifici* ile *S. macrophylla*'nın moleküler benzerlikleri morfolojik olarak da desteklenmektedir. Şu anda Akdeniz, Hindistan, Avusturalya, Afrika ve Kuzey Amerikadan tanımlanmış 8 *Schistonchus* türü bulunmaktadır. Bunlar; *S. caprifici* (Vovlas et al., 1992), *S. hispida* (Kumar and Reddy, 1984), *S. racemosa* (Reddy and Rao, 1986), *S. altermacrophylla* (Lloyd and Davies, 1997), *S. macrophylla* (Lloyd and Davies, 1997), *S. africanus* (Vovlas et al., 1998), *S. aureus* (De Crappeo and Giblin-Davis, 2001) ve *S. laevigatus* (De Crappeo and Giblin-Davis, 2001). Bunların içerisinde *S. macrophylla*, *S. aureus* ve *S. laevigatus* türleri başarılı bir şekilde tekrar toplanmış ve sekans dizileri çıkarılmıştır.

*S. caprifici* türü daha önce tanımlanmış bir tür olmasına rağmen bu tanımlamalarda sadece morfolojik özellikler kullanıldığı için moleküler verileri mevcut değildi. Bu türün 28S rRNA D2D3 ve mitokondrial sitokrom oksidaz I bölgesi DNA dizi analizleri ilk defa bu çalışma ile belirlenmiş ve uluslararası Gen Bankasına gönderilmiştir.

*S. caprifici* ve *S. macrophylla* diğer *Schistonchus*lar ve çoğu nematodlarda var olan ameboid spermlerden farklı olarak alışılmadık dışında çubuk şekilli veya kamçılı gibi görünen spermlere sahiptirler (De Crappeo and Giblin-Davis, 2001, Lloyd and Davies, 1997, Vovlas et al., 1992). *S. caprifici* ve *S. macrophylla* ayrıca baş kısımlarındaki dudak bölümünde disk taşırlar ve boşaltım delikleri metacarpusun

yanında yer alır. Diğerlerinde ise dudak diski bulunmaz ve boşaltım delikleri baş kısmına daha yakındır (De Crappeo and Giblin-Davis, 2001, Lloyd and Davies, 1997).

İtalya'da yapılan benzer bir çalışmada *Ficus carica* populasyonlarından toplanan meyve örneklerinden sadece morfolojik değerlendirmeler ile tür tanımlaması yapılmış ve *Ficus carica* ile ilişkili olan nematodların *Schistonchus caprifici* oldukları rapor edilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada kullanılan moleküler ve morfolojik değerlendirmeler ile elde ettiğimiz sonuçlar İtalya'daki çalışma ile birbirini desteklemektedir (Vovlas et al., 1992; Vovlas and Larizza, 1996).

Yapılan bu çalışmada incir meyveleri *Parasitodiplogaster* cinsine ait nematod varlığı açısından da incelenmiştir. Ancak bu cinse ait hiçbir nematoda rastlanmamıştır. Şimdiye kadar literatürde de ülkemizle ilgili bir kayıt bulunmamaktadır. Günümüzde *Parasitodiplogaster* cinsine ait 13 tür tanımlanmıştır. Bunlar *Ficus burkei*, polinatörü *Elisabethiella stuckenbergi* ile ilişkili *P. sycophilon* (Poinar, 1979), *Ficus laevigata* ve polinatörü *Pegascapus* sp. ile ilişkili *P. laevigata*, *F. citrifolia* bulunan *Parasitodiplogaster citrinema*, *F. dugandii* ile ilişkili *Parasitodiplogaster duganema*, *F. maxima* ve nematodu *P. maxinema*, *F. nymphaeifolia* ve nematodu *P. nymphanema*, *F. obtusifolia* ve nematodu *P. obtisunema*, *F. paraensis* ile ilişkili *P. paranema*, *F. pertusa* ve *P. pertanema*, *F. poponoei* ve *P. poponema*, *F. trigonata* ve *P. trigonema*, *F. yoponensis* ve ilişkili nematodu *P. yoponema* (Poinar and Herre, 1991). Tanımlanmış *Parasitodiplogaster* cinsine ait türlerin hiçbirisinin ülkemizde bulunduğu dair henüz bir kayıt mevcut değildir.

Türkiye'nin iklimsel şartları, topografik yapısı ve florası birbirinden çok farklı olan bölgelerinden alınan incir örneklerinden elde edilen nematodların farklı türler göstermeden sadece tek bir türe ait olduğu görülmüştür. Bunda en önemli etken olarak *Ficus carica*'nin ekonomik değeri olan bir meyve olması dolayısıyla bilinçli olarak bir bölgeden diğerine insan eliyle taşınıp üretiminin yapılması ve hayvanlar (özellikle kuşlar) tarafından yenmek suretiyle dağılımlarının gerçekleşmekte olduğu

düşünülmektedir. Bölgeler arasındaki ekolojik ve coğrafik bariyerlerin yeterince işlememesi nedeniyle türleşme mekanizmalarının etkin şekilde görev yapamadığı da tahmin edilmektedir.

#### 4. SONUÇ ve ÖNERİLER

1- Çalışma boyunca Türkiye'den toplanan ve incelenen tüm incir örnekleri tek bir tür, *Ficus carica* olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler ve analizlere dayanarak, Türkiye'deki *Ficus carica*'larda nematod olarak sadece *Schistonchus caprifici*'nin var olduğu belirlenmiştir.

2- 28S rRNA D2D3 sekans dizileri ve mtCOI ile yapılan analiz sonuçları birbirine uygun ağaçlar meydana getirmiş ve Türkiye'den elde edilen tek tür *Schistonchus caprifici*'nin bazı küçük kalıtsal farklılıklara rağmen monofiletik bir tür olduğu hipotezini desteklemiştir. En iyi destek %100 bootstrap ile MP (Maksimum Parsimony) analizinden gelmiştir.

3- İncelenen incir meyvelerinin hiç birinde *Parasitodiplogaster* cinsine ait nematod varlığına rastlanmamıştır.

4- *S. caprifici* ve *S. macrophylla*'ya yakın olan çok daha fazla sayıda *Schistonchus* türlerinin keşfedilmeye ve hem morfolojik hem de moleküler çalışmalarla bu dalın evriminin daha iyi anlaşılmasına ihtiyaç vardır. *Ficus carica* bugüne kadar zaten çok az sayıda olan ginodioik incirler içerisinde nematodlarla ilişkisi araştırılmış olan tek türdür (üzerinde çalışma yapılmış olan incir türlerinin çoğu monoiktir). Diğer ginodioik incir türlerinin de *Schistonchus* türleri ile ilişkilerinin olup olmadığının araştırılması ve aralarında birlikte evrimleşmelerini veya ilişkilerini sağlayan evrimsel bir yönelmenin olup olmadığının incelenmesi oldukça mantıklı görünmektedir.

## ÖZET

Bu çalışma, Türkiye'deki ekonomik değeri olan ve büyük ölçekte üretimi yapılan *Ficus carica* meyvelerinde bulunan nematod populasyonlarının moleküler ve morfolojik yöntemler kullanılarak türlerinin belirlenmesi ve ülkemizdeki dağılımlarının tespit edilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışma boyunca Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan ve incelenen 308 incir örneğinin *Ficus carica* (Moraceae), bunların polinasyonlarını sağlayan arıların da *Blastophaga psenes* (Agaonidae) türü olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan 28S rRNA D2D3 ve mitokondrial sitokrom oksidaz I (mtCOI) dizi analizleri ile morfolojik ve morfometrik incelemelerden elde edilen verilere dayanarak, Türkiye'deki *Ficus carica*'larda bulunan nematodların *Schistonchus caprifici* (Aphelenchoididae) oldukları belirlenmiştir. İlk defa bu çalışmayla *Schistonchus caprifici* türünün DNA dizi analizleri çıkarılarak Gen Bankasına gönderilmiştir.

Çalışmada *Parasitodiplogaster* cinsine ait hiçbir nematoda rastlanmamıştır.

## SUMMARY

In this study, the diversity and distribution of the nematodes associated with polinator fig wasps and native figs (*Ficus sp.*) which have economic importance and wide range of distribution in Turkey were examined using morphological and molecular analyses. During the study, a total number of 308 figs sample collected and investigated from different part of Turkey was determined as *Ficus carica* (Moraceae), and their polinator wasps were identified as *Blastophaga psenes* (Agaonidae). According to the molecular analyses (sequences of 28S rRNA D2D3 domains and mitochondrial cytochrome oxidase I (mtCOI)) and morphological and morphometric measurements, all isolated nematodes from *Ficus carica* in Turkey were identified as *Schistonchus caprifici* (Aphelenchoididae). It was the first time that the DNA sequences of *Schistonchus caprifici* species were obtained and sent to Gene Bank with this study.

The nematodes belong to the genus *Parasitodiplogaster* were not found in this study.

## TEŞEKKÜR

Üniversite ikinci sınıfta özel çalışma öğrencisi olarak yanında çalışmaya başladığım günden beri her zaman gerek arazi gerekse laboratuvar çalışmalarımızda bilim ve hayata dair bilgi ve tecrübelerini paylaşan ve tez çalışmamda her türlü imkanı sağlayan çok değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Selçuk Hazır'a,

Tez çalışmam ile ilgili yürüttüğümüz projenin yöneticiliğini yapan, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Hacettepe Üniversitesi Uygulamalı Biyoloji Anabilim dalından sayın hocam Prof. Dr. Nevin Keskin'e,

Dünyanın pek çok farklı ülkesinde yaptığı çalışmalarıyla konusunda uzman olduğunu kanıtlamış, engin bilgisiyle ve yardımsever kişiliğiyle çalışmamda büyük destekleri olan Amerika Birleşik Devletleri Florida Üniveritesinden Prof. Dr. Robin M. Giblin-Davis'e,

Nematodların moleküler analizlerinde DNA izolasyonu aşamasında ortak çalıştığımız Hacettepe Üniversitesi Moleküler Biyoloji Anabilimdalından Doç. Dr. Hatice Mergen'e, sekans analizlerini yapan Amerika Birleşik Devletleri Florida Üniversitesinden Weimin Ye'ye,

Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne,

Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne,

Çalışmamın arazi ve laboratuvar safhalarında büyük emekleri olan çok değerli dostlarım Canan Çobanoğlu, Havva Şakar, Nazlı Özbek, Ayhan Korkmaz, Burak Yasan, Erdal Aytekin ve diğer öğrenci arkadaşlarıma en içten duygularıyla teşekkür ederim.

## KAYNAKLAR

AKSOY U. ve ŞAHİN N. 2001. İncir Çeşit Kataloğu. Merkez İkmal Müdürlüğü Matbaası. Ankara. 83s.

AKSU, N. ve ÖZCAN, M. 2000. İncirin Döllenme Biyolojisi. OMÜ Zir. Fak. Dergisi, 15 (3): 126-130.

BERG, C. C. 1989. Classification and distribution of *Ficus*. *Experientia* 45: 605-611.

BERG, C. C. 1990. Reproduction and evolution in *Ficus* (Moraceae): traits connected with adequate rearing of pollinators. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 55: 169-185.

BLOUIN, M.S., YOWELL, C.A., COURTNEY, C.H., and DAME, J.B. 1998. Substitution Bias, Rapid Saturation, and The Use of mtDNA for Nematode Systematics. *Mol. Biol. Evol.* 15(12): 1719-1727.

BOUCEK, Z. 1988. Australasian Chalcidoidea (Hymenoptera). A biosystematic revision of genera of fourteen families, with a reclassification of species. :832pp..CAB International, Wallingford, Oxon, U.K., Cambrian News Ltd; Aberystwyth, Wales.

BRONSTEIN, J. L. 1992. Seed predators as mutualists: Ecology and evolution of the fig/pollinator interaction. Pp. 1-44 in E. Bernays, ed. *Insect-plant interactions*, vol. 4. Boca Raton, FL: CRC Press.

BRUSCA, R. C. and BRUSCA, G. J. 2002. *Invertebrates- Second Edition*. Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA. USA. 936p.



BURGERMEISTER, W., METGE, K., BRAASCH, H. AND BUCHBACH, E. 2005. ITS-RFLP Patterns for Differentiation of 26 *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae) and Observations on Their Distribution. Russian Journal of Nematology. 13(1): 29-42.

CHEN, Z. X., CHEN, S. Y. and DICKSON, D. W. 2004. Nematology-Advanceds and Perspectives Volume I: Nematode Morphology, Physiology and Ecology. Tsinghua University Pres. Beijing, China. 636p.

CHILTON, N.B., HUBY-CHILTON, F., and GASSER, R.B. 2003. First complete large subunit Ribosomal RNA sequence and secondary structure for a parasitic nematode: phylogenetic and diagnostic implications. Molecular and Cellular Probes 17: 33-39.

COLLINSON, M. E. 1989. The fosil record of Moraceae. Evolution, systematics, and fosil history of the Hamamelidae. Pp. 319-339. In P. R. Crane, and S. Blackmore, eds. "Higher" Hamamelidae, vol. 2. Oxford, UK: Clarendon Press.

COOK, J. M. and RASPLUS J-Y. 2003. Mutualists with attitude: coevolving fig wasps and figs. Trends in Ecology and Evolution. 18(5) : 241-247.

DE CRAPPEO, N. and GIBLIN-DAVIS R. M. 2001. *Schistonchus aureus* n. sp. and *S. laevigatus* n. sp. (Aphelenchoididae): Associates of Native Floridian *Ficus* spp. and Their Pegascapus Pollinators (Agaonidae). Journal of Nematology 33 (2-3): 91-103.

DEMİRİSOY, A. 2001. Yaşamın Temel Kuralları (Omurgasızlar) H. U. Yayınları, Cilt 2/ kısım 1. Ankara. 417- 440. Meteksan A. Ş.

FRANK, S. A. 1984. The behavior and morphology of the fig wasps *Pegoscapus assuetus* and *P. jimenezi*: descriptions and suggested behavioral characters for phylogenetic studies, *Psyche* 91. 289-308.

GANESHAIAH, K. N., KATHURIA, P.& SHAANKER, R. U. 1995. Does optimal packing of flowers in syconia shape style length variation in monoecious fig? *Biotropica*, 31, 312-320.

GIBLIN-DAVIS, R. M. 1993. Interactions of nematodes with insects. In: W. Khan, ed. *Nematode Interactions*. Chapman & Hall, London. 377p.

GIBLIN-DAVIS, R. M., B. J. CENTER, H. NADEL, J. H. FRANK, and W. B. RAMÍREZ. 1995. Nematodes associated with fig wasps, *Pegoscapus* spp. (Agaonidae), and syconia of native Floridian figs (*Ficus* spp). *Journal of Nematology* 27: 1-14.

GIBLIN-DAVIS, R.M., DAVIES, K.A., TAYLOR, G.S., and THOMAS, W.K. 2003. Entomophilic Nematode Models for Studying Biodiversity and Cospeciation.

GIBLIN-DAVIS, R. M., K. A. DAVIES, G. S. TAYLOR, and W. K. THOMAS. 2004. Entomophilic nematode models for studying biodiversity and cospeciation. Pp. 492-538 in Z. X. Chen, S. Y. Chen, and D. W. dickson, eds. *Nematology, Advances and Perspectives*. New York: Tsinghua University Press/ CABI Publishing.

GIBLIN-DAVIS, R. M., YE, W., KANZAKI, N., WILLIAMS, D., MORRIS, K., and THOMAS W. K. 2005. Systematic, Stomatal Ultrastructure and Molecular Phylogeny of *Parasitodiplogaster laevigata* n. sp.(Nematoda: Diplogasteridae), a Parasite of Fig Wasps from *Ficus laevigata* from Florida. *Journal of Nematology*. In Press.

GRANDI, G. 1985. Istizioni di entomologia generale. Bologna, Italy, Ed. Calderini. 654p.

GREFF, J. M., and S. G. COMPTON. 1996. Sequential oviposition and optimal sex ratios in pollinating fig wasps. *Ecol Entomol.* 21: 300-302.

HAZIR, S. 2002. Türkiye' deki Entomopatojenik Nematodlar (Steinernematidae ve Heterorhabditidae) Üzerine Faunistik Çalışmalar. Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 158s.

HILLIS, D.M and DAVIS, S.K. 1986. Evolution of ribosomal DNA: fifty million years of recorded history in the frog genus *Rana*. *Evolution*, 40 (6), 1275-1288.

HILLIS, D.M. and DIXON, M.T. 1991. Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. *Quarterly Review of Biology.* 66(4): 411–453.

HOMINICK, W.M., BRISCOE, B.R., DEL-PINO, F.G., HENG, J., HUNT, D.J, KOZODOY, E., MRACEK, Z., NGUYEN, K.B., REID, A.P., SPIRIDONOV, S., STOCK, P., STURHAN, D., WATURU, C AND YOSHIDA, M. 1997. Biosystematics of Entomopathogenic Nematodes: Current Status, Protocols and Definitions. *Journal of Helminthology.* 71: 271-298

HOSSAERT-MCKEY, M., M. GIBERNAU, and J. E. FREY. 1994. Chemosensory attraction of fig wasps to substances produced by receptive figs. *Entomol. Exp. Appl.* 70: 185-191.

<http://tr.wikipedia.org/wiki/Magnoliopsida>

<http://waynesword.polomar.edu>

KAYA, H. K and STOCK, S. P. 1997. Techniques in insect nematology. In “Manual of Techniques in Insect Pathology” (L. Lacey, Ed.), pp. 281-324 Academic Pres, San Diego, CA.

KENNEDY M. W. and HARNETT W. 2001. Parasitic Nematodes- Molecular Biology, Biochemistry and Immunology. Athenaeum Pres, Gateshead. UK. 486p.

KJELLBERG, F., GOUYON, P. H., IBRAHIM M., RAYMOND, M., and VALDEYRON, G. 1987. The Stability of The Symbiosis Between Dioecious Figs and Their Pollinators: A Study of *Ficus carica* L. and *Blastophaga psenes* L. Evolution, 41(4), 1987, pp. 693-704.

KJELLBERG, F. (2001) Pollination mode in fig wasps: the predictive power of correlated traits. Proc. R. Soc. Lond. Ser. B 268, 1113-1121.

KOPPENHÖFER, A.M. 2000. Nematodes. Lacey, L. A. and Kaya, H. K. (eds.). Field manual of techniques in invertebrate pathology. Dordrecht, The Netherlands. Kluwer. pp. 283-301

KUMARI, R. V., and Y. N. REDDY. 1984. Studies on the association of a new nematode species *Schistonchus hispida* n. sp. (Aphelenhoidea, Nickle, 1971) and wasp. Proceedings of the Indian Academy of Parasitology 5:21-25.

LLOYD, J., and K. A. DAVIES. 1997. Two new species of *Schistonchus* (Tylenchida: Aphelenchoididae) associated with *Ficus macrophylla* from Australia. Fundamental and Applied Nematology 20: 79-86.

NEFDT, R. J. C., and S. G. COMPTON. 1996. Regulation of seed and pollinator production in the fig-fig wasp mutualism. Journal of Animal Ecology 65: 170-182.

POINAR, G. O., JR. 1979. *Parasitodiplogaster sycophilon* gen. n., sp. n. (Diplogasteridae: Nematoda), a parasite of *Elisabethiella stuckenbergi* Grandi (Agaonidae: Hymenoptera) in Rhodesia. Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen (C) 82: 375-381.

POINAR, G. O., JR., and E. A. HERRE. 1991. Speciation and adaptive radiation in the fig wasp nematode *Parasitodiplogaster* (Diplogasteridae: Rhabditida) in Panama. *Revue de Nematologie* 14: 361-374.

RAMIREZ B., W. 1969. Fig wasps: the mechanism of pollen transfer. *Science* 163: 580-581.

RASPLUS, J. Y. 1996. The one- to- one specificity of the *Ficus* Agaonidae mutualism: how casual? In: *The Biodiversity of African Plants*, (L.G.J. Van der Maesen, X.M. Van der Burgt & J.M. Van Medenbach de Rooy eds) pp. 639-649. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

RASPLUS, J. Y., KERDELHUSE, C., CLAINCHE, I. LE & MONDOR, G. 1998. Molecular phylogeny of fig wasps. Agaonidae are not monophyletic. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences (III)* 321 (6): 517-527.

REDDY, Y. N., and P. N. RAO. 1986. *Schistonchus racemosa* n. sp., a nematode parasite of wasp (*Ceratosolen* sp.) associated with the fig, *Ficus racemosa* L. *Indian Journal of Nematology* 16: 135-137.

RUPPERT, E. E., FOX, R. S., BARNES, R. D. 2004. *Invertebrate Zoology*. Thomson Learning, Inc. Belmont CA. USA. 963p.

RYSS, A., VIEIRA, P., MOTA, M. AND KULINICH, O. 2005. A Synopsis of the Genus *Bursaphelenchus* Fuchs, 1937 (Aphelenchida: Parasitaphelenchidae) with Keys to Species. *Nematology*, 7(3): 393-458.

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A., 1988, primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.

VALDEYRON, G., and D. G. LLOYD. 1979. Sex differences and flowering phenology in the common fig, *Ficus carica* L. *Evolution* 33: 673-685.

VALENTINE, E. W.; WALKER, A. K. 1983. Three families of Hymenoptera new to New Zealand. *New Zealand Entomologist* 7:397-400.

VIGLIERCHIO, D.R. 1991. *The World of Nematodes*. University of California, Davis, Sacramento, USA. 266p.

VOVLAS, N., R. N. INSERRA, and N. GRECO. 1992. *Schistonchus caprifici* parasitizing caprifig (*Ficus carica slyvestris*) florets and relationships with its fig wasp (*Blastophaga psenes*) vector. *Nematologica* 38: 215-226.

VOVLAS, N., and A. LARIZZA. 1996. Relationship of *Schistonchus caprifici* (Aphelenchoididae) with fig inflorescences, the fig pollinator *Blastophaga psenes*, and its cleptoparasite *Philotrypesis caricae*. *Fundamental and Applied Nematology* 19: 443-448.

VOVLAS, N., TROCOLI, A., NOORT, S. V., and BERG, E. VAN DEN. 1998. *Schistonchus africanus* n. sp. (Aphelenchida: Aphelenchoididae) Associated with *Ficus thonningii* (Moraceae) and its Pollinator Wasp *Elisabethiella stuckembergi* (Chalcidoidea: Agaonidae). *Journal of Nematology*. 30 (4): 404 - 410.

WEIBLEN, G, FLICK B, SPENCER H. 1995. Seed set and wasp predation in dioecious *Ficus variegata* from an Australian wet tropical forest. *Biotropica* 27: 391-94.

WEIBLEN, G. D. 1999. Phylogeny and ecology of dioecious fig pollination. PhD thesis. Harvard Univ. , Cambridge. 368 pp.

WEIBLEN, G. D. 2002. How to be a fig wasp. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 299-330.

WEIER, T. E., C. R. STOCKING, and M. G. BARBOUR. 1974. botany: An Introduction to Plant Biology. New York: John Wiley & Sons.

WIEBES, J. T. 1976. A short history of fig wasp research. *Gard. Bulletin, Singapore* 29: 207-232.

WIEBES, J. T. 1979. "Co-evolution of Figs and Their Insect Pollinators. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 10: 1-12.

WIEBES, J. T. 1982. Biogeography and ecology of New Guinea, Nos 1 and 2. Chapter 14. Fig wasps (Hymenoptera). *Monographie Biologicae* 42: 735-755. (Ed.: Gressitt, J. L.)

YE, W., GIBLIN-DAVIS, R.M., BRAASCH, H., MORRIS, K. and THOMAS, W. K. 2006. Phylogenetic Relationships Among *Bursaphelenchus* species (Nematoda:Parasitaphelenchidae) Inferred From Nuclear Ribosomal and Mitochondrial DNA Sequence Data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. (In press).

YEN MY, YEN T C, PANG C Y, LIU JH, WEI YH. 1992. Mitochondrial DNA mutation in Leber's Hereditary optic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Jul;33(8):2561-6.

## **ÖZGEÇMİŞ**

12.06.1981 tarihinde Aydın' da doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini Aydın' da tamamladı. 2004 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2005 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde yüksek lisansa başladı.