

Orijinal araştırma (Original article)

Türkiye'nin farklı alanlarından alınan Kök-ur nematodu türlerinin (*Meloidogyne* spp.) (Nemata: Meloidogynidae) moleküler ve morfolojik tanımlama ile belirlenmesi¹

Adem ÖZARSLANDAN²

İ. Halil ELEKCİOĞLU^{3*}

Summary

Identification of the Root-knot nematode species (*Meloidogyne* spp.) (Nemata: Meloidogynidae) collected from different parts of Turkey by molecular and morphological methods

The objective of this study was to identify the root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) samples, by molecular and morphological methods that have been collected from different regions of Turkey. The seventy-nine root-knot nematode samples were first homogenized by inoculating susceptible tomato cultivar 'Simita F1' with single egg masses. Then, second stage larvae obtained from homogenized-egg masses were used for DNA isolation. The molecular identification of the samples were conducted with species-specific SCAR (sequence characterized amplified region) and PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) markers. The morphological identification of the samples were carried out using dissected-fixed vulva of female and second stage larvae collected from susceptible tomatoes (homogenized samples). Results showed that four root-knot nematode species, *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889) Chitwood and *Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo et Finley, 1980 were the most common in Turkey. Of the 79 samples, 28 (35%), 22 (28%), 21 (27%), and 8 (10%) were identified molecular and morphological methods to be *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria* and *M. chitwoodi*, respectively. It was determined that all the samples collected from potato crop in mid-Anatolia were belong to *M. chitwoodi*.

Key words: Root-knot nematode, *Meloidogyne* spp., molecular identification, morphological identification

Anahtar sözcükler: Kök-ur nematodu, *Meloidogyne* spp., moleküler teşhis, morfolojik teşhis

¹ TÜBİTAK TOVAG (Proje no: 105 O 177) ile Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen projenin bir bölümüdür.

² Ziraî Mücadele Araştırma Enstitüsü, 01321, Adana

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

* Sorumlu yazar (Corresponding author) e-mail: halile@cu.edu.tr

Alınış (Received): 13.10.2009 Kabul edilmiş (Accepted): 22.01.2010

Giriş

Dünyada Kök-ur nematodlarının 90'dan daha fazla türünün tanımlandığı (Karssen, 2002; Karssen & Moens, 2006; Palomares Rius et al., 2007), bunlardan en yaygın olan türlerin *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, *Meloidogyne hapla* Chitwood, 1949, *Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo & Finley, 1980, *Meloidogyne fallax* Karssen, 1996 olduğu ve 5500'den fazla bitki türünde beslendiği bildirilmektedir (Trudgill & Blok, 2001). *M. incognita*, *M. javanica* ve *M. arenaria*'nın esas olarak tropikal bölgelerde; *M. chitwoodi*, *M. fallax* ve *M. hapla*'nın ise daha serin bölgelerde bulunduğu, bu türlerin morfolojik özelliklerinin birbirine benzediği, bu nedenle morfolojik yöntemlerle teşhis etmenin zor olduğu bildirilmektedir (Adam et al., 2007). Türkiye'de de *M. arenaria*, *M. incognita* ve *M. javanica*'nın sebze alanlarında en yaygın ve ekonomik bakımdan önemli türler olduğu bildirilmiştir (Elekcioğlu & Uygun 1994; Elekcioğlu et al., 1994; Mennan & Ecevit, 1996; Kaşkavalcı & Öncüler, 1999; Söğüt & Elekcioğlu, 2000). Bu çalışmalarda Kök-ur nematodlarını teşhiste morfolojik ve/veya morfometrik yöntemlerden faydalanılmıştır.

Moleküler yöntemlerden PCR kullanarak Kök-ur nematodlarının ilk teşhisi Harris et al. (1990) tarafından ikinci dönem larvadan mitokondriyal DNA elde edilerek yapılmıştır. Bu metodu daha sonra Powers & Harris (1993) geliştirerek, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla* ve *M. chitwoodi*'yi teşhiste kullanmışlardır. Cenis (1993), ikinci dönem larvadan RAPD yapmış ve iki ayrı reaksiyonda türe özel küçük bantlar bulmuş, fakat reaksiyonun yarısında hiç bant elde edemediğini bildirmiştir. Williamson et al., (1997) ikinci dönem larvadan spesifik SCAR primer kullanarak *M. hapla* ve *M. chitwoodi* yi teşhis etmişler, ancak rutin analizlerde bunun yeterli olmadığını bildirmişlerdir. Zijlstra (2000) ikinci dönem larva kullanarak SCAR primerlerle *M. hapla*, *M. chitwoodi* ve *M. fallax* türlerini teşhis etmiştir. Yine Zijlstra et al. (2000) ile Meng et al. (2004) spesifik SCAR primerlerle *M. incognita*, *M. javanica* ve *M. arenaria* yı ikinci dönem larva kullanarak teşhis etmişlerdir. Powers et al., (2005) primer ve kesim enzimleri kullanarak *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla* ve *M. chitwoodi* yi birbirinden ayırmışlardır. Adam et al. (2007) Kök-ur nematodlarının ekonomik önemli türlerini tek larvadan belirlemek için moleküler teşhis anahtarı oluşturmuşlardır.

Türkiye'de ise Kök-ur nematodlarının teşhisinde moleküler yöntemleri ilk defa Devran et al. (2002), *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* ve *M. hapla*'nın rDNA'sının ITS bölgesini içeren fragmentleri PCR ile çoğaltarak kullanmışlardır. ITS bölgesinin RsaI enzimi ile kesimi sonucu *M. hapla*'yı diğer türlerden ayırmışlar ve EcoRI ve BamHI enzimlerinin bu türleri ayırmakta etkisiz olduğunu tespit etmişlerdir. Bu nedenle diğer türleri ayırmada mtDNA markerleri kullanılarak PCR sonucu elde edilen 600 bp'lik fragment Hinfl enzimi ile keserek türleri birbirinden ayırmışlardır. Türkiye'de *M. chitwoodi* ilk defa Niğde ve Nevşehir illerinde patates alanlarından alınan patates örneklerinde moleküler

tanı yöntemleri kullanılarak tespit edilmiştir (Özarslan et al., 2009). Daha sonra Devran et al. (2009) Niğde ili patates alanlarından Kök-ur nematodlarıyla infekteli 12 örneği morfolojik ve moleküler yöntemlerle inceleyerek *M. chitwoodi* olduğunu tespit etmişler ve RAPD primerler ile *M. chitwoodi*'nin genetik akrabalıklarını araştırmışlardır. Yıldız et al. (2009) İzmir ili Ödemiş İlçesi'nde patates yetiştiriciliği yapılan alanlarda *M. chitwoodi*'nin varlığını moleküler yöntemlerle ortaya koymuşlardır.

Türkiye'de yukarıda belirtildiği gibi Kök-ur nematodlarının teşhisi genellikle morfolojik ve morfometrik yöntemlerle yapılmıştır. Son yıllarda geliştirilmiş olan moleküler teşhis yöntemlerinin Türkiye'de Nematoloji alanında kullanılabilmesi ve kesin tür teşhislerinin yapılabilmesine yönelik olarak bu çalışmada Türkiye'nin farklı alanlarından toplanan Kök-ur nematodları moleküler ve morfolojik yöntemlerle teşhis edilmiştir.

Materyal ve Yöntem

Bu çalışmada Kök-ur nematodu türlerini belirlemek amacıyla Türkiye genelinde 28 ilden toplanan 79 Kök-ur nematodu popülasyonu kullanılmıştır. Kök-ur nematodlarının toplandığı iller ve konukçuları Çizelge 1' de verilmiştir.

Kök-ur nematodlarının saf kültürlerin elde edilmesi

Çalışmada, toplanan Kök-ur nematodu örnekleri, Kök-ur nematodlarına duyarlı domates çeşidi "Simita F1" köklerinde çoğaltılmış ve saf kültürleri oluşturulmuştur. Domates fideleri 2. gerçek yapraklı döneme geldiğinde otoklav kullanılarak sterilize edilen kumlu toprak (% 80 kum, % 5 mil ve % 15 toprak) içeren saksılara şaşırtılmıştır. Nematodların gelişmesi için 6-8 hafta bekletilip bitkiler sökülüştür. Köklerde oluşan yumurta paketleri binoküler altında çıkarılarak hassas domates çeşidine 2-4 gerçek yaprak döneminde yeni domates fidelerine birer yumurta paketi inokulasyonu yapılmış ve 60 gün bekletildikten sonra iyi üreyen bir tanesi alınmıştır. Kök-ur nematodu popülasyonları bu şekilde saflaştırılmıştır. Bu hassas domates fidelerinin köklerinde oluşan Kök-ur nematodlarının yumurta paketleri binoküler altında toplanmıştır.

Moleküler tanılama

DNA izolasyonu:

Saf kültürlerde elde edilen yumurta kümelerinden ve 2. dönem larvalarından DNA izolasyonu, Promega DNA izolasyon kiti (Madison, Wisconsin, USA) kullanılarak yapılmıştır.

Türe Özgü Primerlerle Moleküler Tanımlamaların Yapılması:

Çalışmaya konu olan Kök-ur nematodu örneklerini türlere özgü spesifik primerler kullanılarak tanımlamak için Çizelge 2'de belirtilen primerler ilgili literatürde belirtildiği gibi kullanılmıştır (Zijlstra et al., 2000; Powers & Harris, 1993; Powers et al., 2005).

Çizelge 1. Kök-ur nematodu örneklerinin toplandığı iller ve konukçu bitkileri

Örnek Kodu	İl	Konukçu Bitki	Örnek Kodu	İl	Konukçu Bitki
01-Cs-1	Adana	Hıyar	34-Sl-1	İstanbul	Domates
01-Cs-2	Adana	Hıyar	34-Sl-2	İstanbul	Domates
01-Cs-3	Adana	Hıyar	35-Cs-1	İzmir	Hıyar
01-M	Adana	Dut	35-Sl-1	İzmir	Domates
01-Sn-1	Adana	İt üzümü	44-Sl-1	Malatya	Domates
01-Fc-1	Adana	İncir	45-Sl-1	Manisa	Domates
01-Pg-1	Adana	Nar	45-Sl-2	Manisa	Domates
02-Sl-1	Adıyaman	Domates	45-Sm-1	Manisa	Patlıcan
02-Sl-2	Adıyaman	Domates	33-Mc-1	Mersin	Muz
05-Sl-1	Amasya	Domates	33-Sm-1	Mersin	Patlıcan
05-Cs-1	Amasya	Hıyar	33-CI-1	Mersin	Karpuz
07-Sl-1	Antalya	Domates	33-Cs-1	Mersin	Hıyar
07-Sl-2	Antalya	Domates	33-Cs-2	Mersin	Hıyar
07-Sl-3	Antalya	Domates	33-Sl-1	Mersin	Domates
09-Sl-1	Aydın	Domates	33-Sl-2	Mersin	Domates
09-Sl-2	Aydın	Domates	33-Ca-1	Mersin	Biber
09-Cs-1	Aydın	Hıyar	33-Ca-2	Mersin	Biber
09-Cs-2	Aydın	Hıyar	48-Sl-1	Muğla	Domates
10-Sl-1	Balıkesir	Domates	48-Cs-1	Muğla	Hıyar
15-Sl-1	Burdur	Domates	50-St-1	Nevşehir	Patates
17-Sl-1	Çanakkale	Domates	50-St-2	Nevşehir	Patates
17-Sl-2	Çanakkale	Domates	51-St-1	Niğde	Patates
17-Sl-3	Çanakkale	Domates	51-St-2	Niğde	Patates
19-Sl-1	Çorum	Domates	51-St-3	Niğde	Patates
21-Sl-1	Diyarbakır	Domates	51-St-4	Niğde	Patates
21-Sl-2	Diyarbakır Çermik	Domates	51-St-5	Niğde	Patates
21-Sl-3	Diyarbakır Bismil	Domates	51-St-6	Niğde	Patates
21-Sl-4	Diyarbakır Dikili	Domates	52-Sl-1	Ordu	Domates
26-Sl-1	Diyarbakır Çınar	Domates	52-Sl-2	Ordu	Domates
26-Sl-2	Eskişehir	Domates	55-Cs-1	Samsun	Hıyar
26-Cs-1	Eskişehir	Hıyar	55-Cs-2	Samsun	Hıyar
27-Vv-1	G.Antep	Bağ	55-Cs-3	Samsun	Hıyar
27-Vv-2	G.Antep	Bağ	57-Cs-1	Sinop	Hıyar
27-Os-1	G.Antep	Zeytin	57-Sl-1	Sinop	Domates
31-Sl-1	Hatay	Domates	73-Sl-1	Şırnak	Domates
31-Sl-2	Hatay	Domates	77-Cs-1	Yalova	Hıyar
31-Cs-1	Hatay	Hıyar	77-Sl-1	Yalova	Domates
31-Cs-2	Hatay	Hıyar	Mi	Kontrol	
32-Sl-1	Isparta	Domates	Mj	Kontrol	
32-Cs-1	Isparta	Hıyar			

Çizelge 2. Kök-ur nematodlarının moleküler teşhisinde kullanılan primerler, dizileri ve ilgili kaynaklar

Kod no.	Primer sequence 5'-3'	Kaynak
C2F3	GGTCAATGTTTCAGAAATTTGTGG	Powers & Harris, 1993
1108	TACCTTTGACCAATCACGCT	
18sl.2/	GGCGATCAGATACCGCCCTAGTT	Powers et al., 2005
18sr2b	TACAAAGGGCAGGGACGTAAT	
Far	TCGGCGATAGAGGTAAATGAC	Zijlstra et al., 2000
Rar	TCGGCGATAGACTACAAACT	
Fjav	GGTGCGCGATTGAACTGAGC	
Rjav	CAGGCCCTTCAGTGGAATATAC	
Finc	CTCTGCCCAATGAGCTGTCC	
Rinc	CTCTGCCCTCACATTAGG	

PCR reaksiyonu 20 ng DNA, PCR tampon çözelti (2,5 mikrolitre), 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, her primerden 0,4 µM Primer, 1 unit Taq DNA polymerase ve dSu olacak şekilde toplam 25 mikrolitrede gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde elektroforez yapılarak türler ayrılmıştır.

18s1.2/18sr2b primerleri sonucu elde edilen PCR ürünleri Alu, C2F3/1108 primerleriyle yapılan PCR ürünü *DraI* enzimiyle 37 °C de 3 saat bekletilerek kesim işlemi yapılmıştır. Bunun için; PCR ürünü (10 mikrolitre), 10xBuffer (2 mikrolitre), *AluI* ve *DraI* Kesim Enzimi (1-2 mikrolitre-unit) ve dSu (18 mikrolitre) olacak şekilde örneklerin kesimi gerçekleştirilmiştir. Kesilen örnekler % 2,5'lik agarozda yürütülerek fotoğraflanmıştır.

Kök-ur nematodu türlerini belirlemek için farklı Primerlerin PCR koşulları			
35 döngü			
61°C (Far/Rar)			
94°C	94°C	64°C (Fjav/Rjav)	72°C
120sn	30 sn	54°C (Finc/Rinc)	60sn
94°C	94°C	48°C C2F3/1108)	72°C
180sn	30 sn	48°C 18sl.2/18sr2b	120 sn
		30 sn	72°C
			420 sn

Morfolojik tanılama

Kök-ur nematodlarının ikinci dönem larvalarından tür düzeyinde teşhis edilebilmesi için bunların usulüne göre öldürülerek daimi preparatlarının yapılması gerekmektedir. Bu amaçla yumurta paketlerinden elde edilen 2. dönem larvalar etüvde 60 °C'de 5 dakika bekletilerek öldürülmüş ve TAF çözeltisi (7 ml formalin (% 40 formaldehid) + 2 ml triethanolamin + 91 ml saf su) içerisinde fikse edilmiştir (Hooper, 1986). Fikse edilen nematodlar Seinhorst (1959) yöntemine göre saf gliserin içerisine alınmıştır. Bunun için nematodlar ilk önce 20 kısım etanol (% 96), 1 kısım gliserin ve 79 kısım saf sudan meydana gelen birinci çözeltiliye aktarılarak 35–40 °C'de 12 saat bekletilmiştir. Daha sonra ise 5 kısım gliserin ve 95 kısım etanol (% 96) içeren ikinci çözeltiliye alınmış ve burada da 40 °C'de 3 saat tutulduktan sonra sıvı içerisindeki suyun tamamının çekilmesi amacıyla desikatör içinde bir süre bekletilmiştir. Bu şekilde saf gliserin içerisine alınan ikinci dönem Kök-ur nematodu larvaları lam üzerinde sabitleştirilerek, tür teşhisine hazır duruma getirilmiştir.

Kök-ur nematodlarının tür ayrımlarında önemli morfolojik kriterlerden biri de dişi bireylerin vulva-anüs kısımlarını içeren perineal bölgeleridir. Teşhiste kullanılan dişi Kök-ur nematodu bireyleri urlu bitki köklerinden binoküler altında

pens ve bisturi yardımıyla dişi bireyler çıkarılarak perineal bölgeleri % 45 laktik asit içerisinde kesilip gliserin içerisinde süreli preparatları yapılmıştır.

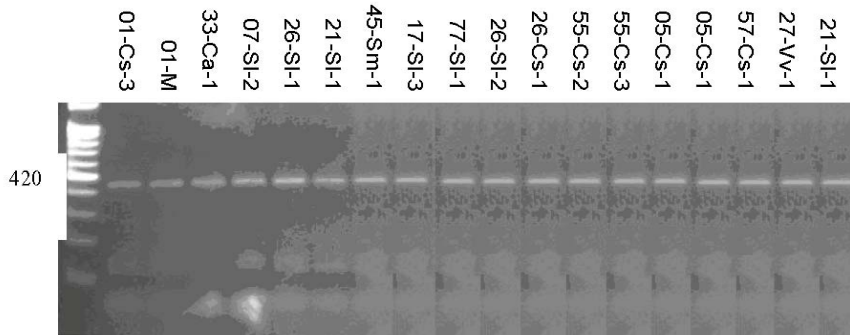
Tür düzeyinde teşhislerde ikinci dönem larvalar ve vulva bölgesinin morfolojik özellikleri kullanılmış ve Jepson (1987) ile Karssen (2002)' dan faydalanılmıştır.

Araştırma Sonuçları ve Tartışma

Moleküler Tanılama Sonuçları:

Türkiye'nin değişik alanlarından elde edilen Kök-ur nematodu örnekleri, moleküler yöntemlerle teşhis edilmiş ve dört tür, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919), *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889), *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) ve *Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo & Finley, 1980 tespit edilmiştir. Bu çalışmada Türkiye genelinden toplanan 79 adet Kök-ur nematodu populasyonundan, 19 örnekte *M. javanica*, 18 örnekte *M. arenaria*, 14 örnekte *M. incognita*, ve 8 örnekte *M. chitwoodi* saptanmış olup, bulunma oranları sırasıyla % 24.05, % 22.78, % 17.72, % 10.13 olmuştur. Bu populasyonlardan 20 (% 25.32) örnek moleküler olarak tanımlanamamıştır (Çizelge 3).

Kök-ur nematodlarının teşhisinde Zijlstra et al., (2000) tarafından geliştirilen türe özgü spesifik primerler kullanılmış, *M. arenaria*'ya özgü 420 bp (Şekil 1), *M. incognita*'ya özgü 1200 bp (Şekil 2) ve *M. javanica*'ya özgü 670 bp (Şekil 3) DNA bandları elde edilmiştir. Powers ve Harris (1993) tarafından geliştirilen C2F3 ve 1108 primerleri ile yapılan PCR çalışmalarında *M. chitwoodi* 520 bp uzunluğunda DNA bandı (Şekil 4), 18s1.2/18sr2b primerleriyle (Powers et al., 2005) yapılan çalışmada 636 bp uzunluğunda DNA bandı (Şekil 5) ve AluI enzimi ile kesim sonucu 350 bp, 115 bp 85 bp ve 50 bp uzunluğunda DNA bantları (Şekil 7) elde edilmiştir. C2F3/1108 primerleriyle yapılan PCR ürününü *DraI* ile kesildiğinde *M. chitwoodi* için 260 bp, 120 bp, 85 bp, ve 40 bp de bant oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 6). Patates örneklerinden alınan Kök-ur nematodlarının tamamının *M. chitwoodi* olduğu tespit edilmiştir.

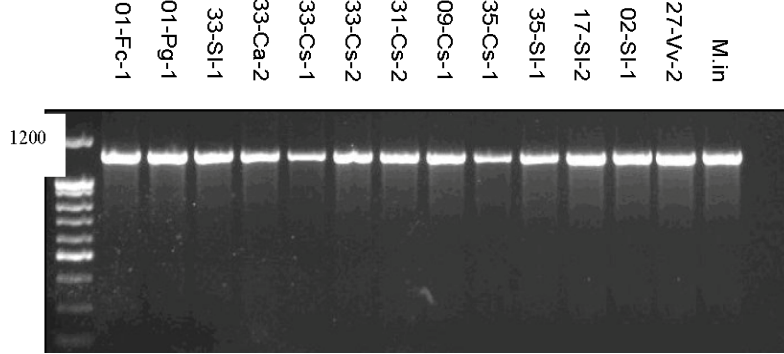


Şekil 1. *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889)'ya özgü band (420 bp) oluşturan örnekler.

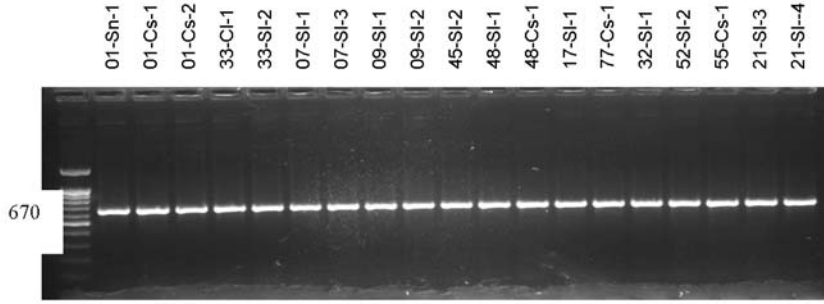
Çizelge 3. Kök-ur nematodu örneklerinin kodu, toplandığı iller, alındığı konukçu bitkiler ve türleri

Örnek Kodu	İl	Konukçu Bitki	Tür	Örnek Kodu	İl	Konukçu Bitki	Tür
01-Cs-1	Adana	Hıyar	<i>Mj</i>	34-SI-1	İstanbul	Domates	<i>Mj*</i>
01-Cs-2	Adana	Hıyar	<i>Mj</i>	34-SI-2	İstanbul	Domates	<i>Mi*</i>
01-Cs-3	Adana	Hıyar	<i>Ma</i>	35-Cs-1	İzmir	Hıyar	<i>Mi</i>
01-M	Adana	Dut	<i>Ma</i>	35-SI-1	İzmir	Domates	<i>Mi</i>
01-Sn-1	Adana	İt üzümü	<i>Mj</i>	44-SI-1	Malatya	Domates	<i>Ma*</i>
01-Fc-1	Adana	İncir	<i>Mi</i>	45-SI-1	Manisa	Domates	<i>Ma</i>
01-Pg-1	Adana	Nar	<i>Mi</i>	45-SI-2	Manisa	Domates	<i>Mj</i>
02-SI-1	Adıyaman	Domates	<i>Mi</i>	45-Sm-1	Manisa	Patlıcan	<i>Ma</i>
02-SI-2	Adıyaman	Domates	<i>Mi*</i>	33-Mc-1	Mersin	Muz	<i>Mi*</i>
05-SI-1	Amasya	Domates	<i>Ma</i>	33-Sm-1	Mersin	Patlıcan	<i>Mi*</i>
05-Cs-1	Amasya	Hıyar	<i>Ma</i>	33-CI-1	Mersin	Karpuz	<i>Mj</i>
07-SI-1	Antalya	Domates	<i>Mj</i>	33-Cs-1	Mersin	Hıyar	<i>Mi</i>
07-SI-2	Antalya	Domates	<i>Ma</i>	33-Cs-2	Mersin	Hıyar	<i>Mi</i>
07-SI-3	Antalya	Domates	<i>Mj</i>	33-SI-1	Mersin	Domates	<i>Mi</i>
09-SI-1	Aydın	Domates	<i>Mj</i>	33-SI-2	Mersin	Domates	<i>Mj</i>
09-SI-2	Aydın	Domates	<i>Mj</i>	33-Ca-1	Mersin	Biber	<i>Ma</i>
09-Cs-1	Aydın	Hıyar	<i>Mi</i>	33-Ca-2	Mersin	Biber	<i>Mi</i>
09-Cs-2	Aydın	Hıyar	<i>Mj*</i>	48-SI-1	Muğla	Domates	<i>Mj</i>
10-SI-1	Balıkesir	Domates	<i>Mj*</i>	48-Cs-1	Muğla	Hıyar	<i>Mj</i>
15-SI-1	Burdur	Domates	<i>Ma*</i>	50-St-1	Nevşehir	Patates	<i>Mc</i>
17-SI-1	Çanakkale	Domates	<i>Mj</i>	50-St-2	Nevşehir	Patates	<i>Mc</i>
17-SI-2	Çanakkale	Domates	<i>Mi</i>	51-St-1	Niğde	Patates	<i>Mc</i>
17-SI-3	Çanakkale	Domates	<i>Ma</i>	51-St-2	Niğde	Patates	<i>Mc</i>
19-SI-1	Çorum	Domates	<i>Ma*</i>	51-St-3	Niğde	Patates	<i>Mc</i>
21-SI-1	Diyarbakır ermik	Domates	<i>Ma</i>	51-St-4	Niğde	Patates	<i>Mc</i>
21-SI-2	Diyarbakır Bismil	Domates	<i>Mj*</i>	51-St-5	Niğde	Patates	<i>Mc</i>
21-SI-3	Diyarbakır Dikili	Domates	<i>Mj</i>	51-St-6	Niğde	Patates	<i>Mc</i>
21-SI-4	Diyarbakır Çınar	Domates	<i>Mj</i>	52-SI-1	Ordu	Domates	<i>Mi*</i>
26-SI-1	Eskişehir	Domates	<i>Ma</i>	52-SI-2	Ordu	Domates	<i>Mj</i>
26-SI-2	Eskişehir	Domates	<i>Ma</i>	55-Cs-1	Samsun	Hıyar	<i>Mj</i>
26-Cs-1	Eskişehir	Hıyar	<i>Ma</i>	55-Cs-2	Samsun	Hıyar	<i>Ma</i>
27-Vv-1	G.Antep	Bağ	<i>Ma</i>	55-Cs-3	Samsun	Hıyar	<i>Ma</i>
27-Vv-2	G.Antep	Bağ	<i>Mi</i>	57-Cs-1	Sinop	Hıyar	<i>Ma</i>
27-Os-1	G.Antep	Zeytin	<i>Mj*</i>	57-SI-1	Sinop	Domates	<i>Mi*</i>
31-SI-1	Hatay	Domates	<i>Mi*</i>	73-SI-1	Şırnak	Domates	<i>Mj*</i>
31-SI-2	Hatay	Domates	<i>Mj*</i>	77-Cs-1	Yalova	Hıyar	<i>Mj</i>
31-Cs-1	Hatay	Hıyar	<i>Mi*</i>	77-SI-1	Yalova	Domates	<i>Ma</i>
31-Cs-2	Hatay	Hıyar	<i>Mi</i>	<i>Mi</i>	Kontrol		<i>Mi</i>
32-SI-1	Isparta	Domates	<i>Mj</i>	<i>Mj</i>	Kontrol		<i>Mj*</i>
32-Cs-1	Isparta	Hıyar	<i>Mj*</i>				

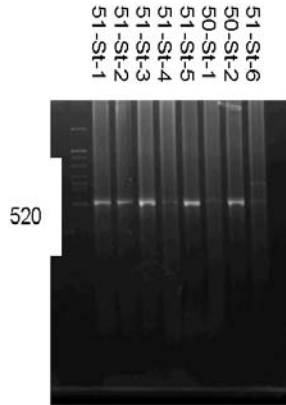
* Moleküler olarak tanımlanmayan sadece morfolojik olarak tanımlanan populasyonlar
Ma: *M. arenaria*, Mi: *M. incognita*, Mj: *M. javanica*, Mc: *M. chitwoodi*



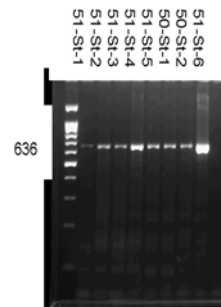
Şekil 2. *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919)'ya özgü band (1200 bp) oluşturan örnekler.



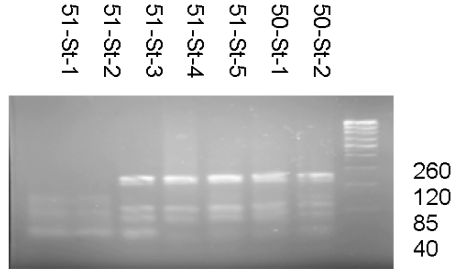
Şekil 3. *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885)'ya özgü band (670 bp) oluşturan örnekler.



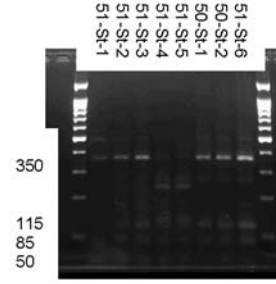
Şekil 4. *Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo & Finley, 1980 örneklerinin C2F3-1108 primerleriyle oluşturduğu bandlar (520 bp).



Şekil 5. *Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo & Finley, 1980 örneklerinin 18s1-18sr2b primerleriyle oluşturduğu bandlar (636 bp).



Şekil 6. *Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo & Finley, 1980 örneklerinde C2F3-1108 primerlerinin PCR ürünlerinin *DraI* ile kesimiyle oluşan bantlar.



Şekil 7. *Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo & Finley, 1980 örneklerinde 18s1-18sr2b primerlerinin PCR ürünlerinin *AluI* ile kesimiyle oluşan bantlar.

Moleküler yöntemlerle spesifik primerler kullanılarak yapılan analiz sonucu *M. incognita*, *M. arenaria* ve *M. javanica* türleri için sırasıyla 1200 bp, 420 bp ve 670 bp uzunluğu DNA bandı elde edilmiştir. Bu çalışmada Zijlstra et al. (2000)'nin kullanmış oldukları primerler kullanılmış ve aynı uzunlukta DNA bantları elde edilmiştir. Söz konusu çalışma ile bu proje kapsamında elde edilen sonuçlar paralellik göstermektedir.

M. chitwoodi'nin teşhisi, C2F3 ve 1108 primer ürünlerinin *DraI* enzimi ile kesilmesi sonucu oluşan bantlara göre yapılmıştır (Powers & Harris, 1993). Bu örneklerden aynı zamanda 18s1.2 ve 18 sr2b primer ürünleri elde edilmiş ve *AluI* enzimi ile kesilerek bu türün teşhisi teyit edilmiştir (Powers et al., 2005).

Morfolojik Tanılama Sonuçları:

ikinci dönem larvalar ve vulva bölgesinin morfolojik özelliklerine göre yapılan teşhis sonucunda ise *M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria* ve *M. chitwoodi* tespit edilmiştir (Çizelge 3). Toplanan 79 populasyondan 28 adedinin *M. javanica*, 22 adedinin *M. incognita*, 21 adedinin *M. arenaria*, ve 8 adedinin *M. chitwoodi* olduğu, bunların bulunma oranlarının da sırasıyla % 35, % 28, % 27 ve %10 olduğu tespit edilmiştir.

Devran et al. (2002) *Meloidogyne* türlerinin teşhisinde Türkiye'de ilk defa moleküler yöntemleri kullanmışlar ve Akdeniz Bölgesi'nde *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* ve *M. hapla*'yı tespit etmişlerdir. Dış karantina listesinde bulunan *M. chitwoodi* Niğde ve Nevşehir illeri patates alanlarından alınan patates örneklerinde moleküler tanı yöntemleri kullanılarak tespit edilmiş ve Türkiye nematod faunası için ilk kayıt olarak bildirilmiştir (Özarslan et al., 2009). Daha sonra Devran et al. (2009) Niğde ili patates alanlarından *M. chitwoodi* ile bulaşık 12 örneğin RAPD primerleri ile genetik akrabalıklarını

araştırmışlardır. Yıldız et al. (2009) da İzmir ili Ödemiş İlçesi'nde patates yetiştiriciliği yapılan alanlarda *M. chitwoodi*'nin varlığını moleküler yöntemlerle ortaya koymuşlardır. Nyczepir et al. (1982), Amerika'nın Kuzey Kaliforniya, Idaho, Nevada, Oregon ve Washington eyaletlerinde patates (*Solanum tuberosum* L.) üretim alanlarında *Meloidogyne* spp.'nin yayılışını tespit etmek için yaptıkları çalışmada, sürvey kapsamındaki bütün bölgelerde Kök-ur nematodlarının var olduğunu, örneklerin % 83'ünün *M. chitwoodi*, % 11'inin *M. hapla* ve % 6'sının da her iki türü içerdiğini kaydetmişlerdir. Bu çalışmada da patates alanlarında *M. chitwoodi*'nin yaygın olduğu ve bu konuda yapılan çalışmalarla paralellik gösterdiği belirlenmiştir.

Bu çalışma sonucuna göre Türkiye genelinden elde edilen 79 populasyondan, 28 adedinin *M. javanica*, 22 adedinin *M. incognita*, 21 adedinin *M. arenaria* ve 8 adedinin *M. chitwoodi* olduğu, bunların bulunma oranlarının da sırasıyla % 35, % 28, % 27 ve %10 olduğu tespit edilmiştir. Türkiye'de daha önce yapılan çalışmalarda, Enneli (1980) İç Anadolu Bölgesi'nde Kök-ur nematodlarının en yaygın türlerinin *M. incognita* (% 93), *M. javanica* (% 2), *M. arenaria* (% 1) olduğu, Söğüt & Elekcioğlu (2000), Adana, Antalya, Hatay ve İçel ili sebze alanlarında bulunan *Meloidogyne* türleri ve ırklarını tespit etmek amacıyla farklı alanlardan toplanan 38 *Meloidogyne* populasyonunun 21 adedinin *M. javanica* (% 55), 16 adedinin *M. incognita* (% 42), 1 adedinin *M. hapla* (% 3) olarak teşhis edildiği ve *Meloidogyne* populasyonları arasında en baskın türün *M. javanica* olduğunu bildirmişlerdir. Kaşkavalcı & Öncüer (1999), Aydın ilinin yazlık sebze yetiştirilen bölgelerinde *M. incognita*, *M. javanica* ve *M. hapla*'nın sırasıyla, % 80.06, % 14.49 ve % 5.45 oranlarında yaygın olduklarını saptamışlardır. Ercan & Elekcioğlu (2009), Adana ve Mersin İllerinde 17 yabancı ot türünde *M. arenaria*, *M. incognita* ve *M. javanica*'nın sırasıyla % 8, % 44 ve % 48 oranlarında bulunduğunu saptamışlardır. Dünya genelinde 75 ülkeden elde edilen Kök-ur nematodu populasyonlarının % 53'nün *M. incognita*, % 30'nun *M. javanica*, % 8'i *M. arenaria*, % 8'i *M. hapla*, % 2'sinin *M. exigua* Goeldi, 1892 ve diğerleri olduğu belirlenmiştir (Johnson & Fassuliotis, 1984). Bu araştırma ile daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar arasında benzerlik görülmektedir. Bu çalışmada diğer çalışmalardan farklı olarak *M. arenaria*'nın da yaygın olduğu belirlenmiştir. Bu bağlamda Türkiye Kök-ur nematodu faunasının tam olarak ortaya çıkarılması için daha fazla örneklerin toplanıp moleküler yöntemlerle teşhis edilmesi gerekmektedir.

Özet

Bu çalışmada Türkiye Kök-ur nematodu türlerinin saptanması amacıyla, farklı alanlardan 79 adet Kök-ur nematodu populasyonu toplanarak moleküler ve morfolojik yöntemlerle teşhis çalışması yapılmıştır. Elde edilen Kök-ur nematodu populasyonları bir yumurta paketi ile hassas bir domates çeşidi üzerinde üretilmiş, yumurta paketlerinden elde edilen ikinci larva dönemindeki bireylerinden DNA izolasyonu yapılmış, türe özgü primerlerle PCR kurularak *Meloidogyne* türleri teşhis edilmiştir. Aynı zamanda her

populasyona ait ikinci dönem larvaların ve hassas domates bitkilerinin köklerinden elde edilen dişi bireylerin vulva kesitlerinden daimi preparatlar yapılarak morfolojik yöntemlerle de teşhis çalışmaları yapılmıştır. Moleküler ve morfolojik yöntemlerle yapılan teşhis sonucunda 4 türün, *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) Chitwood, *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, ve *Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo et Finley, 1980, ülkemizde yaygın olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Türkiye genelinden elde edilen 79 Kök-ur nematodu populasyonundan 28 adedinin *M. javanica*, 22 adedinin *M. incognita*, 21 adedinin *M. arenaria*, ve 8 adedinin de *M. chitwoodi* olduğu saptanmış olup, bunların bulunma oranları sırasıyla, % 35, % 28, % 27ve %10 olduğu morfolojik ve moleküler yöntemlerle belirlenmiştir. Orta Anadolu Bölgesi'ndeki patates örneklerinden elde edilen örneklerdeki Kök-ur nematodlarının tamamının *M. chitwoodi* olduğu tespit edilmiştir.

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.
- Cenis, J. L., 1993. Identification of four major *Meloidogyne* spp. by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). **Phytopathology** **83**: 76-78.
- Devran, Z., U. Gözel, M. A. Söğüt, Ş. Yıldız & İ. H. Elekcioğlu, 2002. Identification of root-knot nematodes in the Mediterranean Region of Turkey by using rDNA and mtDNA markers. **Turkish Journal of Agriculture Forestry** **26**: 337-341.
- Devran, Z., N. Mutlu, A. Özarslandan & İ. H. Elekcioğlu 2009. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne chitwoodi* in potato production areas of Turkey. **Nematropica** **39**: 75-83.
- Elekcioğlu, 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: 409-410.
- Elekcioğlu, İ. H., B. Ohnesorge, G. Lung & N. Uygun. 1994. Plant parasitic nematodes in the Mediterranean region of Turkey. **Nematologia Mediterranea**. **22**: 59-63.
- Enneli, S., 1980. İç Anadolu Bölgesinde Yetiştirilen Domateslerde Zararlı Kök-ur Nematodu (*Meloidogyne incognita* Chitwood)'un Tanımı, Biyolojisi, Histopatolojisi ve Patojenitesi Üzerinde Araştırmalar. A.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi (Basılmamış), Ankara, 129 s.
- Ercan, H & İ. H. Elekcioğlu, 2009. Adana ve Mersin illerinde yabancı otlarda bulunan Kök-ur nematod türlerinin (*Meloidogyne* spp.) (Nemata: Meloidogynidae) belirlenmesi. **Türkiye Entomoloji Dergisi**. **33 (3)**: 179-192.
- Harris, T. S., L. J. Sandal & T. O. Powers, 1990. Identification of single *Meloidogyne* juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. **Journal of Nematology** **22**: 518–24.
- 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.

- Karszen, G., 2002. The Plant-Parasitic Nematode Genus *Meloidogyne* Goeldi, 1892 (Tylenchida) in Europe. Leiden, Netherlands: Brill.
- Karszen, G & M. Moens, 2006. Root-knot nematodes In: Plant Nematology. Perry, R.N., Moens, M. (eds), CABI Publishing: 59-90.
- Kaşkavalcı, G & C. Öncüer, 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.
- Jepson, S. B., 1987. Identification of Root-Knot Nematodes. CAB International, 265pp.
- Johnson, A. W & G. Fassuliotis, 1984. Nematode Parasites of Vegetable Crops. In: Nickle, W. R. (ed). Plant and Insect Nematodes. Marcel Dekker Inc: 323-372.
- Meng, Q. P., H. Long & J. H. Xu, 2004. PCR assays for rapid and sensitive identification of three major root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria*. **Acta Phytopathologica Sinica** **34**: 204–10.
- Mennan, S & O. Ecevit, 1996. Bafra ve Çarřamba 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.
- 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.
- Ozarıslandan, 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.
- Palomares Rius, J. E., N. Vovlas, A. Troccoli, G. Liebanas, B. B. Landa & P. Castillo, 2007. A new root knot nematode parasitizing sea rocket from Spanish Mediterranean Coastal Dunes: *Meloidogyne dunensis* n. Sp. (Nematoda: Meloidogynidae). **Journal of Nematology** **39** (2):190-202.
- Powers, T. O & T. S. Harris, 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* spp. **Journal of Nematology** **25**: 1–6.
- 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.
- Seinhorst, J.W. 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. **Nematologica** **4**: 67–69.
- 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.
- Trudgill, DL. & V. C. Blok, 2001. Apomictic polyphagous root knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. **Annual Review of Phytopathology** **39**: 53–77.
- Zijlstra, C., D. T. H. M. Donkers-Venne & M. Fargette, 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterised amplified region (SCAR) based PCR assays. **Nematology** **2**: 847–853.

- 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.
- Yıldız, V., Ç. Güneş, N. Bulun & U. Gözel, 2009. Ödemiş (İzmir) İlçesi patates üretim alanlarında tespit edilen Kök-ur nematodu: *Meloidogyne chitwoodi* (Goeldi, 1892, Nemata: Heteroderidae). Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi. 15-18 Temmuz 2009, Van, S:35.
- Williamson, V. M., E. P. Caswell-Chen, B. B. Westerdahl, F. F. Wu & G. Caryl, 1997. A PCR assay to identify and distinguish single juveniles of *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. **Journal of Nematology** **29**: 9–15.