

Orijinal araştırma (Original article)

Bitlis ili patates üretim alanlarında Kök-ur nematodu (*Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo et Finley, 1980)'nun saptanması¹

Identification of Root knot nematode (*Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo et Finley, 1980) in potato in Bitlis Province, Turkey

Adem ÖZARSLANDAN^{2*}

Mustafa İMREN²

Atilla ÖCAL³

İ. Halil ELEKÇİOĞLU⁴

Summary

The root knot nematode (*Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo et Finley, 1980) is an important pest of potatoes throughout the world. It is in international quarantine list of many countries. This species was first reported in Niğde and Nevşehir in 2009 Turkey. The objective of the study was to identify the species of root-knot nematodes collected from potato fields in the province of Bitlis where potatoes are grown extensively in 2010. 16 potato tubers were found infected with the root knot nematode. Egg masses and females of root knot nematodes were obtained using binocular stereo microscope from the infected tubers. For the morphological identification of individuals, female vulva and second term juveniles were prepared. At the same time DNA was extracted from egg masses of nematodes and SCAR primers (JMV1, JMV2 and JMVhapla) were used in PCR. Specific SCAR fragment were obtained from the extracted DNA. The multiplex PCR reaction produced the 540 bp fragment for *M. chitwoodi*. Both the morphological and molecular methods showed that the samples were *M. chitwoodi*. This study was the first to show the existence of the species in Eastern Anatolian region. The species attacks potato tubers and make them unmarketable due to deformation, lowers the quality of potato chips and french fries for the processing industry.

Key words: Potato, root-knot nematode, *Meloidogyne chitwoodi*, molecular identification

Özet

Kök ur nematodu (*Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo et Finley, 1980) dünyada patatesin en önemli zararlılarından biridir. Birçok ülkede uluslararası karantina listesindedir. Bu tür Türkiye'de ilk olarak Niğde ve Nevşehir illerinde 2009 yılında tespit edilmiştir. Bu çalışmanın amacı 2010 yılında Bitlis ilinde patatesin yaygın yetiştirilen alanlarından toplanan patateslerden Kök ur nematodu türünü belirlemektir. 16 patates yumruları Kök ur nematodu ile infekteli bulunmuştur. Kök ur nematodlarının dişi ve yumurta kümeleri infekteli yumruların stereo mikroskop altında toplanmıştır. Morfolojik teşhis için dişi vulva ve ikinci dönem larvalar hazırlanmıştır. Aynı zamanda nematodların yumurta kümelerinden DNA elde edilmiş ve SCAR primerler (JMV1, JMV2 ve JMVhapla) PCR için kullanılmıştır. Multiplex PCR'da *M. chitwoodi* için 540 bp'de bant oluşturmuştur. Morfolojik ve moleküler çalışmanın her ikisinde de örneklerin *M. chitwoodi* olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada Doğu Anadolu Bölgesi'nde bu türün varlığı gösterilmiştir. Bu zararlı patates yumrularına saldırmakta ve yumruların şekil bozukluğuna sebep olduğu için pazar değerini düşürmekte, Sanayide cips ve patates kızartması olarak da işleme kalitesinin düşmesine neden olmaktadır.

Anahtar sözcükler: Patates, Kök-ur nematodu, *Meloidogyne chitwoodi*, moleküler teşhis

¹ Bu çalışma, 28–30 Haziran 2011 tarihinde Kahramanmaraş'ta düzenlenen "Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi"nde poster olarak sunulmuş ve "Özet" olarak basılmıştır.

² Biyolojik Mücadele Araştırma İstasyon Müdürlüğü, 01321, Yüreğir, Adana.

³ Batı Akdeniz tarımsal Araştırma Enstitüsü, Antalya

⁴ Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 01330, Sarıçam, Adana.

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

Alınış (Received): 16.05.2013

Kabul edilmiş (Accepted): 03.07.2013

Giriş

Patates Türkiye'nin en önemli tarımsal ürünleri arasında yer almakta ve değişik coğrafik alanlarda yetiştiriciliği yapılabilmektedir. Türkiye'de toplam 1.429.849 da alanda 4.613.071 ton patates üretimi yapılmaktadır (Anonymous, 2011). Niğde ve Nevşehir illeri patates üretimin yoğun yapıldığı iki önemli merkez olmakla birlikte Ege Bölgesi ve Doğu Anadolu Bölgesi'nde de patates üretimi gerçekleştirilmektedir. Bu kapsamda Doğu Anadolu Bölgesi'nde Bitlis ili Ahlat ilçesi 37814 da alanda 134 255 ton üretimi ile ülkemiz patates üretiminde önemli bir yer teşkil etmektedir (Anonymous, 2011).

Patatesin en önemli zararlıları arasında gösterilen Kök-ur nematodunun patateste üreyip çoğalabilen üç önemli türü mevcut olup bunlar; *Meloidogyne chitwoodi* (Golden, O'Bannon, Santo et Finley, 1980), *M. fallax* (Karssen, 1996) ve *M. hapla* (Chitwood, 1949) olarak bilinmektedir (Powers et al., 2005). Kök-ur nematodu *M. chitwoodi* başta Kuzey ve Güney Amerika, Güney Afrika olmak üzere birçok Avrupa ülkesinde (Belçika, Hollanda, Fransa) saptanmış olup, söz konusu ülkeler nematodla bulaşık alanlarda patates tohumluğu yetiştiriciliğini yasaklamışlardır. Nitekim, Avrupa Bitki Koruma Organizasyonu ve Kuzey Amerika Bitki Koruma Organizasyonu (NAPPO) sertifikalı tohumluk patates yetiştirilen alanların *M. chitwoodi*, *M. javanica*'dan ari olmasını istemektedir. Bu kapsamda, *M. chitwoodi*'nin Kuzey Amerika Bitki Koruma Organizasyonu (NAPPO) ve Avrupa Bitki Koruma Organizasyonu'nun (EPPO, A₂) karantina listelerinde yer almaktadır (Powers et al., 2005). *M. chitwoodi* patateste beslenmesi sonucunda yumrunun şeklinin bozulmasına, pazar değerinin, yemeklik ve kızartmalık kalitesinin düşmesine neden olmaktadır. *M. chitwoodi* ile mücadele patateste zararlı diğer Kök ur nematodları *M. hapla* ve *M. fallax*'a göre nematodun biyolojisi gereği daha zordur. Zira *M. hapla* toprak sıcaklığı 10°C ve üstündeki sıcaklıklarda üreyebilirken, *M. chitwoodi* 5 °C ve altındaki sıcaklıklarda üreyebilmekte hatta *M. hapla*'ya göre 1-2 generasyon daha fazla vermektedir. Ayrıca, *M. chitwoodi*'nin 5°C'nin altındaki toprak sıcaklığında üreyebilmesi nedeniyle yumrudaki aktivitesini depo koşullarında da devam ettirebilmektedir (Pavlista, 2008).

Meloidogyne chitwoodi ile mücadelede toprak fumigasyonu ile uygulamada başarılı sonuçlar alınabilmektedir. Ancak, söz konusu uygulamanın insan ve çevre sağlığına olan olumsuz etkileri ve ekonomik maliyetinin yüksek olmasından dolayı nematodla bulaşık olan her bölgede istenilen zamanda ve istenilen etkinlik oranında uygulanamamaktadır. Bu nedenle *M. chitwoodi* ile bulaşık patates üretim alanlarında ekim nöbeti en önemli mücadele yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak ekim nöbeti uygulamaları çok geniş bir konukçu dizisine sahip olan Kök ur nematodu popülasyonunun ekonomik zarar eşliğinin altına (1 yumurta/250 g toprak) düşürmede pek başarılı olamamakta ve nematodun aynı zararı yaptığı görülmektedir (Brodie et al., 1993; Pscheidt, 1997). Çok geniş konukçu dizisine sahip olup bunlardan bazıları buğday, mısır, havuç, yonca, şeker pancarı, karpuz, çim, lahanaya, fasulye ve domatestir (Nyczypir et al., 1982; Karssen, 2002).

Kök ur nematodu ile mücadelede nematodun türünün hatta ırkının bilinmesi mücadele stratejilerinin geliştirilebilmesinde oldukça önemlidir. Bu kapsamda Kök ur nematodları morfolojik ve moleküler olarak teşhis edilebilmektedir. Morfolojik teşhiste ikinci dönem larva ve dişi bireye ait morfometrik ve allometrik teşhis kriterleri esas alınmaktadır. Moleküler teşhiste kesim enzimleri ve türe özgü primerler (SCAR) kullanılarak tanımlama yapılabilmektedir (Zijlstra, 2000; Powers et al., 2005). Bu kapsamda, ülkemizde *M. chitwoodi*'nin İç Anadolu ve Ege Bölgeleri patates üretim alanlarında morfolojik ve moleküler teknikler kullanılarak teşhisi yapılmıştır. (Özarslan et al., 2009; Devran et al., 2009; Yıldız et al., 2009; Ulutaş et al., 2011; Evlice & Bayram, 2012).

Bu çalışmada Bitlis ili Ahlat ilçesi patates yetiştiriciliği yapılan farklı alanlardan alınan 16 Kök-ur nematodu popülasyonunun moleküler ve morfolojik yöntemlerle teşhisleri yapılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Patates üretimi yapılan Bitlis İlinde urlu görünen patates yumruları farklı alandan toplanan 16 adet Kök-ur nematodu popülasyonu üzerinde çalışılmıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Örneklere ait bilgiler

KODU	Örneğin alındığı yer	KODU	Örneğin alındığı yer
1	Bitlis Ahlat Saka- Mescitdüzü	9	Bitlis Ahlat Saka- Sakabaşı
2	Bitlis Ahlat Saka- Mescitdüzü	10	Bitlis Ahlat Saka- Sakabaşı
3	Bitlis Ahlat Saka- Mescitdüzü	11	Bitlis Ahlat Saka- Sakabaşı
4	Bitlis Ahlat Saka- Mescitdüzü	12	Bitlis Ahlat Saka- Sakabaşı
5	Bitlis Ahlat Saka- Mescitdüzü	13	Bitlis Ahlat Saka- Sakabaşı
6	Bitlis Ahlat Saka- Mescitdüzü	14	Bitlis Ahlat Saka- Sakabaşı
7	Bitlis Ahlat Saka- Mescitdüzü	15	Bitlis Ahlat Saka- Sakabaşı
8	Bitlis Ahlat Saka- Mescitdüzü	16	Bitlis Ahlat Saka- Sakabaşı

Morfolojik teşhis

Kök-ur nematodlarının morfolojik teşhisi ikinci dönem larva ve dişi bireye üzerinden yapılabilmektedir. Bu amaçla ikinci dönem larva ve dişi bireye ait preparatlar hazırlanmıştır.

İkinci dönem larva:

Meloidogyne chitwoodi ile infekteli patates yumrularından nematoda ait yumurta paketleri toplanıp, yumurta paketlerinden ikinci dönem larvalar elde edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. *Meloidogyne chitwoodi* ile bulaşık patates yumrusu.

Meloidogyne chitwoodi'ye ait ikinci dönem larvalar etüvde 60 °C'de 5 dakika su banyosu yaptırılarak, TAF çözeltisi (7ml formalin (% 40 formaldehyd) + 2 ml triethanolamin + 91 ml saf su) içerisinde fikse edilmiştir (Hooper, 1986). Nematodlar fiksasyon işleminden sonra çözelti I'de (1 kısım gliserin ve 79 kısım saf su) 35–40 °C'de 12 saat ve çözelti II'de (5 kısım gliserin ve 95 kısım (%96) ethanol) 40 °C'de 3 saat bekletilerek gliserin içerisine alınarak, lam üzerinde sabitleştirilirmiş ve tür teşhisine hazır duruma getirilmiştir (Seinhorst, 1959).

Dişi Birey:

Dişi bireyler urlu bitki köklerinden binoküler altında pens ve bisturi yardımıyla çıkarılarak perineal bölgeleri %45 laktik asit içerisinde kesilip gliserin içerisinde süreli preparatları yapılmıştır.

Meloidogyne chitwoodi'ye ait ikinci dönem larvalar ve dişi bireylerin vulva bölgesinin morfolojik özellikleri kullanılmak suretiyle yapılan teşhislerinde Jebson (1987) ile Karssen (2002)'den faydalanılmıştır.

Moleküler teşhis

DNA izolasyonu:

Urlu yumrulardan stereo binoküler altında *M. chitwoodi*'nin yumurta paketleri çıkartılarak DNA izolasyonunda Fermentas DNA izolasyon kiti kullanılarak yapılmıştır.

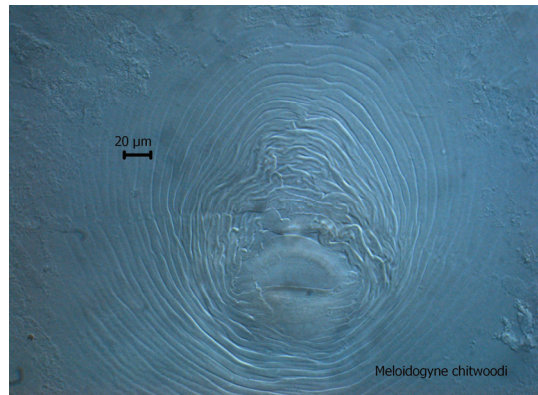
Multiplex PCR kullanılarak tür teşhisi

Kök-ur nematodu örneklerinin moleküler teşhislerinde Wishart et al. (2002) tarafından bildirilen türlere özgü spesifik primerler kullanılarak multiplex PCR yapılmıştır. PCR reaksiyonu 20 ng DNA, PCR tampon çözelti (2,5 mikrolitre), 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, her primerden 0,4 µM (JMV1 5-GATGGCGTGCTTTCAAC-3, JMV2 5-TTTCCCCTTATGATGTTTACCC-3, JMVhapla 5-AAAAATCCCCTCGAAAAATCCACC-3), 1 unit *Taq* DNA polymerase ve ddH₂O olacak şekilde toplam 25 mikrolitrede gerçekleştirilmiştir. PCR Döngüsü, başlangıçta 94 °C de 3 da, 94 °C de 30 sn, 48 °C de 30 sn, 72 °C de 120 sn ve PCR 35 döngü, son olarak 72 °C 7 da süre ile PCR reaksiyonları yürütülmüştür. PCR ürünleri % 1,5'luk agaroz jelde yürütüldükten sonra görüntülenmiştir (Wishart et al., 2002; Adam et al., 2007)

Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Morfolojik Tanılama Sonuçları:

İkinci dönem larvalar ve dişi bireylerin vulva bölgesinin morfolojik özelliklerine göre yapılan teşhis sonucunda tüm örneklerin *M. chitwoodi* olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 2, Şekil 2).



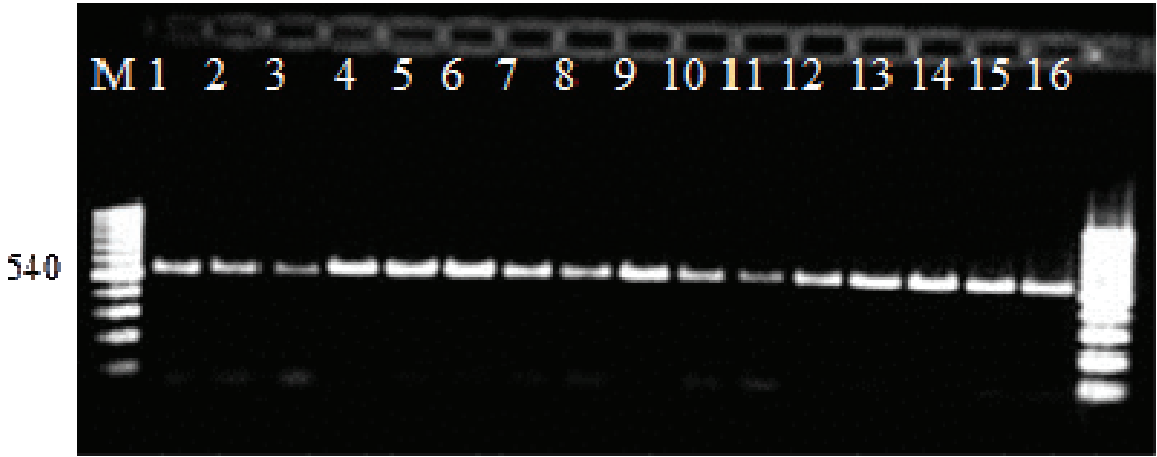
Şekil 2. *Meloidogyne chitwoodi*'nin ikinci dönem larva ve dişi bireylerin vulva bölgesi.

Çizelge 2. Örneklere ait ikinci dönem larva ve dişilerinin ölçüm değerleri

Karakter	İkinci dönem Larva(J ₂)	İkinci dönem Larva(J ₂) (Karsen, 2002)	Dişi	Dişi (Karsen, 2002)
n	20		20	
Body length	388.29 (344-419.20)	380 ±11.5 (362-394)		
Greatest body diameter	13.82 (12.80-15.20)	13.1±0.5 (12.6-13.9)		
Body diameter at stylet knobs	9.15 (8-9.60)			
Body diameter at S-E pore	13.00 (12-14.40)	11.8±0.3 (11.4-12.0)		
Body diameter at anus	9.93 (8-12)	9.4±0.4 (8.9-10.1)		
Stylet length	12.86 (9.6-14.40)	9.7±0.3 (9.5-10.1)	10.90±0.25 (11.5-10)	11.8±0.3 (11.4-12.0)
DGO	3.51 (3.2-4)	3.4±0.4 (2.5-3.8)	4.02±0.15 (4.5-3.5)	4.1±0.3 (3.8-4.4)
S-E pore to anterior end			23.66±1.68 (18.9-27.5)	(19.6-28.4) 47±7.4
Anterior end to metacarpus			50.78±2.1 (43.5-55.5)	47±7.4 (41-58)
Metacarpus length			38.86±0.65 (36.5-40.1)	41.4±1.8 (37.9-42.3)
Metacarpus diameter			35.50±2.09 (28.5-39.5)	38.1±4.4 (29.7-41.1)
Tail length	42.42 (38.40-51.20)	43.2±1.6 (39.8-44.8)		
Tail terminus length	10.37 (8.8-12.80)	10.9±0.8 (8.9-12.0)		
Anus primordium	100.91 (84.80-116.80)	93±8.5 (82-109)		
a	28.12 (24.95-31.10)	29.1±1.3 (26.0-31.0)		
b'	6.8 (6.14-7.46)	7.6±0.9 (5.7-8.8)		
c	9.16 (7.38-10.25)	8.8±0.4 (8.1-9.5)		
c'	4.11 (3.46-5.15)	4.6±0.2 (4.2-5.0)		
(S-P pore/L) X 100	18.56 (17.18-20.93)	18.5±0.8 (18.0-19.1)		

Moleküler Tanılama Sonuçları

Kök-ur nematodu ile infekteli patates yumrularından elde edilen 16 popülasyonun moleküler teşhisinde multiplex SCAR primerleri (JMV1, JMV2, JMV hapla) kullanılmış ve *M. chitwoodi*'ye özgü 540 bp'de spesifik band elde edilmiştir (Şekil 3.). Bitlis İli patates üretim alanlarından elde edilen Kök-ur nematodu popülasyonlarının hepsinin *M. chitwoodi* olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3. *Meloidogyne chitwoodi*'ye spesifik SCAR primerlerine göre 540 bp PCR ürünleri M-Marker (100 bp Fermentas).

Meloidogyne chitwoodi'nin moleküler düzeyde teşhisinde JMV primerleri ile kullanılarak yapılan çalışmalarda 540 bp'de türe spesifik band elde edildiği bildirilmektedir (Wishart et al., 2002; Adam et al., 2007; Devran et al., 2009). Söz konusu çalışma sonuçları ile kendi bulgularımız paralellik göstermek olup, çalışılan örneklerin morfolojik ve moleküler teşhisi sonucunda örneklerin tamamının Kök ur nematodu *M. chitwoodi* olduğu saptanmıştır. Bu çalışma ile bugün NAPPO ve EPPO'nun karantina listesinde bulunan Kök ur nematodu *M. chitwoodi* Bitlis ili Ahlat ilçesi patates üretim alanlarında ilk defa tespit edilmiştir. *M. chitwoodi*'ye Türkiye'de Niğde ve Nevşehir'de (Özarslandan et al., 2009; Devran et al., 2009), İzmir Ödemiş'te (Yıldız et al., 2009) ve Aksaray'da (Evlice & Bayram, 2012) patates üretim alanlarında rastlanıldığı belirtilmektedir. Yukarıda belirtilen araştırma sonuçlarının bulgularımızla uyumluluk gösterdiği tespit edilmiştir.

Meloidogyne chitwoodi'nin karantina etmeni olmasından dolayı tespit edildiği alanlarda iç karantina tedbirlerinin uygulanması ve nematodun bulaşık alanlardan temiz alanlara geçişinin engellenmesi gerekmektedir. Zira diğer Kök ur nematodları *M. fallax* ve *M. hapla*'nın aksine mısır ve buğdayın konukçuları arasında yer almasından dolayı mücadelesi oldukça önemli ve önceliklidir. *M. chitwoodi*'nin yumru ile taşınabiliyor olması ve yüksek tohumluk maliyetinden dolayı yemeklik olarak kullanılan patateslerin tohumluk olarak kullanılıyor olmasından dolayı sıkı karantina tedbirlerinin uygulanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu kapsamda nematodla bulaşık alanlarda patates üretiminin yasaklanması ve çiftçilerin sertifikalı tohumluk kullanması teşvik edilmelidir.

Yararlanılan Kaynaklar

- Adam, M. A. M., M. S. Phillipps & V. C. Blok, 2007. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *Plant Pathology*, 56:190 –197
- Anonymous, 2011. Türkiye İstatistik Kurumu, Ankara (<http://tuikrapor.tuik.gov.tr>). (Erişim tarihi: Ocak, 2013).
- Brodie, B. B., K. Evans & J. Franco, 1993. "Nematode Parasites of Potatoes, 87-132". In: *Plant Parasitic Nematodes in Temperate Agriculture* (Eds: K. Evans, D.L. Trudgill & J.M. Webster). CAB International, Wallingford, England.
- Devran, Z., N. Mutlu, A. Ozarslandan & İ. H. Elekcioğlu 2009. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne chitwoodi* in potato production areas of Turkey. *Nematropica*, 39:75-83.
- Evlice, E. & Ş. Bayram, 2012. "A survey of potato fields for root-knot nematode in Central Anatolia, Turke, 128". 31 st International Symposium of the European Society Nematologists (September 23-27), Adana Turkey.

- Hooper D. J., 1986. "Extraction of Free Living Stages From Soil, 5-30". In: Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes (Ed: J.F. Southey). Her Majesty's Stationery Office, London.
- Jepson, S.B., 1987. Identification of Root-knot Nematodes. CAB International, 265p.
- Karssen, G., 2002. The Plant-Parasitic Nematode Genus *Meloidogyne* Goeldi, 1892 (Tylenchida) in Europe. Brill. Leiden, The Netherlands.
- Nyczepir, A. P., J. H. O'Bannon, G. S. Santo & A. M. Finley.1982. Incidence and distinguishing characteristics of *Meloidogyne chitwoodi* and *M. hapla* in potato from northwestern United States. Journal of Nematology, 14:347–353.
- Ozarslandan, A., Z. Devran, N. Mutlu & İ. H. Elekcioğlu, 2009. First report of Columbia Root-Knot nematode (*Meloidogyne chitwoodi*) in potato in Turkey. Plant Disease, 93(3):316.
- Pavlista, A. D., 2008. Extension Potato Specialist Universty of Nebraska Panhandle Research and Extension Center. University of Nebraska Lincoln. Potato eyes Vol.20, Issue 1, Spring.
- Powers, T. O., P. G. Mullin, T. S. Harris, L. A. Sutton & R. S. Higgins, 2005. Incorporating molecular identification of *Meloidogyne* spp. into a large-scale regional nematode survey. Journal of Nematology, 37: 226–235.
- Pscheidt, J. W., 1997. Pacific Northwest Plant Disease Control Handbook. Agricultural Communications, Oregon State University, Corvallis, OR 97331-2119.
- Seinhorst, J.W. 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. Nematologica, 4: 67–69.
- Ulutaş, E., G. Kaşkavalcı & E. Pehlivan, 2011. "Ege Bölgesi patates üretim alanlarında bulunan önemli bitki paraziti nematodların belirlenmesi, 217". Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi (28-30 Haziran 2011), Kahramanmaraş.
- Wishart, J., M.S. Phillips & VC. Blok, 2002. Ribosomal intergenic spacer: a polymerase chain reaction diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, and *M. hapla*. Phytopathology, 92: 884–892.
- Yıldız, V., Ç. Güneş, N. Bulun & U. Gözel, 2009. "Ödemiş (İzmir) ilçesi patates üretim alanlarında tespit edilen Kök-ur nematodu: *Meloidogyne chitwoodi* (Goeldi, 1892, Nemata: Heteroderidae), 35". Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi (15-18 Temmuz 2009), Van.
- Zijlstra, C., 2000. Identification of *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla* based on SCAR-PCR a powerful way of enabling reliable identification of populations or individuals that share common traits. European Journal of Plant Pathology, 106: 283–290.

