



**DNA DİZİSİ TABANLI OLARAK *RAPHIDASCARIS*
ACUS'UN MOLEKÜLER TANIMLAMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mine KESKİN

Danışman
Prof. Dr. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

Nisan, 2019

Bu tez çalışması “17.FEN.BİL.13” numaralı proje ile Afyon Kocatepe Üniversitesi
BAPK Birimi tarafından desteklenmiştir.

**T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DNA DİZİSİ TABANLI OLARAK *RAPHIDASCARIS ACUS*’UN
MOLEKÜLER TANIMLAMASI**

Mine KESKİN

**Danışman
Prof. Dr. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK**

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Nisan, 2019

TEZ ONAY SAYFASI

Mine KESKİN tarafından hazırlanan “**DNA Dizisi Tabanlı Olarak *Raphidascaris acus*’un Moleküler Tanımlaması**” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 15 / 04 / 2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK

Başkan : Prof. Dr. Mustafa YILDIZ
Afyon Kocatepe Üniv., Fen-Edebiyat Fak.

Üye : Prof. Dr. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK
Afyon Kocatepe Üniv., Fen-Edebiyat Fak.

Üye : Doç. Dr. Deniz İNNAL
Burdur Mehmet Akif Üniv., Fen-Edebiyat Fak.

M. Oğuz Öztürk

M. Mustafa Yıldız

M. Oğuz Öztürk

Doç. Dr. Deniz İnnal

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
...../...../..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim EROL
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi.
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu.
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu.
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi.
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı.
- Bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

15/ 04 / 2019



Mine KESKİN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DNA DİZİSİ TABANLI OLARAK *RAPHIDASCARIS ACUS*'UN MOLEKÜLER TANIMLAMASI

Mine KESKİN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK

Bu araştırmada, müze materyali olarak etil alkol ortamında korunan *Raphidascaris acus* türünün (Nematoda, Ascarididae) 5.8S gen dizisi üzerinden moleküler tanımlaması yapılmıştır. 5.8S rRNA gen bölgesi dizi verileri, anatomik ve morfolojik yapılarına göre tanımlaması yapılan *R. acus* türünün taksonomik konumunu doğrulamıştır. Bu süreçte, özel olarak tasarlanan AcusF ve AcusR primerleri kullanılmıştır. gDNA (5.8S rRNA) geninin 750 bp kısmi belirgin nükleotidleri, her numuneden doğrudan dizilenmiştir. Araştırmada incelenen 12 *R.acus* örneğine ait 5.8S gen dizilerinde hiçbir nükleotid varyasyonu tespit edilmedi. 5.8S hizalı nükleotid dizileri bakımından, bu araştırmanın *Raphidascaris acus* izolatları (MK271779-MK271790) ile iki *R.acus* izolatu (KT633862, KM047505) arasında minimum varyasyon görülmüştür. Buna karşın, AY603537 *R.acus* izolatu ile %4.11 farklılık bulunmuştur. *R.acus* izolatlarımız, dört *Raphidascaris* türü ile (JN102362.1 *Raphidascaris longispicula*, FJ009682.1 *Raphidascaris trichiuri*, JF809816.1 *Raphidascaris lophii*, KR232377.1 *Raphidascaris macrouri*) %13.03-14.97, GQ215514.1 *Eustrongylides* sp. dış grubu ile %26 farklılık göstermiştir. Ayrıca bu çalışma sonuçları ile etanolde fikse edilen ve uzun süre etanolde korunan *R.acus* gDNA'larının hasar görmediğini ve rutin olarak çoğaltılabildiği gösterilmiştir.

2019, ix + 36 sayfa

Anahtar Kelimeler: DNA, *Esox lucius*, PZR, *Raphidascaris acus*

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *RAPHIDASCARIS ACUS* (BLOCH, 1779) (RAPHIDASCARIDIDAE) BASED ON DNA SEQUENCES

Mine KESKİN

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetic

Supervisor: Prof. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK

In this study, the molecular identification of the *Raphidascaris acus* species (Nematoda, Ascarididae), which is protected as a material in the ethyl alcohol environment, was carried out on the 5.8S gene sequence. The 5.8S rRNA gene region sequence data confirmed the taxonomic position of the *R. acus* species, which was identified according to their anatomical and morphological structures. In this process, specifically designed AcusF and AcusR primers were used. 750 bp partial certain nucleotides of the gDNA (5.8S rRNA) gene was sequenced directly from each sample. No nucleotide variations were detected in the 5.8S gene sequences of the 12 *R.acus* samples examined in the study. In terms of the 5.8S aligned nucleotide sequences, the minimum nucleotide variations were detected between the present *Raphidascaris acus* isolates (MK271779-MK271790) and the two *R.acus* isolates (KT633862, KM047505). On the other hand, AY603537 *R.acus* isolate showed 4.11% difference. Our *R.acus* isolates differed by three *Raphidascaris species* (JN102362.1 *Raphidascaris longispicula*, FJ009682.1 *Raphidascaris trichiuri*, JF809816.1 *Raphidascaris lophii*, KR232377.1 *Raphidascaris macrouri*) 13.03-14.97%, GQ215514.1 *Eustrongylides* sp. external group 26%. In addition, the present data showed that *R.acus* gDNAs fixed in ethanol and preserved in ethanol for a long time were not damaged and routinely reproduced.

2019, ix + 36 pages

Keywords: DNA, *Esox lucius*, PCR, *Raphidascaris acus*

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez çalışmam süresince desteğini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Oğuz ÖZTÜRK’e şükranlarımı sunarım.

Tez savunma sınavında jüri üyesi olarak görev alan ve tezdeki düzeltmelere katkıda bulunan Anabilim Dalı Başkanı’m Sayın Prof. Dr. Mustafa YILDIZ ve Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden Sayın Doç. Dr. Deniz İNNAL hocama çok teşekkür ederim.

Tez çalışmasına ait örneklerin DNA izolasyonu, dizilemesi ve veri analizine katkıda bulunan Sayın İlkay Selver BÜYÜKTOPÇU, Ahmet DEMİRLİÇAKMAK ve Humen CEBBARİ’ye teşekkür ederim.

Çalışma sürecindeki her aşamada maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen AİLEME çok teşekkür ederim.

Ayrıca bu tez çalışmasını “17.FEN.BİL.13” numaralı proje kapsamında destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Komisyon Birimine teşekkür ederim.

Mine KESKİN

AFYONKARAHİSAR, 2019

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Turna Balığı (<i>Esox lucius</i>)’nın Sistematik, Biyolojik ve Ekolojik Özellikleri....	2
2.2 <i>Raphidascaris acus</i> ’un Taksonomik Konumu.....	4
2.3 <i>Raphidascaris acus</i> ’un Morfolojik ve Anatomik Özellikleri.....	5
2.4 <i>Raphidascaris acus</i> ’un Tayin Anahtarı	8
2.5 <i>Raphidascaris acus</i> Üzerine Yapılan Moleküler Çalışmalar	9
2.6 Ascarid Türler Üzerine Yapılan Moleküler Çalışmalar.....	10
2.7 Dizileme ve Ağaç Yapımında Kullanılan Bazı Yöntemler	11
2.7.1 Mesafe Tabanlı Metotlar.....	11
2.7.1.1 Kümeleme Tabanlı Metotlar.....	11
2.7.1.2 En İyi Durum Tabanlı Metotlar.....	12
2.7.2 Karakter Dayalı Metotlar.....	12
2.7.2.1 Maksimum Parsimony (MP).....	12
2.7.2.2 Maksimum Likelihood (ML)	13
2.7.2.3 Bayesian Analizi.....	13
3.MATERYAL ve METOT.....	14
3.1 Araştırma Alanı Olan Uluabat Gölü’nün Genel Özellikler.....	14
3.2 Araştırma Numuneleri.....	14
3.3 DNA İzolasyonu	15
3.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	17
3.5 Dizileme, Veri Analizi ve Ağaç Oluşturma.....	18

4. BULGULAR	19
4.1 DNA İzolasyon Bilgileri	19
4.2 Dizileme Verileri	20
4.3 Ağaç Verileri	27
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	30
6. KAYNAKLAR	31
ÖZGEÇMİŞ.....	36



KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

bp	baz çifti
mM	mili molar
HCl	hidroklorik asit
NaCl	sodyum korür
pH	hidrojen iyonu değerinin logaritması
K	potasyum
DNA	deoksiribonükleik asit
PZR	polimer zincir reaksiyonu
MgCl ₂	magnezyum klorür
dNTP	di-nükleotid trifosfat
A	adenin
T	timin
G	guanin
C	sitozin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

- Şekil 2.1** *Raphidascaris acus*'un karakteristik kısımlarına ait çizimler: A, B: sefalik uç, C: anterior kısım, D: vulva bölgesi, dişinin arka kısmı, F: erkeğin arka kısmı. Ölçek çubukları, A, B: 100 µm, C–F: 200 µm (Jahantab et al.2014)..... 7
- Şekil 2.2** *Raphidascaris acus*'un genital bölge kısımlarına ait çizimler: A: dişi bireyde vulva açıklığı, B: erkek bireyde posterior uç kısım, C: dişi bireyde posterior uç kısım. Ölçek çubuğu 50 µm (Öztürk, 1995)..... 8
- Şekil 4.1** Seçilen örneklerin 5.8S gen dizilerinden çıkarılan maksimum olabilirlik ağacı..... 28

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 2.1 Turna balığının genel görünümü (Akkent 2015).....	4
Resim 2.2 <i>Raphidascaris acus</i> 'a ait elektron mikrografları. A: dorsal ve subventral dudakların tabanları arasında lateral yaka. B: subventral dudaklar arasında üçgen yükseklik bulunmaması. Ölçek çubukları, A: 20 µm, B: 50 µm (Jahantab <i>et al.</i> 2014).....	6
Resim 3.1 Uluabat Gölü haritası	16
Resim 3.2 Müze materyali olarak korunan <i>Raphidascaris acus</i> numuneleri	16
Resim 3.3 Bu çalışma için rastgele seçilmiş <i>Raphidascaris acus</i> numuneleri.....	16
Resim 3.4 <i>Raphidascaris acus</i> 'tan gDNA izolasyonu.....	17
Resim 4.1 <i>Raphidascaris acus</i> türlerine ait 5.8S rRNA genine ait PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü ve Marker DNA.....	19
Resim 4.2 Bu çalışmada elde edilen <i>Raphidascaris acus</i> izolatları (MK271779- MK271790) ile AY603537.1 <i>Raphidascaris acus</i> , KT633862.1 <i>Raphidascaris acus</i> , KM047505.1 <i>Raphidascaris acus</i> , FJ009682.1 <i>Raphidascaris trichiuri</i> , JF809816.1 <i>Raphidascaris lophii</i> , JN102362.1 <i>Raphidascaris longispicula</i> , GQ215514.1 <i>Eustrongylides</i> sp. izolatlarına ait 5.8S nükleotid dizi hizalama verileri.....	21

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1 <i>R. acus</i> 'un 5.8S rRNA genini çoğaltma ve dizileme için kullanılan primerler.....	18
Çizelge 4.1 İncelenen <i>R. acus</i> numunelerine ait bilgiler.....	20
Çizelge 4.2 <i>Raphidascaris acus</i> izolatu ile farklı lokasyonlardaki izolatların 5.8S nükleotit dizi farklılıklarının (%) ikili karşılaştırılması	27



1. GİRİŞ

Organizmaların moleküler özellikleri, onların yeniden tanımlanması veya benzer taksonlarla karşılaştırılması üzerine yapılan çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Smith 1984). Örneğin, anisakid nematodların yumurta, larva ve yetişkinlerinin tür seviyesinde tanımlanması için ITS1, ITS2 ve 5.8S gibi nükleer rDNA bölgeleri moleküler belirteç olarak başarıyla kullanılmaktadır (Chilton *et al.* 1995, Zhu *et al.* 1998, 2000, 2001, Zhang *et al.* 2007, Fang *et al.* 2010, Testini *et al.* 2011).

Son zamanlarda anisakid türler üzerine yapılan çalışmalarda, hem morfolojik tanımlamalar hem de genetik özellikler sunulmaktadır (Li *et al.* 2012a, b, Shamsi *et al.* 2008, 2009). Bununla birlikte, daha önceki yıllarda morfolojik ve anatomik özelliklerine göre tanımlanmış olan türlerin moleküler özelliklerinin de ortaya çıkarılması günümüz taksonomistlerinin çalışma alanlarından birini oluşturmaktadır (Xu *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2007, Zhu *et al.* 1998, 2000, 2001, Jahantab *et al.* 2014, Şimşek *et al.* 2016).

Bir Anisakid nematod olan *Raphidascaris acus* (Bloch 1779), Holarktik bölgedeki Esocidae, Salmonidae, Anguillidae, Gadidae familyalarındaki balıkların sindirim borusunda parazit olarak yaşayan kozmopolit bir türdür (Moravec 1994). Türkiye’deki çeşitli balık türlerinde *Raphidascaris acus* olgusu klasik anatomik, morfolojik ve moleküler yöntemler yardımıyla tanımlanmıştır (Öztürk vd. 2000, Kır ve Tekin-Ozan 2005, Akmirza ve Yardımcı 2014, Şimşek vd. 2016). Bununla birlikte, Uluabat Gölü (Bursa) turna balıklarındaki (*Esox lucius* L.) *Raphidascaris acus*'un moleküler özelliklerinin belirlenmesi üzerine araştırma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı; Uluabat Gölü (Bursa)’ndeki *Esox lucius* L.’dan izole edilen ve müze materyali olarak korunan *Raphidascaris acus* örneklerinin 5.8S gen dizi bölgesi tanımlamaktır. Elde edilecek genetik verilerle, anatomik ve morfolojik özelliklerine göre teşhisi yapılan *Raphidascaris acus* türünün taksonomik konumu doğrulanacaktır. Ayrıca çalışmada elde edilecek verilerle, küresel ölçekte yapılacak olan *Raphidascaris acus* türünün genetik çeşitliliğinin belirlenmesi çalışmalarına katkı sağlanacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Turna Balığı (*Esox lucius*)'nın Sistematik, Biyolojik ve Ekolojik Özellikleri

Turna balığının sistematik konumu Kuru (2011) tarafından aşağıdaki şekilde sıralanmıştır.

Alem : Animalia

Şube : Chordata

Grup II : Craniata

Altşube : Gnathostomata

Üst sınıf : Pisces

Sınıf : Osteichthyes

Altsınıf : Actinopterygii

Üst takım : Teleostei

Takım : Esociformes

Alt takım : Esocoidei

Familiya : Esocidae

Cins : *Esox*

Tür : *Esox lucius* Linnaeus, 1758 (Turna balığı)

Turna balığı (*Esox lucius* Linnaeus, 1758) tüm kuzey yarımkürede doğal yayılım gösteren, Holoarktik kökenli bir balık türüdür (Resim 2.1). Soğuk su balığı olarak sınıflandırılmaktadır. Bu türün yaşadığı su sıcaklık tolerans aralığı yüksek olduğu için Avrupa ve Asya sularına adapte olmuştur. 12 m den daha az derinlikteki sığ sular ile sucul makrofitlerin yaşadığı bölgeler, ideal yaşam ortamlarını oluşturmaktadır (Craig 2008). Ülkemizin iç sularında genellikle, Sakarya ve Seyhan nehirleri ile Büyük Çekmece, Küçük Çekmece, Sapanca, Manyas, İznik, Uluabat (Apolyont), Akşehir, Eber, Işıklı (Çivril) göllerinde yaşamaktadır (Geldiay ve Balık 1999).

Turna balığının bilimsel ismi *Esox lucius*'dur. Ülkemizin farklı bölgelerinde Turna, Uzunca, Oklama, Dişli, Yılan Balığı, Ördek Gaga, Yeşilbaş ve Çivi Balığı gibi yöresel isimlerle bilinmektedir (Geldiay ve Balık 1999, Çeliktas 2009).

Turna balığı 60-150 cm boyuna ve 15-25 kg ağırlığına sahip yırtıcı bir balıktır. Vücudu uzun, yanlardan hafifçe basık ve küçük pullarla kaplıdır. Başın anterior tarafı oldukça uzun ve yassılaştırmış olup küreği andırmaktadır. İleri doğru uzamış alt çene kenarlarında kuvvetli, sivri ve eklemlili dişler bulunur. Üst çene ise kısa ve dişsizdir. Özel ağız ve çene yapısı nedeniyle kendi büyüklüğünün yarısına yakın balıkları rahatlıkla yutabilmektedir. Başın dorso-lateralinde yer alan gözler, ileri ve yukarı doğru bakar konumdadır. Pektoral ve abdominal yüzgeçler küçük olmasına karşılık, daha gelişmiş olan dorsal ve anal yüzgeçler, vücudun posterior tarafına kaymıştır. Abdominal, anal ve dorsal yüzgeçler kırmızımsıdır. Yüzgeçlerin bu pozisyonu balığın daha hızlı yüzmesine ve ani atak yapmasına büyük kolaylık sağlamaktadır. Vücudun dorsal tarafı zeytin yeşili, açık yeşil ve mavimsi ya da kahverengi olabilmektedir. Bu nedenle rahatlıkla yaşadığı ortamda kamufle olabilmektedir. Karın bölgesi ise daima açık sarı veya kirli beyazdır. Boyları 150 cm, ağırlıkları 35 kg kadar ulaşabilmektedir. Ülkemizde genellikle 15-20 kg ağırlığında bireylere rastlanmaktadır (Geldiay ve Balık 1999, Çeliktas 2009).

Genellikle göllerde görülen bu tür, bazen akarsularda ender olarak da acı sularda yaşamaktadır. Karnivor beslenme özelliğindeki bu balık; balık, kurbağa ve su kuşları gibi çeşitli canlılarla beslenmektedir. Cinsel olgunluğa 4-5 yaşında ulaşmaktadır. Yumurta bırakma periyodu Mart-Nisan aylarındadır. Dişi balığın büyüklüğüne bağlı olarak yumurta sayısı değişmektedir. Yaklaşık 5 kg ağırlığındaki bir dişi balık 90 000 adet yumurta verebilmektedir. Yumurtaların çapı 2-3 mm ve renkleri kavuniçidir (Geldiay ve Balık 1999).



Resim 2.1 Turna balığının genel görünümü (Akkent ve Öztürk 2017).

2.2 *Rapidascaris acus*'un Taksonomik Konumu

Araştırma materyali olan *Rapidascaris acus*'un taksonomik konumu, GBIF | Global Biodiversity Information Facility veri tabanı esas alınarak oluşturulmuştur (İnt. Kyn.1).

Kingdom: Animalia

Phylum: Nematoda

Class: Secernentea

Order: Rhabditida

Family: Rapidascarididae

Genus: *Rapidascaris* Raillet and Henry, 1915

Species: *Rapidascaris acus* (Boch 1779)

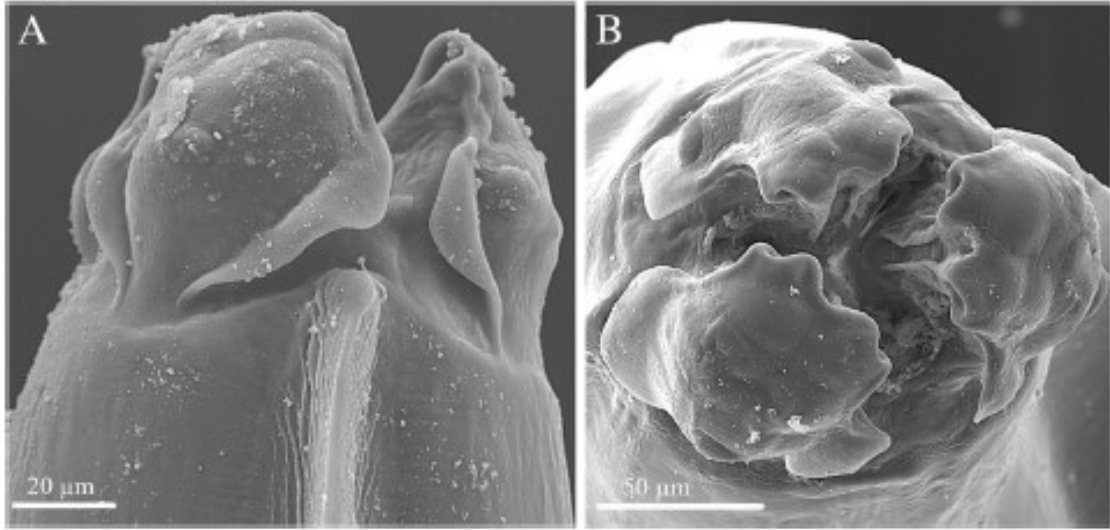
2.3 *Raphidascaris acus*'un Morfolojik ve Anatomik Özellikleri

Enine çizgili kütiküle sahip, beyazımsı orta boy bir nematodlardır. Ağzın terminalinde üç büyük dudak yer almaktadır. Dudakların ön kısmı iki lobludur. Dorsal dudakta iki lateral çift papilla; her bir subventral dudak bir yanal amphid ve bir papillaya sahiptir (Resim 2.2b). Yanal yakalar (alae), subventral ve dorsal dudakların kaide kısmındaki bölgeden başlar ve posteriörde kuyruk orta kısmına kadar uzanmaktadır (Resim 2.2A). Ara dudaklar yoktur. Dudakların kaide kısımlarındaki pedunkulat yapıları ile kütikül özellikteki yakaların varlığı bu tür için karakteristiktir (Jahantab *et al.* 2014).

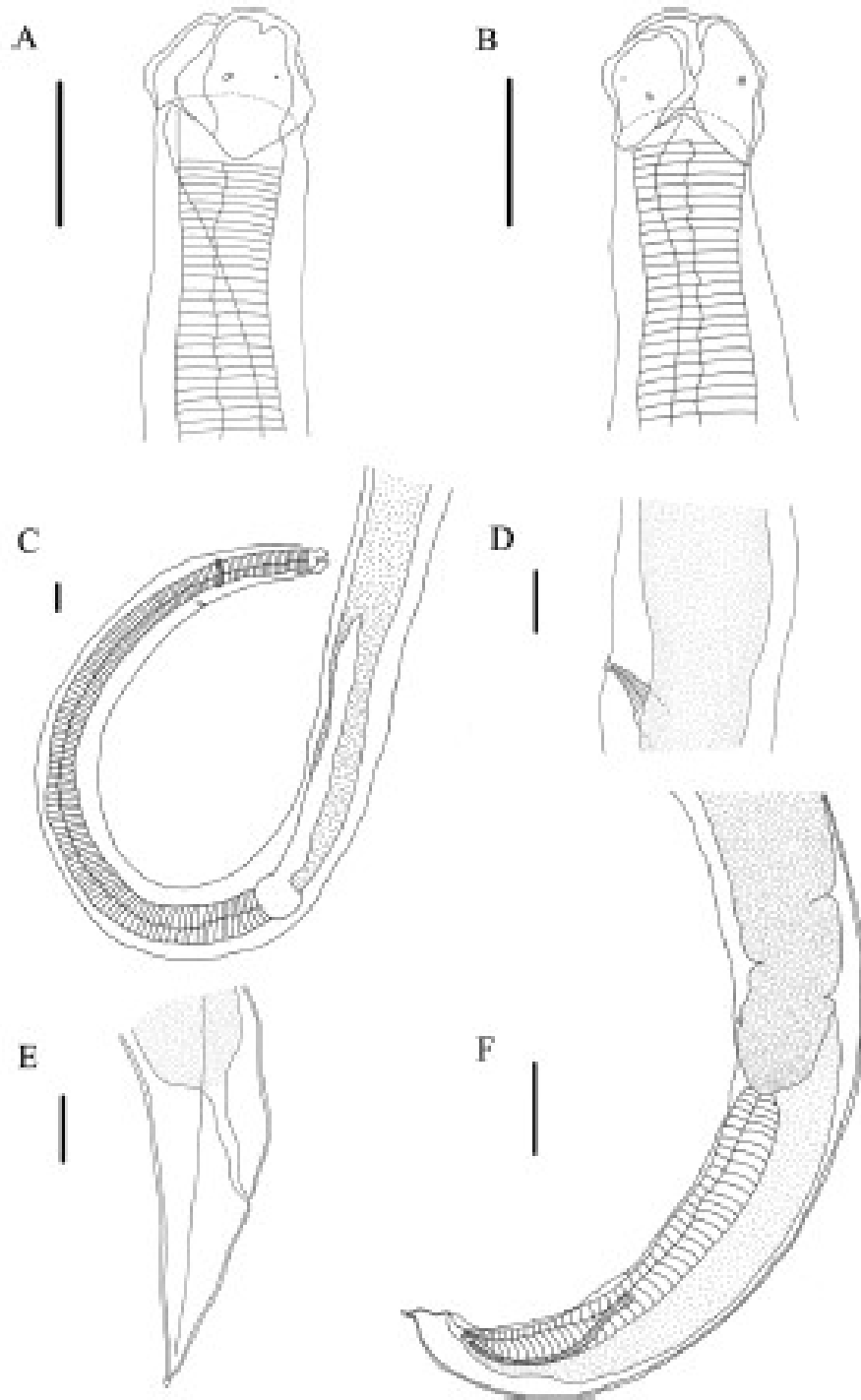
Kassı ve bezsi olmak üzere iki kısımdan meydana gelen özofagus çubuk şeklindedir. Kaslı özofagus, anteriordan posteriora kısmen genişlemekte ve vücut uzunluğunun %8-13'ü kadar uzunluğa sahiptir. Bezsi özofagusun uzunluğu yaklaşık olarak aynı olup ventriküler apandis nispeten uzundur. Boşaltım açıklığı, sinir halkasının arka kısmında ve ventralde bulunmaktadır (Şekil 2.1c). Bağırsak çekumu yoktur. Her iki eşeyde kuyruk koniktir. Fakat erkeklerde kuyruk ventrale doğru kavislidir (Öztürk 1995, Jahantab *et al.* 2014) (Şekil 2.1e,f; Şekil 2.2 b,c).

Erkeklerde vücut uzunluğu 19,512–36,585 µm, maksimum genişlikleri ise 366–731 µm'dir. Dorsal dudak 72-93 µm uzunluğunda, maksimum genişliği 75–105 µm olup subventral dudaklar ise 70–98 µm uzunluğunda ve maksimum genişliği 70–105 µm'dir. Özofagus 2,352–3,528 µm uzunluğunda ve vücut uzunluğunun %8,9-13,3'ünü oluşturmaktadır. Anterior uçtan sinir halkasının uzaklığı 461-784 µm'dir. Ventrikulus glandüler 108-225 µm uzunluğunda, 98-196 µm genişliğinde olup ventriküler apandis 1.098–1,715 µm uzunluğundadır. Ejakülatör kanal 686–1,666 µm uzunluğundadır. Spiküller yaklaşık eşit uzunlukta ve 688–863 µm (750 ± 62.5)'dir. Ayrıca hafif kavisli olup distal uçları oval, proksimal uçları ise fan şeklindedir (Şekil 2.b). Spiküller ejakülator kanal uzunluğunun %48,44-114,41'ini ve vücut uzunluğunun %2.01-3.71'ini oluşturmaktadır. Kloakın anterior ucunda median konumlu bir papil bulunmaktadır. Kuyruğun uç kısmında phasmidler yer almaktadır. Kuyruk kavisli ve 117-196 µm uzunluğa sahiptir (Jahantab *et al.* 2014).

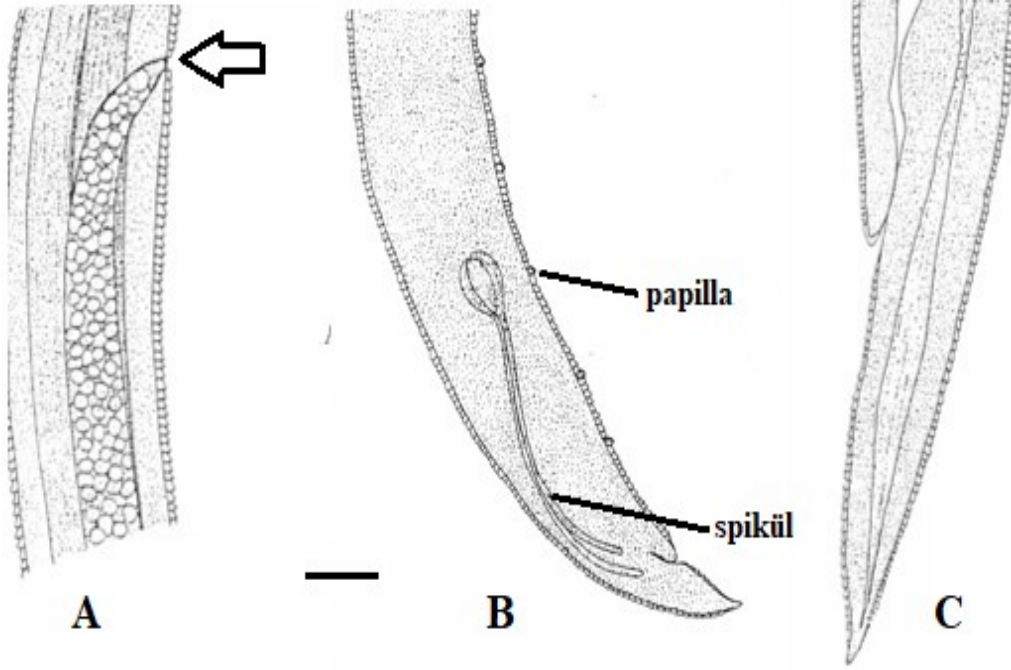
Dişilerde vücut 20,244–44,634 μm uzunluğunda, maksimum genişliği 415–1,097 μm 'dir. Dorsal dudak 72–98 μm uzunluğunda, maksimum genişlik 79 μm olup subventral dudaklar 68–105 μm uzunluğunda, maksimum genişliği 70–100 μm 'dir. Özofagus 2,156–4,606 μm uzunluğunda ve vücut uzunluğunun da %8,5–12,8 μm 'sini oluşturmaktadır. Anterior uçtan sinir halkasının uzaklığı 441–588 μm 'dir. Ventrikül 98–265 μm uzunluğunda, 98–274 μm genişliğinde olup ventriküler apandis 539–1,616 μm uzunluğundadır. Vulva anteriordan 11.956–6,517 μm uzaklıkta olup, vücut uzunluğunun %25,35–29,08'lik anterior kısmında yer almaktadır. Oviduktün posterioründe çok kıvrımlı ve uzun ovaryumlar yer almaktadır. Vulvanın posterioründe kaslı vajina bulunmaktadır. Konik şekilli kuyruğun uç kısmında phasmidler yer almaktadır. Kuyruk uzunluğu ise 225–470 μm 'dir (Jahantab *et al.* 2014).



Resim 2.2 *Raphidascaris acus*'a ait elektron mikrografları. A: dorsal ve subventral dudakların tabanları arasında lateral yaka. B: subventral dudaklar arasında üçgen yükseklik bulunmaması. Ölçek çubukları, A: 20 μm , B: 50 μm (Jahantab *et al.* 2014).



Şekil 2.1 *Raphidascaris acus*'un karakteristik kısımlarına ait çizimler: A, B: sefalik uç, C: anterior kısım, D: vulva bölgesi, dişinin arka kısmı, F: erkeğin arka kısmı. Ölçek çubukları, A, B: 100 μ m, C–F: 200 μ m (Jahantab *et al.* 2014).



Şekil 2.2 *Raphidascaris acus*'un genital bölge kısımlarına ait çizimler: A: dişi bireyde vulva açıklığı, B: erkek bireyde posteriyör uç kısım, C: dişi bireyde posteriyör uç kısım. Ölçek çubuğu 50 µm (Öztürk 1995).

2.4 *Raphidascaris acus*'un Tayin Anahtarı

Raphidascaris acus'un tür tayin anahtarının hazırlanmasında Bykhovskaya-Pavlovskaya vd. (1962)'den yararlanılmıştır.

- 1a. Bağırsak mevcut, vücudun anterior ucunda probosis yok Nematoda2
- 1b. Bağırsak yok, vücudun anterior ucunda kancalarla donanımlı probosis var
.....Acanthocephala
- 2a. Kuyruk bölgesi phazmid veya lateral bezli, kaudal bezler yok, kaudal kuyruk çoğunlukla mevcut, amfidler por şekilli Subclass Phasmidea 3
- 2b. Kuyruk bölgesinde phazmidler mevcut; kaudal bezler mevcut, bazen yok; amfidler cepsi, tüpsü, nadiren por şekilliSubclass Aphasmeida
- 3a.Üç büyük dudak genellikle mevcut, büyük dudakların arasında üç intermedial dudak sıklıkla mevcut, özofagus genellikle ampul şekilli Ordo Ascaridida 4
- 3b. İki lateral dudak veya altı ilkel dudak mevcut, dudak bazen yok, kaslı anterior ve bezli posteriyör olmak üzere özofagus genellikle iki kısımdan oluşur, hiç ampulsü değil Ordo Spirurida

- 4a. Baştan sona halka serileri şeklindeki kütikül ile kaplı, halkaların arka kenarları arkaya yönlendirilmiş dikenlerle donanımlıFamilya Goeziidae
- 4b. halka yapıları olmayan kütiküllü Familya Anisakidae.....5
- 5a. Bağırsak kanalı bir kör çekumlu, anterior bağırsak çekumu mevcut Porrocaecum
- 5b. Bağırsak kanalı bir kör çekumlu, posterior ösafagal çekum mevcut.....*Raphidascaris*..... 6
6. Solucanların kütikülü baştan sona enine çizgili. Kütikül anteriordan ventrikül seviyesine kadar belirgin servikal yaka var. Yemek borusu silindirik, uzunluğu boyunca tekdüze genişlikte. Erkeklerde 17 çift preanal ve 4 çift postanal papilla var. Spiculler ventrale doğru kavisli. Dişilerde vulva, vücudun birinci ve ikinci üçte iki oranı arasında bir yerde bulunmakta *Raphidascaris acus* (Bloch 1779)

2.5 *Raphidascaris acus* Üzerine Yapılan Moleküler Çalışmalar

Şimşek vd. (2016), Büyük Menderes Nehri'nden yakalanan 30 adet Avrupa yılan balığında (*Anguilla anguilla* L.) *Raphidascaris acus* türüne rastlamıştır. Bu parazit türün ribozomal DNA (rDNA) Internal Transcribed Spacer (ITS-1, ITS-2 ve 5.8S)'nin dizi sekans analizleri yapılmış ve sonuçta bu nematodun *R. acus* olduğu doğrulanmıştır. Yılan balığında tespit edilen *R. acus* izolatının (GenBank erişim numarası: KT633862) ITS gen bölgeleri (ITS-1 ve ITS-2) ve 5.8S bölgesinin ikili hizalamaları sonucunda Hazar Denizi (KM047505) ve Polonya, Vistula Lagünü'nden (AY603537) izole edilmiş *R. acus* izolatları ile arasında sırasıyla %0.0 ve 1.9 oranlarında tür içi nükleotit farklılığı saptanmıştır.

Jahantab vd. (2014), Hazar Denizindeki turna balıkları (*Esox lucius* L.)'ndan 20 adet *Raphidascaris acus* örneği toplamıştır. Numuneler ışık ve taramalı elektron mikroskobu kullanılarak incelenmiştir. Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1), 5.8 S ve ITS2 içeren ribozomal DNA'nın (rDNA) dizilenmiş ve bu tür için genetik belirteç olarak sunulmuştur. *Raphidascaris acus* (Bloch 1779) türüne ait allopatrik populasyonlar (İran, Polonya, Çekya, Kanada) morfolojik ve genetik olarak karşılaştırılmıştır.

2.6 Ascarid Türler Üzerine Yapılan Moleküler Çalışmalar

ITS bölgelerinin ve 5.8S'in; ascaridoid türler içindeki sibling ve morfortürlerin doğru tanımlanması için yararlı genetik belirteçler sağladığı gösterilmiştir (Kellermanns *et al.* 2007, Klimpel *et al.* 2007). Belirteç olarak nüklear ribozomal DNA'nın (rDNA) Internal Transcribed Spacer (ITS) kullanılarak; yumurta, larva ve erişkin evrelerindeki ascaridoid nematodların tür düzeyinde doğru tanımlanması için uygun olduğu ifade edilmiştir (Zhu *et al.* 1998, Zhang *et al.* 2007, Zhu *et al.* 2000, Du *et al.* 2010, Fang *et al.* 2010, Testini *et al.* 2011, Pekmezci *et al.* 2014).

ITS1, 5.8S ve ITS2'yi içeren ribozomal DNA (rDNA) bölgesinin, tür seviyesinde anisakid türlerin tanımlanması için bir genetik işaretleyici olarak rol oynadığı gösterilmiştir (Chilton *et al.* 1995, Zhu *et al.* 1998, 2000, 2001, D'Amelio *et al.* 2000).

Xu vd. (2012), beş farklı balıktan nematod numuneleri toplayıp, ribozomal DNA'nın Internal Transcribed Spacer (ITS) analiz ederek tanımlamışlardır. Analiz edilen örnekler arasında hedef nükleotid dizileri içinde boyut ve nükleotid polimorfizmlerinde herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir. Elde edilen bilgiler, bu az bilinen nematodun doğru teşhisini kolaylaştırmaya katkıda bulunmuştur.

Abe (2011), Japon gümüş balığı olan, *Hypomesus transpacificus nipponensis*'in abdominal duvarında *Eustrongylides ignotus* ve bağırsaklarında *Raphidascaris gigi* 'yi ilk defa tanımlamıştır. Bu parazitlere ait ITS analizleri %99 oranında benzerlik göstermiştir. Bu güne kadar yapılan araştırmalara göre, Japon gümüş balığında bu parazitlere daha önce rastlanılmamıştır. Bu nedenle, *H.transpacificus nipponensis*'de *E.ignotus* ve *R. gigi*'nin bulunmuş olması ile yeni bir konak tespit edilmiştir.

Güney Çin Denizi'ndeki *Uroconger lepturus* (Richardson) (Anguilliformes: Congridae) bağırsak ve midesinden tanımlanan *Raphidascaris (Ichthyascaris) longispicula* sp. nov'un ribozomal DNA'sının Internal Transcribed Spacer dizileri (ITS) analiz edilerek yakından ilişkili nematodların dizileri ile karşılaştırma yapılmıştır. Moleküler analizler, morfolojik gözlemlere dayanan bu türün geçerliliğini desteklemiştir (Li *et al.* 2012).

Pérez-i-García vd. (2015), Akdeniz’de yaşayan ve iki derin su balığı olan fare balığında (*Nezumia aequalis*) ve uzun burunlu fare balığı (*Trachyrincus scabrus*)’nın mide ve poliürik çekumda yeni bir tür olarak *Raphidascaris macrouri* n. sp. (Anisakid) tanımlamıştır. Işık ve taramalı elektron mikroskobu incelemeleri sonucunda bu yeni türün *Raphidascaris* Railliet and Henry, 1915'in diğer dört türü ile benzer morfolojik özellik taşıdığını görmüştür. Bu sonuçların desteğinde Macrouridae familyasından ilk subgenus bildirilmiştir. Ayrıca ITS1, 5.8S, ITS2 bölgesi dizilerinin analiz sonuçları *Raphidascaris macrouri* n. sp'nin homolojisini doğruladığı belirtilmiştir.

2.7 Dizileme ve Ağaç Yapımında Kullanılan Bazı Yöntemler

2.7.1 Mesafe Tabanlı Metotlar

Bütün taksonlar arasındaki uzaklığa dayanarak oluşturulan filogenetik ağaçlardır. Belirli bir dizi grubundaki her bir çift arasındaki değişikliklerin sayısını temel alınarak oluşturulan bir yöntemdir. Uzaklık metotlarıyla hizalanmış diziler arasındaki farklılıkların miktarlarına göre ağaç oluşturulmaktadır.(Mount 2001). Bu metotlarla yapılan analizler diğer metotlardan kolay ve daha hızlıdır (Freeman and Herron 1999).

2.7.1.1 Kümeleme tabanlı metotlar

Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)

Taksonları eldeki verilerin uzaklıklarına göre algoritmik olarak düzenleyip kümeleyen bir metottur. Bu metotla oluşan ağaçlar köklü ağaçlar ve kökten tüm uçlara eşit uzunlukta dallara sahip olan ağaçlardır (Xiong 2006). Öncelikle en yakın iki takson gruplanır, daha sonra taksonlar arası uzaklıklarla bütün taksonlar gruplandırılır. Taksonlar, uzaklık arttıkça birbirlerinden farklılaşmaya ve yeni gruplara girmeye başlamaktadır (Morrison 1996).

Neighbor-Joining (NJ)

1987 yılında Saitou ve Nei tarafından ileri sürülmüş bir yöntemdir. Bu yöntemle oluşturulan ağaçlar köksüzdür ve köksüz filogenetik ağaçların en basit metodunu oluşturmaktadır (Xiong 2006).

Bu yöntemler çok hızlı ve basittir. UPGMA’da dal uzunluğu eşit ve köklü ağaç oluşturulurken NJ’de dal uzunlukları farklı ve köksüz ağaçlar oluşturulmaktadır.

2.7.1.2 En İyi Durum Tabanlı Metotlar

Genellikle geniş veri setleri için kullanılan metotlardır.

Fitch-Margoliash (FM)

Eşit evrimleşme hızı varsayımını göz ardı ederek genetik uzaklıklarla evrim ağacı oluşturan bir yöntemdir (Fitch and Margoliash 1967). NJ yöntemiyle elde edilen topolojinin çaprazlama kontrolünü yapmak için kullanılmaktadır (Aydın 2015).

Minimum Evolution (ME)

Dal uzunluğu bulunurken cebirsel eşitlik kullanılmaktadır. Oluşan ağaçlar arasından en uygun olanı seçilmektedir. Uzun bir DNA ya da amino asit dizisi kullanıldığı durumlarda ME ağacı tercih edilmektedir. Kullanılan nükleotitlerin veya amino asitlerin sayısı az olduğu durumlarda NJ metodu kullanılmaktadır (Nei *et. al.* 1998).

2.7.2 Karakter Dayalı Metotlar

Taksonlardaki farklı karakterlerin varlığı esasına dayanmaktadır. Her bir taksondaki canlıya ait olan karakterlere ait moleküller dizilenmektedir (Sarıçam ve Müştak 2015). Bu metotlar fazla emek ve zaman isteyen metotlardır. Bu yöntemde kullanılan algoritmalar Maximum Parsimony, Maximum Likelihood ve Bayesian Inference’dir.

2.7.2.1 Maksimum Parsimony (MP)

Bu yöntem incelenen diziler ile uyumlu bir ağaç elde etmek için gereken en az mutasyonların belirlenmesi esas alınır. Parsimoni tutumluluk, güvenilirlik, olabilirlik demektir. Hesaplama kolaylığından dolayı istatistiksel özellikleri kapsamlı bir şekilde incelenebilmektedir (Saitou and Imanishi 1989). Bir DNA veya amino asit dizisinin

evrimsel değişimini açıklayabilmek için gereken en az sayıda mutasyon değişiklik sayısı her topoloji için hesaplanarak bulunmaktadır. Dizilerin az ve dizi çiftleri arasındaki benzerliklerin fazla olduğu durumlarda en iyi MP analiz sonucu elde edilmektedir. MP ile ağaçların oluşturulmasında kesin yaklaşımlar, dizi sayısı az olduğu durumlarda kullanılmakta ve tüm ağaçlar incelemektedir. Tahmini yaklaşımlar ise çok sayıda dizi varlığında kullanılarak olası tüm ağaçlar gözden geçirilerek en uygun ağaç belirlenir. (Freeman and Herron 1999). En iyi ağaç olarak en küçük mutasyon değişiklik sayısını gösteren topoloji seçilmektedir (Saitou and Imanishi 1989, Nei *et al.* 1998).

2.7.2.2 Maksimum Likelihood (ML)

Joseph Felsenstein tarafından 1981 yılında ortaya atılmış bir metottur (Felsenstein 1987). Bu yöntem varyasyonların ortaya çıkma olasılıklarını tanımlamaktadır. Ayrıca belirli dal uzunlukları bilinen ağacın DNA dizi setini elde etme olasılığını verebilmektedir (Freeman and Herron 1999).

2.7.2.3 Bayesian Analizi

Bayesian Thomas Bayes (1702-1761) tarafından oluşturulmuştur. Bu yöntem rastgele bir değişken için olasılık dağılımı içinde koşullu olasılıklar ile arasındaki ilişkiyi göstermektedir. ML ve Bayesian yöntemleri yayınlarda çık sık kullanılan yöntemlerdendir (Freeman and Herron 1999).

3. MATERYAL ve METOD

3.1 Araştırma Alanı Olan Uluabat Gölü'nün Genel Özellikleri

Çalışma alanı Uluabat (Apolyont, Apollonia) Gölü, Bursa-İzmir Karayolu'nun 30. km'sinde yer alan tektonik özellikli bir göldür (Resim 3.1). Göl 28, 60° D boylamı ile 40, 17° K enlemi arasında yer almaktadır. 24.623 hektar yüz ölçümüne sahip göl deniz seviyesinden yaklaşık 10 m yükseklikte yer almaktadır. Uluabat gölü Mustafa Kemal Paşa Çayı ve havzaya düşen yağışlarla beslenmektedir (Öztürk 1995).

Uluabat Gölü (Bursa) sulama, su ürünleri avcılığı ve günübirlik hafta sonu dinlenme yeri olarak turizm amaçlı kullanılan önemli bir sulak alandır. Uluabat Gölünde 9 farklı familyaya ait 21 balık türü bulunmaktadır: *Carassius gibelio* (Bloch 1782), *Vimba vimba* (Linnaeus 1758), *Alburnus alburnus* (Linnaeus 1758), *Blicca björkna* (Linnaeus 1758), *Scardinius erythrophthalmus* (Linnaeus 1758), *Rutilus rutilus* (Linnaeus 1758), *Barbus plebejus* (Bonaparte 1832), *Tinca tinca* (Linnaeus 1758), *Chalcalburnus chalcoides* (Gül-denstaedt 1772), *Rhodeus sericeus* (Jordan and Thompson 1914), *Pseudorasbora parva* (Temminck and Schlegel 1846), *Cobitis sp.* (Linnaeus 1758), *Siluris glanis* (Linnaeus 1758), *Alosa maeotica* (Grimm 1901), *Mugil cephalus* (Linnaeus 1758), *Sygnathus sp.* (Linnaeus 1758), *Gobius fluviatilis* (Pallas 1811), *Knipowitschia sp.* (Iljin 1927), *Anguilla anguilla* (Linnaeus 1758), *Cyprinus carpio* (Linnaeus 1758), *Esox lucius* (Linnaeus 1758), *Scardinius erythroptalmus* (Linnaeus 1758), (Çınar et al. 2013).

3.2 Araştırma Numuneleri

Öztürk vd. (2000) tarafından, Uluabat Gölü (Bursa)'ndeki turna balığı (*Esox lucius* L.)'nin bağırsağından izole edilen ve %70 etanol içinde depolanmış halde müze materyali olarak korunan *Raphidascaris acus* numuneleri araştırma materyali olarak kullanılmıştır.

3.3 DNA İzolasyonu

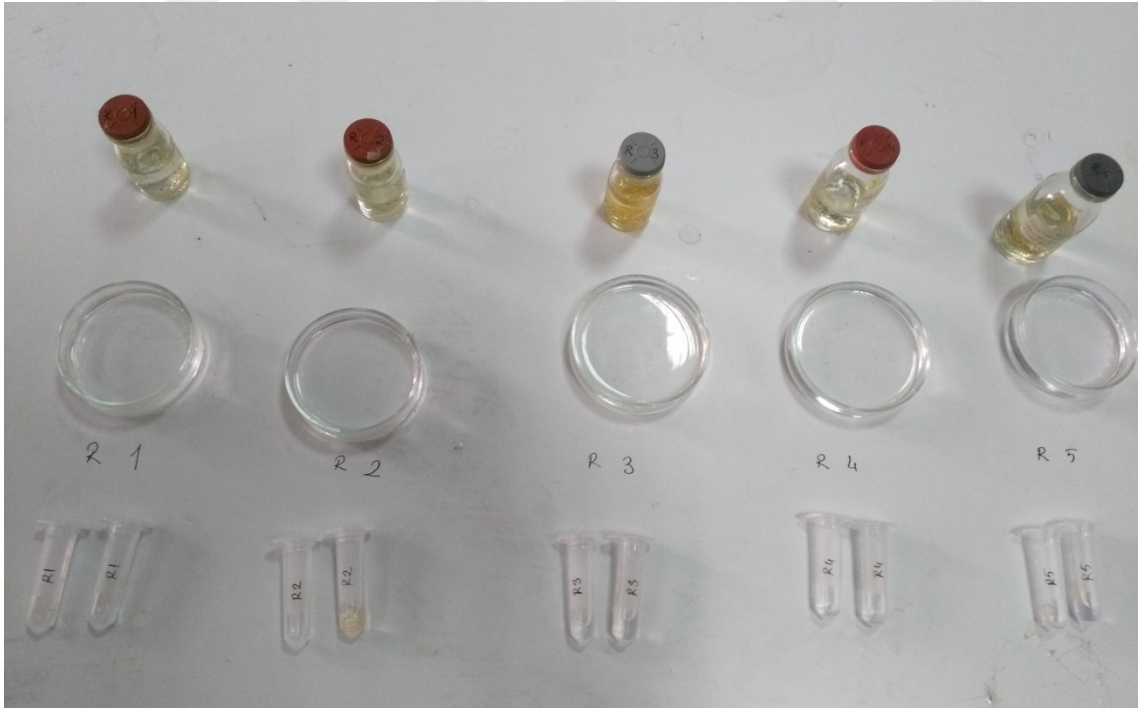
Analizler için, müze materyali olarak korunan örnekler arasından *Raphidascaris acus*'lar rastgele seçilmiştir. DNA izolasyonu, EurX GeneMATRIX Tissue-Bacterial DNA izolasyon kiti (Polonya) kullanılarak elde edilmiştir (<https://eurx.com.pl/manuals/en/E3551-TissueBacterial.pdf>). Örneklere ait gDNA'nın saflığını kontrol etmek için Thermo Scientific Nanodrop 2000 (USA) cihazında spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır.



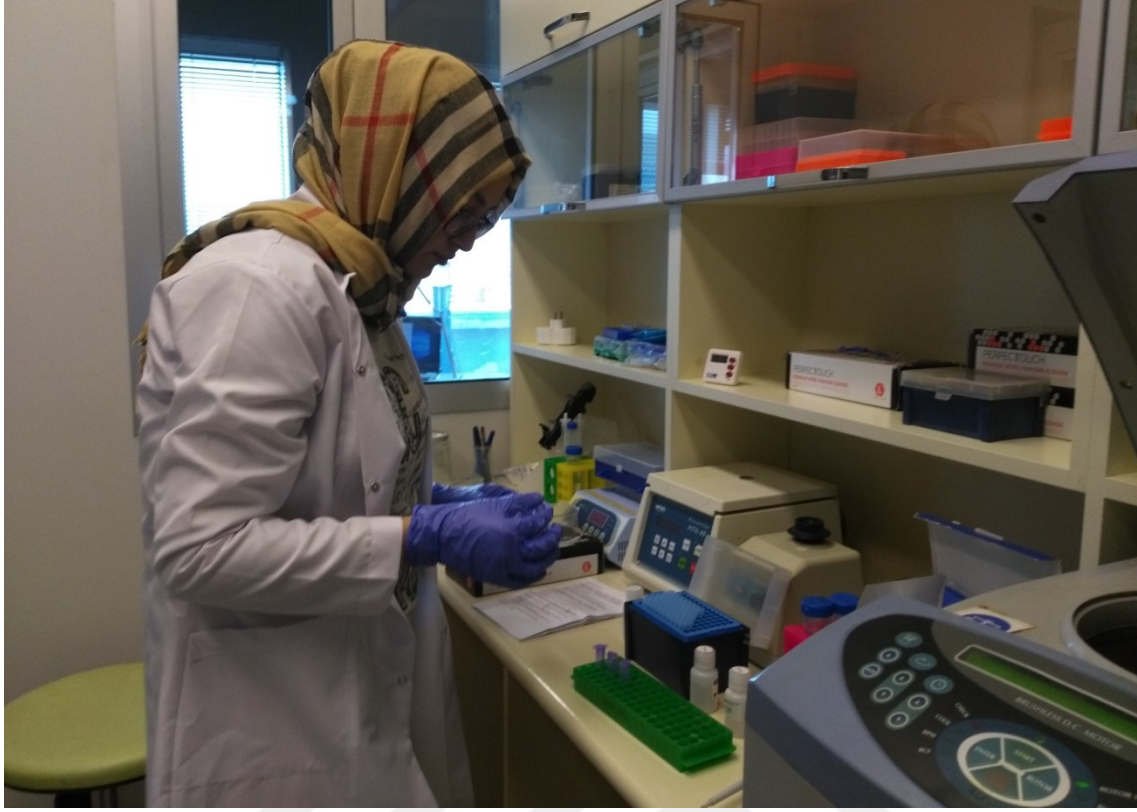
Resim 3.1 Uluabat Gölü haritası (İnt. Kyn.2).



Resim 3.2 Müze materyali olarak korunan *Raphidascaris acus* numuneleri



Resim 3.3 Bu çalışma için rastgele seçilmiş *Raphidascaris acus* numuneleri.



Resim 3.4 *Raphidascaris acus*'tan gDNA izolasyonu

3.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

R.acus örneklerine ait gDNA'nın PZR ortamında çoğaltımı için 30 µl'lik şu ortam hazırlanmıştır: 1 µl gDNA, her primerden 10 mM, 15 mM MgCl₂, her bir dNTP'den 20 mM ve 5 U TaqPolimeraz (Solis Biodyne (Estonya) FIREPol® DNA Polymerase). PZR işleminde *R.acus* numuneleri için özel olarak tasarlanan AcusF 5' CACAGCGAGTTGCACACAT3' ve AcusR 5' CCAACAAGCAACACATGCTC3' primerleri kullanılmıştır. Primerler ve konumları Çizelge 3.1 de listelenmiştir. PZR reaksiyonu şu periyotlar özelinde gerçekleştirilmiştir: 95°C'de 5 dakika 35 döngüyü takiben ilk denatürasyon, 95°C'de 45 saniye ve denatürasyon, 57°C'de 45 saniye ve annealing, 72°C'de 1 dakika uzama ve 72°C'de 5 dakika son bir final uzaması. Daha sonra sıcaklık 4°C'ye düşürülüp PZR tamamlanmıştır. PZR ürünleri agarose jel elektroforezinde yürütülmüştür. Elde edilen bantlar (gDNA) jelden kesilmiştir. EurX GeneMATRIX Agarose Out DNA pürifikasyon kiti (Polonya) kullanılarak saflaştırılmıştır.

Çizelge 3.1 *R. acus*'un 5.8S rRNA genini çoğaltma ve dizileme için kullanılan primerler

Hedef gen	Primerler	Dizileme (5'–3' yönü)	Kaynak
5.8S	AcusF	CACAGCGAGTTGCACACAT	Bu çalışma
(rRNA)	AcusR	CCAACAAGCAACACATGCTC	Bu çalışma

3.5 Dizileme, Veri Analizi ve Ağaç Oluşturulması

R. acus'a ait saflaştırılmış PZR ürünleri doğrudan AcusF ve AcusR primerleri ile ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti (Applied Biosystems, Foster City, CA) (Macrogen Hollanda laboratuvarı) kullanılarak dizilenmiştir.

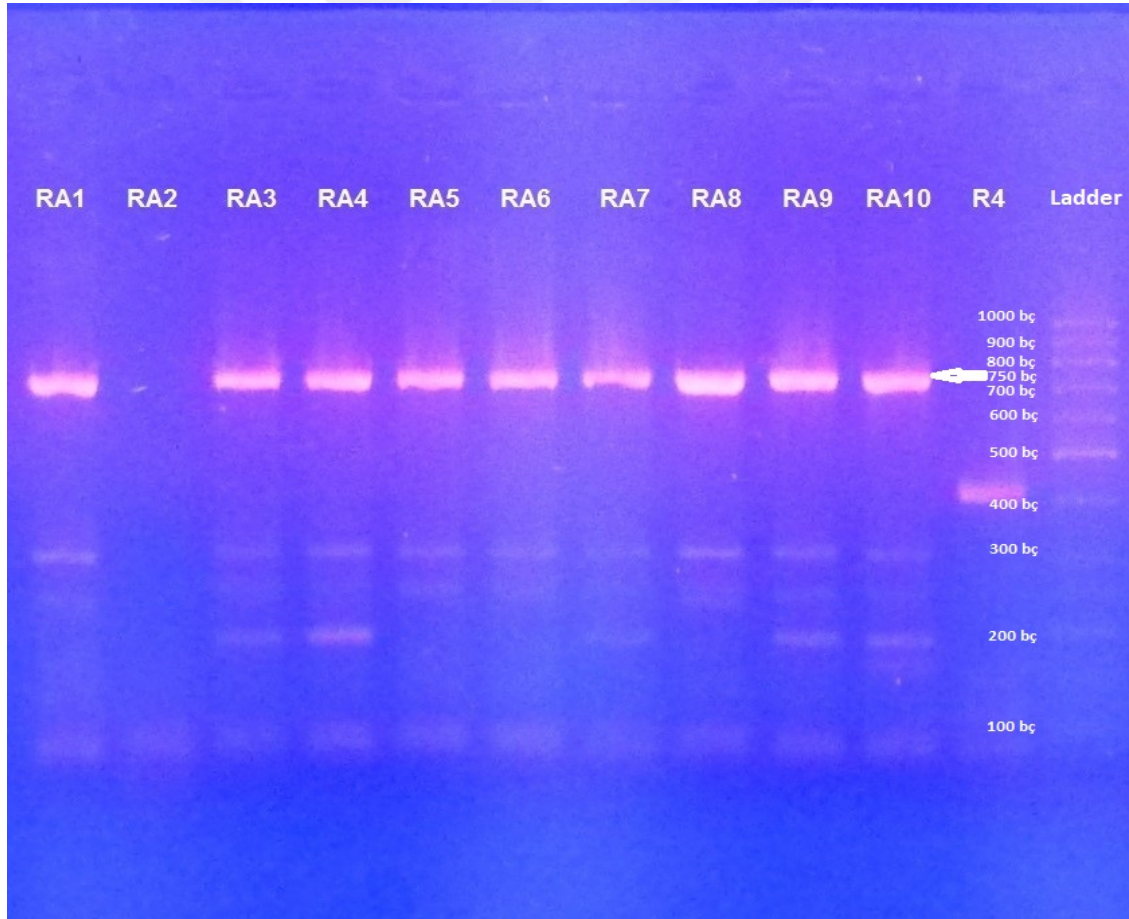
Nükleotid dizileri Mega 7.0 çoklu dizi hizalama ClustalW2 yazılımı kullanılarak hizalanıp elle ayarlanmıştır. 5.8S rRNA gen dizilerinin homoloji araştırması FASTA programı (EMBL; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/nucleotide.html>) ve BLAST algoritması kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Genetik mesafeler, Mega 7.0'da çift yönlü silme yöntemli Tamura Nei iki parametrelili model kullanılarak hesaplanmıştır.

Diğer *R. acus* türleriyle Mega 7.0'da Maksimum-Likelihood (ML) yöntemi ile yapılan ağaç şekil 4.1 de verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. DNA İzolasyon Bilgileri

Bu araştırmada, 25 yıldır etanol ortamında muhafaza edilen 14 *Raphidascaris acus* (Nematoda, Ascarididae) bireyinin gDNA ekstraksiyonu ile moleküler tanımlaması iki aşamada çalışılmıştır. İlk aşamada çalışılan R1, R2, R3, R4 nolu örneklerden R4 nolu örneğe ait bant doğru hizalanmamıştır. İkinci aşamada çalışılan RA1-RA10 nolu örneklerden ise RA2 nolu örnekte gDNA ürünü hiç elde edilmemiştir. Diğer örneklerin tamamında tek bir desen ve güvenilir bant kaydedilmiştir. gDNA geni bant boyutu 750 bp olarak belirlenmiştir (Resim 4.1).



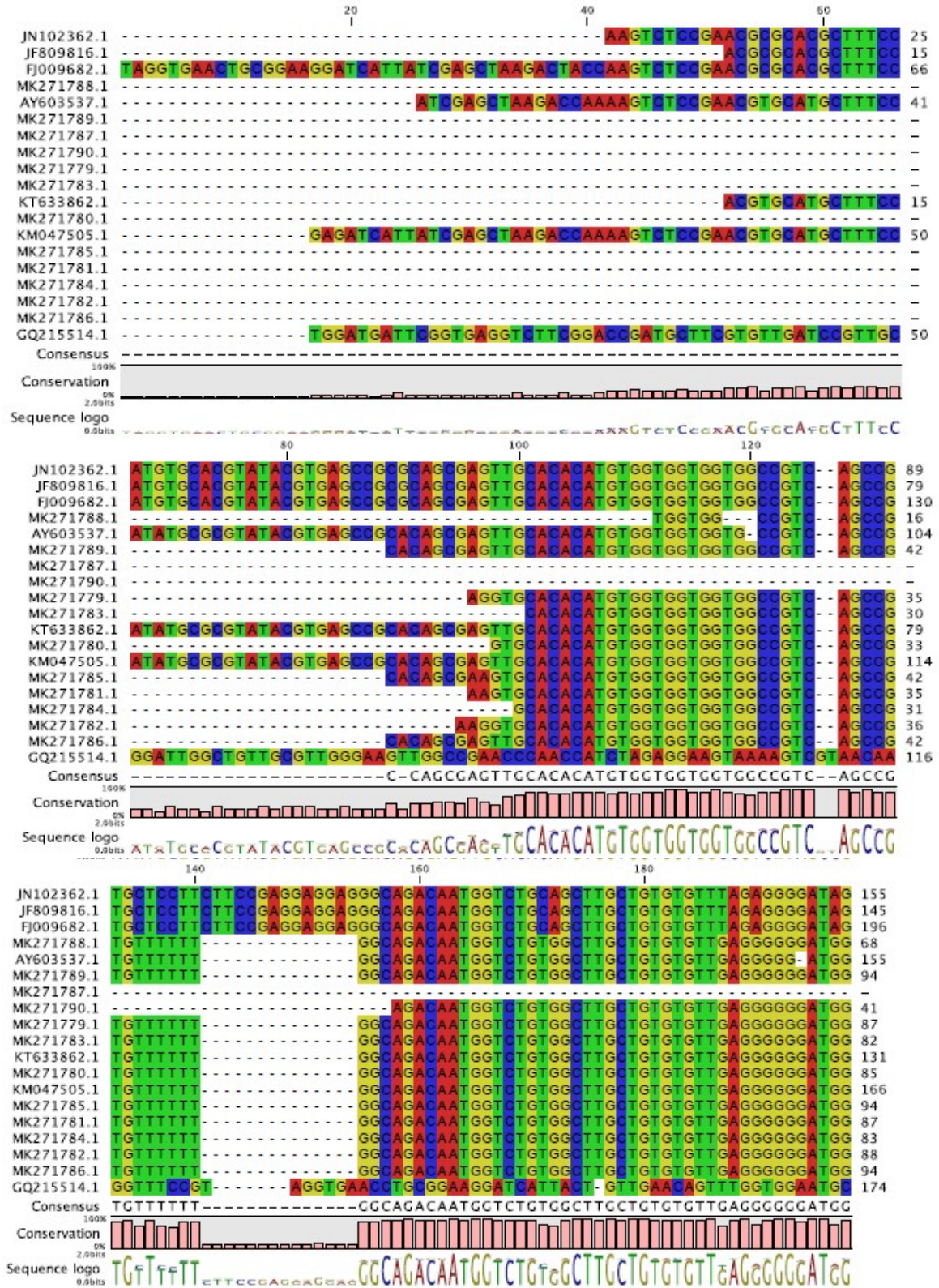
Resim 4.1 *Rapidascaris acus* türlerine ait 5.8S rRNA genine ait PZR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü ve Marker DNA

4.2 Dizileme Verileri

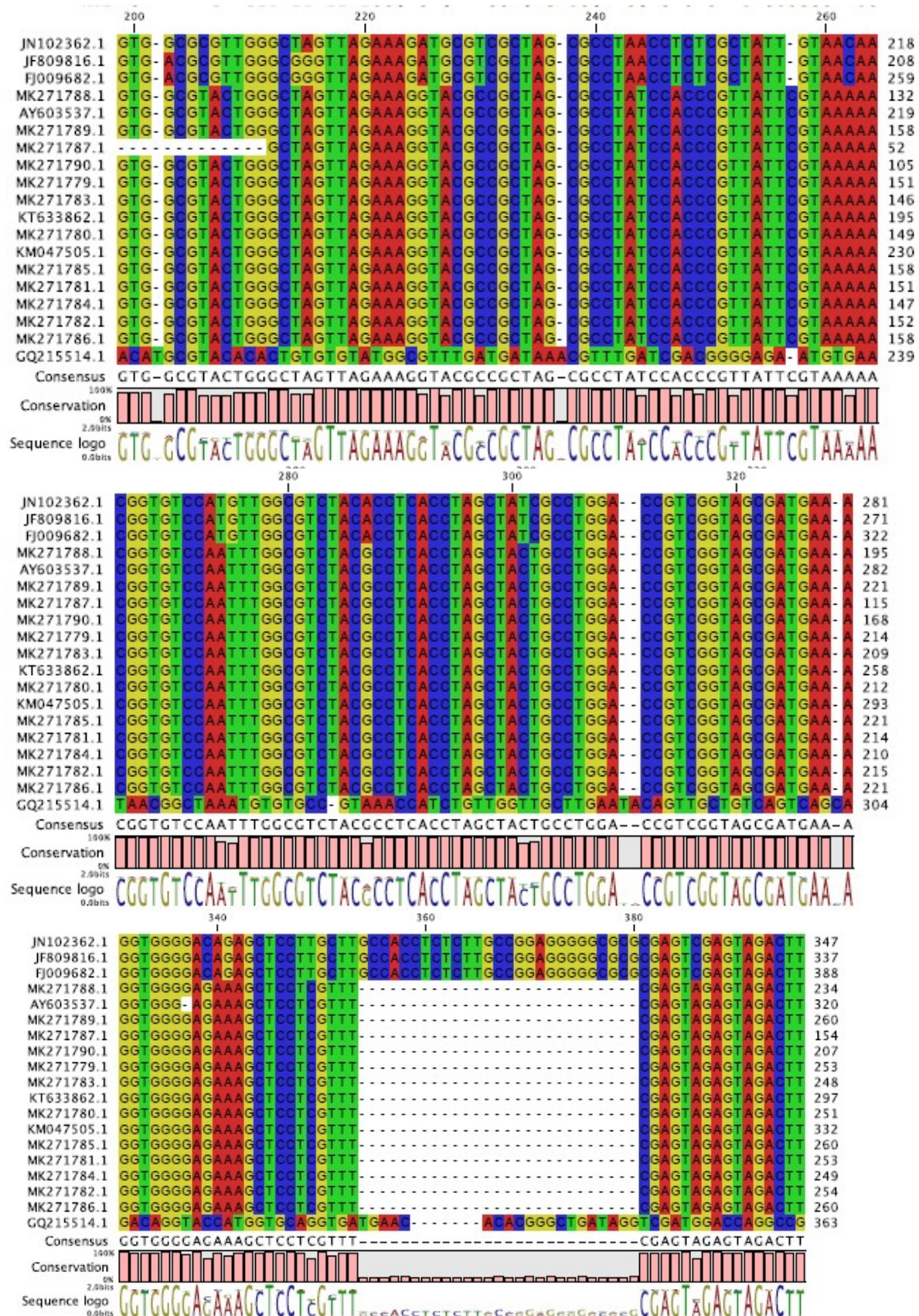
5.8S rRNA geninin 750 bp nükleotidleri, her numuneden doğrudan dizilenmiştir. 12 *R.acus* bireyine ait 5.8S geni dizileme verileri, GenBankta kayıt altına alınmıştır (Çizelge 4.1). Örneklerle ait 5.8S genin hiçbirinde nükleotid varyasyonu tespit edilmemiştir (Resim 4.2).

Çizelge 4.1 İncelenen *R. acus* numunelerine ait bilgiler

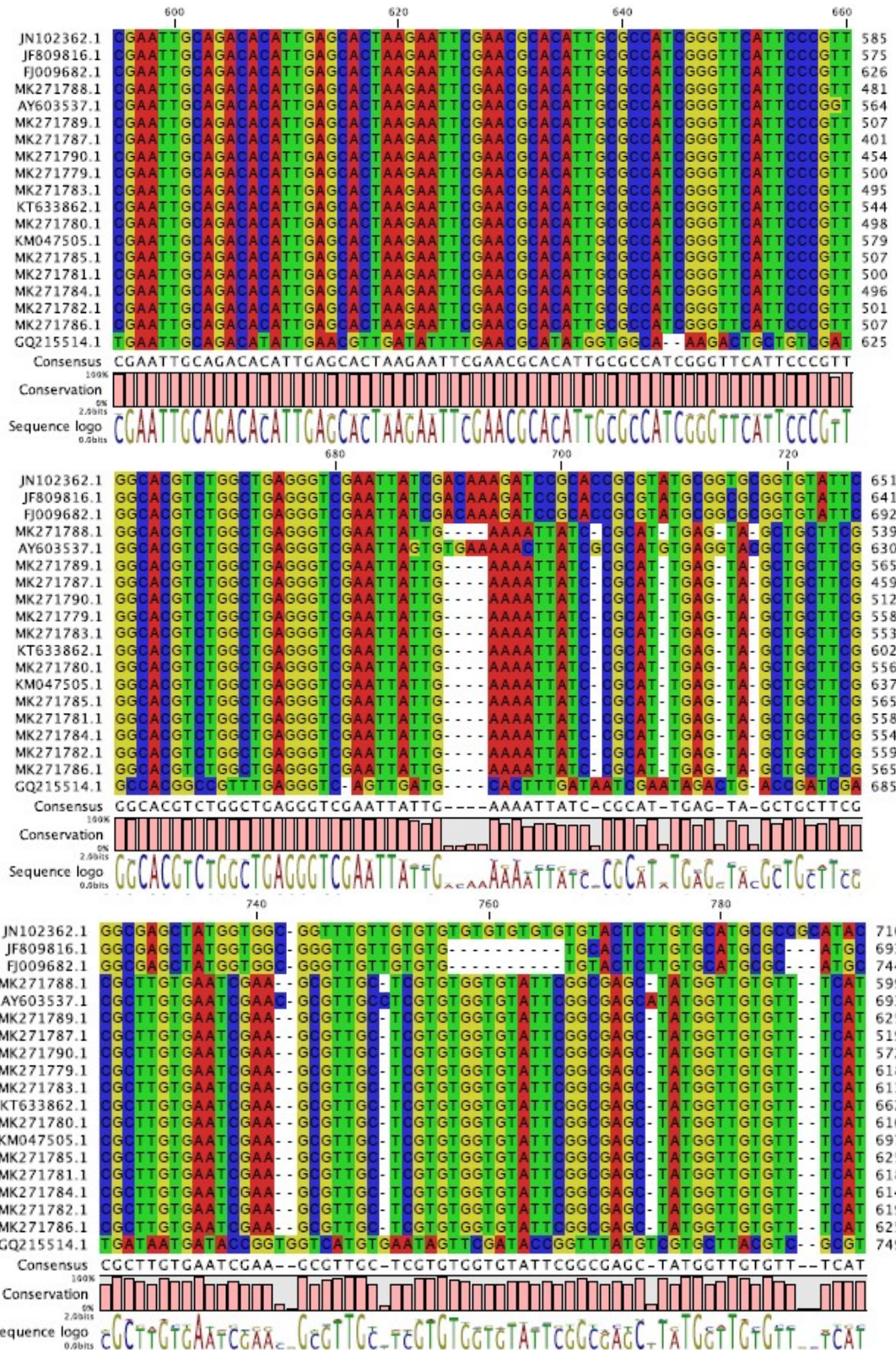
Coğrafik yer	Konak balık	Toplanma tarihi	Fiksatif	Numune no	DNA izolasyonu	GenBank Kabul No
Uluabat Gölü (Bursa)	<i>Esox lucius</i> (Turna Balığı)	30.12.1993	Etanol	R1	Var	MK271779
		30.12.1993		R2	Var	MK271780
		30.12.1993		R3	Var	MK271781
		30.03.1993		R4	ANOMALİ	---
		30.03.1993		RA1	Var	MK271782
		05.03.1993		RA2	YOK	---
		05.03.1993		RA3	Var	MK271783
		21.04.1993		RA4	Var	MK271784
		21.04.1993		RA5	Var	MK271785
		21.04.1993		RA6	Var	MK271786
		03.03.1993		RA7	Var	MK271787
		03.03.1993		RA8	Var	MK271788
		07.04.1993		RA9	Var	MK271789
		07.04.1993		RA10	Var	MK271790



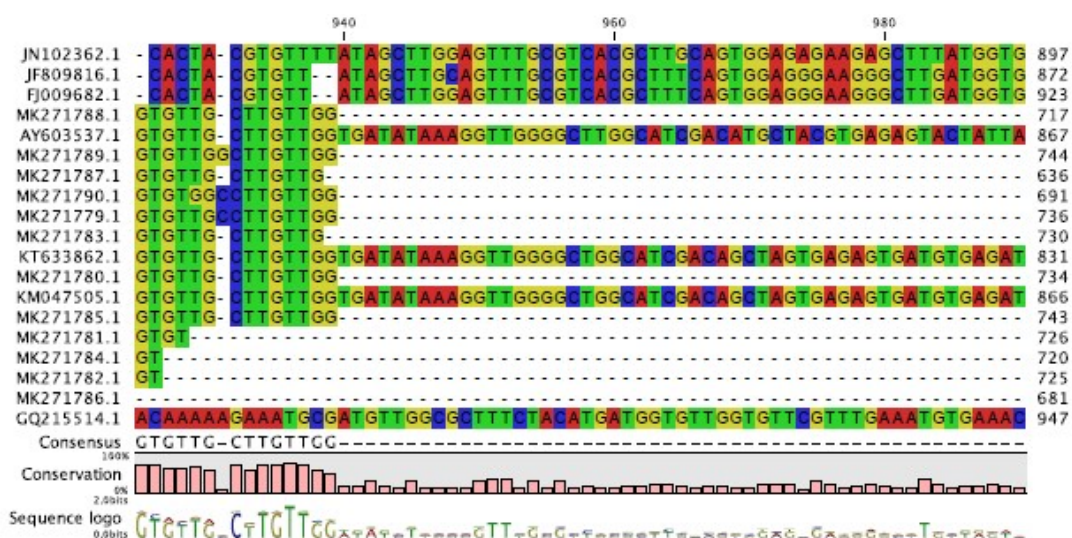
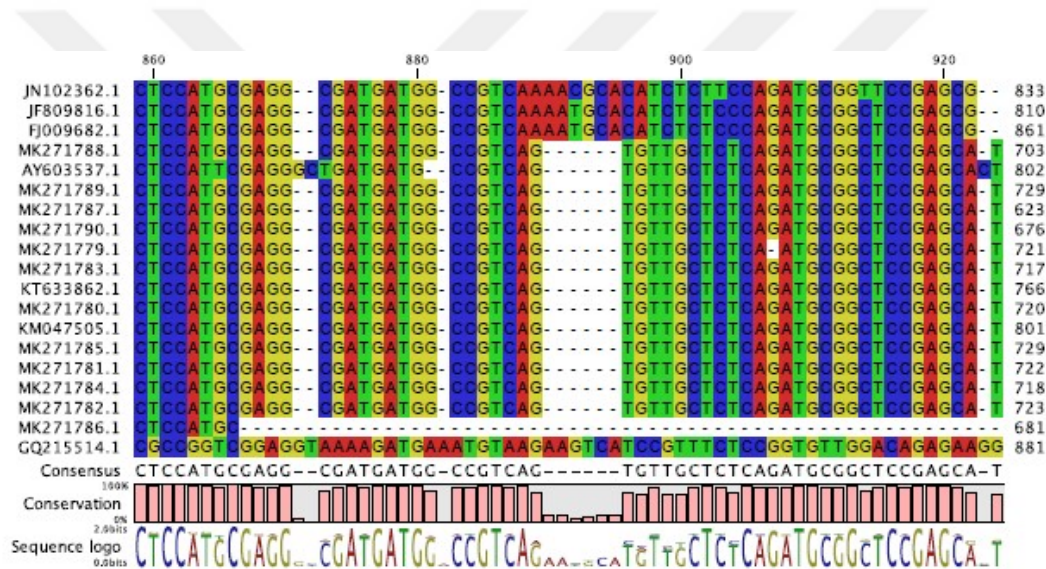
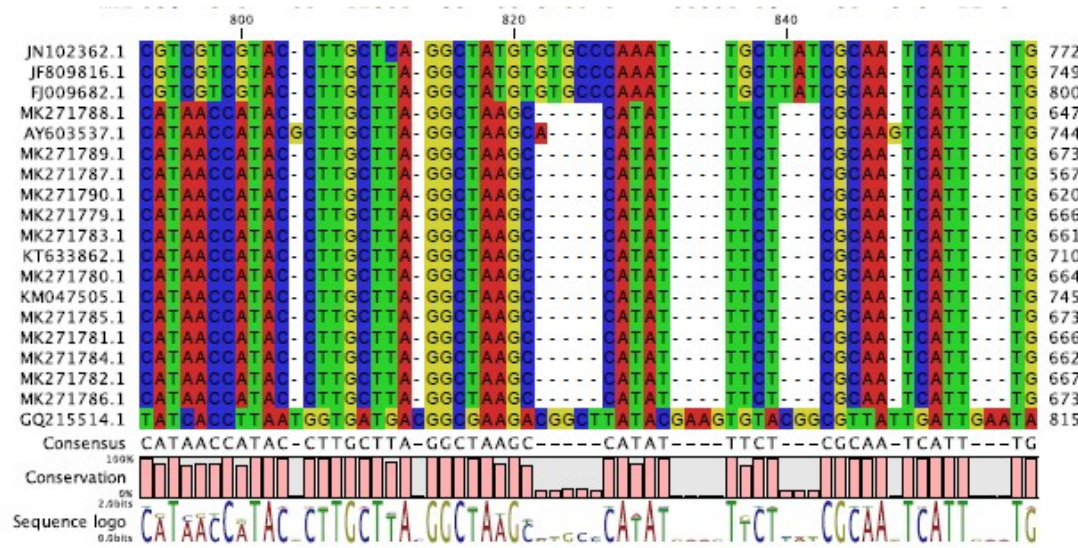
Resim 4.2 Bu çalışmada elde edilen *Raphidascaris acus* izolatları (MK271779-MK271790) ile AY603537.1 *Raphidascaris acus*, KT633862.1 *Raphidascaris acus*, KM047505.1 *Raphidascaris acus*, FJ009682.1 *Raphidascaris trichiuri*, JF809816.1 *Raphidascaris lophii*, JN102362.1 *Raphidascaris longispicula*, GQ215514.1 *Eustrongylides* sp. izolatlarına ait 5.8S nükleotid dizi hizalama verileri



Resim 4.2 (Devam)



Resim 4.2 (Devam)



Resim 4.2 (Devam)

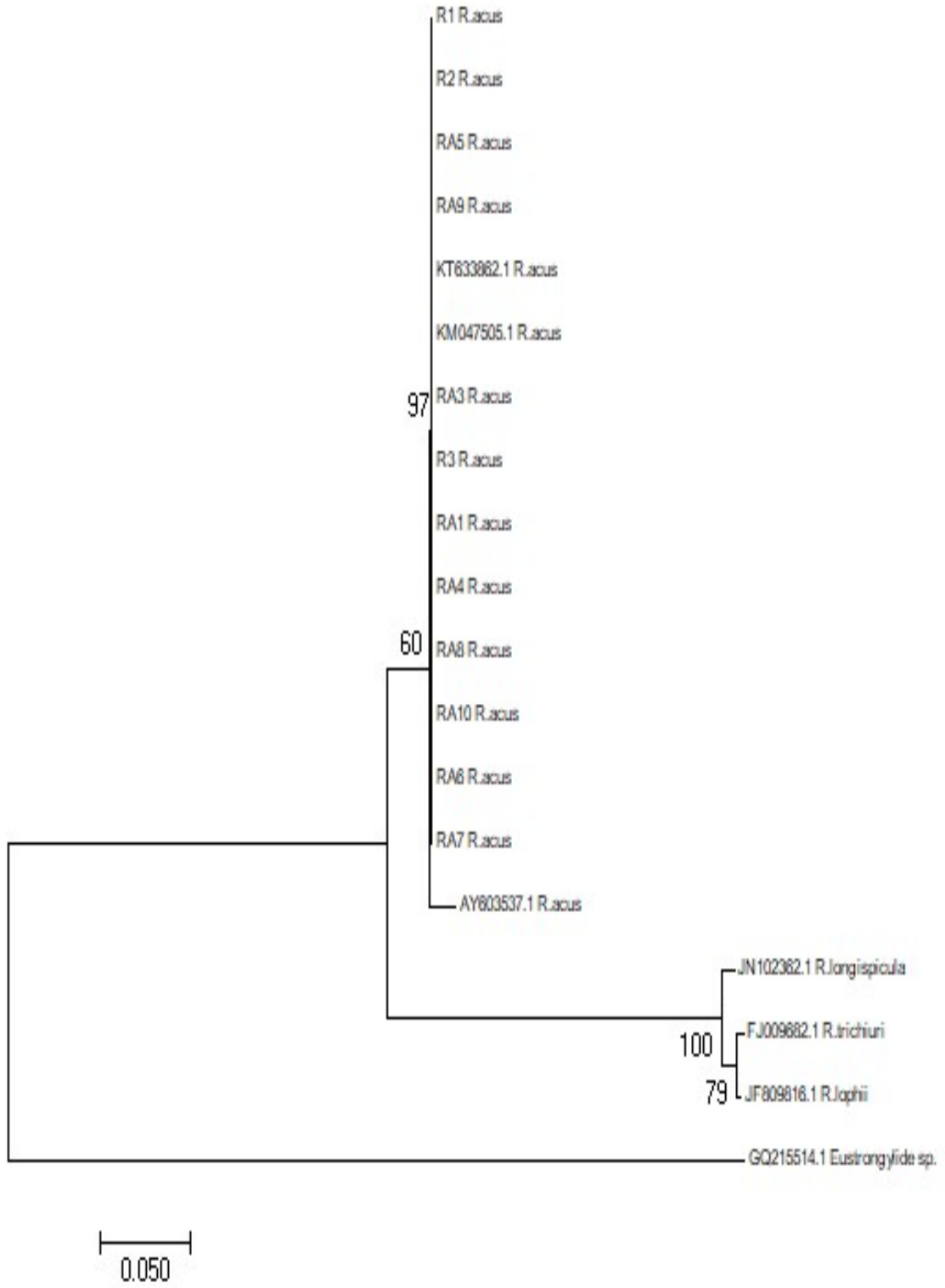
macrouri) %13.03-14.97 arasında bir farklılık göstermiştir. Ayrıca bu çalışma sonuçları ile etanolde fikse edilen ve uzun süre etanolde korunan *R.acus* gDNA'larının hasar görmediğini ve rutin olarak çoğaltılabildiği gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 *Raphidascaris acus* izolatu ile farklı lokasyonlardaki izolatların 5.8S nükleotit dizi farklılıklarının (%) ikili karşılaştırılması

	<i>R.macrouri</i>	<i>R.trichiuri</i>	<i>R.lophii</i>	<i>R.longispicula</i>	<i>R.acus</i> Poland	<i>R.acus</i> Hazar	<i>R.acus</i> Menderes	<i>R.acus</i> Uluabat
<i>R.macrouri</i>	-	12.10	11.86	11.86	16.00	14.97	14.97	14.97
<i>R.trichiuri</i>	12.10	-	0.45	3.81	14.19	13.68	13.68	13.68
<i>R.lophii</i>	11.86	0.45	-	3.77	14.19	13.68	13.68	13.68
<i>R.longispicula</i>	11.86	3.81	3.77	-	13.70	13.03	13.03	13.03
<i>R.acus</i> Poland	16.00	14.19	14.19	13.70	-	4.63	4.77	4.11
<i>R.acus</i> Hazar	14.97	13.68	13.68	13.03	4.63	-	0	0.41
<i>R.acus</i> Menderes	14.97	13.68	13.68	13.03	4.77	0	-	0.41

4.3 Ağaç Verileri

Kısmi nükleotit dizilerine dayanan analiz, *Raphidascaris acus*'un morfolojik temelli taksonomik konumunu desteklemiştir (Şekil 4.1). 5.8S gen dizi verilerine göre oluşturulan ilişki, bu çalışmada kullanılan *Raphidascaris acus* bireylerinin, AY603537.1 *Raphidascaris acus*, KT633862.1 *Raphidascaris acus*, KM047505.1 *Raphidascaris acus*, FJ009682.1 *Raphidascaris trichiuri*, JF809816.1 *Raphidascaris lophii*, JN102362.1 *Raphidascaris longispicula*, KR232377.1 *Raphidascaris macrouri*, GQ215514.1 *Eustrongylides* sp. ile birlikte aynı grupta yer aldığını doğrulamıştır. Ayrıca mevcut veriler, etanolde fikse edilen ve uzun süre etanolde korunan *R.acus* gDNA'sının hasar görmediğini ve rutin olarak çoğaltılabildiğini ve çoğaltılabileceğini göstermiştir.



Şekil 4.1 Seçilen örneklerin 5.8S gen dizilerinden çıkarılan maksimum olabilirlik ağacı.

Şekil 4.1 deki ağacın en uç kısmında R1 ve R2 nolu örneklerin yer aldığı ve bunları RA5 ve RA9 numunelerinin takip ettiği görülmüştür. İlginç bir şekilde KT633862 ve KT047505 nolu *R.acus* izolatlarının söz konusu dört izolata (R1, R2, RA5, RA9) göre bu çalışmada izole edilen diğer izolatlara daha çok benzerlik gösterdiği ortaya çıkmıştır. Diğer yandan AY603537 *R.acus* izolatu, ağacın karşı ucunda RA7 ve RA6 izolatlarıyla daha fazla benzerlik göstermiştir. Ayrıca ağacın kol ayrımına yakın bölgede yer alan RA8 ve RA10 izolatları bu konumlarıyla, JN102362.1 *Raphidascaris longispicula*, FJ009682.1 *Raphidascaris trichiuri*, JF809816.1 *Raphidascaris lophii* türlerine, diğer izolatlara göre daha yakın benzerlik taşıdıkları görülmüştür. GQ215514.1 *Eustrongylides* sp. dış grup olması nedeniyle beklendiği üzere ağaçta farklı bir ayrışma kolu meydana getirmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Parazit organizmaların var olan taksonomik problemlerini çözmek ve larval gelişimlerinin herhangi bir aşamasında onları doğru olarak tanımlayabilmek günümüz taksonomisinin önemli çalışma alanlarından biridir (Kijewska *et al.* 2002).

Parazitik yaşam gösteren bir takson olan Ascaridae familyası içindeki türlerin doğru tanımlanması için ITS1, ITS2 ve 5.8S rRNA gen bölgesi yararlı genetik belirteçler olarak tanımlanmıştır (Jahantab *et al.* 2014, Li *et al.* 2012, Pekmezci *et al.* 2013, Şimşek *et al.* 2016, Zhu *et al.* 1998). Bu nedenle, son zamanlarda özellikle yeni anisakid türleri ile ilgili çalışmalarda, hem morfolojik tanımlama hem de genetik belirteçleri sunulmaktadır (Li *et al.* 2012, Shamsi *et al.* 2008). Bu çalışmada da, Uluabat Gölü (Bursa)'ndeki turna balıklarında daha önce morfolojik olarak tanımlanan *Raphidascaris acus* (Öztürk *et al.* 2000)'un, rRNA 5.8S geni ilk defa tanımlanmıştır.

Bu çalışmada elde edilen *R.acus* izolatlarına ait ITS dizi sonuçları, KT633862 *R.acus* ve KM047505 *R.acus* izolatları ile %99-100 özdeşlik göstermiştir. Bununla birlikte, Vistula Lagünü (Polonya) AY603537 *R.acus* izolatları ile dizi benzerlik olgusu %96-100 arasında değişmiştir. İzolatlar arası bu ITS dizisi varyasyonları ve özdeşlikleri, izolatların allopatrik dağılış alanları arasındaki mesafeye bağlı olarak ortaya çıkan muhtemel gen akış izolasyonunun bir göstergesi olabilir.

Sonuç

Sonuç olarak, bu çalışmada, bir tatlısu gölü olan Uluabat Gölü (Bursa)'ndeki *Esox lucius* L.'da parazit olarak yaşayan *Raphidascaris acus*'un, 5.8S gen dizisi ilk defa bu çalışma ile tanımlanmıştır. Söz konusu genin bant boyutu 750 baz çifti (bp) olarak belirlenmiştir. İlgili dizi verileri, anatomik ve morfolojik yapılarına göre tanımlaması yapılan *R. acus* türünün taksonomik konumunu doğrulamıştır. İncelenen 12 *R.acus* izolatu gen dizilimi bakımından kendi aralarında tam özdeşlik göstermiştir. Çalışmada elde edilen veriler *Raphidascaris acus*'un, monotipik veya politipik özelliğinin anlaşılmasına ve allopatrik populasyonlar arasındaki genetik farklılıkların ortaya çıkarılmasına katkıda bulunmuştur. Ayrıca, uzun süre etanolde korunan *R.acus* gDNA'sının hasar görmediğini ve rutin olarak çoğaltılabildiğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

- Abe, N. (2011). Molecular and morphological identification of helminthes found in Japanese smelt, *Hypomesus transpacificus nipponensis*, with notes on new host records of *Eustrongylides ignotus* and *Raphidascaris gigi*. *Acta Parasitologica*, **56(2)**: 227–231. DOI: 10.2478/s11686-011-0029-7
- Akkent, E. and Öztürk, M.O. (2017). Afyonkarahisar Karamık Gölü'ndeki Turna Balıkları'nın (*Esox lucius* Linnaeus, 1758) Bağırsak Helminth Faunası Üzerine Bir Araştırma. *Kocatepe Vet J.* **10(3)**:196-203 DOI: 10.5578/kvj.57531
- Akmirza, A. and Yardımcı, R.E. (2014). Fish parasites of the Sakarya River, Turkey. *JADFA*, **1**: 23-29.
- Aydın, P. C. (2015). Yunanistan'dan toplanmış *Brachypodium* spp. (Poacea) Populasyonlarının Fenotipik ve Genetik Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Bychovskaja-Pavlovskaja, I.E., Gusev, A.V., Dibinina, M.V., Izjumowa, N.A., Smirnova, T.S., Sokolovskaja, I.L., Štein, G.A., Šulman, S.S. and Epstein, U.M. (1962). Key to parasites of freshwater fishes of the USSR. Publ. House of the USSR Acad. Sci.Moscow, Leningrad.
- Chilton, N.B., Gasser, R.B. and Beveridge, I. (1995). Differences in a ribosomal DNA sequence of morphologically indistinguishable species within the *Hypodontus macropi* complex (Nematoda: Strongyloidea). *Int J Parasitol*, **25**: 647–651.
- Craig, J.F. (2008). A short review of pike ecology, International Pike Symposium Hydrobiologia, **601**: 5–16
- Çeliktaş, S. (2009). Apolyont (Uluabat) Gölü Turna Balığı (*Esox lucius* L.,1758)'nın Bazı Biyolojik Özellikleri. Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Anabilim Dalı, İST.
- Çınar, Ş., Küçükkara, R., Balık, İ., Çubuk, H., Ceylan, M., Erol, KG.,Yeğen, V. and Bulut, C. (2013). Uluabat (Apolyont) Gölü'ndeki balık faunasının tespiti, tür kompozisyonu ve ticari avcılığın türlere göre dağılımı. *Jornal of Fisheries Sciences*,**7(4)**: 309-316. DOI:10.3153/jfscm.2013034
- D'Amelio, S., Mathiopoulou, K.D., Santos, C.P., Pugachev, O.N., Webb, S.C., Picanco, M. and Paggi, L. (2000). Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by

- polymerase-chain reaction- based restriction fragment length polymorphism. *Int J Parasitol*, **30**: 223–226.
- Du, C.X., Zhang, L.P., Shi, M.Q., Ming, Z., Hu, M. and Gasser, R.B. (2010). Elucidating the identity of Anisakis larvae from a and broad range of marine fishes from the Yellow Sea, China, using a combined electrophoretic-sequencing approach. *Electrophoresis* **31**: 654– 658.
- Fang, W.Z., Xu, S.S., Zhang, S.L., Wang, Y.N., Chen, X.B. and Luo, D.M. (2010). Multiple primer PCR for the identification of anisakid nematodes from Taiwan Strait. *Exp Parasitol*, **124**:197–201.
- Felsenstem, J. (1987). Estimation of hominoid phylogeny from a DNA hybridization data set. *Molecular Evolution*. **26**: 123-31.
- Fitch, W.M. and Margoliash, E. (1967). Construction of phylogenetic trees. *Science* **155** (3760): 279–284.
- Freeman, S. and Herron, J.C. (1999). Evrimsel Analiz. Çıplak, B, Başbüyük H, Karaytuğ, S, Gündüz, İ. (eds). Palme Yayıncılık. Ankara.
- Geldiay, R. and Balık, S. (1999). Türkiye Tatlı Su Balıkları, Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yayınları No: 46, III. Baskı, İzmir.
- Jahantab, M., Haseli, M. and Salehi, Z. (2014). Morphological and genetic characteristics of the anisakid nematode *Raphidascaris acus* from the southwest Caspian Sea: Evidence for the existence of sibling species within a species complex. *Parasitol Res*, **113**: 3419-3425. DOI: 10.1007/s00436-014-4007-5
- Kellermanns, E., Klimpel, S. and Palm, H.W. (2007). Molecular identification of ascaridoid nematodes from the deep-sea onion-eye grenadier (*Macrourus berglax*) from the East Greenland Sea. *Deep Sea Res Part I*, **54**: 2194-2202. DOI: 10.1016/j.dsr.2007.09.001
- Kır, I. and Tekin Ozan, S. (2005). Seasonal distributions and effects of parasites in Pike (*Esox Lucius* L., 1758) inhabiting the Isıklı Dam Lake (Denizli). *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, **29** (4): 291-294.
- Kijewska, A., Rokicki, J., Sitko, J. and Wegrzyn, G. (2002). Ascaridoidea: a simple DNA assay for identification of 11 species infecting marine and freshwater fish, mammals, and fish-eating birds. *Exp Parasitol*, **101**: 35-39. DOI: 10.1016/S0014-4894(02)00031-0.

- Klimpel, S., Kleinertz, S., Hanel, R. and Rückert, S. (2007). Genetic variability in *Hysterothylacium aduncum*, a raphidascarid nematode isolated from sprat (*Sprattus sprattus*) of different geographical areas of the northeastern Atlantic. *Parasitol Res*, **101**: 1425-1430. DOI: 10.1007/s00436-007-0662-0
- Kuru, M. (2011). Omurgalı hayvanlar (Onuncu baskı). Palme Yayıncılık, 841, Ankara
- Li, L., Liu, Y-Y., Liu, B-C. and Zhang, L.P. (2012a). Morphological and molecular evidence for a new species of the genus *Raphidascaris* (Nematoda: Anisakidae) from marine fishes from the South China Sea. *Parasitol Res*, **110**:1473–1479.
- Li, L., Liu, Y-Y. and Zhang, L.P. (2012b). Morphological and genetic characterization of *Hysterothylacium zhoushanensis* sp. nov. (Ascaridida: Anisakidae) from the flatfish *Pseudorhombus oligodon* (Bleeker) (Pleuronectiformes: Paralichthyidae) in the East China Sea. *Parasitol Res*, **111**:2393–2401.
- Moravec, F. (1994): Parasitic Nematodes of Freshwater Fishes of Europe. *Academia and Kluwer, Dordrecht*.
- Morrison D.A. (1996). Phylogenetic Tree-building. *International Journal for Parasitology*, **26 (6)**: 589-617.
- Mount, D.W. (2001). Bioinformatics Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. Chapter 3. Alignment of pairs of sequences: 52-137.
- Nei, M., Kumar, S. and Takashi K. (1998). The optimization principle in phylogenetic analysis tends to give incorrect topologies when the number of nucleotides or amino acids used is small. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**: 12390–12397
- Öztürk, M.O. (1995). Uluabat (Apolyont) Gölünde Yaşayan Turna Balıkları (*Esox lucius*, L. 1758)'ndaki Endohelminthlerin Tespitine Yönelik Çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa
- Öztürk, M.O., Oguz, M.C. and Altunel, F.N. (2000). Metazoan parasites of pike (*Esox lucius* L.) from Lake Uluabat, Turkey. *Israel J. of Zoology*, **46 (2)**: 119-130.
- Pekmezci, G.Z., Yardimci, B., Onuk, E.E. and Umur, S. (2014). Molecular characterization of *Hysterothylacium fabri* (Nematoda: Anisakidae) from *Zeus faber* (Pisces: Zeidae) caught off the Mediterranean coasts of Turkey based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Parasitol Int*, **63**: 127-131. DOI: 10.1016/j.parint.2013.10.006
- Pérez-i-García, D., Constenla, M., Carrassón, M., Montero, F., E., Soler-Membrives, A. and González-Solís, D., (2015). *Raphidascaris* (*Raphidascaris*) *macrouri* n. sp.

- (Nematoda: Anisakidae) from two deep-sea macrourid fishes in the Western Mediterranean: Morphological and molecular characterisations. *Parasitology International*, **64(5)**: 345-352. DOI: 10.1016/j.parint.2015.05.002
- Saitou, N. and Imanishi, T. (1989). Relative Efficiencies of the Fitch-Margoliash, Maximum Parsimony, Maximum-Likelihood, Minimum-Evolution, and Neighbor-joining Methods of Phylogenetic Tree Construction in Obtaining the Correct Tree. *Mol. Biol. Evol.* **6(5)**: 514-525.
- Sarıçam, S. and Müştak, H.H. (2015). Filogenetik Ağaçlandırma Metotları. *Etlik Vet. Mikrobiyol Derg.*, **26 (2)**: 58-64
- Shamsi, S., Norman, R., Gasser R.B. and Beveridge, I. (2009). Genetic and morphological evidences for the existence of sibling species within *Contracaecum rudolphii* (Hartwich, 1964) (Nematoda: Anisakidae) in Australia. *Parasitol Res*, **105**: 529–538.
- Shamsi, S., Gasser, R.B. and Beveridge, I. (2008). *Contracaecum pyripapillatum* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) and a description of *C. multipapillatum* (von Drasche, 1882) from the Australian pelican, *Pelecanus conspicillatus*. *Parasitol Res*, **103**: 1031–1039.
- Smith, J.D. (1984). Taxonomy of *Raphidascaris* spp. (Nematoda, Anisakidae) of fishes, with a redescription of *R. acus* (Bloch, 1772). *Canadian Journal of Zoology*, **62**: 685–694.
- Şimşek, E., Çiloğlu, A., Aypak, S., Yıldırım, A., Aldemir, O.S., Ünlü, A.H. and Pekmezci, G.Z. (2016). First Molecular Characterization of *Raphidascaris acus* Bloch, 1779 (Nematoda: Anisakidae) from European eels (*Anguilla anguilla* Linnaeus, 1758) Caught off the Aegean Region Streams, Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, **22 (4)**: 529-532. DOI: 10.9775/kvfd.2016.14980
- Testini, G., Papini, R., Lia, R.P., Parisi, A., Dantas-Torres, F., Traversa, D. and Otranto, D. (2011). New insights into the morphology, molecular characterization and identification of *Baylisascaris transfuga* (Ascaridida, Ascarididae). *Vet Parasitol*, **175**: 97–102.
- Xiong, J. (2006). Essential Bioinformatics: Cambridge University Press The Edinburgh Building, Cambridge CB2 2RU, UK, pp. 318.

- Xu, Z., Zhang, L-P., Liu, B.C. and Li, L. (2012). Morphological and molecular characterization of *Raphidascaris (Ichthyascaris) lophii* (Wu, 1949) (Nematoda, Anisakidae) from marine fishes from China, with a key to the species of the subgenus *Ichthyascaris*. *Acta Parasitologica*, **57(3)**: 316–322. DOI: 10.2478/s11686-012-0037-2
- Zhang, L-P., Hu, M., Shamsi, S., Beveridge, I., Li, H-M., Xu, Z., Li, L., Cantacessi, C. and Gasser, R.B. (2007). The specific identification of anisakid larvae from fishes from the Yellow Sea, China, using mutation scanning coupled sequence analysis of nuclear ribosomal DNA. *Mol Cell Probe*, **21**: 386–390.
- Zhu, X.Q., Gasser, R.B., Jacobs, D.E., Hung, G.C. and Chilton, N.B. (2000). Relationships among some ascaridoid nematodes based on ribosomal DNA sequence data. *Parasitol Res*, **86**: 738–744
- Zhu, X.Q., Gasser, R.B., Chilton, N.B. and Jacobs, D.E. (2001). Molecular approaches for studying ascaridoid nematodes with zoonotic potential, with an emphasis on *Toxocara* species. *J Helminthol*, **75**: 101–108.
- Zhu, X.Q., Gasser, R.B., Podolska, M. and Chilton, N.B. (1998). Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol*, **28**: 1911–1921.
- Zhu, X.Q., Podolska, M., Liu, J.S., Yu, H.Q., Chen, H.H., Lin, Z.X., Luo, C.B., Song, H.Q. and Lin, R.Q. (2007). Identification of anisakid nematodes with zoonotic potential from Europe and China by single-strand conformation polymorphism analysis of nuclear ribosomal DNA. *Parasitol Res*, **101**: 1703–1707. DOI: 10.1007/s00436-007-0699-0.

6.1 İnternet Kaynakları

Erişim Tarihi

- İnt. Kyn. 1. <https://www.gbif.org/species/4346670> 07.01.2019
- İnt. Kyn. 2: <http://yigm.kulturturizm.gov.tr/TR-10218/ulubat-golu.html> 19.03.2019

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mine KESKİN
Doğum Yeri ve Tarihi : Sandıklı, 16.01.1992
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim (Telefon/e-posta) : 0542 315 67 03 / minekskn16@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Özel Zafer Lisesi, (2006-2010)
Lisans : Afyon Kocatepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü,
(2010-2015)



