

Orijinal araştırma (Original article)

Domateste Kök ur nematodu (*Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood)'na dayanıklılık sağlayan *Mi*-1.2 geninin Mi23 SCAR markırı ile belirlenmesi

Adem ÖZARSLANDAN^{1*} Ercan EKBIÇ² İ. Halil ELEKCİOĞLU³

Summary

Detection of the *Mi*-1.2 gene for resistance to root-knot-nematode (*Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood) in tomato by SCAR marker, Mi23

Root-knot nematodes have wide range of host plants and cause important yield losses in many crop plants. The resistance gene *Mi* was introduced to the cultivated tomatoes from wild tomato species *Solanum peruvianum* in 1940. The gene confers resistance to *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood and *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood. Present study was carried out in Plant Protection Research Institute of Adana in 2010. In the study tomato plants were inoculated by *M. javanica* (1000 larva per plant) and resistance features of the genotypes were screened by classical method. Furthermore those tomato genotypes were screened for their resistance as susceptible, homozygote or heterozygote resistant by using REX-F1-REX-R2 and Mi23F-Mi23R specific primers. According to the classical tests results the root-gall index values were determined as lower than 2 in resistant plants and higher than 2 in susceptible ones. Reproduction factors were observed 0 and more than 1 in resistant and susceptible plants respectively. The data showed a clear correlation between classical screening and the used of DNA markers. It was concluded that those markers could be used in marker assisted selection for *M. javanica* resistance breeding.

Key words: Tomato, resistant, *Mi* gene, root-knot nematodes

Anahtar sözcükler: Domates, dayanıklılık, *Mi* geni, Kök-ur nematodları

¹ Ziraat Mücadele Araştırma Enstitüsü, 01321, Adana

² Adıyaman Üniversitesi, Kahta MYO, 02400, Adıyaman

³ Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 01360, Balcalı, Adana

* Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: ozarslandan2001@yahoo.com

Alınış (Received): 30.12.2010

Kabul ediliş (Accepted): 16.03.2011

Giriş

Türkiye’de sebze yetiştirilen alanlarda yaygın ve ekonomik öneme sahip Kök-ur nematod türlerinin *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) ve *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood olduğu bildirilmiştir (Elekcioğlu & Uygun 1994; Elekcioğlu et al., 1994; Mennan & Ecevit, 1996; Kaşkavalcı & Öncüer, 1999; Söğüt & Elekcioğlu, 2000; Özarslandan & Elekcioğlu, 2010). Kök-ur nematodlarının dünya genelinde sebzelerde çok önemli verim kayıplarına neden oldukları ve bu kayıpların domateslerde % 42-54, patlıcanlarda % 30–60 oranlarında olduğu belirtilmiştir (Netscher & Sikora, 1990). Nematodlara karşı mücadelede yaygın olarak uygulanan nematosislerin doğru kullanılmadığında insan ve çevre sağlığına çok zararlı oldukları bilinmektedir. Domates üretiminde nematodlara karşı en etkili mücadele yöntemlerinden biri de dayanıklı çeşit kullanmaktır. Dayanıklılık çalışmaları, nematodun üremesini tamamen engellemesi veya çok az düzeyde tutması, özel uygulama tekniği ve alet ekipman gerektirmemesi, diğer mücadele yöntemlerine göre maliyetin daha düşük olması ve çevre dostu olmasından dolayı tercih edilmektedir (Cook & Evans, 1987; Boerma & Hussey, 1992; Lopez-Perez et al., 2006).

Domates üretiminde kullanılan ve *M. arenaria*, *M. incognita* ile *M. javanica*’ya karşı dayanıklı olan RN (Kök-ur nematodları’na dayanıklı)’li domates çeşitleri *Mi* genini taşımaktadır. Kök-ur nematodları’na karşı dayanıklılığı sağlayan *Mi* geni 1940’lı yıllarda yabancı domates olan *Solanum peruvianum* L’dan kültür domatesine aktarılmıştır (Smith, 1944). *Mi* geni 6. kromozomun kısa kolu üzerinde bulunmaktadır. Bu kromozom haritalandırılmış ve kromozom üzerinde gen ile bağlantılı olan birçok markır belirlenmiştir (Messequer et al., 1991; Williamson et al., 1994). Williamson et al. (1994) ve Yaghoobbi et al. (1995) CAPS markır yöntemiyle dominant homozigot ve heterozigot dayanıklılığı sağlayan *Mi* genini tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalar ile domateslerde *Mi-1* geni ile bağlantılı Rex-1 markırı geliştirilmiştir (Williamson et al., 1994).

Major genlerle idare edilen hastalıklara karşı dayanıklılık ıslahı çalışmalarında dayanıklı ve duyarlı bireylerin ayırılmasında homozigot dayanıklı bireylerin belirlenebilmesi ıslah etkinliğini artırarak süreyi kısaltabilmektedir. Dayanıklı (homozigot ve heterozigot) ve hassas (homozigot) bireylerin karışık bulunduğu generasyonlarda (F_2 ve geriye melez populasyonları) klasik testleme yöntemleri kullanılarak yapılan seleksiyonlarda hassas ve dayanıklı bireyler başarı ile ayrılabilir. Fakat dayanıklı bireyler arasında homozigot ve heterozigot genotipler aynı reaksiyonu verdiklerinden klasik testleme ile ayırt edilemezler. Hassas ve dayanıklı allelleri ayırt edebilen ko-dominant moleküler markırların kullanılması ile dayanıklı bireyler arasında homozigot ve heterozigot olanlar ayırt edildiği gibi hassas bireyler de ayırt edilebilmektedir. Allel spesifik

(dayanıklılığı veya hassaslığı oluşturan genin sekansından elde edilmiş markır) veya dayanıklılığı sağlayan gene çok yakın (markır ile gen arasındaki rekombinasyon oranı <math><1\%</math>) bir genomik bölgeden dizayn edilmiş moleküler markırların kullanılması %100 veya buna çok yakın doğrulukta dayanıklı (homozigot veya heterozigot) ve hassas bitki bireylerini belirleyebilmektedir. Bu durum klasik seleksiyonda nematodtan kaynaklanabilecek hataları önlemesi yanında homozigot ve heterozigot dayanıklılığın ortaya çıkarılması için dayanıklı bitkilerde test-mezeleme veya kendilenmesi ile elde edilecek bitkilerin de test edilmesini ortadan kaldırmaktadır. Bu amaçla çalışmada 18 adet domates hattının Kök-ur nematodu türü, *M. javanica*'ya karşı dayanıklılık durumları ve dayanıklılığın özellikleri (homozigot, heterozigot) moleküler markır yöntemiyle araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Denemenin ana materyalini domates bitkileri, Kök-ur nematodu (*M. javanica*), PCR, primerler oluşturmuştur.

Klasik yöntemle Kök-ur nematodları'na karşı dayanıklılığın araştırılması

Bu çalışmada ıslah aşamasında olan 18 adet domates hattının Kök-ur nematodu türü, *M. javanica*'ya karşı dayanıklılık durumları ve dayanıklılığın özellikleri $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve % 60 ± 10 oransal nem koşullarında araştırılmıştır. Denemelerde kullanılan Kök-ur nematodu (*M. javanica*) üretimi duyarlı olarak bilinen "Şoray F1" domates çeşidinde gerçekleştirilmiştir. Üretim sonunda bitki köklerinde oluşan yumurta paketleri binoküler mikroskop altında toplanarak, geliştirilmiş Baerman-huni yöntemiyle 2. dönem larvalar elde edilmiş ve ışıklı mikroskop altında sayımları yapılarak inokulasyona hazır hale getirilmiştir. Denemeye alınan 18 adet domates hattının tohumları viyollere ekilmiş ve 2-4 yapraklı dönemde bitkiler 4 tekerrürlü olacak şekilde 11 cm çapında ve 500 cm^3 hacimlik plastik saksılara şaşırtılmıştır. Saksılarda kullanılan toprak yapısı; % 80 kum, % 5 mil ve % 15 toprak olacak şekilde hazırlanmış ve deneme öncesi otoklav yapılarak dezenfekte edilmiştir. Domates fideleri yukarıda belirtilen özelliklerde hazırlanmış olan saksı toprağına şaşırtılarak, sulama ve gübreleme gibi rutin yetiştirme işlemleri yapılmıştır.

Domates fideleri yaklaşık ilk gerçek yapraklarını çıkardıktan sonra yaklaşık 15 cm boyuna ulaştıklarında Kök-ur nematodu inokulasyonu yapılmıştır. Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre 4 tekrarlamalı olarak kurulmuştur. İnokulasyon her bir saksıya ortalama 1000 adet 2. dönem larva olacak şekilde santrifüj tüpleri içerisine sayımları yapıldıktan sonra bitki kök bölgesi yakınına açılan yaklaşık 2 cm toprak derinliğine yapılmıştır.

Değerlendirme: İnokulasyondan sonra bitkiler 45 gün süre ile 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyot ve 25°C sıcaklık koşullarına sahip iklim odasında yetiştirilmiş ve bu süre sonunda bitki sökümleri yapılarak kök urlanma oranı, toprakta meydana gelen 2. dönem larva populasyon yoğunluğu, üreme oranı (Ro) parametreleri üzerinden değerlendirmeler yapılmıştır. Denemeye alınan çeşitlerin dayanıklılık veya duyarlılık özelliklerinin ortaya konması yalnızca ur oluşumuna göre değil, aynı zamanda Kök-ur nematodları'nın yumurta oluşturmaya bağlıdır. Kök-ur nematodu'nun beslenmesi sonucu bir çeşidin köklerinde ur oluşabilir, ancak iyi bir konukçu olmadığı için yumurta üretmeyebilir. Bu nedenle, denemede kullanılan bitkilerin kökleri, Hartman & Sasser (1985) tarafından belirtilen 0-5 yumurta kesesi ve ur sayısı skalasına göre değerlendirilmiştir. Bu skalada; 0: Kökte yumurta kesesi ve ur oluşumu yok, 1: Kökte 1-2 adet yumurta kesesi ve ur oluşumu var, 2: Kökte 3-10 adet yumurta kesesi ve ur oluşumu var, 3: Kökte 11-30 adet yumurta kesesi ve ur oluşumu var, 4: Kökte 31-100 adet yumurta kesesi ve ur oluşumu var, 5: Kökte 100'den fazla yumurta kesesi ve ur oluşumu var. Bu skalaya göre köklerde 0-2 değerini alan bitkiler dayanıklı, 3-5 skala değeri alan bitkiler ise hassas olarak kaydedilmiştir.

Topraktaki ikinci dönem larva yoğunluğunun belirlenmesi amacıyla, her bir saksıdan alınan 100 gr toprak örneği, geliştirilmiş Baermann-huni yöntemi (Hooper, 1986) ile analiz edilmiş ve elde edilen larva yoğunluklarının ışık mikroskobu altında sayımları yapılmıştır. Deneme öncesi (Pi) ve deneme sonrası (Pf) elde edilen ikinci dönem larvaların populasyonlarının oranlanması ile üreme oranları (Ro) elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı kullanılarak Varyans Analizi yapılmış ve ortalamalar 0.05 önem seviyesinde Duncan testine göre karşılaştırılmıştır.

Moleküler markır yöntemiyle dayanıklılığın özelliğinin araştırılması

DNA İzolasyonu

Bitki DNA izolasyonları Haymes (1996)'e göre yapılmıştır. Taze yapraklar sıvı azot kullanılarak porselen havanlarda parçalandıktan sonra 100-200 mg miktarlarda 1.5 ml eppendorf santrifüj tüpü içerisine alınmış ve 250 µl ekstraksiyon çözeltisi [100 mM tris-HCl, pH 8.0; 1.4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2% hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide (CTAB, Sigma Chemical Co., MO, USA); 0.4% β-mercaptoethanol] ilave edildikten sonra iyice karıştırılmış ve 30 dakika (dk.) süre ile 65 °C sıcaklıkta su banyosunda inkübasyona tabi tutulmuştur. 100 µl chloroform/isoamyl alkol (24/1) eklenerek dikkatlice karıştırdıktan sonra 3 dk. süre ile tam güçte santrifüj edilmiş ve üst sıvı faz yeni bir eppendorf tüpe aktarılmıştır. DNA çöktürmek amacı ile 500 µl etanol-asetate çözeltisi (96 mL EtOH, 4 mL 3 M NaAc, pH 5.2) eklenip yavaşça karıştırıldıktan sonra 3 dk. süre ile tam güçte santrifüj edilmiştir. Uygulama sonrası sıvı kısım dökülmüş ve oda sıcaklığında 1 saat süre ile kurumaya bırakılmıştır. İşlem sonunda 200 µl steril saf su ilave edilerek DNA peleti çözündürülmüştür.

Domateste Kök-ur nematodu'na dayanıklılık sağlayan Mi geninin seleksiyonunda daha önceden yapılan çalışmalarda geliştirilmiş 1 CAPS (REX-F1 5'-TCGGAGCCTTGGTCTGAATT-3' ve REX-R2 5'-GCCAGAGATGATTCGTGAGA-3'; Williamson et al., 1994) ve 1 SCAR (Mi23F 5'-TGG AAA AAT GTT GAA TTT CTTTTG-3' ve Mi23R 5'- GCA TAC TAT ATG GCT TGT TTA CCC-3'; Seah et al., 2007) markırı kullanılmıştır. PCR reaksiyonları 20 ng genomik DNA, 1 u Taq polimeraz, 0.4 µM primer, 1.5mM MgCl, 200 µM dNTP ve deiyonize saf su ile 25 µl'ye tamamlanarak 94°C'de 3 dk. 1 döngü, 94°C'de 1 dk., 55°C'de 2 dk. ve 72°C'de 2 dk. olarak 30 döngü ve 72°C'de 8 dk. süre ile 1 döngü şeklinde yürütülmüştür. CAPS markırı PCR ürünleri Taql enzimi ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda 3 saat süre ile kesim işlemine tabi tutulmuştur. SCAR markırı için ise yukarıdaki ile aynı miktarlarda ürünler kullanılarak 94°C'de 3 dk. 1 döngü, 94°C'de 30 sn., 57°C'de 1 dk. ve 72°C'de 1 dk. olarak 35 döngü ve 72°C'de 10 dk. süre ile 1 döngü şeklinde PCR reaksiyonları yürütülmüştür.

Elektroforez

PCR ürünleri %2 agaroz gel kullanılarak elektroforez edilmiş ve 30 dk. etidyum bromid çözeltisinde bekletildikten sonra UV transilluminatör yardımı ile görüntülenmiş ve fotoğrafları çekilmiştir.

Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Klasik yöntemle Kök-ur nematodları'na karşı dayanıklılığın araştırılması

Denemeye alınan domates hat ve çeşitlerinin köklerinde *M. javanica*'nın meydana getirdiği urlanma ile toprakta bulunan ikinci dönem larva sayıları Çizelge 1'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre 1, 2, 9 ve 18 nolu domates çeşitlerinde urlanma oranı 4-5 skalasında oluşmuştur. Aynı hat ve çeşitlerde topraktaki ikinci dönem larva yoğunluğu ise 1200 – 4985 birey/bitki olarak tespit edildiğinden ve üreme gerçekleştiğinden, bu hatlar duyarlı olarak kabul edilmiştir. Denemede kullanılan diğer hatlar da ise urlanma oranı 0-2 arasında tespit edilmiş, topraktaki ikinci dönem larva sayıları ise sıfır olarak tespit edildiğinden yani üreme gerçekleşmediğinden, bu hatlar da dayanıklı olarak kaydedilmiştir. Bu çeşitler arasında urlanma ve ikinci dönem larva sayıları bakımından istatistiksel olarak bir fark olmadığı da belirlenmiştir.

Çizelge 1. *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood 'ya karşı denemeye alınan domates hat ve çeşitlerinin köklerindeki ırlanma değerinin 0-5 skalasına göre ve 100 gr topraktaki ikinci dönem larva sayıları

<i>M. javanica</i>				
Hatlar	Urlanma (0-5 skalası)	İkinci dönem larva sayısı/ 100 gr toprak	Üreme oranı (Ro)	Dayanıklı (R) Duyarlı (S)
1	4.0 ± 0.0e*	1710±294b	1.71	S
2	4.5 ± 0.29e	1270±97b	1.27	S
3	0.5 ± 0.29ab	0 ± 0a	0	R
4	0 ± 0a	0 ± 0a	0	R
5	0.5 ± 0.29 ab	0 ± 0a	0	R
6	0.75± 0.25abc	0 ± 0a	0	R
7	0.25± 0.25a	0 ± 0a	0	R
8	1.75± 0.25cd	0 ± 0a	0	R
9	5.0 ± 0.0e	4985±3141b	4.9	S
10	2.0 ± 0.0d	0 ± 0a	0	R
11	1.0± 0.41abcd	0 ± 0a	0	R
12	1.0 ± 0.0abcd	0 ± 0a	0	R
13	0.5 ± 0.29ab	0 ± 0a	0	R
14	0.75± 0.25abc	0 ± 0a	0	R
15	0.75± 0.25abc	0 ± 0a	0	R
16	1.5 ± 0.25bcd	0 ± 0a	0	R
17	0.5 ± 0.29ab	0 ± 0a	0	R
18	5.0 ± 0.0e	1200±209b	1.2	S

R: Dayanıklı; S:Duyarlı

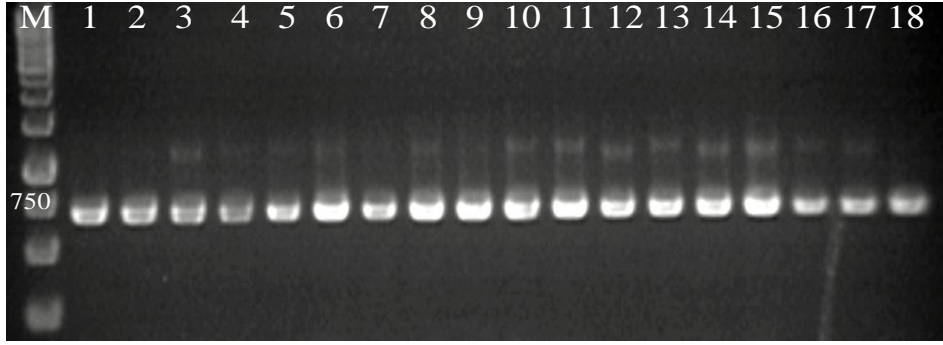
* Aynı sütunda aynı harfleri içeren çeşitler Duncan (P<0,05)'a göre birbirinden farklıdır.

Moleküler markır yöntemiyle dayanıklılığın özelliğinin araştırılması

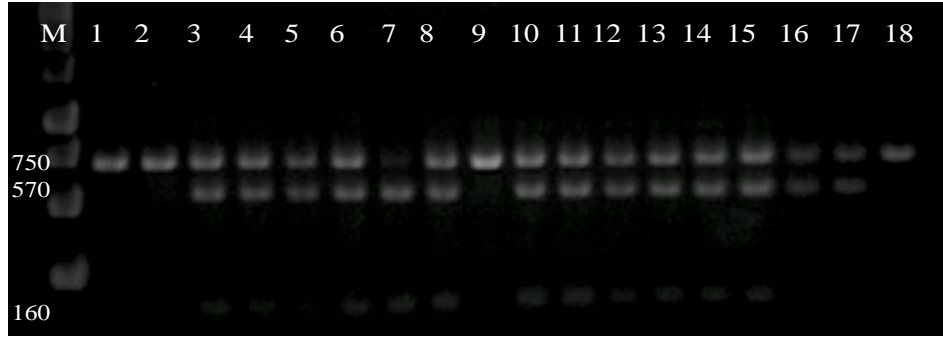
Rex1 primerleri ile yapılan CAPS markırı çalışmalarında PCR ürünleri Taq1 enzimi ile kesilmeden önce elektroforez edildiğinde denemede kullanılan 18 domates hattı da 750 bp büyüklüğünde tek bant vermiştir (Şekil 1). Taq1 enzimi ile kesimden sonra ise 750, 570 ve 160 bp büyüklüğünde 3 bant profili elde edilmiştir (Şekil 2). 750 bp büyüklüğünde tek bant veren genotipler homozigot duyarlı (mi/mi), her üç bant varlığında heterozigot dayanıklı (Mi/mi), 570 ve 160 bp büyüklüğünde bant veren genotipler de homozigot dayanıklı (Mi/Mi) olarak belirlenmiştir. Şekil 2'de de görüldüğü gibi 1, 2, 9 ve 18 nolu genotipler 750 bp büyüklüğünde tek bant oluşturmuş ve duyarlı olarak belirlenmiştir. Diğer genotiplerden 3,4,5,6,8,10,11,12,13,14,15,16,17 nolu hatlar 3 bant oluşturarak heterozigot dayanıklı (Mi/mi) olarak belirlenirken 7 nolu hat da 560 ve 160 bp büyüklüğünde 2 bant oluşturmuş ve homozigot dayanıklı olarak belirlenmiştir. Bu markır ile homozigot ve heterozigot dayanıklı ve duyarlı domates genotiplerinin ayrılmanması başarılı bir şekilde yapılabilmektedir. Bu yapılan çalışma sonuçları Williamson et al. (1994)'ın yapmış oldukları çalışmalar ile paralellik göstermiştir.

Homozigot dayanıklı, heterozigot dayanıklı veya hassas domates çeşitleri, Mi23F ve Mi23R primerleri ile de ayırtelebilmektedir. Sözü edilen primerler ile 430 ve 380 bp büyüklüğünde iki bant oluşmaktadır (Şekil 3). Sadece 430 bp

büyükliğinde tek bant veren genotipler duyarlı (mi/mi), sadece 380 bp büyükliğinde bant veren genotipler homozigot dayanıklı (Mi/Mi), her iki yerde de bant veren genotipler de heterozigot dayanıklı olarak değerlendirilmiştir. Buna göre 7 nolu domates genotipi 380 bp büyükliğinde tek bant vererek homozigot dayanıklı, 1, 2, 9 ve 18 nolu domates hat ve çeşitleri 430 bp büyükliğinde tek bant vererek duyarlı ve diğer 3, 4, 5, 6, 8, 10,11, 12, 13, 14, 15, 16 ve 17 nolu genotip ve çeşitler de 380 ve 430 bp büyükliğinde iki bant oluşturarak heterozigot dayanıklı olarak belirlenmişlerdir.



Şekil 1. REX-F1 ve REX-R2 primerleri elde edilen 750 bp de PCR ürünü M-Marker (1kb Fermentas).



Şekil 2. Enzimle kesimden sonra oluşturduğu 750 bp, 570 bp, 160 bp PCR ürünleri, 750 bp, 1,2,9,18 (mi/mi), 750 bp, 570 bp, 160 bp, 3,4,5,6,8,10,11,12,13,14,15,16,17 (Mi/mi), 570 bp, 160 bp, 7 (Mi/Mi), M-Marker (1kb Fermentas).

CAPS metodu ile dayanıklı hat veya çeşitlerde *Mi* geninin hızlı bir şekilde tespit edilebileceği bildirilmiştir (Williamson et al., 1994). REX-1 markırı *Mi* genine çok yakın ıslah çalışmalarında anne, baba ve F₂ bireylerinde çok kolay ayrılabilir. REX-F1 ve REX-R2 primerleri dayanıklı ve hassas bitkilerde 750 bp büyükliğinde bant oluşturmaktadır. Bu PCR ürünü *TaqI* enzimi ile kesildiğinde heterozigot dayanıklı bitkilerde 3 bant, homozigot dayanıklı bitkilerde 2 bant vermektedir. Hassas bitkilerde ise PCR ürünü *TaqI* enzimi ile kesilmemektedir. Benzer bir şekilde dayanıklı domates hat ve çeşitleri SCAR markırı yöntemi ile de ayrımlanabilmektedir. Yapılan bu çalışmada da kullanılan Mi23F ve Mi23R primerleri ile 380 ve 430 bp büyükliğinde iki bant vererek

dayanıklı ve duyarlı bitkilerin ayrılmasında rahatlıkla kullanılabilmiştir. Bu primerlerle tek bir PCR yaparak herhangi bir enzimle muamele etmeye gerek duyulmadan hassas, heterozigot ve homozigot dayanıklı bireyleri ayırmak mümkün olmuştur. Elde edilen sonuçlar, Seah et al. (2007)'ın yapmış oldukları çalışma ile paralellik göstermektedir.



Şekil 3. Mi23F ve Mi23R primerleri ile elde edilen 380 bp, 430 bp PCR ürünleri 430 bp 1,2,9,18 (mi/mi), 380 bp, 430 bp, 3,4,5,6,8,10,11,12,13,14,15,16,17 (Mi/mi), 380 bp, 7(Mi/Mi), M-Marker (100 bp Fermentas).

Domateste nematoda dayanıklılık sağlayan *Mi* genleri için (Mi-1.1 ve Mi-1.2) geliştirilen C1/2 ve C2S4 primerleri dayanıklılık genlerinin aktarıldığı transgenik bitkilerin seleksiyonunda kullanılmıştır. Bu primerlerin kullanımı ile dayanıklılık geni aktarılmış (transgenik) bitkilerin PCR reaksiyonları sonucunda 1.7 kb büyüklüğünde bant elde edilmiş ve dolayısı ile gen aktarılan ve aktarılmayan bitkiler ayrılanabilmiştir (Milligan et al., 1998). Aynı primerler Türkiye'de domateste F₂ populasyonlarının nematodlara dayanıklılık yönünden ayrılanmasında kullanılmıştır. C1/2 ve C2S4 primerleri ele alınan genotipin homozigot dayanıklı ve/veya heterozigot dayanıklı olduğunu ayırmamaktadır. Sadece dayanıklı veya duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir (Devran & Elekçioğlu, 2004).

Yapılan bu çalışmada klasik dayanıklılık testleri ile moleküler markırlar yardımı ile yapılan testleme sonuçları birbirlerini destekler nitelikte çıkmıştır. Klasik yöntemlerle dayanıklılığı tespit etmek uzun zaman almakla birlikte çok miktarda bitkinin testlenmesini de zorunlu kılmaktadır. Klasik yöntemle testleme yaparken mutlaka Kök-ur nematodunun türünün de doğru teşhis edilmesi çok önemlidir. Ayrıca nematod ile bulaşık olmayan bir yerde klasik testleme yapmak zorunda kalınırsa o bölgeye nematodun bulaşma riski de ortaya çıkabilir. Tüm bunlara ek olarak en önemlisi de özellikle ıslah çalışmalarında bireylerin ayrılanmasında klasik tesleme ıslahçıya o bireyin sadece dayanıklı ya da duyarlı olduğu bilgisini verir. Dayanıklılık lokusunun homozigot veya heterozigot olduğunu vermez. Klasik testlemede bu lokusun özelliklerini ortaya koyabilmek için kontrol melezlemeleri yapmak gerekir ki bu da ıslah aşamalarını uzatır. Moleküler yöntemler ile ise çok fazla sayıda genotipi daha kısa sürede daha güvenilir sonuçlar ile test etmek mümkündür.

Özet

Kök-ur nematodları çok geniş bir konukçu dizisine sahiptir ve ekonomik öneme sahip birçok bitki türünde önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Domateste Kök-ur nematotlarına karşı dayanıklılığı sağlayan *Mi* geni, 1940'lı yıllarda bir yabancı domates türü olan *Solanum peruvianum* L.'dan kültür domatesine aktarılmıştır. Bu gen *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood ve *Meloidogyne javanica* (Treub,1885) Chitwood'ya karşı dayanıklılık sağlamaktadır. Bu çalışma 2010 yılında Adana Ziraî Mücadele Araştırma Enstitüsü'nde yürütülmüştür. Bu çalışmada, domates fideleri 1000 larva /bitki olacak şekilde *M. javanica* ile infekte edilip genotiplerin dayanıklılık özelliği klasik testleme yöntemi ile belirlenmiştir. Ayrıca aynı domates hatlarının REX1-F1-REX-R2 ve Mi23F-Mi23R moleküler markırları kullanılarak hassas, heterozigot ve homozigot dayanıklı oldukları belirlenmiştir. Klasik olarak yapılan testleme sonuçlarına göre köklerdeki urlanma oranı dayanıklı bitkilerde 0-2, duyarlı bitkilerde ise 2' den büyük olarak tespit edilmiştir. Üreme oranları ise dayanıklı bitkilerde 0, duyarlı bitkilerde 1'den büyük olarak bulunmuştur. Klasik ve moleküler yöntemlerle yapılan testleme sonuçlarından elde edilen bulgular paralellik göstermiştir. Sözü edilen DNA markırlarının *M. javanica*'ya dayanıklı çeşit geliştirme çalışmalarında güvenilir bir şekilde kullanılabilceği görülmüştür.

Teşekkür

Domates hatlarını sağlayan Gen Fide A.Ş.'ye teşekkür ederiz.

Yararlanılan Kaynaklar

- Boerma, H. R. & R. S. Hussey, 1992. Breeding plants for resistance to nematodes. **Journal of Nematology**, **24** (2): 242-252.
- Cook, R. & K. Evans, 1987. Resistance and Tolerance. In: Kerry, B.R., Brown, R. H., (ed). Principles and Practice of Nematode Control in Crop. Academic Press, Australia, 179-220 pp.
- Devran, Z. & İ. H. Elekçioğlu, 2004. The screening of F2 plants for the root-knot nematode resistance gene, *Mi* by PCR in tomato. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, **28**: 253-257
- Elekçioğlu, İ. H & N. Uygun, 1994. Occurrence and distribution of plant parasitic nematodes in cash crop in Eastern Mediterranean region of Türkiye. In: Proceedings of 9th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Kuşadası-Aydın-Türkiye, pp. 409-410.
- Elekçioğlu, İ. H., B. Ohnesorge, G. Lung & N. Uygun, 1994. Plant parasitic nematodes in the Mediterranean region of Turkey. **Nematologia Mediterranea**, **22**: 59-63.
- Hartman, K. M & J. N. Sasser, 1985. Identification of *Meloidogyne* Species on the Basis of Different Host Test and Perineal Pattern Morphology. In: K. R. Barker, C. C. Carter, J. N. Sasser, (eds). An Advanced Treatise on *Meloidogyne*, Vol. 2. Methodology. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 69-77.

- Haymes, K. M., 1996. Mini-prep method suitable for a plant breeding program. **Plant Molecular Biology Reporter**, **14** (3): 280-284.
- Hooper, D. J., 1986. Extraction of Free Living Stages from Soil. In: Southey, J. F. (ed). Laboratory Methods for Work with Plant Soil Nematodes. Her Majesty's Stationary Office, London: 5-30.
- Kaşkavalcı, G. & C. Oncüer, 1999. Investigations on the distribution and economic importance of *Meloidogyne* Goeldi, 1887 (Tylenchida: Meloidogynidae) species found in the major areas of hot climate vegetables in Aydın province. **Türkiye Entomoloji Dergisi**, **23** (2): 149-160.
- Lopez-Perez, J. A., M. L. Strange, I. Kaloshian & A. T. Ploeg, 2006. Differential response of *Mi* gene resistant tomato rootstocks to root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*). **Crop Protection**, **25**: 382-388.
- Mennan, S. & O. Ecevit, 1996. Bafra ve Çarşamba ovaları yazlık sebze ekim alanlarındaki Kök-ur nematodları (*Meloidogyne* spp)'nin biyolojisi, yayılışı ve bulaşıklık oranları üzerine araştırmalar. Türkiye III. Entomoloji Kongresi Bildirileri, 700-705 s.
- Messeguer, R., M. Ganal, M. C. De Vicente, N. D. Young, H. Bolkan & S. D. Tanksley, 1991. High resolution RFLP map around the root knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, **82**: 529-536.
- Milligan, S. B., J. Bodeau, J. Yaghoobi, I. Kaloshian, P. Zabel & V.M. Williamson, 1998. The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. **The Plant Cell**, **10**: 1307-1319.
- Netscher, C. & R. A. Sikora, 1990. Nematode Parasites on Vegetables. In: Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. (Eds.: M. Luc, R. A. Sikora and J. Bridge). CAB International, 231-283 pp.
- Özarslandan, A. & İ. H. Elekcioğlu, 2010. Türkiye'nin farklı alanlarından alınan Kök-Ur nematodu türlerinin (*Meloidogyne* spp.) (Nemata: Meloidogynidae) moleküler ve morfolojik tanıma ile belirlenmesi. **Türkiye Entomoloji Dergisi**, **34** (3): 323-335.
- Seah, S., A. C. Telleen, & V. M. Williamson, 2007. Introgressed and endogenous *Mi-1* gene clusters in tomato differ by complex rearrangements in flanking sequences and show sequence exchange and diversifying selection among homologues. **Theoretical and Applied Genetics**, **114**: 1289-1302.
- Smith, P. G., 1944. Embryo culture of a tomato species hybrid. **Proceedings of the American Society for Horticultural Science**, **44**: 413-416.
- Söğüt, M. A. & İ. H. Elekcioğlu, 2000. Akdeniz Bölgesi'nde sebze alanlarında bulunan *Meloidogyne* Goeldi, 1892 (Nemata: Heteroderidae) türlerinin ırklarının belirlenmesi. **Türkiye Entomoloji Dergisi**, **24** (1): 33-40.
- Williamson, V. M., J-Y. Ho, F. F. Wu, N. Miller & I. Kaloshian, 1994. A PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene, *Mi*, in tomato. **Theoretical and Applied Genetics**, **87**: 757-763.
- Yaghoobi, J., I. Kaloshian, Y. Wen & V. M. Williamson. 1995. Mapping a new nematode resistance locus in *Lycopersicon peruvianum*. **Theoretical and Applied Genetics**, **91**: 457-464.