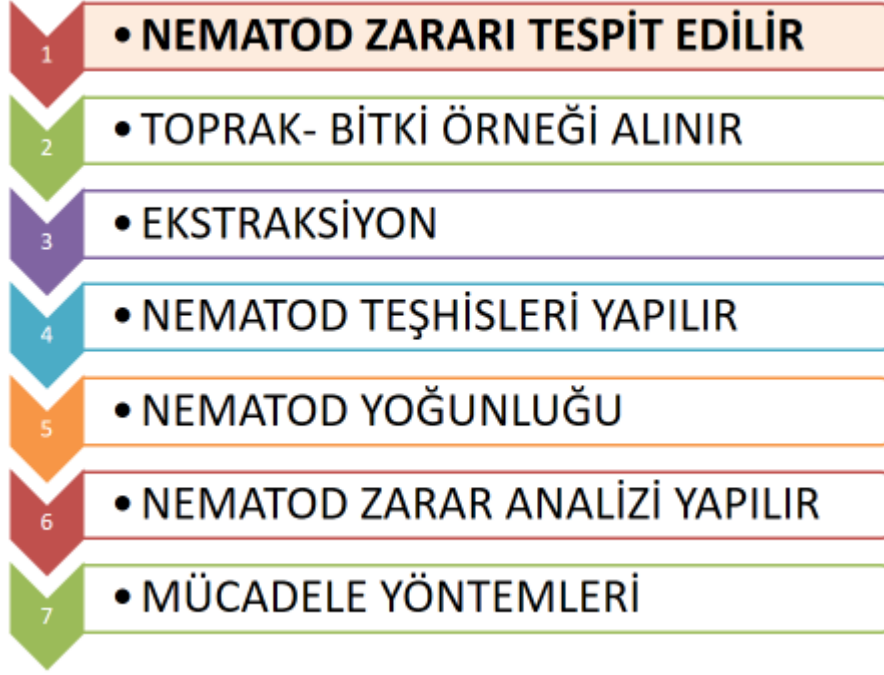


VI. Hafta: Nematodların toplanması, saklanması ve preparasyonu



Nematodların Toplanması

Nematodla bulaşık olduğu düşünülen veya bulaşık olduğunu bilinen alandan bulaşık bitki parçaları ve toprak örnekleri alınarak analiz için laboratuara götürülmektedir.

Toprak tipine göre örnekleme metodu değişiklik gösterebilmektedir. Ayrıca onukçu bitki kök sistemi ve nematodun mevsimsel değişimine göre nematodun dağılımı

- Ürün tipi ve araziye daha önce ekilen bitki çeşidi
- Farklı çeşitlerin arazideki ekilişine göre
- Toprak nemi
- Toprak yoğunluğuna göre
- Toprak tipine göre
- Sıcaklık ve mevsimler değişikliklere göre gibi maddelerde göz önünde bulundurulmalıdır.

Örnekleme Malzemeleri

Sonda, kürek, plastik poşet, kağıt, kurşun kalem,

Örnekleme Sayısı

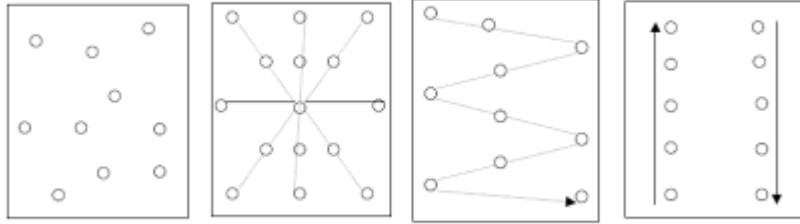
Örnekleme sayısı

0,5-1 hektar minimum 10- 50 örnek .

Yaklaşık her bir örnekleme alanından 1- 2 kg arası toprak örneği alınmaktadır.

Örnekleme Deseni

Birçok farklı şekilde araziden toprak örneği alınabilir.



Örnekleme Zamanı

Birçok nematod türü en yoğun popülasyona bitkinin büyüme döneminde gelirler. Kurak dönemde popülasyonlarının düşük olduğu dönemdir.

Örneklerin toplanacağı en uygun zaman mevsim ortası ve/veya hasat sonrasıdır.

Çok yıllık bitkilerde örnekleme büyüme döneminde özellikle yağmurlu/büyüme döneminde problemler tanımlanır.

Toprak Örneği Almak

Toprak Örneklemesin yapılırken toprağın çok ıslak / kuru olmamasına dikkat etmek gerekmektedir. 1 hektardan büyük olan alanlar örnekleme için bölünür. 10-50 örnekleme yapılır her ayrılmış alandan yaklaşık 1-2 kg toprak örneği alınır.

Kök Örneği Almak

Kök örneği de toprak örnekleme sırasında alınır. Aynı poşete konması köklerin kurumasını önleyecek, kökleri koruyacaktır.

Genellikle ürüne göre 25-100 gr. Kök yeterli olmaktadır. Pirinç gibi az ağırlıkta olandan az miktarda muz gibi büyük bitkilerden de daha fazla miktarda örnek alınır.

Örnek alınırken ölü bitki dokusu almamaya özen gösterilmelidir çünkü nematodlar ölü bitkilerden başka bitki kaynağı aramak üzere ayrılırlar doğru örnekleme yapamayız.

Örnekleme etiketine yazılacaklar ;

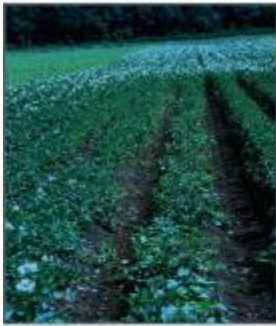
- Bitkinin türü, çeşidi
- Örnekleme tarihi
- Yeri /konumu (varsa GPRS verileri)
- Deneme ise deneme numarası
- Daha önce hangi bitki yetiştirildiđi bilgisi

NEMATOD EXTRAKSİYONU

- Alınan örneklerden hangi bitki paraziti nematod türünün bulunduğunu saptamak ve bu türlerin yoğunlukları hakkında bir yargıya varabilmek için örnekler laboratuvar koşullarında incelemeye tabi tutulur.
- Nematoloji biliminin ortaya çıkışından günümüze kadar çeşitli yöntemlere başvurulmuştur.

BİTKİ	
DİREK EXTRAKSİYON	BİTKİDEN
	BİTKİ parçaları kesildikten sonra mikroskop altında direkt olarak nematodların toplanmasına dayanmaktadır.
İNDİREK YÖNTEMİ	EXTRAKSİYON
	Aktif Nematodlar için;
	Baermann yöntemi
	Huni sprej yöntemi
	Blender filtre yöntemi
	İnaktif ve Aktif nematodlar için;
	Santifuj yöntemi





Pale Cyst Nematode



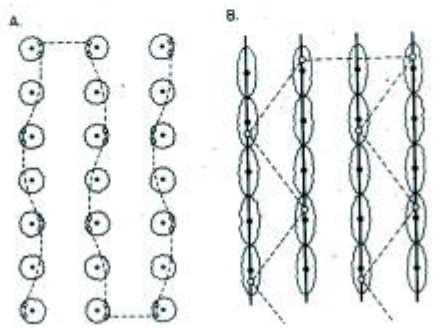
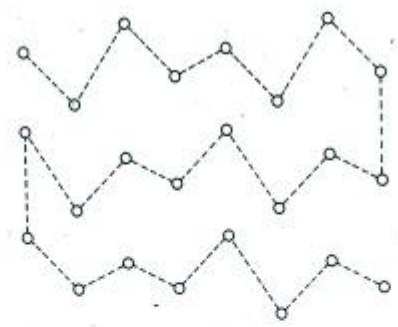
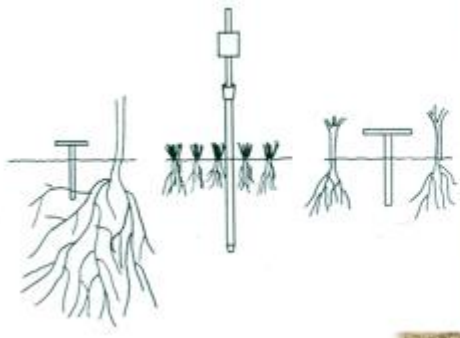
Golden Cyst Nematode

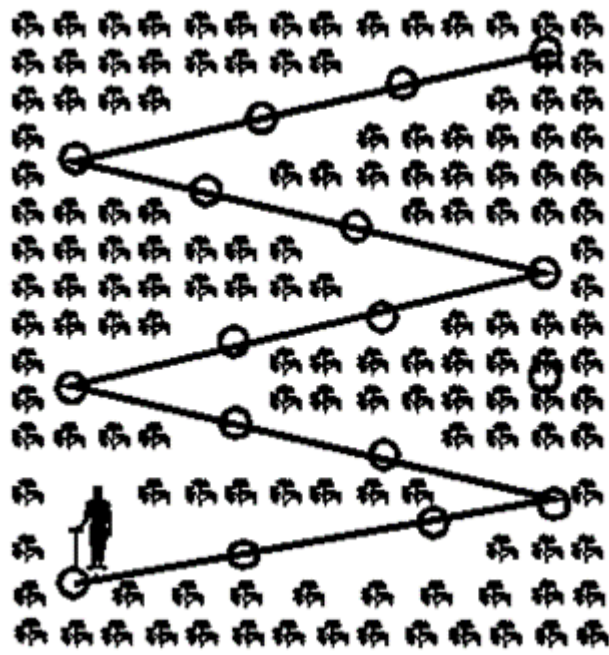
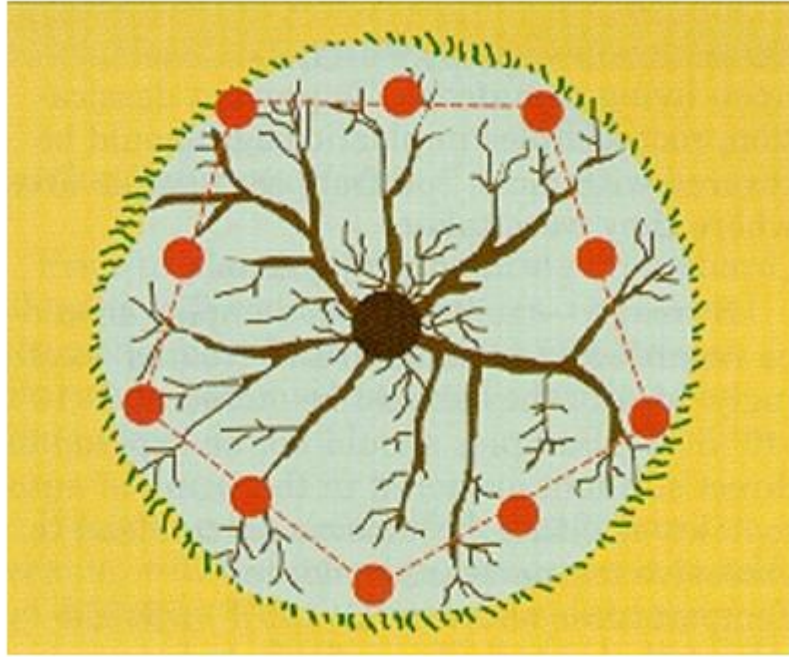


Örnekleme

- Nereden ?
- Nasıl ?
- Nezaman ?





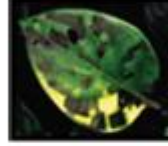


EKSTRAKSİYON

Nematod Ekstraksiyonu

- **Yaprak Örnekleri**

Delme
Makasla kesmek



- **Toprak örneği**

Baermann funnel
Modified Baermann funnel
Seinhorst
Fenwick
Kort
Zonal Centrifuge method



- **Kök örneği**

Baermann funnel
Modified Baermann funnel



Yaprak Örneklerinden Ekstraksiyon



BAERMAN HUNİ YÖNTEMİ

Bu yöntemde esas amaç; nematodların kendi aktiviteleri ile bezden suya geçip lastik boru içindeki suyun dibine çökmeleridir.



HUNİ SPREY YÖNTEMİ

- Bu yöntem bitki materyallerinden hareketli akarları toplamak için kullanılmaktadır.
- Bu yöntem içinde Baermann hunileri kullanılmaktadır.



Baermann funnel



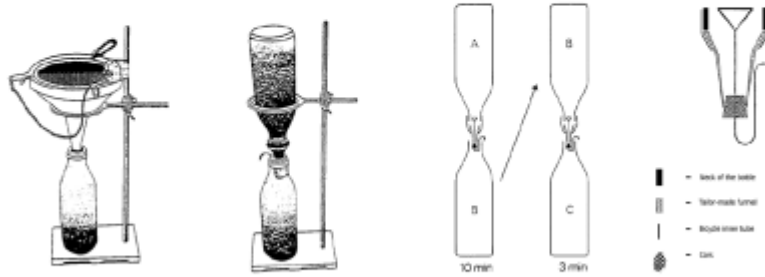
Baermann tray

DECANTING YÖNTEMİ

- Bu yöntem bitki , toprak ve hareketli nematod türlerinin toplanmasında kullanılmaktadır.
- Bir kova içine konan toprak homojen şekilde karıştırılır ve nematodların suyun içine geçmesi sağlanır.

ERLENMEYER YÖNTEMİ

Topraktaki aktif nematodların toplanması için bu yöntem kullanılmaktadır.



OOSTENBRINK YÖNTEMİ

Bu yöntemle toprak, akarsu toprağı ve diğer nematod türlerinin ekstraksiyonu yapılabilmektedir.



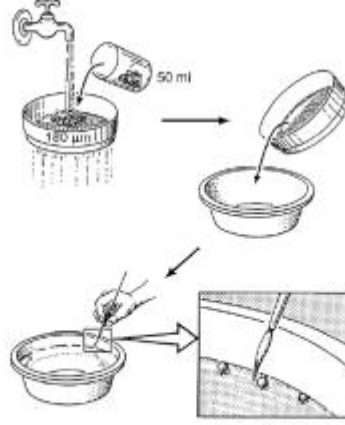
KİST EXTRAKSİYONU

- Kistlerin büyüklükleri, şekilleri ve ağırlıklarının ayrıca birçok nematod döneminin farklı olması nematod ekstraksiyonu için özel yöntemler geliştirilmesine neden olmuştur.
- Islak veya kuru toprağa göre kist ekstraksiyonu farklılık göstermektedir.
- Kuru ekstraksiyon temelinde kistlerin su yüzeyinde yüzdürülmesine dayanmaktadır. Kistler hava kabarcığı içermektedirler. Dolayısıyla su yüzeyinde yüzerler. Başarılı bir ekstraksiyon için örneğin tamamen kuru olmasına dikkat edilir.
- Globodera sp. Kurağa dayanıklı olmasına rağmen Heterodera sp. ve Punctodera türleri kistlerinin canlılığını son derece düşürmektedir. Özellikle kuruma hızlı bir şekilde oluyorsa.
- Bu türlerin kistlerinin ekstraksiyonunda Further Multiplication veya inokulasyon yöntemi uygulanmaktadır.
- Kuru ekstraksiyonun bir diğer dezavantajı yıkamanın iyi yapılmadığından sadece genç dolu kistlerle değil, yarı boş kistlere de sıklıkla karşılaşılmaktadır. Bu durum populasyon yoğunluğunu hespalamada zorluk yaratmaktadır.
- Islak ekstraksiyon da kistlerin suyun yüzeyinde yüzdürülmesi ile toprak parçalarından ayrılması sağlanır. Bu yöntemle genç dolu kistler kolaylıkla toplanmaktadır.

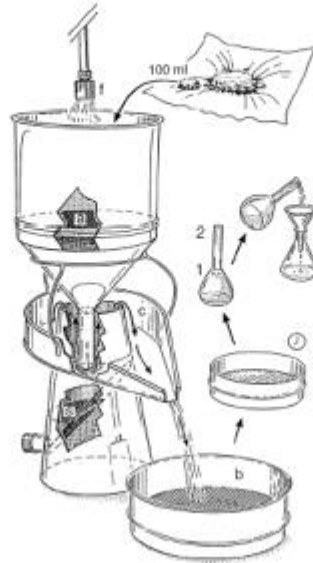
KİST NEMATODLARI	
Aktif dönem	topraktan L2 ve cf (Yukarıda anlatılan yöntemlerle toplanmaktadır.)
Aktif ve İnaktif dönem	Bitkilerden L3 –L5 (?larva 5 tekrar check et 4 olacak)
TOPRAKTAKİ EXTRAKSİYONU	KİSTLERİN
Kuru Ekstraksiyon	Baunacke Yöntemi
	Fenwick Yöntemi
	Schulling Santrifuj Yöntemi
Islak Ekstraksiyon	Kort Ekstraksiyon Aleti*
	Seinhorts Ekstraksiyon Aleti

BAUNACKE YÖNTEMİ

Oldukça basit, ucuz ve hızlı olan bu yöntemler 50 g. toprak örneğinde yıkanarak içindeki kistler toplanmaktadır.



FENWICK YÖNTEMİ



PEDRİ DİSH YÖNTEMİ

- Araziden toprak numunesi alınırken çok farklı yöntemler uygulanmaktadır. Bunlardan önerilen yöntemlerden biride "W" yöntemidir.
- Alınan örnekler homojen şekilde karıştırılıp 500gr. ile 1000 gr arasında olacak şekilde toprak numunesi alınıp laboratuara getirilir.
- Toprakta numune alma zamanı ilkbahar ve sonbaharda alınması önerilir. Toprağın tavında olması istenmektedir.
- Gelen toprak örneğinden 100 gr. tartılır ve özel pedri içine peçete konur bunun üzerine tartılan toprak örnekleri konur. Islatılarak nematodların suya geçişi sağlanır.



Pedri içinde 2 gün sulu ortamda bekleyen toprak örnekleri 2.gün sonunda 100 ml ölçü kabına alınırlar. Burada 6 saat bekletilirler. Bunun amacı nematodların dipte toplanmasıdır.



- Bu ölçü kabındaki suyu 6 saat sonunda 10 ml olacak şekilde boşaltırız. Burada dikkat edilmesi gereken nokta dibe boşaltma borusunun değdirilmemesi eğer değmişse tekrar 6 saat nematodların dibe çökmesi için beklenir.
- 10 ml'ye inen nematodlu örnekler 15 ml'lik tüplere aktarılırlar. Burada da 2 saat bekletilirler.
- Burada beklemiş olan örneklerin 1ml olacak şekilde suları azaltılarak küçük tüplere konur.
- 10 μ m bu örnekten alınarak içerisindeki nematod sayımı yapılır.
- Geri kalan örneği preparatını yapmak için cam tüpler içerisine konur.

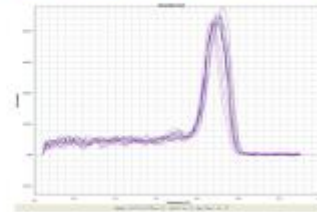
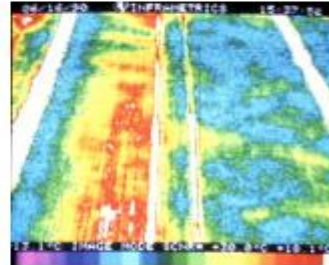






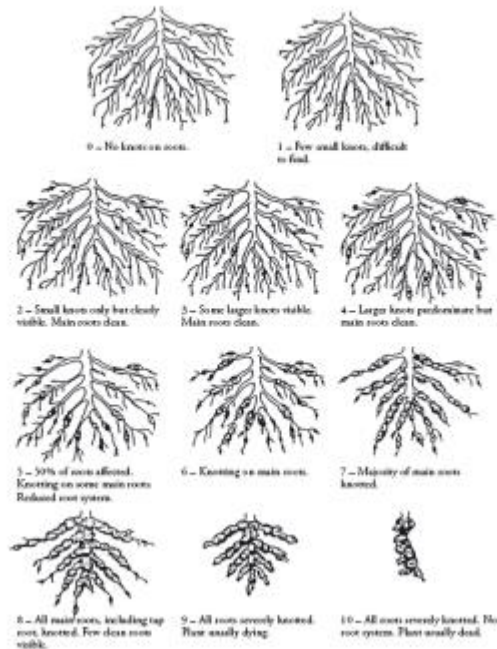
SAYIM

- Mikroskop
 - Compound mikroskop
 - Dissection mikroskop
- Image analysis
- Q-PCR



NEMATOD ZARAR ANALİZİ YAPILIR

Diagrammatic root-rot scoring chart
Courtesy of John Pridge and Sam Page (1980).



NEMATOD PREPARASYONU

- Cam tüpler içine konan örnekler içindeki nematodları öldürmek için önce 65°C suyun içinde 2 dakika bekletilir.
- Alınan örneklerin içerisine 1 ml "TAF" eklenir. TAF'ın uçmaması için tüpleri ağzı parafilm ile kaplanır ve 2 gün bekletilir.
- İkinci günün sonunda tüpteki örnekler küçük pedri kaplarına aktarılır ve kuruması beklenir. Kuruyan örneğin üzerine önce sırasıyla ;
 - ÇÖZELTİ 1
 - ÇÖZELTİ 2
 - GLİSERİN
- Her aşamadan önce iyice kurulması beklenir.
- Gliserinden sonra cins içindeki bireyler pedri kaplarından alınıp lam üzerine konu ve preparatı yapılır.

Kullanılan Kimyasallar ;

TAF

FORMALİN(%40 FORMALDEHYDE)	7 ml
TRİTHEONALAMİLE	2 ml
DESTİLE SU	91 ml

KONSANTRE TAF

FORMALİN(%40 FORMALDEHYDE)	7 ml
TRİTHEONALAMİLE	2 ml
DESTİLE SU	91 ml

ÇÖZELTİ 1

% 96 ETHANOL ALKOL	20 kısım
GLYSERİN	1 kısım
DESTİLE SU	79 kısım

ÇÖZELTİ 2

GLYSERİN	5 kısım
%96 ETHANOL ALKOL	95 kısım

GLYSERİN

SAF GLYSERİN KULLANILIR.