

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşenur ASLAN

**DOĞU AKDENİZ BÖLGESİ ÖRTÜALTI SEBZE
ALANLARINDA KÖK-UR NEMATODLARININ
BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE
TANILANMASI**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ADANA, 2019

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOĞU AKDENİZ BÖLGESİ ÖRTÜALTI SEBZE ALANLARINDA KÖK-
UR NEMATODLARININ BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLER İLE TANILANMASI**

Ayşenur ASLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Bu Tez Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. İbrahim Halil ELEKCİOĞLU
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. Ekrem ATAKAN
ÜYE

.....
Doç. Dr. Adem ÖZARSLANDAN
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof.Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DOĞU AKDENİZ BÖLGESİ ÖRTÜALTI SEBZE ALANLARINDA KÖK-UR NEMATODLARININ BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER YÖNTEMLER İLE TANILANMASI

Ayşenur ASLAN

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. İbrahim Halil ELEKCİOĞLU
Yıl: 2019, Sayfa: 71
Jüri : Prof. Dr. İbrahim Halil ELEKCİOĞLU
: Prof. Dr. Ekrem ATAKAN
: Doç. Dr. Adem ÖZARSLANDAN

Araştırma Doğu Akdeniz Bölgesinde örtüaltı sebze üretiminin yoğun olarak yapıldığı Adana, Mersin, Hatay il ve ilçelerindeki seralarda yürütülmüştür. Söz konusu alanlarda bulunan kök-ur nematodu (*Meloidogyne* spp.) türleri moleküler PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve biyokimyasal PAGE (Poliakrilamid Jel Elektroferez) yöntemleri ile saptanmış ve karakterizasyonu yapılmıştır. 2018 yılı Nisan-Mayıs-Haziran aylarında yapılan sörveylerde toplanan 100 adet kök örneğinden elde edilen larvalardan DNA izolasyonu yapılmıştır. Örnekler türe spesifik primerler kullanılarak PCR yöntemi ile taranmıştır. *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne ethiopica*, *Meloidogyne incognita* ve *Meloidogyne hapla*'ya karşı testlenmiştir. Testlenen örneklerde toplanan 39 örnekte *M. incognita*, 7 örnekte ise *M. javanica* saptanmıştır. Pozitif sonuç alınan örneklerle ait PCR ürünlerinin DNA dizileri çıkartılmıştır. Dizilerin NCBI'da BLAST yapılması sonucunda aynı türün hem kendi aralarında ve hemde dünyadaki diğer izolatlarla olan akrabalık ilişkileri ortaya konulmuştur. Filogenetik analiz çalışmasında, Karataş, Kazanlı, Adanahoğlu, Aydıncık, Samadağ *M. incognita* izolatları kendi aralarında %100 benzerlik göstermiş olup, Hindistan ve Çin izolatlarına yakın olmakla birlikte Tayland ve Endonezya izolatlarına uzak bulunmuştur. *M. javanica* izolatları hem kendi aralarında hemde Hindistan, Malezya ve Çin izolatları ile %99 oranında benzerlik gösterirken Irak izolatu ile %95 gibi düşük oranda benzerlik gösterip, uzak bir akrabalık sergilemiştir. Toplanan 46 örnekte saptanan *M. javanica* ve *M. incognita* türlerinin gerçekten doğru türler olup olmadığını onaylamak amacıyla örneklerin tamamının genç ergin dişileri PAGE yöntemi ile biyokimyasal analiz yapılmış ve estera enzim profilleri kontrol edilmiştir. Araştırma sonucunda PCR yöntemi ile PAGE yöntemi kullanılarak alınan sonuçlar birbirini desteklemiş olup, doğru bir şekilde tanılama ve karakterizasyon yapılmıştır.

Anahtar kelimeler; sebze, örtüaltı, kök-ur nematodu, PCR, PAGE

ABSTRACT

MSc THESIS

BIOCHEMICAL AND MOLECULAR DIAGNOSIS OF ROOT-NEMATODES IN GREENHOUSE VEGETABLE AREAS OF EASTERN MEDITERRANEAN REGION

Aysenur Aslan

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION

Supervisor : Prof. Dr. İbrahim Halil ELEKCİOĞLU
Year: 2019, Pages: 71
Jury : Prof. Dr. İbrahim Halil ELEKCİOĞLU
: Prof. Dr. Ekrem ATAKAN
: Assoc. Prof. Dr. Adem ÖZARSLANDAN

The research has been performed in East-Mediterranean region composed of Adana, Mersin and Hatay provinces including towns in which vegetable produced in greenhouse densely. Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) species were detected and characterized by molecular PCR (Polymerase Chain Reaction) and biochemical PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) techniques in mentioned area. DNAs were extracted from the larva received from hundred root samples collected during the surveys of April-May-June in 2018. Samples were tested by PCR (Polymerase Chain Reaction) using specific primer couples against to *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne ethiopica*, *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne hapla*. In the results of tests, *M. incognita* has been detected in 39 examples collected from 7 vegetable surveys areas, *M. javanica* has been detected in 7 examples collected from 4 vegetable survey areas. DNA were sequenced from the PCR products of positive samples. With the BLAST of sequences in NCBI, line of descents among them between each other and other isolates in the World of isolates were determined. In the phylogenetic analysis, *M. incognita* isolates showed similarity between each other in the rate of 100%. While they are neighborhood to India and China isolates, they were found distance to Thailand and Indonesia isolates. Although *M. javanica* isolates have showed similarity both among them and India and China isolates in the rate of 99%, showed low rate similarity with Iraq isolate in the rate of 95% in relationship. Young mature females of all samples were analyzed by PAGE method as biochemical and esterase enzyme profile were checked in order to determine whether *M. javanica* and *M. incognita* species detected on 46 examples infested are correct species. In the end of research, the results of PCR and PAGE method have supported each other and the detection and characterization were performed properly.

Key words: vegetable, greenhouse, root-knot nematode, PCR, PAGE

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Akdeniz Bölgesi de toplam 608 bin dekar örtüaltı sebze üretim alanı ile Türkiye’de sebze üretilen bölgeler arasında ilk sırayı almaktadır. Bunun 286 bin da’ı Doğu Akdeniz Bölgesi’nde yer almaktadır. Akdeniz Bölgesi’nde yıllık toplam sebze üretimi miktarı 6 milyon ton olup bunun 3 mt’u domates, 669.588 tonu biber, 778 bin tonu hıyar ve 307 bin tonu patlıcandır (TÜİK, 2018). *Meloidogyne* spp. sebze üretiminde önemli verim ve kalite kayıplarına sebep olması nedeniyle tüm dünyada ekonomik öneme sahip türler olup karantina etmenleri içerisinde bulunmaktadır. Bu kayıplar; iklim, konukçu türü ve zararlının tür ve ırklarına göre farklılık göstermektedir (Söğüt ve Elekcioğlu, 2000; Karssen ve Moens, 2006; Collange ve ark., 2011).

Ülkemizde *Meloidogyne* türleri ile ilgili moleküler yöntemler ile yapılan en son çalışma 10 yıl önce yürütülmüş olup tanılama perianal bölgeye göre yapılmıştır. Bilindiği üzere perianal bölgeye göre yapılan teşhislerde zaman zaman güvenilir olmayan sonuçlar ortaya çıkmaktadır (Geric Stare ve ark., 2018). Bu nedenle Doğu Akdeniz Bölgesi örtüaltı sebze üretim alanlarında *Meloidogyne* türlerinin daha güvenilir ve doğru bir şekilde tanılamak için moleküler ve biyokimyasal analizlerin her ikisi birlikte kullanılarak araştırmaların sonuçları güncellenmelidir. Bu araştırmanın amacı, Doğu Akdeniz Bölgesi’nde örtüaltı üretiminin yoğun olarak yapıldığı Adana, Mersin, Hatay il ve ilçelerine ait seralarda yetiştirilen sebzelerde bulunması muhtemel kök-ur (*Meloidogyne* spp.) nematodlarının moleküler yöntemler (PCR) ile saptanarak bulunan ve karakterizasyonu yapılan türlerin biyokimyasal yöntemler (PAGE) ile esteraz profilleri kontrol edilerek etmenin doğru ve güvenilir bir şekilde tanılanmasıdır. Bu amaç doğrultusunda 2018 yılı Nisan-Mayıs-Haziran aylarında araştırmanın yürütüldüğü alanlarda yapılan sorveylerde 100 adet sebze üretim seralarından rastgele örnekleme yapılmıştır. Toplanan popülasyonların 46 tanesi simptomolojik olarak kök-ur nematoduyla bulaşıklık bulunmuştur. Toplanan örnek sayısı

üzerinden bulaşıklık oranı %46 olarak tespit edilmiştir. Örtüaltı sebze (domates, biber, patlıcan, hıyar) üretim alanlarından toplam 46 adet popülasyon JMV/JMV1/JMV2 - FAR/RAR – METH F /METH R, FJAV/RJAV ve MIF/MIR primerleri kullanılarak PCR yöntemi ile sırasıyla *M. hapla*, *M. arenaria* ve *M. ethiopica*, *M. javanica* ve *M. incognita*'ya karşı testlenmiştir. Testlemeler sonucunda bütün örnekler için PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezde kontrolleri sonucunda FJAV/RJAV primer çiftinin kullanılması ile beklenen 670 bp büyüklüğünde DNA bantları 7 adet örnekte (Kazanlı, Aydıncık, Erdemli ve Samandağ) görüntülenmiştir. Bu örneklerin *M. javanica* ile bulaşık olduğu ortaya konulmuştur. Testlenen örnekler üzerinden *M. javanica*'nın bulaşıklık oranı %15.2 olarak belirlenmiştir. MIF/MIR primer çiftinin kullanılması ile beklenen 999 bp büyüklüğünde DNA bantları 39 adet örnekte (Karataş, Tarsus, Adanalıoğlu, Kazanlı, Erdemli, Aydıncık ve Samandağ) görüntülenmiştir. Bu örneklerin ise *M. incognita* ile bulaşık olduğu ortaya konulmuştur. Testlenen örnekler üzerinden *M. incognita*'nın bulaşıklık oranı %84.7 olarak belirlenmiştir. Saptanan *M. javanica* ve *M. incognita* izolatlarına ait PCR ürünlerinin *M. incognita* için forward ve reverse olarak çift yönlü, *M. javanica* için forward primeri ile tek yönlü olarak DNA dizilemeleri yaptırılmıştır. DNA dizileme için 46 popülasyondan pozitif sonuç veren yöreleri temsil edecek şekilde her yöreden 1 popülasyon seçilmiştir. *M. incognita* için Karataş, Kazanlı, Adanalıoğlu, Tarsus, Erdemli, Aydıncık ve Samandağ dan 1'er popülasyon örneği olmak üzere toplam 7 örnek, *M. javanica* için Kazanlı, Erdemli, Aydıncık ve Samandağ dan 1'er popülasyon olmak üzere toplam 4 örnek seçilmiştir. Elde edilen DNA dizileri Gen Banka'sında (NCBI) BLAST yapılarak aynı türün dünyada ki diğer izolatlar ile karşılaştırma yapılan gen bölgesi açısından benzerlik oranları kontrol edilmiştir.

Meloidogyne javanica için filogenetik analiz çalışması, araştırmada kullanılan 4 izolat ve GenBank'tan alınan 13 izolat (Hindistan, Malezya, Çin ve Irak'tan) olmak üzere toplam 17 izolat kullanılarak yapılmıştır. Bütün izolatların oluşturduğu filogenetik ağaç 2 farklı grupta toplanmıştır. Analiz edilen *M. javanica*

izolatları, Hindistan, Malezya ve Çin izolatlarının birlikte oluşturduğu soy grubunda bulunmuş olup Irak izolatına uzak bir akrabalık sergilemiştir. Türk izolatları, Irak izolatından uzak olmakla beraber kendi grubu içerisinde çok azda olsa farklılıklar göstermektedir; KazM ve ErM izolatları Hindistan ve Malezya izolatlarına yakın olmakla birlikte SamH izolatu diğer bir Malezya izolatu ile AyM izolatu ise Çin izolatları ile yakın ilişki sergilemiştir. Bütün türk izolatları ve kendi grubu içerisinde bulunan Hindistan, Malezya ve Çin izolatları aynı atadan gelen bir soy sergilemiş olup, Çin izolatu farklı bir soy uzantısı göstermiştir.

Meloidogyne incognita için filogenetik analiz çalışması, araştırmada kullanılan 7 izolat ve GenBank tan alınan 16 izolat (Malezya, Hindistan, Çin, Tayland ve Endonezya) olmak üzere toplam 23 izolat kullanılarak yapılmıştır. *M. incognita*'ya ait bütün izolatlar oluşturduğu filogenetik ağaç 2 farklı grupta toplanmıştır. Türk izolatları, Tayland ve Endonezya izolatlarından uzak olmakla beraber kendi grubu içerisinde çok az da olsa farklılıklar göstermektedir; KazM, AdM, KarA, AyM ve SamM izolatları Hindistan, Malezya ve Çin izolatlarına yakın olmakla birlikte ErM ve TarM izolatları kendi grubu içerisinde aynı soy sergilemekle birlikte Çin izolatlarına daha yakın bir akrabalık sergilemiştir.

Yörelere ait toplanan örneklerden ergin genç dişilerden ilk defa Poliakrilamid Jel Elektroforez (PAGE) yöntemi ile biyokimyasal analiz yapılarak esteraz enzim profilleri kontrol edilmiştir. Dört yöreden toplanan 7 örnekte saptanan ve karakterizasyonu yapılan *M. javanica*, yedi yöreden toplanan 39 örnekte saptanan ve karakterizasyonu yapılan *M. incognita*'nın gerçekten doğru türler olduğunu onaylamak için bütün örnekler esteraz enzim profillerinin kontrolü için PAGE yöntemleri ile tekrar analiz edilmiştir. *M. incognita* esteraz enzimi profilleri I1 ve I2, *M. javanica* esteraz enzim profile J3 olarak saptanmıştır. PAGE yönteminde esteraz profilleri görüntülenmesi sırasında *M. javanica* (J3) referans popülasyon olarak kullanılmıştır. Biyokimyasal analiz sonuçları göstermiştir ki, spesifik primer çifti kullanılarak yapılan PCR sonucunda örneklerde saptanan *M. javanica* ve *M. incognita* türlerinin gerçekten doğru türler olup, PCR ve PAGE

sonuçları birbirlerini desteklemiştir. Araştırmada kullanılan bütün test sonuçları göstermiştir ki, nematod türlerinin teşhis ve karakterizyonunda moleküler (PCR) ve özellikle biyokimyasal (PAGE) yöntemlerin birlikte ve birbirlerini denetleyici olarak kullanılması tr teşhisinin doğru ve güvenilir şekilde yapılması açısından önemlidir.



TEŞEKKÜR

Bu çalışmamda her türlü desteği ve yardımı sağlayan, çalışmalarımın her aşamasında beni teşvik eden, bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren sayın Danışman Hocam Prof. Dr. İbrahim Halil. ELEKCİOĞLU'na

Araştırmaların moleküler aşamasının yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle destekleyen aynı zamanda manevi olarak ikinci danışmanlık yapan sayın Hocam Doç. Dr. Behçet Kemal ÇAĞLAR'a

Tüm manevi desteği ve tezimde materyal sağlayan sayın Dilek DİNÇER'e
Sörvey çalışmalarında beni yalnız bırakmayan meslektaşım Adem Şükrü TAŞKIN'a

Moleküler çalışmalarında yanımda olan meslektaşım sayın Ali GÜNEŞ'e
Biyokimyasal analiz için yardımlarını esirgemeyen sayın Betül ÇAKMAK'a

Değerli destekleri ve katkılarından dolayı saygı değer jüri üyelerim Prof. Dr. Ekrem ATAKAN ve Doç. Dr. Adem ÖZARSLANDAN'a

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan maddi ve manevi destek olan babam Gündüz ASLAN, annem Fatma ASLAN, abim Yunus ASLAN ve arkadaşlarım Tuğçe, Tuğba ve Ayşe Gül'e sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
ŞEKİLLER VE KISALTMALAR.....	XIV
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
2.1. Kök-Ur Nematodlarının Biyolojileri ve Zararları	5
2.2. Kaynak Özetleri	9
3. MATERYAL VE METOD	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Kök-ur nematodu popülasyonlarının toplanması	21
3.1.2. Kök-ur nematodlarının izolasyonu.....	26
3.1.2.1. Kök-ur nematodu yumurta paketlerinin elde edilmesi.....	26
3.1.2.2. Kök-ur nematodu larvaların elde edilmesi	27
3.1.2.3. Kök-ur nematodu dişilerinin elde edilmesi	27
3.2. Metod	28
3.2.1. Moleküler Yöntem	28
3.2.1.1. Kök-ur nematodu popülasyonlarının moleküler tanılanması ..	28
3.2.1.1.(1). DNA ekstraksiyonu	28
3.2.1.1.(2). Türlerle spesifik primerler kullanılarak moleküler	
tanılama	29
3.2.1.1.(3). Polimeraz zincir reaksiyonu çalışmaları (PCR).....	30

3.2.1.2. Agaroj jel elektroforez alışmaları	31
3.2.1.3. DNA dizileme ve sekans	32
3.2.1.3.(1). Saptanan kök-ur nematod türlerinin filogenetik analiz alışmaları	32
3.2.2. Poliakrilamid jel elektroforez Yöntemi (PAGE).....	33
3.2.2.1. PAGE yöntemi ile kök-ur nematodlarının tanılanmasında yapılan alışmalar	34
3.2.2.1.(1). Elektroforez yönteminde kullanılacak solüsyonların hazırlanması	34
3.2.2.1.(2). Poliakrilamid jel, boyama ve fiksatif solüsyonunun yapılması ve uygulanması	36
4. BULGULAR VE TARTIşMA	39
4.1. Bulgular.....	39
4.1.1. Kök-ur nematodu popülasyonlarının moleküler tanılanması	39
4.1.2. Kök-ur nematodu popülasyonlarının filogenetik analizi.....	42
4.1.3. Kök-ur nematodu PAGE yöntemi bulguları	45
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	53
KAYNAKÇA.....	57
ZGEMİş	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 2.1.	Meloidogyne türlerinin sistematikteki yeri (Siddiqi, 2000).....	5
Çizelge 2.2.	Kök-ur nematodlarında yaygın olarak kullanılan primerlerin adları, bant uzunlukları, dizilimleri ve referansları.....	8
Çizelge 3.1.	Araştırmada kullanılan konukçu bitki, nematodun bulunma durumu ve örneklerin toplandığı lokasyonlara ait GPS verileri.	23
Çizelge 3.2.	PCR çalışmalarında kullanılan türlere spesifik primerler	30
Çizelge 3.3.	Türlere spesifik primer çiftleri için uygulanan Termocycle döngüleri	31
Çizelge 4.1.	Doğu Akdeniz Bölgesinden <i>Meloidogyne</i> türlerinin moleküler ve biyokimyasal analiz sonuçlarının karşılaştırılması	50



ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 2.1.	Kök-ur nematodları (<i>Meloidogyne</i> spp.)'nın hayat döngüsü.....	6
Şekil 2.2.	Kök-ur nematodlarının geçmişten günümüze tür sayısındaki artış	7
Şekil 3.1.	Kök-ur nematodu ile bulaşık biber serası Adanalıoğlu yöresinde.....	22
Şekil 3.2.	Kök-ur nematodu ile bulaşık biber serası Kazanlı yöresi	22
Şekil 3.3.	Kök-ur nematodu ile bulaşık Aydıncık yöresi patlıcan serası	22
Şekil 3.4.	Kök-ur nematodu ile bulaşık Aydıncık yöresi hıyar serası	22
Şekil 3.5.	Kök-ur nematodu ile bulaşık Samandağ yöresi domates serası	22
Şekil 3.6.	Kök-ur nematodu ile bulaşık Tarsus yöresi patlıcan serası	22
Şekil 3.7.	Kök-ur nematodunun hıyar bitkisi köklerindeki yoğun zararı	23
Şekil 3.8.	Kök-ur nematodu A; yumurta paketi ile bulaşık kök, B; dişi.....	27
Şekil 3.9.	Geliştirilmiş Baerman-Huni yöntemi ile kök-ur nematodu larva elde edilme aşamaları.	28
Şekil 3.10.	A; rotör pellet pestle, B; soğutmalı santrifüj, C; DNA içeren eppendorflar.....	29
Şekil 3.11.	Örneklerin jel elektroforeze yüklenmesi ve yürütülmesi	32
Şekil 3.12.	Poliakrilamid Gel Elektroforez uygulama aşamaları.....	38
Şekil 4.1.	<i>Meloidogyne javanica</i> 'ya spesifik SCAR primerleri ile yapılan çalışma sonucunda görüntülenen 670 bp büyüklüğünde ki PCR ürünleri.	40
Şekil 4.2.	<i>Meloidogyne incognita</i> 'ya spesifik SCAR primerleri ile yapılan çalışma sonucunda görüntülenen 999 bp büyüklüğünde ki PCR ürünleri.	40
Şekil 4.3.	<i>Meloidogyne incognita</i> 'ya spesifik SCAR primerleri ile yapılan çalışma sonucunda görüntülenen 999 bp büyüklüğünde ki PCR ürünleri.	41

Şekil 4.4.	<i>Meloidogyne incognita</i> 'ya spesifik SCAR primerleri ile yapılan çalışma sonucunda görüntülenen 999 bp büyüklüğünde ki PCR ürünleri.	41
Şekil 4.5.	<i>Meloidogyne javanica</i> izolatlarına ait filogenetik analiz.....	43
Şekil 4.6.	<i>Meloidogyne incognita</i> izolatlarına ait filogenetik analiz	44
Şekil 4.7.	<i>Meloidogyne</i> spp. esterase enzim fenotipleri teşhis anahtarı Esbenshade ve Triantaphyllou (1985)'e göre dizayn edilmiştir.	46
Şekil 4.8.	<i>M. javanica</i> izolatlarına ait esterase enzim profilinin poliakrilamid jelde J3 fenotipi.....	47
Şekil 4.9.	<i>M. incognita</i> izolatlarına ait esterase profili poliakrilamid jelde 1-4-6-8: I1 fenotipi, 2-3-5-7: I2 fenotipi.	47
Şekil 4.10.	<i>M. incognita</i> izolatlarına ait esterase profilleri poliakrilamid jelde 3-8: I1 fenotipi, 1-2-4-5-6-7: I2 fenotipi.	48
Şekil 4.11.	<i>M. incognita</i> izolatlarına ait esterase profili poliakrilamid jelde 1-7: I1 fenotipi, 8: I2 fenotipi.	48
Şekil 4.12.	<i>M. incognita</i> izolatlarına ait esterase profili poliakrilamid jelde 1-8: I1 fenotipi.....	49
Şekil 4.13.	<i>M. incognita</i> izolatlarına ait esterase profili poliakrilamid jelde 1-2-3: I1 fenotipi, 4-5-6-7: I2 fenotipi.....	49

ŞEKİLLER VE KISALTMALAR

PAGE	: Poliakrilamit jel elektroforez
APS	: Amonyum persülfat
EST	: Esteraz
GOT	: Glutamet oksaloasetat transaminaz
MDH	: Malat dehidrojenaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
ml	: Mililitre
mm	: milimetre
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
mt	: Milyon ton
mM	: Milimolar
M	: Marker
mtDNA	: Mitokondrial DNA
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
rDNA	: Rekombinant DNA
RNA	: Ribonükleik asit
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	: Random Amplification of Polymorphic DNA
dNTP	: Deoksiribonükleotidtrifosfat
Rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
Taq	: Termo Stabil Polimeraz Enzimi
TAE	: Tris Asetik Asit EDTA
bp	: Base pair
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
UV	: Ultraviolet
°C	: Santigrat derece

pH : Hidrojen İyonu Konsantrasyonu
L : larva
Spp : Türler



1. GİRİŞ

Türkiye sebze üretim miktarı bakımından, Amerika ve Çin'den sonra dünyada önemli bir konuma sahiptir. Türkiye'de toplam örtüaltı üretim alanı 772 bin dekar ve toplam örtüaltı sebze üretimi 7.5 milyon tondur. Akdeniz Bölgesi de toplam 656 bin da örtü altı (alçak tünel, yüksek tünel, cam sera, plastik sera) sebze üretim alanı ile Türkiye'de sebze üretilen bölgeler arasında ilk sırayı almaktadır. Bunun 286 bin dekarı Doğu Akdeniz Bölgesi'nde yer almaktadır. Akdeniz Bölgesi'nde 608 bin da alandan yıllık toplam sebze üretimi miktarı 6.090.964 ton olup bunun 3 mt'u domates, 669 bin tonu biber, 778 bin tonu hıyar ve 307 bin tonu patlıcandır (TÜİK, 2018).

Toprak kökenli olan kök-ur nematodları (*Meloidogyne* spp.) tüm dünyada sebze üretim alanlarında ekonomik olarak zarara yol açan türler içerisinde en önemli zararlı olarak tanımlanmaktadır. Bu kayıplar; iklim, konukçu türü ve zararlının tür ve ırklarına göre farklılık göstermektedir (Söğüt ve Elekcioğlu, 2000; Karssen ve Moens, 2006; Collange ve ark., 2011). Dünyadaki tarım alanlarının yarısından fazlasının kök-ur nematodları ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir (Taylor, 1987; Trudgill ve Blok, 2001). Sasser (1986), dünyada kök-ur nematodlarının neden olduğu ürün kaybının yaklaşık %15 olduğunu, bu oranın sebzelerde %80'e kadar çıkabildiğini bildirmiştir. Bitki paraziti nematodların dünya genelinde bitkisel üretimde neden olduğu zararın toplam değerinin yıllık yaklaşık 80 milyar euro olduğu tahmin edilmektedir (Djian-Caporalino ve ark., 2011). Kök-ur nematodlarının konukçu dizisi çok geniş olup 2000'den fazla bitki türünde beslenmektedir. *M. incognita* ve *M. javanica*'nın en yaygın ve ekonomik olarak en önemli türler olduğu, *M. arenaria* ve *M. hapla*'nın ise ender rastlanan türler olduğu bildirilmektedir (Yüksel, 1974; Ağdacı, 1978; Elekcioğlu, 1992; Elekcioğlu ve Uygun 1994; Elekcioğlu ve ark., 1994; Mennan ve Ecevit, 1996; Söğüt ve Elekcioğlu, 2000). Ülkemizde toplam 10 kök-ur nematodu türünün (*Meloidogyne luci*, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. hapla*, *M. arenaria*, *M. chitwoodi*, *M. thamesi*,

M. acrita, *M. exiqua*, *M. artiellia*) bulunduğu, bunlar içerisinde *M. incognita*, *M. javanica* ve *M. arenaria* türlerinin sebze alanlarında yaygın türler olduğu ve ekonomik olarak önemli kayıplara neden olduğu belirtilmiştir (Yüksel, 1966; Yüksel, 1967; Yüksel, 1974; Elekcioglu, 1995; Elekcioglu ve Uygun, 1994; Elekcioglu ve ark., 1994; Mennan ve Ecevit, 1996; Söğüt ve Elekcioglu, 2000; Kepenekci ve ark., 2002; Özarslandan ve ark., 2009; Özarslandan ve Elekcioglu, 2010; Çetintaş ve Çakmak, 2011; Aydınli ve ark., 2013; Uysal ve ark., 2017; Aydınli ve Mennan, 2018). Tarım alanlarında önemli zararlılardan olan kök-ur nematodu türlerinin sebzelerde %15-85 oranında verim kaybına neden oldukları ve bu zararın popülasyon yoğunlukları ile bitkinin türüne göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Türkiye örtüaltı üretiminin merkezi olan Akdeniz Bölgesi'nde yapılan çalışmalarda kök-ur nematodlarının örtüaltı hıyar üretim alanları dikkate alındığında, Antalya ilinde bulunan örtüaltı hıyar üretim alanlarında %16, Adana ilindeki örtüaltı üretim alanlarında %47 oranında daha yaygın olduğu, en çok üretilen sebzeler olan hıyar, domates ve biberde neden oldukları zararın ise önemli olduğu ortaya konulmuştur (Ağdacı, 1978; Elekcioglu, 1992; Söğüt ve Elekcioglu, 2000).

Bulaşık bölgelerde kök-ur nematodu ile mücadele çok zor ve ekonomik açıdan önemli olmaktadır. Kimyasal mücadelede kullanılan nematisitlerin pahalı olması, çevre ve insan sağlığına olumsuz etkileri ve uygulama zorluğundan dolayı kullanımı sınırlandırılmıştır. Bu kimyasallar taban suyuna karışarak tehlike oluşturmaktadır. Alternatif yöntem olarak; biyolojik mücadele, dayanıklı çeşit ve solarizasyon gibi yöntemler ise kimyasal kullanımının azaltılmasında, sonuçta üretici ve tüketici için daha olumlu sonuçlar doğurmasını sağlamaktadır.

Ülkemizde özellikle domates yetiştirilen sera alanlarında kök-ur nematoduna dayanıklı çeşitler kullanılmaktadır. Domateste *M. incognita*, *M. javanica* ve *M. arenaria*'ya karşı Mi-1 geni taşıyan dayanıklı çeşit ve popülasyonların dayanıklılıkları 28°C'nin üzerinde virulent nematod popülasyonlarına karşı etkinliğini kaybetmekte ve söz konusu çeşitler nematoda karşı hassas hale

gelmektedir. Dayanıklı çeşit ile mücadele son derece ekonomiktir (Boerma ve Hussey, 1992; Roberts, 1992; Jung ve Wyss, 1999; Özarslandan ve ark., 2010).

Nematodlarla mücadelede ve özellikle dayanıklı çeşitlerin kullanımında önemli olan nokta; bölgedeki nematod türlerinin doğru bir şekilde tanılanmasıdır. Kök-ur nematodlarının tanılanması genellikle morfolojik olarak yapılmakta ve bu yöntem bazı durumlarda (örneğin ergin olmamış nematod formları (dauer larva) gibi durumlarda) yetersiz kalmaktadır. Bu aşamada moleküler ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak yapılan tür tanılama çalışmaları daha kısa sürede güvenilir ve doğru sonuçlar vermektedir.

Biyokimyasal tanı yöntemi kullanılarak esteraz ekstraksiyonu DNA döngüsünün belirli bir noktasına tamamen dayalı olarak embriyo oluşumundan sonra embriyonun gelişmesini ve soyun devamlılığını sağlar (McGhee ve ark., 1990). Esterazlar, temel olarak bütün organizmalarda bulunan çeşitli enzim sınıflarıdır. Memeliler 20 farklı enzim türüne sahipken bu durum nematodlarda 10 dan az olarak bulunmaktadır. Her bir tür esteraz enzimini kodlayan gen bölgesinin büyüklüğü ve sayıları nematod türlerinde farklılık göstermektedir. Bu esterazlar aynı zamanda moleküler marker olarakta kullanılmakta olup, hem güvenilir hemde moleküler yöntemleri kontrol etmede çok önemli bir yöntemdir. (Butler ve ark., 1981; Leslie ve ark., 1982; Esbenshade ve Triantaphyllou, 1986; McGhee ve Cottrell, 1986). *M. incognita* ile *M. luci*'nin perinal bölgelerini birbirinden ayırt etmek oldukça zor olup, bunları ayırt etmenin en iyi yolu esteraz enzimi fenotipidir (Geric Stare ve ark., 2018). Bu nedenle son yıllarda bu tür çalışmalar artmaktadır (Chilton ve ark., 2003).

Türkiye'nin sebze yetiştirilen bölgelerinde var olan kök-ur nematodlarının tür düzeyinde teşhis ve tanılamaları yapılmıştır. Ancak Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Adana, Mersin ve Hatay il ve ilçelerinde örtüaltı sebze yetiştirilen bölgelerde bulunan kök-ur nematodları (*Meloidogyne* spp.) ile alakalı olarak ayrıntılı bir tanılama çalışması bulunmamaktadır. Ülkemizde *Meloidogyne* türleri ile ilgili moleküler yöntemler ile yapılan çalışmalarda tür tanılaması perianal bölgeye

konukçu testi ve moleküler metodlarla yapılmıştır. Türkiye genelinden toplanan 79 Kök-ur nematodu popülasyonundan morfolojik ve moleküler tanılama yapılmıştır (Özarslandan ve Elekcioglu, 2010). Bilindiği üzere perianal bölgeye göre yapılan teşhislerde zaman zaman güvenilir olmayan sonuçlar ortaya çıkmaktadır (Geric Stare ve ark., 2018).

Bu nedenle Doğu Akdeniz Bölgesi örtüaltı sebze üretim alanlarında *Meloidogyne* türlerinin daha güvenilir ve doğru bir şekilde tanılamak için moleküler ve özellikle biyokimyasal tanı yöntemlerinin her ikisi birlikte kullanılarak araştırmaların sonuçları güncellenmelidir.

Bu nedenle yöreden toplanan popülasyonların doğru bir şekilde tür teşhisi ve akrabalık ilişkilerinin ortaya konması amacıyla moleküler ve biyokimyasal yöntemlerin her ikisi de çalışılmıştır.

Kök-ur nematodlarının teşhisinde Doğu Akdeniz Bölgesinden toplanan örnekler ilk defa biyokimyasal yöntem ile teşhis yapılmıştır. Bu çalışmada; Doğu Akdeniz Bölgesi'nde örtüaltı sebze üretim alanlarında bulunan kök-ur nematodu türlerinin moleküler ve biyokimyasal yöntemlerle tanılanması ve akrabalık ilişkileri ortaya konması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kök-ur nematodlarının sistematikteki yeri Çizelge 2.1’de verilmiştir.

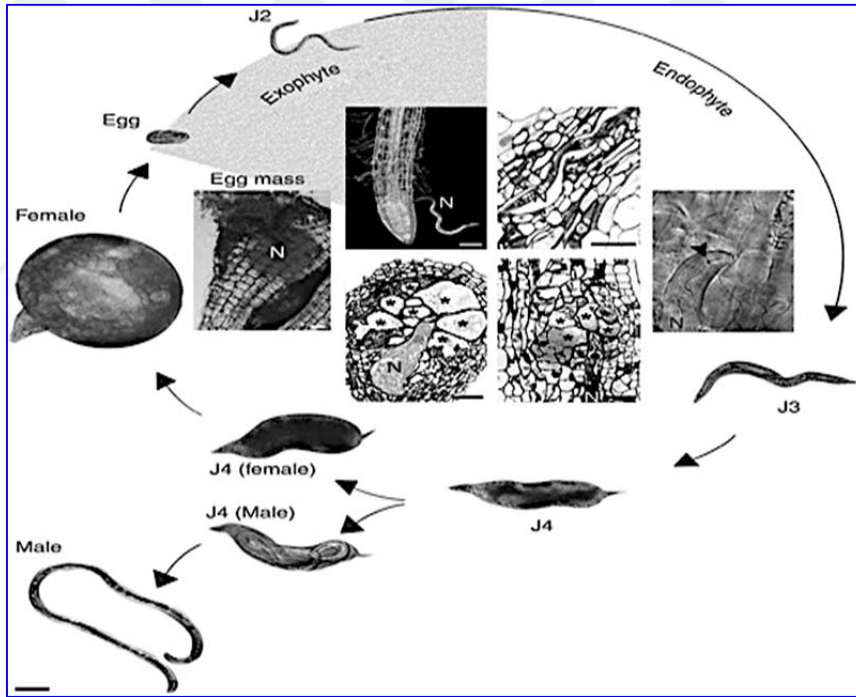
Çizelge 2.1. Meloidogyne türlerinin sistematikteki yeri (Siddiqi, 2000).

Şube	Nematoda Rudolphi, 1808 (Lankester, 1877)
Sınıf	Secernenta Von Linstow, 1905
Takım	Tylenchida Thorne, 1949
Familya	Meloidogynidae Skarbilovich, 1959 (Wouts, 1973)
Cins	Meloidogyne Goeldi, 1892

2.1. Kök-Ur Nematodlarının Biyolojileri ve Zararları

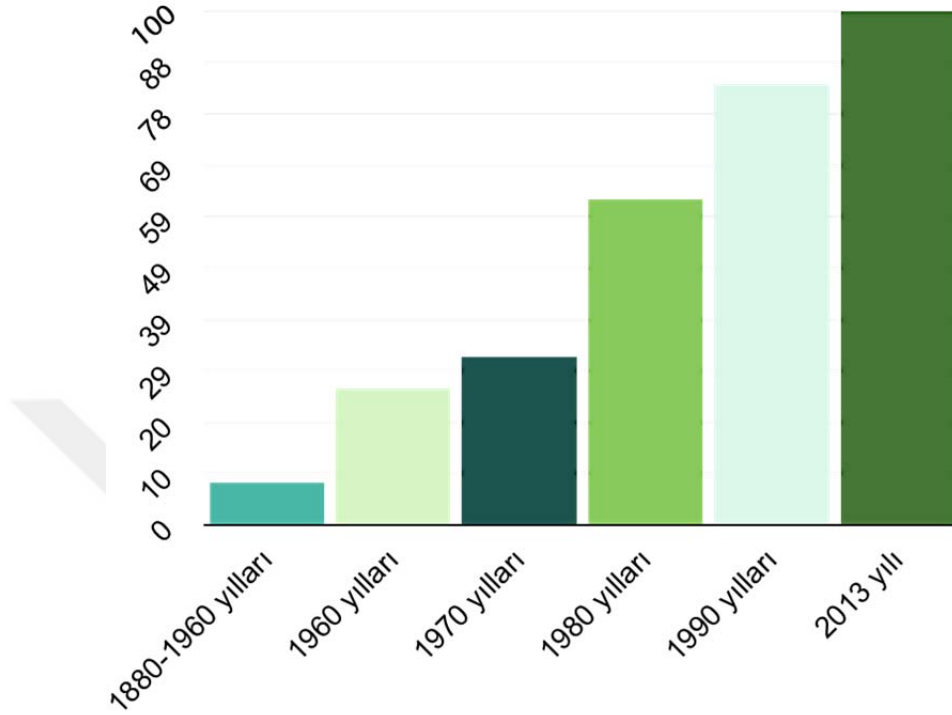
Kök-ur nematodları yumurta, larva (L1, L2, L3, L4) dönemi ve ergin olmak üzere 6 biyolojik dönem geçirmektedir. Erkek ve dişi bireyler arasında eşeysel dimorfizm görülmektedir. Dişi bireyler limon veya armut şeklini alırken erkek bireyler ipliksi formda bulunmaktadır. Larvaları 0.3-0.5 mm erkek bireyler 1.2-2 mm ve dişi bireyler 0.7-0.8 mm boyunda ve 0.3-0.4 mm enindedir. Yumurtalar toprakta bulunmaktadır. Birinci dönem larvaları yumurta içinde deri değiştirerek yumurtadan iplik formunda ikinci dönem larva olarak çıkmaktadırlar. Daha sonra kılcal köklerden bitkiye giriş yaparak beslenmeye başlarlar. Burada hücreler arasında hareket ederek parankima hücrelerine ulaşır ve dev hücre adı verilen yapılar meydana getirerek bu hücrelerden beslenirler. Burada iki gömlek daha değiştirip üçüncü ve dördüncü larva dönemlerini geçirerek ergin hale gelirler. Dördüncü dönemde erkek ya da dişi olarak cinsiyetleri belirir. Ergin hale geldikten sonra dişiler armut veya limon şeklini alarak sabit bir şekilde beslenmeye devam eder, erkekler ise ipliksi formda kalarak kökten ayrılır. Dişi bireyler yumurtalarını rektum salgı bezlerinden, jelatinimsi bir matrix içerisinde ve toplu halde bırakmaktadır (Abad ve ark., 2003; Karssen ve Moens, 2006) (Şekil 2. 1).

Meloidogyne türlerinin en tipik belirtileri bitkilerin köklerinde oluşturdukları urlardır. Bu urlar sebebiyle öncelikle bitkilerin kök sistemleri olumsuz etkilenir ve daha sonra bitkilerin topraktan besin ve su alımları engellenmektedir. Bu şekilde bitkilerde gelişme geriliği meydana getirerek verim ve kalite düşer. Aşırı ve yoğun enfeksiyon olduğu durumlarda ise bitkilerde ölüm görülebilmektedir. *Meloidogyne* türleri bitkide meydana getirdikleri doğrudan zararın yanı sıra, açtıkları yaralardan bakteriyel veya fungal hastalık etmenlerinin giriş yolları olması nedeniyle ikinci bir zarar vermektedir (Trudgill ve Blok, 2001). Genellikle 1 g toprakta bulunan larva sayısının 0.5 ila 2 arasında olması ekonomik olarak zarar yapması için yeterli görülmektedir (Moens ve ark., 2009).



Şekil 2.1. Kök-ur nematodları (*Meloidogyne* spp.)'nin hayat döngüsü (Abad ve ark., 2008).

Dünyada bugüne kadar 100'den fazla kök-ur nematodu (*Meloidogyne* spp.) türü tespit edilmiştir (Hunt ve Handoo, 2009; Moens ve ark., 2009; Jones ve ark., 2013) (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Kök-ur nematodlarının geçmişten günümüze tür sayısındaki artış (Hunt ve Handoo, 2009; Jones ve ark., 2013; Karssen ve ark., 2013).

Kök-ur nematodlarının yaygın olarak kullanılan primer adları, baz dizilimleri (5'-3'), PCR ürün büyüklükleri (bant uzunlukları) ve tanımladıkları nematod türleri Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Kök-ur nematodlarında yaygın olarak kullanılan primerlerin adları, bant uzunlukları, dizilimleri ve referansları

Tanımladığı Nematodlar	Primer	Baz dizilimi (5'-3')	PCR ürün büyüklüğü	Referans
<i>M. javanica</i>	FJAV	GGTGCGCGATTGAACTGAGC	670 bp	Zijlstra ve ark., 2000
	RJAV	CAGGCCCTTCAGTGGAACCTATAC		
<i>M. javanica</i>	DJF	CCTTAATGTCAACACTAGAGCC	1650 bp	Dong ve ark., 2001
	DJR	GGCCTTAACCGACAATTAGA		
<i>M. incognita</i>	MIF	GTGAGGATTACCTCCCCAG	955 bp	Meng ve ark., 2004
	MIR	ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC		
<i>M. incognita</i>	FİNC	CTCTGCCCAATGAGCTGTCC	1200 bp	Zijlstra ve ark., 2000
	RİNC	CTCTGCCCTCACATTAGG		
<i>M. incognita</i>	SEC-1F	GGGCAAGTAAGGATGCTCTG	502 bp	Tesarova ve ark., 2003
	SEC-1R	GCACCTCTTTCATAGCCACG		
<i>M. arenaria</i>	FAR	TCGGCGATAGAGGTAAATGAC	420 bp	Zijlstra ve ark., 2000
	RAR	TCGGCGATAGACACTACAAACT		
<i>M. arenaria</i>	DAF	TCGAGGGCATCTAATAAAGG	950 bp	Dong ve ark., 2001
	DAR	GGGCTGAATATTCAAAGGAA		
<i>M. hapla</i>	JMV	GGATGGCGTGCTTTCAAC	440 bp	Wishard ve ark., 2002
	JMV1	TTCCCCCTTATGATGTTACCC		
	JMV2	AAAAATCCCCTCGAAAAATCCACC		
<i>M.i-M.j-M.a</i>	18S	TCATTACGTCCCTGCCCTTTG	700 bp	Vrain ve ark., 1992
	28S	TTTCACTCGCCGTTACTAAGG		
<i>M. incognita</i>	INCK14R	CCCGCTACACCCTCAACTTC	399 bp	Randing ve ark., 2002
	INCK14F	GGGATGTGTAAATGCTCCTG		

Hastalık ve zararlılara karşı doğru zamanda doğru yöntemler ile etkili mücadele yapmak en önemli noktadır. Nematodlarda tür teşhislerinin yapılması amacıyla morfolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Özellikle morfolojik tanı yöntemleri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır, ancak tür düzeyinde tanımlamalar çok zor olmakta, birbirine yakın türler çok benzemekte ve bazı karakterlerini tespit etmek çok zor olmakta ve bazen türleri ayırmak mümkün olmamaktadır. Dauer larva gibi ergin olmayan nematod formları veya dönemleri,

temel morfolojik özelliklere sahip olmamakta ve morfometrik özellikler açısından da tür tanısında yeterli düzeyde ortaya konulamamaktadır.

1970'li yıllardan itibaren biyokimyasal tanı yöntemlerinden PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) yönteminin kullanılması ile türe spesifik bazı enzim fenotipleri (esteraz, malat dehidrogenaz, süperoksit dizmutaz, glutamat okzalasetat transaminaz) belirlenmiş ve türlerin teşhisinde kullanılmaya başlanmıştır. Bu teknikle daha önce ayırımı yapılamayan türlerin ayrımının yapılması mümkün olmuş ve ileriki yıllarda tanımlanan tür sayısı da artmıştır (Dickson ve ark., 1971; Hussey ve ark., 1972; Dalmasso ve Berge, 1978; Brito ve ark., 2008; Çetintaş ve Çakmak, 2011; Aydın ve Mennan, 2016).

Doğru tanılamada, morfolojik yöntemlerin yanı sıra biyokimyasal ve moleküler yöntemler daha güvenilir, kısa süreli ve doğru sonuçlar vermektedir. PCR (Polymerase Chain Reaction, PZR) yönteminin geliştirilmesine bağlı olarak 1990'lı yıllardan itibaren kullanılmaya başlanan moleküler teşhis yöntemi en doğru ve güvenilir tanımlama yöntemleri olarak kabul görmekte ve yaygın olarak kullanılmaktadır (Chilton ve ark., 2003). Ülkemizde ise Devran ve ark. (2002) kök-ur nematodlarının tanımlanmasında moleküler teşhis yöntemleri ilk defa kullanmışlardır.

2.2. Kaynak Özetleri

Dickson ve ark. (1969), çözünür proteinlerin bütün nematod homojenatlarından disk-elektroforetik yöntemle ayrılması amacıyla yaptıkları çalışmada seçilen *Meloidogyne* ve *Ditylenchus* türlerini ve *Heterodera* ve *Aphelenchus* cinslerini ayırt etmek için yararlı olabilecek bant profilleri verdiğini ortaya koymuşlardır. Bazı protein bantları tüm *Meloidogyne* türlerinde ortak, diğer gruplarda spesifik bulunmuştur. Yalnızca *Meloidogyne* spp. ve *Heterodera glycines*'nin bazı protein benzerlikleri taşıdığı, diğer cinslerin belirgin olarak farklı olduğu ortaya konulmuştur. *Meloidogyne* spp.'nin protein profilleri, nematodun ürettiği konukçu türüne göre önemli bir farklılık göstermediği bildirilmiştir.

Öztüzün (1970), Elazığ ve Malatya'da *M. incognita*'nın varlığını rapor etmişlerdir.

Dickson ve ark. (1971), *Meloidogyne javanica*, *M. hapla*, *M. incognita*, *M. arenaria*, *Ditylenchus dipsaci*, *D. trifurmis*, *Heterodera glycines* ve *Aphelenchus avenae*'nin tüm nematod homojenatlarında dört dehidrojenaz (laktat, malat, glukoz-6-fosfat ve a-gliserofosfat) ve üç hidrolazın (asit ve alkalın fosfataz ve esteraz) taksonomik olarak yararlı olacak çeşitli profillerini tespit etmişlerdir. Enzim profilleri farklı konukçularda bulunan popülasyonlarda benzer bulunmuştur. Ayrıca çalışmada kök-ur nematodlarının enzimatik bir filogenezi ortaya koyulmuştur.

Yüksel (1974), Türkiye'de Akdeniz Bölgesi'nde *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*'nın, Ege Bölgesi'nde *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. hapla*'nın Karadeniz Bölgesi'nde *M. incognita*, *M. arenaria*'nın Marmara Bölgesi'nde *M. incognita*, *M. incognita acrita*, *M. javanica*, *M. arenaria* ve *M. hapla*'nın bulunduğunu bildirmiştir.

Gürdemir ve Ağdacı (1975), İçel ve Antalya illerinde yapılan çalışmada İçel sera alanlarının % 23.1'inin, Antalya seralarının % 75.8'inin kök-ur nematodlarıyla bulaşık olduğunu ve en yaygın türlerin % 71.1 ile *M. incognita*, % 14.9 ile *M. javanica*, % 6 ile *M. arenaria* ve % 2.4 oranı ile *M. thamesi* olduğunu saptamıştır.

Ağdacı (1978), Akdeniz Bölgesi'nde 1973 ve 1976 yılları arasında kabakgil yetiştiriciliği yapılan 717 adet sera incelendiğini ve bunlardan 248 adedinin kök-ur nematodu türlerinden *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* ve *M. thamesi* ile bulaşık olduğunu belirlemiştir. Antalya'da *Meloidogyne* spp. nedeniyle meydana gelen zararın % 16.7, Adana'da ise % 47 oranında olduğunu ve bulaşık bitkilerde vejetatif gelişmenin sağlıklı bitkilere göre önemli ölçüde düşük olduğunu saptamıştır.

Enneli (1980), İç Anadolu Bölgesi'nde kök-ur nematodları ile bulaşıklık oranının %10-94 arasında olduğunu ve en yaygın türlerin sırasıyla *M. incognita*, *M. javanica* ve *M. arenaria* olduğunu bildirmiştir.

Triantaphyllou ve Dalmasso (1982), 35 ülkeden, 75 *Meloidogyne* popülasyonunda bulunan dişilerin izoesteraz bileşimini, bir ile on dişi ekstraktı kullanarak poliakrilamid jel elektroforez ile belirlemeyi amaçlamışlardır. Test sonucunda iki tip izoesteraz B ve P tespit edilmiştir. B izoesterazların dağılımı, *Meloidogyne incognita* ve *M. javanica* popülasyonları arasında özgül ve istikrarlı, *M. arenaria* popülasyonları arasında ise bazı varyasyonlar tespit edilmiştir. B izoesterazların bu sonuçları *M. incognita*, *M. arenaria* ve *M. javanica* tür teşhisi için güvenilir bir taksonomik özellik olarak kabul edilmiştir. Çalışma sonucunda üç tanımlanmış tür içindeki izoesteraz dağılımının kararlılığı ise tartışılmaktadır.

Johnson ve Fassuliotis (1984), dünya genelinde 75 ülkeden elde edilen 1000 adet *Meloidogyne* spp. popülasyonundan % 52'sinin *M. incognita*, % 30'unun *M. javanica*, % 8'inin *M. arenaria*, % 8'inin *M. hapla* olduğunu, geriye kalan % 2'sinin ise diğer *Meloidogyne* türlerinden oluştuğunu bildirmişlerdir.

Esbenshade ve Triantaphyllou (1985), enzim fenotiplerinin kök-ur nematodu türlerinin tanımlanması için kullanılması üzerine yaptıkları çalışmada *Meloidogyne* türlerinde türe özgü olan esteraz enzimini (PAGE) türleri ayırmada kullanmışlardır. Esterazlar (Est) polimorfiktir ve dünyada yaygın olan türlerin tanımlanmasında faydalıdır. *M. hapla*'nın yaklaşık %94'ü, *M. incognita*'nın %98'i, *M. javanica*'nın %100'ü sadece esteraz fenotiplerine dayanarak tanımlanabilmiştir. *M. arenaria* popülasyonunun yaklaşık %84'ü, üç farklı fenotip göstermiş olup bunlardan ikisi son derece tipik türlerdir. Üçüncü ve en az yaygın olan fenotipler, diğer türlerin ikisinde meydana çıkmıştır. Aynı zamanda daha az yaygın olan 12 *Meloidogyne* türü, yalnızca bir ya da her birinin birkaç popülasyonunda bulunmuş olup benzer fenotiplerdi ve bir türden daha fazlasında sık sık gözlemlenmiştir. Kalan iki enzimin *Meloidogyne* türlerinin tanımlanması için daha az yararlı olduğu bildirilmiştir. Çoklu enzim fenotipleri, iki ya da daha fazla enzim tarafından temsil edilmiştir. Bu yeni metodun nematolojide ucuz, güvenilir ve kullanışlı bir metot olduğu sonucuna varılmıştır.

Esbenshade ve Triantaphyllou (1987), PAGE yöntemini kullanarak *M. graminicola*'nın *M. chitwoodi*, *M. naasii* ve *M. graminis*'den, *M. hapla*'nın ise *M. microtyla*'dan farklı olduğunu saptamışlardır.

Fargette (1987), Batı Afrika'dan toplanan 57 *Meloidogyne* popülasyonunda, b esterazlar ile yapılan elektroforez çalışmalarla sekiz farklı fenotipin bulunduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada kullanılan popülasyonun %18'inin birden fazla fenotipten oluştuğu tespit edilmiştir. Monospesifik ve karışık popülasyonlarda en sık görülen fenotipin, Fenotip PI (*M. incognita*) olduğu saptanmıştır. Elektroforetik yöntemin, şimdiye kadar kullanılan yöntemlerden daha kolay, doğru ve daha objektif olduğu sonucuna varılmıştır.

Célia ve Isabel (1989), Portekiz'de varlığı tespit edilen *Meloidogyne* tür popülasyonlarını esteraz ve malat dehidrogenaz enzimleri yolu ile teşhis etmişlerdir. Bu ülkede bulunan 40 kök-ur nematod popülasyonundan 1-5 dişinin, esteraz ve malat dehidrogenaz enzimleriyle, 0,4 mm yoğunluğunda poliakrilamid jel elektroforez vasıtasıyla analizleri yapılmıştır. Esteraz faaliyetinin 14 büyük bandı, 10 farklı fenotipe göre saptanmıştır. *Meloidogyne javanica* ve *M. hapla* gibi farklı türlerin, belirgin fenotiplere sahip olduğu önceden bilinmektedir. *M. arenaria*'da iki farklı fenotip ortaya çıkmış olup, en çok varyasyon *M. incognita* popülasyonunda bulunmuştur. Önceden bulunan popülasyonlar için Est'ler, başlıca *Meloidogyne* türlerinin tanımlanmasında, Mdh'den daha faydalı olduğu ortaya çıkmıştır.

Venkatachari ve ark. (1991), *Meloidogyne* ırk 1, *M. javanica*, *M. arenaria* ırk 1, *M. hapla* ve bir tanımlanmamış *Meloidogyne* spp. türlerinde esteraz, malat dehidrogenaz, fosfoglukomutaz, izositrat dehidrogenaz ve α -gliserofosfat dehidrogenaz izoenzim fenotiplerinin karşılaştırılması ile farklılıklarını ortaya koymayı amaçlamışlardır. Bu 5 enzimden yalnızca esteraz ve fosfoglukomütazın türleri ayırt etmede kullanılabilir olduğu tespit edilmiştir.

Powers ve Harris (1993), *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, *M. hapla* ve *M. chitwoodi*'yi birbirinden ayırabilen bir PCR metodu

geliştirmiştir. Çalışmada tek bir larva bir damla suyun içine alınıp doğrudan PCR reaksiyon karışımına eklemiş, PCR sonucunda 3 değişik büyüklükte DNA bandı tespit edilmiştir. *Meloidogyne incognita* ve *M. javanica* 1.7 kb, *M. arenaria* 1.1 kb ve *M. hapla* ve *M. chitwoodi* 0.52 kb bandları oluşturmuştur. Aynı büyüklükte DNA bandı veren türlerin ayrımı ise DNA'yı kesen enzimler yardımıyla yapılmıştır. 0.52 kb bandın *DraI* ile kesilmesiyle *M. Chitwoodi*'nin verdiği 3 banda karşılık *M. hapla* 2 band vermiştir. 1.7 kb DNA bandın *HinfI* ile kesilmesi sonucu *M. javanica*'nin verdiği 2 banda karşılık *M. incognita* 3 band vermiştir. Daha az rastlanan *Meloidogyne* türleri *M. marylandi*, *M. naasi* ve *M. nataliei*'nin aynı şekilde tek bir larvadan PCR ve restriksiyon enzimleri ve bu primer seti kullanarak ayırt edilebileceği tespit edilmiştir.

Elekcioğlu ve Uygun (1994), Doğu Akdeniz Bölgesi'nde ekonomik öneme sahip bitkilerde bitki paraziti nematodların tespiti, dağılımı üzerine yaptıkları çalışmada muz ve birçok sebzenin köklerinde *Meloidogyne* spp. (*M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*)'nin yoğun olarak bulunduğu bildirilmiştir. *M. incognita* ve *M. javanica*'nın özellikle domates, biber ve patlıcan gibi sebzeler üzerinde yoğun olarak popülasyon oluşturduklarını belirtmektedirler.

İbrahim ve ark. (1994), pirinçte *Aphelencooides*'in tanımlanmamış iki türü; *Ditylenchus angustus* ve *D. myceliophagus*'u SDS-PAGE elektroforez ile analiz etmeyi amaçlamışlardır. Bütün türlerin çoğaltılabilir bantlama modelleri sayı, konsantrasyon ve yakın türlerle bağlantı hareketi açısından farklılık göstermiştir. Bazı enzim grupları türler arasında ortak, bazıları spesifik bulunmuştur. *Botrytis cinerea* veya *Rhizoctonia cerealis* kültürlerinden ekstrakte edilen nematodların protein ve esteraz bantlama modellerinde saptanabilir bir fark tespit edilmemiştir. A, β esteraz bantlama modellerinin stabilitesi ve taksonomik kullanışlılığı tartışıldığı bildirilmiştir.

İbrahim ve Rowe (1995), yaptıkları çalışmada farklı coğrafik kökenli 19 *Heterodera* türünün esteraz profillerindeki spesifik farklılığı gözlemlemeyi amaçlamıştır. Biyokimyasal çalışmalar sonucu 26 büyük esteraz bandı tespit

edilmiştir. Bazı bantlar birkaç türde ortak, bazıları ise belirli türe özgü bulunmuştur. Özellikle *Heterodera elachista*'nın belirgin şekilde spesifik fenotip gösterdiği bulunmuştur. *Heterodera* türleri arasındaki benzerlik katsayılarını belirtmek için her seviyede *cluster* analizi yapılmıştır. Dendogramlardan ortaya çıkarılan gruplar, diğer tekniklerle elde edilen gruplarla benzer bulunmamıştır. Türleri ayırmak için izoesteraz kullanımının, tekrarlanabilir sonuçlarla basit, hızlı ve ucuz bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Carneiro ve ark. (1996), Brezilya Paran Eyaleti'nde kahve bitkisinde zarar yapan kök-ur nematodu, *Meloidogyne paranaensis*'i tanılamışlardır. Çalışmada biyokimyasal testler sonucu elde edilen esteraz (F1) ve malat dehidrogenaz (N1) fenotiplerinin, *M. paranaensis*'i diğer türlerden ayıran en kullanışlı karakterler olduğu bulunmuştur.

Kaşkavalı (1998), Aydın ilinde yazlık sebze yetiştirilen alanlarda kök-ur nematodlarının yaygın olduğunu, bu türlerin %80'ini *M. incognita*, %14.5'ini *M. javanica* ve %5.5'ini ise *M. hapla* olarak tanılandığını bildirmiştir.

Carneiro ve ark. (2000), Brezilya ve bazı Amerika ülkelerinden elde ettikleri kök-ur nematodlarının farklı türlerini tanılama için enzim fenotiplerini, özellikle esterazlar (EST), malat dehidrojenaz (MDH), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutamat-oksalasetat transaminaz (GOT) kullanmışlardır. Çalışma sonucunda esteraz aktivitesi oldukça polimorfik ve farklı türlerin tanımlanmasında yararlı bulunmuştur. Çalışmada bu enzimi kullanarak dört türü (*M. javanica*, *M. incognita*, *M. arenaria* ve *M. hapla*) tanımlamanın mümkün olduğu bulunmuştur. Ek olarak *M. coffeicola*, *M. paranensis*, *M. konaensis*, *M. exigua*, *M. graminicola*, *M. oryzae*, *M. Mayaguensis* olmak üzere 7 tür daha incelenmiş ve türlere özgü EST fenotipleri ortaya konulmuştur. EST ve MDH enzimleri *M. graminicola* ve *M. oryzae*'yi ayırt etmede olumlu sonuçlar verdiği bildirilmiştir.

Zijlstra (2000), yaptığı çalışmada kök-ur nematodlarından *M. chitwoodi*, *M. fallax* ve *M. hapla*'yı türü için spesifik bantlar veren primerlerin geliştirilmesini amaçlamıştır. PCR ürünlerinin DNA dizileri belirlendikten sonra polimorfik olan

bu DNA bandlarının PCR da üretilmesini sağlayarak daha uzun primerler tasarlamışlardır. Elde edilen primer çiftleri SCARs markerini üretmekte kullanmışlardır. Geliştirilen SCAR primerlerini kullanarak nematodun yumurta kümesi, larva ya da ergin dişisi kullanılarak *M. chitwoodi*, *M. fallax* ve *M. hapla*'dan elde edilen DNA'ları çoğaltılarak SCAR bandlarını elde etmiştir. 3 çift SCAR primerleri kullanarak özel olarak dizayn edilmiş, multiplex PCR yöntemi ile birden fazla türün bir PCR da ayırt edilmesi sağlanmıştır. Bu multiplex yöntemini kullanılarak tek larvadan kolaylıkla tür tespit edilebilmiştir. Bu çalışmada geliştirilen SCAR PCR yönteminin pratikte teşhis için kullanılma potansiyeline sahip olduğu ve RAPD markörlerini SCAR markörlerine çevirmenin faydaları tartışılmıştır.

Trudgill ve Blok (2001), *Meloidogyne* türlerinin morfolojik özelliklerinin birbirine benzerliği nedeniyle morfolojik yöntemlerle teşhis etmenin oldukça zor olduğunu bildirmişlerdir.

Wishart ve ark. (2002), 5S ve 18S primerleri ile *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* ve *M. hapla* türlerini birbirinden ayırt edebilmişlerdir. 28S ve 5S primerleri ile ise *M. chitwoodi* ve *M. fallax* türlerini *M. hapla*'dan ayırt edebilmişlerdir.

Devran ve ark. (2002), *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* ve *M. hapla*'nın rDNA'sının ITS bölgesini içeren fagmentleri PCR ile çoğaltmışlardır. PCR ürününü *RsaI* enzimi ile kesimi sonucu *M. hapla*'yı diğer türlerden ayırt etmişler, *EcoRI* ve *BamHI* enzimlerinin bu türleri ayırmakta etkisiz olduğunu sonucuna varmışlardır. Bu nedenle diğer türleri ayırmada mtDNA markörleri kullanılarak yapılan PCR sonucunda elde edilen 600bp'lik DNA fragmenti *HinfI* enzimi ile keserek türleri birbirinden ayırmayı başarmışlardır. Bu çalışmada mtDNA'nın önemli *Meloidogyne* türlerini ayırmada faydalı bir araç olabileceği saptanmıştır.

Randig ve ark. (2002), RAPD markörler kullanarak karakterizasyon yapmışlar ve kök ur nematodlarının akrabalıklarını incelemişlerdir. Bu amaçla *M.*

arenaria, *M. exigua* ve *M. hapla*'yı diğer türlerle karşılaştırmışlardır. Filogenetik analizde *M. hapla* ve *M. exigua*'nın diğer türlerle çok yakın oldukları bulunmuştur. Ayrıca çalışmada *M. arenaria*, *M. exigua* ve *M. hapla* teşhisleri için SCAR primerler geliştirmişlerdir. Üç çift SCAR primerle multipleks PCR yaparak bu türleri ayırabildiklerini ve rutin teşhislerde kullanabileceğini bildirmişlerdir.

Castillo ve Jimenez (2003), Güney İspanya'da yaptıkları çalışmada ticari ürünler yetiştirilen bir bölgede bitki köklerinde ve toprakta *M. incognita*'yı saptamışlardır. Dişi bireylerden perineal kesitler oluşturulmuş, farklı konukçu test bitkileri ve esteraz enzimi kullanarak elde edilen türün *M. incognita* olduğunu bulmuşlardır.

Tesarova ve ark. (2003), *M. incognita* türünü tanıyan spesifik primer dizayn etmişlerdir. Bu primerin *M. fallax*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. chitwoodi* ve *M. hapla*'yı tanımadığı sadece 502 bp bant vererek *M. incognita*'yı tanıdığını saptamışlardır.

Randig ve ark. (2004), Brezilya'da çeşitli ürünlerde ve kahve bitkilerinde zarar yapan *Meloidogyne* spp.'den en önemli türlerin *M. exigua*, *M. incognita* ve *M. paranaensis* olduğunu saptamışlardır. SCAR markörler kullanılarak yapılan çalışmada *M. exigua*'nın 562 bp, *M. incognita*'nın 399 bp ve *M. paranaensis*'nin ise 208 bp de bant oluşturmuştur. Multipleks PCR tekniğinin hızlı, kolay ve çok hassas olduğunu ve karışık türleri kolaylıkla ayırabildiğini bildirmişlerdir.

Cofcewiczve ark. (2005), yaptıkları çalışmada Martinique, Guadeloupe ve French Guiana'da bulunan muz üretim alanlarından elde ettikleri kök-ur nematodlarına ait 96 izolatin esteraz (EST) ve malat dehidrogenaz (MDH) fenotiplerini incelemişlerdir. Çalışmada incelenen *M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. cruciani*, *M. hispanica* ve *Meloidogyne* sp. türlerine ait ergin dişilerin yalnız esteraz enzimi için türe özgü fenotip gösterdiği bulunmuştur. *M. arenaria*, *M. incognita* ve *M. javanica* izolatları arasındaki intraspesifik değişkenlik ise EST ve MDH kullanılarak tespit edilmiştir. Sonuçların güvenilirliğini arttırmak için biyokimyasal karakterizasyonun tamamlayıcısı olarak perineal patern yöntemi

kullanılmıştır. Sonuçta en fazla bulunan türler *M. arenaria* (%61.9) ve *M. incognita* (%34.3) olmuştur. Örneklerin %45.1'inde birden fazla *Meloidogyne* türü bulunmuştur. Ek olarak RAPD markörleri kullanılarak genetik analizler yapılmıştır. RAPD analizlerinde elde edilen verilerin esterase fenotip karakterizasyonlarıyla uyumlu olduğu tespit edilmiştir. *M. incognita* ve *M. arenaria*'daki intraspesifik değişkenlik ise amplifiye edilmiş polimorfik fragmentlerin sırasıyla % 14.9 ve % 61.6'sını temsil etmiştir. Özellikle *M. arenaria* izolatlarındaki bu yüksek varyasyon düzeyinin, *M. arenaria* olarak tespit edilmiş olan popülasyonların çoklu kökene sahip olmasından veya aynı grupta birden fazla tür bulunmasından meydana gelmiş olabileceği düşünülmektedir.

Tzortzakakis ve ark. (2005), Yunanistan'da *Meloidogyne* spp.'nin 9 popülasyonunda yaptıkları çalışmada SCAR PCR ve izoenzim fenotipleri yöntemlerini kullanarak *M. javanica* ve *M. incognita* türlerini tespit etmişlerdir. Ayrıca bulunan *M. javanica* ve *M. incognita* popülasyonlarının virülensliklerini dayanıklı domates çeşidinde saksı denemesi yaparak incelemişlerdir. Dayanıklılığı kıran *M. incognita*'nın bir popülasyonu bu ülkede ilk defa tespit etmişlerdir.

Adam ve ark. (2007), en yaygın ve ekonomik öneme sahip kök ur nematodu türlerini ayıran moleküler yöntem geliştirmişlerdir. Bu oluşturdukları moleküler protokolle *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria*, *M. mayaguensis*, *M. hapla*, *M. chitwoodi* ve *M. fallax* türlerini birbirinden ayırmayı başarmışlardır.

Söğüt ve Elekcioglu (2007), Adana ilinde biber seralarında kök-ur nematodunun verdiği zarardan dolayı ortaya çıkan ürün kaybının yaklaşık %80'e kadar ulaşabildiğini bildirmişlerdir.

Brito ve ark. (2008), Florida'da esterase fenotipi kullanarak *M. mayaguensis*'i diğer *Meloidogyne* türlerinden ayırmışlardır.

Ercan ve Elekcioglu (2009), 17 yabancı ot türünün köklerinde *M. arenaria*, *M. javanica* ve *M. incognita*'yı saptamışlar ve örneklerin %48'inde *M. javanica*, %44'ünde *M. incognita* ve %8'inde ise *M. arenaria* tespit etmişlerdir.

Özarslandan ve Elekcioglu (2010), Türkiye genelinden toplanan 79 Kök-ur nematodu popülasyonundan *M. chitwoodi*, *M. incognita*, *M. javanica* ve *M. arenaria* türlerini saptanmış, tanımlanan kök-ur nematod popülasyonlarından %10'u *M. chitwoodi*, %28'i *M. incognita*, %35'i *M. javanica* ve %27'si *M. arenaria* olarak teşhis edilmiştir.

Çetintaş ve Çakmak (2011), yaptıkları çalışmada Kahramanmaraş ili ve çevresinde üretilen domates, hıyar ve patlıcan bitkilerinde tespit edilen *Meloidogyne* spp.'nin morfolojik ve biyokimyasal yöntemlerle tanılamayı amaçlamışlardır. PAGE (Poliakrilamid Jel Elektroforez) yöntemi ve ergin dişi bireylerin perineal anal kesit yöntemi kullanılarak yapılan çalışma sonucu *Meloidogyne incognita* ile bulaşıklık oranının %20 olduğu tespit edilmiştir. Biyokimyasal ve klasik teşhis yöntemlerinin birlikte kullanılmasının, sonuçların doğruluğunu ve güvenilirliğini kesinleştirdiğini açıklamışlardır.

Evlice ve Bayram (2016), Orta Anadolu Bölgesi'ndeki kök-ur nematodu türlerinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada Niğde, Nevşehir, Aksaray, Isparta, Kayseri ve Konya illerinden toplam 73 adet enfekteli patates yumrusu toplayarak tüm örneklerde moleküler yöntemlerle (JMV1/JMV2/JMVhapla multiplex PCR primerleri ve türe spesifik FC/RC primerleri ile sekans analizi kullanılmıştır), seçilen 15 örnekte ise morfolojik ve morfometrik yöntemlerle tür teşhisi yapmışlardır. Sonuçta yalnızca *M. chitwoodi* türü tespit edilmiş olup diğer bitki paraziti nematodların varlığına ait bir iz bulunmamıştır.

Kolombia ve ark. (2017), *Meloidogyne* türlerinin Batı Afrika'da yam (*Dioscorea* spp.) bitkisi üretiminde önemli bir tehdit oluşturduğunu bildirmişler. Kontrol ve direnç taraması amacıyla, yam yumrularında zarara sebep olan BPN türlerinin çeşitliliğini belirlemek amacıyla yapılan çalışma, Nijerya'nın ana yam üretim bölgelerinde yürütülmüştür. Yam yumrularından izole edilen nematodlar, enzim fenotiplendirme (esteraz ve malat dehidrogenaz), mitokondriyal DNA (mtDNA) ve NADH dehidrogenaz altbirim 5 (Nad5) barkodlama kullanılarak tanımlanmıştır. 48 popülasyonun incelenmesi sonucu, yam yumrularının %69

oranında *Meloidogyne incognita* tarafından enfekte edildiği, bunu %13 enfeksiyon oranıyla *M. javanica*, %2 enfeksiyon oranıyla *Meloidogyne enterolobii* ve %2 enfeksiyon oranıyla *M. arenaria*'nın izlediği ortaya koyulmuştur. Örneklenen yumruların çoğunda %86 oranında tek bir tür, örneklerin %14'ünde birden fazla tür tespit edilmiştir. Her iki tanılama yönteminin sonuçları benzer bulunmuş ve bu tropikal nematod türünün tanınması için bu yöntemlerin doğruluğu kanıtlanmıştır.

Uysal ve ark. (2017), yaptıkları çalışmada 2014-2015 yılları arasında göller yöresinde bulunan sebze üretim alanlarından topladıkları toprak ve bitki örneklerinde kök ur nematodu türlerinin yayılışlarını belirlemişlerdir. Morfolojik ve moleküler analizler sonucu *M. incognita*, *M. hapla*, *M. javanica* ve *M. arenaria* türlerinin varlığı tespit edilmiş olup, Kuzey Karolina Konukçu Testi yapılarak bu türlerden *M. incognita*'nın ırk2, ırk4 ve ırk6'sı; *M. javanica*'nın ise ırk1 ve ırk3'ü belirlenmiştir.

Gerič Stare ve ark. (2017), *M. ethiopica*'nın yakın türü olan *M. luci*'nin tanımlanmasının ardından bu iki tür arasındaki farkın ortaya konularak yeniden sınıflandırma yapılması gerektiğini belirtmişlerdir. Bu amaçla yapılan esterase enzim analizlerinde her iki tür de, üst bandın iki tür arasında hafifçe kaydığı üç bantlı bir esterase modeli göstermektedir. Ek olarak, *M. ethiopica* ve *M. luci* popülasyonlarının moleküler karakterizasyonu, rDNA bölgelerinin ITS, SSU ve LSU'larının kök-ur nematodlarının tropikal grubu arasındaki benzerlikleri incelemek için uygun belirteçler olmadığını ortaya koymuştur. Bununla birlikte, mtDNA üzerindeki COII/IRNA bölgesi, çok yakın akraba olan tür popülasyonlarının filogenetik ilişkisinin analizinde çok faydalı olduğunu kanıtlamıştır. Düşük heteroplazmi seviyelerine sahip olan mitokondriyal sekanslar, bütün *M. luci* popülasyonlarının bir arada toplanarak, bu yakın olan türlerin *M. ethiopica*'dan net bir şekilde ayrılmasına olanak sağlamaktadır. Aynı zamanda, *M. ethiopica* ve *M. luci* arasında çok yakın bir ilişki olduğu tekrar belirtilmektedir.

Aydınlı (2018), Samsun ili sebze üretim alanlarındaki *Meloidogyne* türlerinin dağılımını ortaya koymak için yaptığı çalışmada, toplam 50 adet toprak örneğini esteraz enzim fenotipi ve moleküler yöntemler kullanarak analiz etmiştir. Çalışma sonunda örnekleme yapılan alanların %20'sinde kök ur nematodu varlığı tespit edilmiş ve en yaygın türlerin sırasıyla *M. luci*, *M. arenaria* ve *M. incognita* olduklarını bildirmiştir.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Araştırma materyalini 2018-2019 yılları arasında Doğu Akdeniz Bölgesi sebze üretim alanlarından; Adana, Mersin ve Hatay il ve ilçelerinde örtüaltında yetiştirilen domates (*Solanum lycopersicum*), biber (*Capsicum annum*), hıyar (*Cucumis sativus*), patlıcan (*Solanum melongena*) bitkilerinden toplanan kökler ve kök-ur nematodları (*Meloidogyne* spp.) oluşturmuştur. Sörveyler sırasında toplanan örnekler Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Nematoloji Laboratuvarı'na getirilerek uygun koşullarda muhafaza edilmiştir. Nematoloji Laboratuvarı'nda kök-ur nematodların yumurta paketi, dişi ve larvaların elde edilmesi çalışmaları yürütülmüş olup moleküler ve biyokimyasal çalışmalar Viroloji Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

3.1.1. Kök-ur nematodu popülasyonlarının toplanması

Doğu Akdeniz örtüaltı sebze üretimi alanlarından 2018 yılı Nisan-Mayıs-Haziran aylarında domates, biber, hıyar ve patlıcan bitkilerinin yetiştirildiği alanlarda sörveyler yapılmıştır. Sörveyler sırasında nematodun yapmış olduğu sararma, solgunluk, bodurluk gibi simptomlar dikkate alınarak örnekleme yapılmıştır. Örnek alma metodu (örnekleme alanın %0,1) kullanılarak Bora ve Karaca (1970)'ya göre toplam 100 kök örneği alınmıştır. Her bir örnekleme için bitki kılcal kökleri ile birlikte alınıp polietilen poşetlere konulmuş ve laboratuvara getirilmiştir (Şekil 3.1; Şekil 3.2; Şekil 3.3; Şekil 3.4; Şekil 3.5; Şekil 3.6; Şekil 3.7.). Örnekleme lokasyonları GPS yardımıyla işaretlenmiştir (Çizelge 3.1.).



Şekil 3.2. Kök-ur nematodu ile bulaşık biber serası Adanalıoğlu yöresi



Şekil 3.1. Kök-ur nematodu ile bulaşık biber serası Kazanlı yöresi



Şekil 3.4. Kök-ur nematodu ile bulaşık hıyar serası Aydıncık yöresi



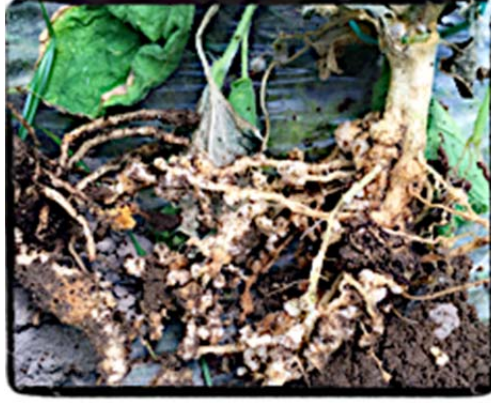
Şekil 3.3. Kök-ur nematodu ile bulaşık patlıcan serası Aydıncık yöresi



Şekil 3.6. Kök-ur nematodu ile bulaşık patlıcan serası Tarsus yöresi



Şekil 3.5. Kök-ur nematodu ile bulaşık domates serası Samandağ yöresi



Şekil 3.7. Kök-ur nematodunun hıyar bitkisi köklerindeki yoğun zararı

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan konukçu bitki, nematodun bulunma durumu ve örneklerin toplandığı lokasyonlara ait GPS verileri.

No	Kod adı	Konukçu bitki	Nematod durumu	Koordinatlar (N : E)	
ADANA / YUMURTALIK					
1	Y1	Domates	Negatif	36° 72' 36"	35° 58' 11"
2	Y2	Domates	Negatif	36° 72' 74"	35° 58' 44"
3	Y3	Domates	Negatif	36° 72' 44"	35° 58' 03"
4	Y4	Domates	Negatif	36° 77' 60"	35° 78' 85"
5	Y5	Domates	Negatif	36° 73' 06"	35° 58' 27"
ADANA / KARATAŞ					
6	KT1	Domates	Pozitif	36° 71' 18"	35° 14' 51"
7	KT2	Domates	Pozitif	36° 73' 99"	35° 17' 45"
8	KT3	Domates	Negatif	36° 74' 01"	35° 17' 35"
9	KT4	Hıyar	Negatif	36° 73' 70"	35° 16' 04"
10	KT5	Hıyar	Negatif	36° 70' 69"	35° 14' 90"
11	KT6	Domates	Pozitif	36° 71' 47"	35° 17' 98"
12	KT7	Hıyar	Pozitif	36° 72' 72"	35° 57' 60"
MERSİN / KAZANLI					
13	KZ1	Biber	Pozitif	36° 82' 57"	34° 76' 68"
14	KZ2	Biber	Pozitif	36° 82' 48"	34° 76' 73"
15	KZ3	Biber	Pozitif	36° 82' 78"	34° 76' 79"
16	KZ4	Biber	Pozitif	36° 82' 63"	34° 76' 81"

Çizelge 3.1.'in devamı

17	KZ5	Biber	Pozitif	36° 82' 78"	34° 73' 37"
18	KZ6	Biber	Pozitif	36° 82' 23"	34° 77' 56"
19	KZ7	Biber	Pozitif	36° 82' 15"	34° 77' 41"
20	KZ8	Biber	Pozitif	36° 82' 23"	34° 76' 50"
21	KZ9	Biber	Pozitif	36° 83' 26"	34° 74' 19"
22	KZ10	Biber	Pozitif	36° 81' 39"	34° 75' 42"
23	KZ11	Biber	Pozitif	36° 83' 85"	34° 74' 18"
24	KZ12	Biber	Pozitif	36° 81' 37"	34° 78' 24"
25	KZ13	Biber	Pozitif	36° 81' 37"	34° 78' 24"
26	KZ14	Biber	Pozitif	36° 81' 04"	34° 78' 90"
27	KZ15	Biber	Negatif	36° 81' 42"	34° 74' 52"
28	KZ16	Biber	Negatif	36° 81' 28"	34° 74' 75"
29	KZ17	Biber	Negatif	36° 81' 45"	34° 75' 25"
30	KZ18	Biber	Negatif	36° 81' 37"	34° 75' 45"
31	KZ19	Biber	Negatif	36° 81' 26"	34° 75' 44"
32	KZ20	Biber	Negatif	36. 81' 29"	34° 75' 32"
MERSİN / ADANALIOĞLU					
33	AL1	Biber	Pozitif	36° 83' 63"	34° 80' 90"
34	AL2	Biber	Pozitif	36° 83' 63"	34° 81' 00"
35	AL3	Biber	Pozitif	36° 83' 56"	34° 81' 09"
36	AL4	Biber	Pozitif	36° 83' 69"	34° 81' 29"
37	AL5	Biber	Pozitif	36° 83' 56"	34° 81' 63"
38	AL6	Biber	Pozitif	36° 83' 40"	34° 81' 74"
39	AL7	Biber	Pozitif	36° 83' 15"	34° 81' 50"
40	AL8	Biber	Pozitif	36° 83' 13"	34° 81' 28"
41	AL9	Biber	Pozitif	36° 83' 07"	34° 81' 62"
42	AL10	Biber	Pozitif	36° 82' 79"	34° 81' 92"
43	AL11	Biber	Pozitif	36° 82' 73"	34° 82' 58"
44	AL12	Biber	Pozitif	36° 82' 18"	34° 80' 98"
45	AL13	Biber	Pozitif	36° 81' 26"	34° 81' 55"
46	AL14	Biber	Pozitif	36° 80' 90"	34° 80' 89"
47	AL15	Biber	Pozitif	36° 82' 96"	34° 80' 47"
48	AL16	Biber	Negatif	36° 81' 27"	34° 80' 30"
49	AL17	Biber	Negatif	36° 81' 27"	34° 80' 10"
50	AL18	Biber	Negatif	36° 81' 40"	34° 80' 04"
51	AL19	Biber	Negatif	36° 81' 50"	34° 80' 03"

3. MATERYAL VE METOD

Ayşenur ASLAN

Çizelge 3.1.'in devamı

52	AL20	Biber	Negatif	36° 81' 66"	34° 80' 06"
MERSİN / SİLİFKE					
53	SL1	Domates	Pozitif	36° 39' 04"	34° 05' 70"
54	SL2	Domates	Negatif	36° 39' 42"	34° 05' 68"
MERSİN / TARSUS					
55	T1	Hıyar	Pozitif	36° 82' 68"	34° 87' 76"
56	T2	Biber	Pozitif	36° 81' 92"	34° 87' 76"
57	T3	Patlıcan	Pozitif	36° 79' 85"	34° 87' 90"
58	T4	Biber	Pozitif	36° 79' 77"	34° 87' 87"
59	T5	Patlıcan	Pozitif	36° 79' 77"	34° 87' 81"
60	T6	Patlıcan	Pozitif	36° 79' 67"	34° 87' 81"
61	T7	Patlıcan	Pozitif	36° 79' 63"	34° 87' 83"
62	T8	Biber	Pozitif	36° 79' 70"	34° 87' 87"
63	T9	Patlıcan	Pozitif	36° 80' 31"	34° 86' 69"
64	T10	Fasulye	Pozitif	36° 80' 29"	34° 86' 67"
65	T11	Biber	Pozitif	36° 80' 27"	34° 86' 63"
66	T12	Biber	Pozitif	36° 80' 26"	34° 86' 66"
67	T13	Biber	Pozitif	36° 80' 26"	34° 86' 67"
68	T14	Biber	Pozitif	36° 80' 30"	34° 86' 64"
69	T15	Biber	Pozitif	36° 80' 86"	34° 86' 12"
70	T16	Patlıcan	Negatif	36° 81' 76"	34° 88' 87"
71	T17	Patlıcan	Negatif	36° 81' 57"	34° 88' 93"
72	T18	Biber	Negatif	36° 81' 45"	34° 88' 70"
MERSİN / ERDEMLİ					
73	E1	Domates	Pozitif	36° 60' 46"	34° 26' 14"
74	E2	Domates	Pozitif	36° 60' 55"	34° 26' 22"
75	E3	Domates	Pozitif	36° 60' 16"	34° 27' 37"
76	E4	Domates	Pozitif	36° 60' 06"	34° 27' 40"
77	E5	Domates	Pozitif	36° 60' 26"	34° 26' 90"
78	E6	Domates	Pozitif	36° 60' 58"	34° 26' 42"
79	E7	Domates	Pozitif	36° 60' 88"	34° 25' 24"
80	E8	Domates	Pozitif	36° 60' 54"	34° 25' 26"
81	E9	Hıyar	Pozitif	36° 60' 42"	34° 26' 64"
82	E10	Domates	Pozitif	36° 60' 37"	34° 26' 59"
83	E11	Domates	Negatif	36° 60' 48"	34° 25' 81"
84	E12	Domates	Negatif	36° 60' 45"	34° 25' 72"

Çizelge 3.1.'in devamı

85	E13	Domates	Negatif	36° 60' 36"	34° 25' 65"
86	E14	Domates	Negatif	36° 60' 33"	34° 25' 66"
87	E15	Domates	Negatif	36° 60' 36"	34° 25' 90"
MERSİN / AYDINCIK					
88	AY1	Hıyar	Pozitif	36° 14' 69"	33° 32' 24"
89	AY2	Hıyar	Pozitif	36° 16' 13"	33° 33' 84"
90	AY3	Hıyar	Pozitif	36° 16' 08"	33° 36' 31"
91	AY4	Hıyar	Pozitif	36° 16' 25"	33° 38' 28"
92	AY5	Patlıcan	Pozitif	36° 15' 90"	33° 37' 55"
93	AY6	Patlıcan	Pozitif	36° 14' 73"	33° 32' 23"
94	AY7	Hıyar	Pozitif	36° 14' 71"	33° 32' 21"
HATAY / SAMANDAĞ					
95	SD1	Domates	Pozitif	36° 07' 36"	35° 98' 55"
96	SD2	Domates	Pozitif	36° 07' 30"	35° 98' 57"
97	SD3	Domates	Pozitif	36° 06' 92"	35° 98' 80"
98	SD4	Domates	Negatif	36° 06' 96"	35° 99' 00"
99	SD5	Domates	Negatif	36° 03' 89"	35° 98' 11"
100	SD6	Domates	Negatif	36° 04' 03"	35° 98' 23"

3.1.2. Kök-ur nematodlarının izolasyonu

Araştırmada her bir seradan alınan kök-ur nematoduyla bulaşık bitkiye bir popülasyon kodu verilmiştir. Araştırma süresince yapılan çalışmalar için izolasyonlar toplanan popülasyonlardan elde edilmiştir.

3.1.2.1. Kök-ur nematodu yumurta paketlerinin elde edilmesi

Yumruta paketleri moleküler çalışmalarda DNA kaynak materyali olarak kullanılacak olan ikinci dönem larva elde edilmesinde kullanılmıştır.

Her bir örnekten 5 tekerrür olacak şekilde dişi ve o dişinin oluşturduğu yumurta paketi seçilerek aynı popülasyon kodu verilmiş ve dişi birey PAGE testlemelerinde kullanılmıştır.

Seralardan rastgele örnekleme yapılarak getirilen urlu bitki kökleri zarar görmeyecek şekilde su ile yıkanıp toprağından arındırılmıştır. Her bir popülasyon

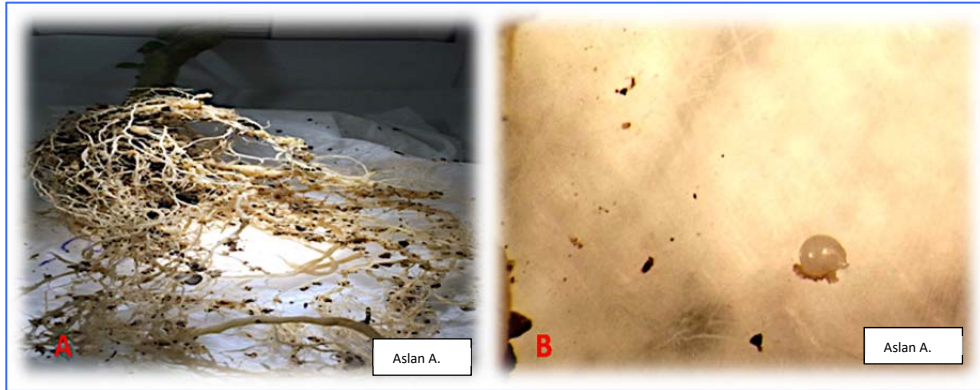
için 1 yumurta paketi binoküler altında pens, iğne ve bistüri yardımıyla toplanıp eppendorf tüplerine koyularak +4°C muhafaza edilmiştir. Toplanan yumurta paketleri daha sonra larva elde edilmesi için kullanılmıştır (Şekil 3.8.).

3.1.2.2. Kök-ur nematodu larvaların elde edilmesi

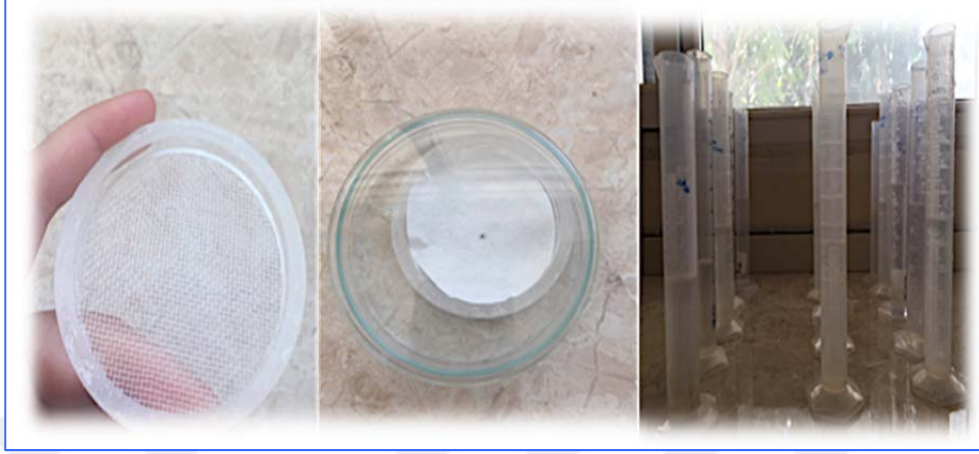
Her bir popülasyon için toplanan 1 yumurta paketi geliştirilmiş Baermann – Huni yöntemi (Hooper, 1986) ile larva elde edilmiş ve DNA izolasyonu için - 20°C’ de muhafaza edilmiştir (Şekil 3.9.)

3.1.2.3. Kök-ur nematodu dişilerinin elde edilmesi

Tanılamada kullanılan her bir popülasyon için alınan 1 yumurta paketinin altında olan o yumurta paketini oluşturmuş dişi ile eşleşecek şekilde dişi çıkartılmıştır. 0,2 ml’lik eppendorf tüplerine 5 µl saf su koyularak çıkartılan dişi tüp içine yerleştirilmiştir. Etiketleme yapılarak PAGE yönteminde kullanmak için - 20 °C’de muhafaza edilmiştir (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. Kök-ur nematodu A; yumurta paketi ile bulaşık kök, B; dişi



Şekil 3.9. Geliştirilmiş Baerman-Huni yöntemi ile kök-ur nematodu larva elde edilme aşamaları.

3.2. Metod

3.2.1. Moleküler Yöntem

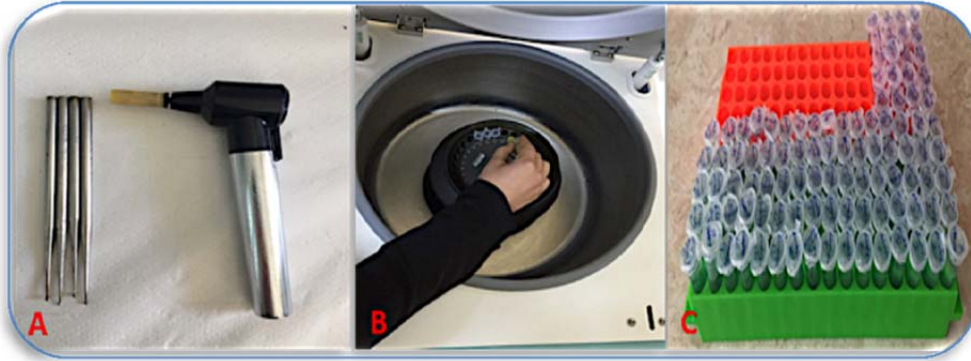
3.2.1.1. Kök-ur nematodu popülasyonlarının moleküler tanılanması

3.2.1.1.(1). DNA ekstraksiyonu

Kök-ur nematodu popülasyonlarının DNA ekstraksiyonunda larva kullanılarak Dong ve ark. (2001) ve Ahrens ve Seemüller (1992)'in kullandığı yöntemlerde modifikasyonlar yapılarak uygulanmıştır (Şekil 3.10.). DNA ekstraksiyonu aşağıda ki basamaklara göre gerçekleştirilmiştir.

- 1- Eppendorf tüpleri içerisine konulan larva üzerine 75 µl CTAB buffer (EK 1.) eklenerek rotör pellet pestle aleti yardımı ile ezilmiş ve üzerine 125 µl CTAB buffer eklenerek vorteks yapılmıştır.
- 2- Ekstraksiyon 95 °C 'de 15 dakika su banyosunda bekletilmiştir.
- 3- Daha sonra ekstraksiyon 65°C de 30 dakika su banyosunda bekletilmiştir.
- 4- 200 µl CTAB buffer eklenerek ekstraksiyon 400 µl CTAB buffer tamamlanmıştır.

- 5- Daha sonra parçalama için tüpler içerisine 1 birim (400 µl) chloroform/ izoamylalkol (24:1) ilave edilerek 1 dakika süreyle vorteks yapılmıştır.
- 6- Tüpler 12.000 rpm de 12 dakika santrifüj edilmiştir.
- 7- Üst fazdan 300 µl alınarak yeni eppendof tüplerine aktarılmıştır.
- 8- Yeni tüpe aktarıldıktan sonra üzerine 1 birim (300 µl) chloroform eklenerek tekrar 1 dakika süreyle vorteks yapılmıştır.
- 9- Tüpler 12.000 rpm’de 12 dakika tekrar santrifüj edilmiştir.
- 10- Üst fazadan 200 µl alınarak yeni eppendoflara aktarılıp tüplerin üzerine 2/3 oranında soğuk isopropanol ilave edilip -20 °C de 20 dakika bekletilmiştir.
- 11- Daha sonra tüpler 12.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildikten sonra üzerindeki sıvı dökülerek, pellet %70’lik etil alkol ile yıkanıp oda sıcaklığında kurutulmuştur.
- 12- Son olarak pellet 50 µl ddH₂O ile çözündürülerek elde edilen DNA’lar kullanılıncaya kadar -20 °C lik derin dondurucuya konulmuştur.



Şekil 3.10. A; rotör pellet pestle, B; soğutmalı santrifüj, C; DNA içeren eppendorflar

3.2.1.1.(2). Türlerle spesifik primerler kullanılarak moleküler tanılama

PCR çalışmaları, kök-ur nematodlarının moleküler tanılamalarında *M. incognita* için MiF/MİR, *M. javanica* için FJAV/RJAV, *M. arenaria* için

FAR/RAR ve *M. hapla* JMV/JMV1/JMV2 spesifik primer çiftleri kullanılmıştır (Çizelge 3.2.).

3.2.1.1.(3). Polimeraz zincir reaksiyonu çalışmaları (PCR)

PCR karışımında, 2 µl DNA, 1 µl dNTPs (10 mM), 5 µl Dream Taq green buffer (10X), 1 µl R primeri (10 pmol), 1 µl F primeri (10 pmol), 0.25 µl Dream Taq DNA polymerase (5u/µl) ve 39,75 µl ddH₂O eklenerek karışım 50 µl'ye tamamlanarak önceden programlanmış olan Termocycle'a konularak program başlatılmıştır. Her primer çifti için uygulanan PCR döngüleri Çizelge 3.3.'te verilmiştir.

Çizelge 3.2. PCR çalışmalarında kullanılan türlere spesifik primerler

Primer	Baz dizilimi (5'-3')	Baz uzunluğu	Tanımladığı Nematodlar	Referans
FJAV	GGTGC GCGATTGAACTGAGC	670 bp	<i>M. javanica</i>	Zijlstra ve ark., 2000
RJAV	CAGGCCCTTCAGTGGA ACTATAC			
FAR	TCGGCGATAGAGGTAAATGAC	420 bp	<i>M. arenaria</i>	Zijlstra ve ark., 2000
RAR	TCGGCGATAGACACTACAACT			
METH	ATGCAGCCGCAGGGAACGTAGTT	350 bp	<i>M. ethiopica</i>	Correa ve ark., 2014
F	G			
METH R	TGTTGTTTCATGTGCTTCGGCATC			
MIF	GTGAGGATTCACCTCCCCAG	955 bp	<i>M. incognita</i>	Meng ve ark., 2004
MIR	ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC			
JMV	GGATGGCGTGCTTTCAAC	440 bp	<i>M. hapla</i>	Wishard ve ark., 2002
JMV1	TTTCCCTTATGATGTTTACCC			
JMV2	AAAAATCCCCTCGAAAAATCCAC C			

Çizelge 3.3. Türler için spesifik primer çiftleri için uygulanan Termocycle döngüleri

MIF / MIR & FJAV / RJAV	JMV / JMV1 / JMV2	FAR / RAR	METH F/METH R	
95 °C'de 3 dk	95 °C'de 3 dk	95 °C'de 3 dk	95 °C'de 3 dk	
95°C'de 60 sn	95°C'de 45 sn	95°C'de 30 sn	95°C'de 45 sn	} 35 döngü
59°C'de 60 sn	53°C'de 45 sn	56°C'de 30 sn	60°C'de 45 sn	
72°C'de 60 sn	72°C'de 45 sn	72°C'de 45 sn	72°C'de 45 sn	
72°C'de 7 dk	72°C'de 7 dk	72°C'de 7 dk	72°C'de 7 dk	

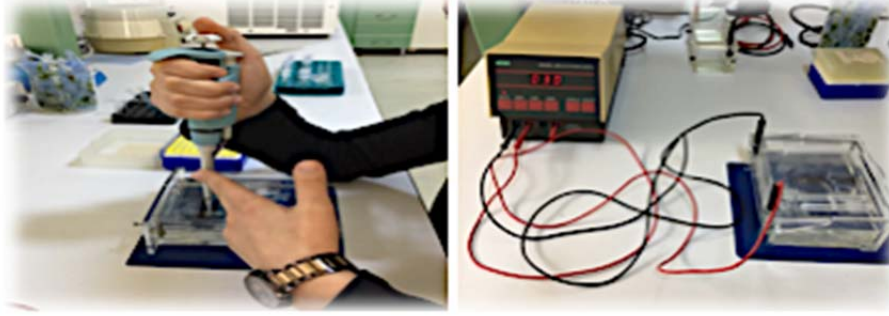
3.2.1.2. Agaroz jel elektroforez çalışmaları

Agaroz jel elektroforez çalışmaları Galitelli ve Minafra (1994)'nın önerdiği yönetime göre yapılmıştır. Primerlerin kullanılması ile beklenen PCR ürünü büyüklüklerine göre agaroz jel konsantrasyonları ayarlanmış olup *M. incognita* için %1'lik, *M. javanica* için %1.5'luk, *M. arenaria* ve *M. hapla* için %2'lik agaroz jel aşağıda belirtilen basamaklara göre uygulanmıştır (Şekil 3.11.).

- Konsantrasyona bağlı olarak agaroz miktarı 20 ml 1x TAE buffer içeren erlen içerisine konulmuş ve alüminyum folyo ile kapatılmıştır.
- Agaroz TAE karışımı kaynayınca ve agaroz eriyinceye kadar ısıtılmış ve sonra hacim 20 ml'ye ayarlanmıştır.
- Karışım tekrar 60°C'ye kadar soğumaya bırakılmış ve tank içerisine boşaltılarak elektroforez targağı yerleştirilmiştir.
- Jel donduktan sonra tarak dikkatli bir şekilde çıkartılmıştır. Daha sonra jelin üzerini 1-2 mm kaplayınca kadar tank içerisine TAE eklenmiştir.
- Jelde oluşan çukurlara 10 µl örnek yüklenmiştir. İlk çukura marker (1µl yükleme tamponu + 1µl marker + 4µl H₂O) konulmuştur.
- Daha sonra jel 1 cm'ye 5 volt olacak şekilde 90 dakika yürütülmüştür.
- Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel, oda sıcaklığında 10 dakika ethidium bromide karışımı (70 ml H₂O + 30 µl (10 mg ethidium bromide /1

ml H₂O)) içerisinde boyanmıştır. Jeldeki fazla ethidium bromide uzaklaştırılması için 10 dk süreyle su içerisinde bekletilmiştir.

h. UV transilluminatör yardımı ile jel görüntülenmiştir.



Şekil 3.11. Örneklerin jel elektroforeze yüklenmesi ve yürütülmesi

3.2.1.3. DNA dizileme ve sekans

3.2.1.3.(1). Saptanan kök-ur nematod türlerinin filogenetik analiz çalışmaları

PCR çalışmaları sonucunda görüntülenen ve türlere ait PCR ürünleri DNA dizilenmesi amacıyla Altıgen Bio firmasına gönderilmiş ve DNA dizilemeler yaptırılmıştır. DNA dizileme için 46 popülasyondan pozitif sonuç veren yöreleri temsil edecek şekilde her yöreden 1 popülasyon seçilmiştir. *M. incognita* için Karataş, Kazanlı, Adanalıoğlu, Tarsus, Erdemli, Aydınçık ve Samandağ dan 1'er popülasyon örneği olmak üzere toplam 7 örnek, *M. javanica* için Kazanlı, Erdemli, Aydınçık ve Samandağ dan 1'er popülasyon olmak üzere toplam 4 örnek seçilmiştir. *M. incognita* için forward ve reverse olarak çift yönlü, *M. javanica* için forward primeri ile tek yönlü olarak DNA dizileme yaptırılmıştır. Örnekler ait dizilerden *M. incognita*'nın F ve R dizileri Mega X programı kullanılarak contig (birleştirme) yapılmıştır. *M. javanica* dizileri tek yönlü sentezlendiği için birleştirme işlemi yapılmamıştır. DNA dizileri daha sonra NCBI da BLAST yapılarak kontrol edilmiştir. BLAST tan sonra kendi izolatalarımıza yakın ve uzak

izolatlar NCBI dan alınmış ve Meaga X programı kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

İzolatların evrimsel tarihi Neighbor-Joining metodu ile, (Saitou N. ve Nei M. (1987) 1000 defa tekrarlı olarak karşılaştırılması sonucunda bootstrap ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Felsenstein J., 1985). Bootstrap testinde sınıflandırmada tekrarlanan ağaçların yüzdeliği bölümlerin yanında gösterilmiştir (Felsenstein, 1985). Filogenetik ağacın çıkarılması için kullanılan evrimsel uzunluklar olarak aynı bölümlerde bölüm uzunluğu ile ağaç skala için çizilmiştir. Evrimsel uzunluklar Maximum Composite Likelihood metodu kullanılarak hesaplanmıştır (Tamura K., Nei M., ve Kumar S. (2004)) bu uzaklıklar her bölüm için baz yer değişim sayılarının ünitesindedir. Her iki tür için evrimsel analizler MEGA (X)' de yürütülmüştür (Kumar ve ark., 2018).

M. javanica'nın filogenetik analizi için ağaçta 17 izolata ait DNA nükleotit dizilemesi kullanılmış, tüm belirsiz durumlar, her bir dizileme bölümü için uzaklaştırılmıştır.

M. incognita'nın filogenetik analizi için ağaçta 23 izolata ait DNA nükleotit dizilemesi kullanılmıştır. Tüm belirsiz durumlar her bir dizileme bölümü için uzaklaştırılmıştır.

Filogenetik analiz yardımı ile izolatların kendi arasında ve dünyadaki aynı türe ait farklı izolatlar ile akrabalık ilişkileri ortaya konulmuştur.

3.2.2. Poliakrilamid jel elektroforez Yöntemi (PAGE)

Meloidogyne türleri için enzim fenotipleri ilk kez 1971 yılında tanımlanmıştır. Toplam 27 protein çeşidi vardır, bunlardan en yaygın olarak kullanılanı Esterase (EST), Malate dehydrogenase (MDH), Superoxide dismutase (SOD) ve Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT)'dır. İzoenzim analizi yalnızca genç ergin dişiler için uygulanabilmektedir ve güvenilir bir yöntemdir. Proteinlerin izozim analizleri ve genetik çeşitliliklerinde en iyi sonuç veren elektroforez ortamı poliakrilamid jel elektroforez (PAGE)'dir. En önemli avantajı;

jel yoğunluğunun kesin olarak belirlenip değiştirilebilmesi olmuştur. Bu şekilde por büyüklüğünün jel konsantrasyonu ile istenilen şekilde ayarlanması sağlanmıştır. Jel yoğunluğunun artırılması, gözenek çaplarının küçülmesiyle sonuçlanmış ve jel bir moleküler elek gibi ayrıştırmayı sağlamıştır. Dünyada ve ülkemizde yaygın olarak bulunan *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* ve *M. hapla*'nın tanımlanmasında kullanılmaktadır (Barker, 1985).

3.2.2.1. PAGE yöntemi ile kök-ur nematodlarının tanımlanmasında yapılan çalışmalar

3.2.2.1.(1). Elektroforez yönteminde kullanılacak solüsyonların hazırlanması

Örnek buffer solüsyonunun hazırlanması: Ependorf tüplerinde bulunan her bir kök-ur nematodu dışısının ezileceği bufferın hazırlanmasında; cam bir kap içerisine 5.55 ml saf su, 3.0 ml Glyserol, 1.25 ml pH 6.8'lik jel buffer ve 5µg Bromophenol Blue kimyasalları eklenerek elde edilen solüsyon 20 dk karıştırılmıştır. Daha sonra alüminyum folyo ile kaplı 50 ml'lik cam şişenin içinde, +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Kök-ur nematodları dişi bireylerinin alınması ve örnek bufferında muhafazası: Araziden toplanan urlu bitki kökleri stereo-mikroskop altında bistüri yapıdımıyla kesilerek, kök parçalarının içinden alınan kök-ur nematodu dişileri her biri ayrı ayrı, içerisinde 5 µl saf su ve 5 µl örnek bufferdan oluşan 10 µl'lik solüsyonda ependorf tüplerine (her tüpe bir dişi olacak şekilde) konulmuştur. Daha sonra pipet ucu ile ezilerek ekstraksiyonu yapılmış ve PAGE yönteminde kullanılmak üzere +4 °C'deki buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Akrilamid/Bis solüsyonunun hazırlanması: Elektroforezde koşturucu ve tamamlayıcı jelin bir kısmını oluşturacak olan Akrilamid/Bis solüsyonunun hazırlanmasında, 100 ml saf su içerisine 29.2 g Akrilamid ve 0.8 g NN methylene bis akrilamid 70 ml saf su içerisinde çözülmüştür. Solüsyon +4 °C'deki buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Jel buffer-1 (pH: 8.8)'in hazırlanması: Koşturucu jelde kullanılacak 18.15 g Trizma-base, 70 ml saf suyun içerisine konulmuş ve karıştırıcıda eritilerek pH'ı 8.8'e ayarlandıktan sonra 100 ml'ye tamamlanmıştır ve +4 °C de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Jel buffer-2 (pH: 6.8)'nin hazırlanması: Bu solüsyon için 6 g Trizma-base 80 ml saf su içinde eritildikten sonra pH'ının 6.8 olarak ayarlanmış ve saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Amonyum Persülfat (APS) solüsyonunun hazırlanması: 100 mg amonyum persülfat 1 ml saf suda eritilerek +4 °C'deki buzdolabında muhafazaya alınmıştır.

N-Butanol solüsyonunun hazırlanması: N-Butanol solüsyonunun hazırlanması için %50 saf su ve %50 N-Butanol, 200 ml'lik cam şişe içerisine alınmış ve 10 sn kadar bir süre elle çalkalanmıştır.

Elektrot buffer solüsyonunun hazırlanması (10x): Elektrot buffer solüsyonu için 144.0 g Glycine ve 30.3 g Trizma Base 700 ml saf su içeririnde eritildikten sonra 1000 ml'ye tamamlanmış ve +4 °C'de buzdolabında muhafaza altına alınmıştır. Bu bufferın elektrota konulması aşamasında 1X olarak seyreltilmiştir.

Potasyum fosfat bufferın hazırlanması (pH:6): Potasyum fosfat bufferın hazırlanmasında öncelikli olarak X1 ve X2 solüsyonları yapılmıştır. X1 solüsyonu için 50 ml monobasic solüsyonu 900 ml saf su içerisine eklenerek pH'sı 6 olarak ölçülmüş ve 1000 ml'ye tamamlanmıştır. X2 solüsyonunda, 25 ml dibasic solüsyonu 400 ml saf su içerisine eklenerek pH'sı 6 olarak ölçülmüş ve 500 ml'ye tamamlanmıştır. Sonra 720 ml X1 ve 180 ml X2 kimyasalları karıştırılarak potasyum fosfat buffer solüsyonu hazır hale getirilmiştir.

3.2.2.1.(2). Poliakrilamid jel, boyama ve fiksatif solüsyonunun yapılması ve uygulanması

Koşturucu jelin yapılışı ve uygulanması (4 jel için): Koşturucu jel (%8 lik) hazırlanışında cam beher içinde 9.6 ml saf su, 5.4 ml Acrylamide/BIS, 5.0 ml jel buffer (pH: 8.8) solüsyonu, 100 µl amonyum persülfat solüsyonu ve 10 µl Temed ilave edilmiştir. Hazırlanmış olan jel solusyonunun ikili camlardan oluşan Bio-Rad mini-jel tanklarına dolumları yapılmıştır. Dolum sırasında hava kabarcıklarının oluşmamasına dikkat edilmiş oluşacak hava kabarcıklarını cam plaka içindeki sıvı dökülmeyecek şekilde eğerek kabarcığın patlaması sağlanmıştır. Sonra tarakların geleceği kısma kadar doldurulan bu jelin düzgün bir şekilde donmasını sağlamak için cam tabakanın boş kalan üst kısmına % 50 N-Butanol karışımdan eklenmiştir. Jelin donması için 35-40 dk'lık bir süre geçtikten sonra cam panellerdeki sıvı boşaltılmış ve saf su ile 3 kez yıkanarak n-butanol karışımından iyice arındırılmıştır.

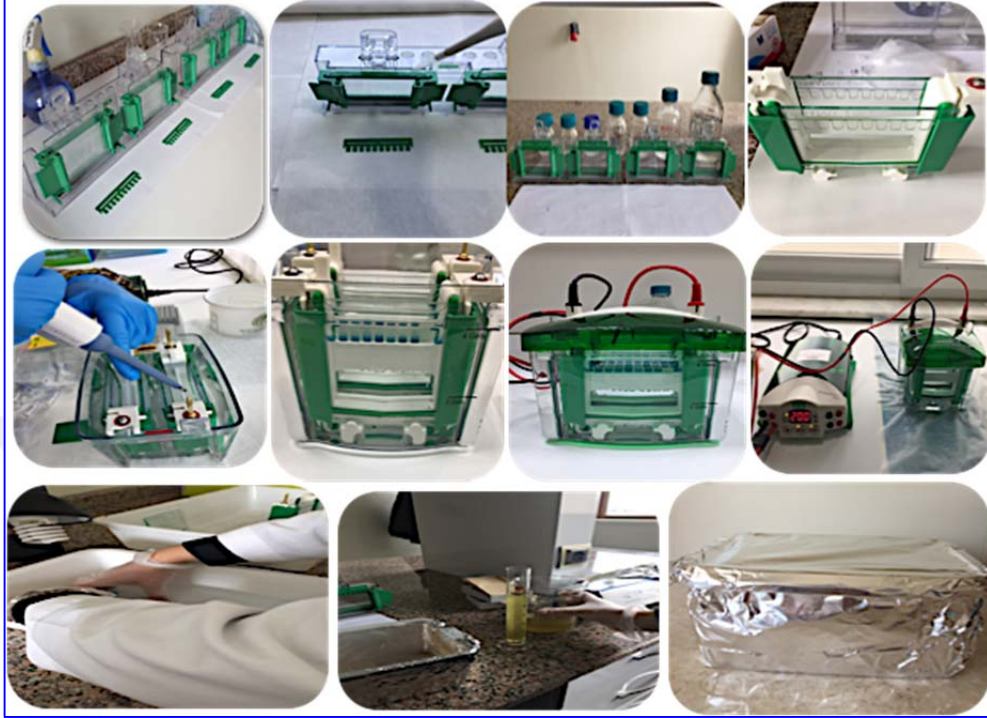
Tamamlayıcı jelin yapılışı ve uygulanması: Tamamlayıcı jelin (%5 lik) hazırlanmasında 6.2 ml saf su, 1.3 ml Acrylamide/BIS solüsyonu, 2.5 ml jel buffer (pH: 6.8), 10 µL Temed ve 50 µL amonyum persülfat kullanılmıştır. Donmuş olan koşturucu jelin üzerine, hazırlanan bu tamamlayıcı jel hava kabarcığı kalmayacak şekilde doldurulmuş ve tarak bu jelin içerisine oturtulmuştur. Daha sonra 30-35 dk donmaya bırakılmıştır. Tamamlayıcı jel donduktan sonra tarak donan jele zarar vermeyecek şekilde yavaşça çıkarılmıştır (Şekil 3. 12.).

Jellerin elektroforez tanklarına yerleştirilmesi ve dişi nematodların jellere yüklenmesi : Jel içeren cam plakalar elektroforez tankının içerisine yerleştirildikten sonra sızma yapıp yapmadığına bakmak için ilk olarak jelin bulunduğu camların iç tarafına elektrot bufferı eklenmiş ve gereken seviyeye kadar elektrot solüsyonu ile doldurulmuştur Elektrot solüsyonu ile tank doldurulduktan sonra, örnek buffer içinde pipet ucu ile ezilen her bir dişi nematod, jelde bulunan her bir tarağa dikkatlice yüklenmiştir. Jelin sağ ve sol tarağına marker olarak seçilen saf kültürden elde edilmiş referansımız olan *Meloidogyne javanica*

konularak geriye kalan 8 tarağa türü belli olmayan (örtüaltı seralardan alınmış popülasyonlardan elde edilen) dişilerden konulmuştur. Örnekler tamamlayıcı jeli geinceye kadar 80 Volt 13 dk, örnekler koşturucu jeli geçtikten sonra ise 200 Volt 45 dk elektrik akımına tâbi tutulmuştur (Şekil 3. 12.).

Elektroforez işleminden sonra elde edilen jellerin esteraz enzimine özgü boyama solüsyonunun hazırlanması ve uygulanması: Jelde bulunabilecek muhtemel esteraz enzimine ait bantların görünebilir hale gelmesine yardımcı olacak boyama solüsyonunun hazırlanması için 5 ml saf su, 5 ml Aseton, 0.1 g α -Naftil Asetat'dan solüsyon oluşturulmuştur. Bu solüsyondan 6 ml alınmış ve 0.2 g Fast Blue RR Salt ile birlikte 200 ml potasyum fosfat buffer karışımı içerisinde eritilmesi sağlanmıştır. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra tanktan cam plakalar çıkarılmış ve saf su içerisinde jellerin cam plakalardan ayrılması için bio-rad jel kesme aparatı ile dikkatli bir şekilde cam plakaların ayrımı sağlanmıştır. Ayrıştırılan jeller 50 ml'lik boyama solüsyonu bulunan kaplara konulmuş ve üstleri alüminyum folyo ile kaplanarak karanlık ortamda 40-45 dk boyanmıştır (Şekil 3. 12.). Boyamaya bırakırken jelin solüsyon içinde katlanmamasına dikkat edilmiş, kaplar düzgün bir şekilde karanlık ortama koyulmuştur.

Jellerin muhafazası için fiksatif solüsyonu yapılışı : Karanlık ortamda bekletilen boyama solüsyonu, jellere zarar gelmeyecek şekilde boşaltılmış ve saf su ile 3 kez yıkanmıştır. Boyamaya tâbi tutulan jellerde oluşmuş bantların bozulmadan korunması için 140 ml saf su, 20 ml Gliserol ve 40 ml Ethanolden oluşan fiksatif solüsyonuna konulmuştur. Her birine 50 ml'lik fiksatif solüsyonu gelecek şekilde kaplara konulmuş ve alüminyum folyo ile kaplayarak daha sonra fotoğraflanmak üzere karanlık ortamda muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.12. Poliakrilamid Gel Elektroforez uygulama aşamaları

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

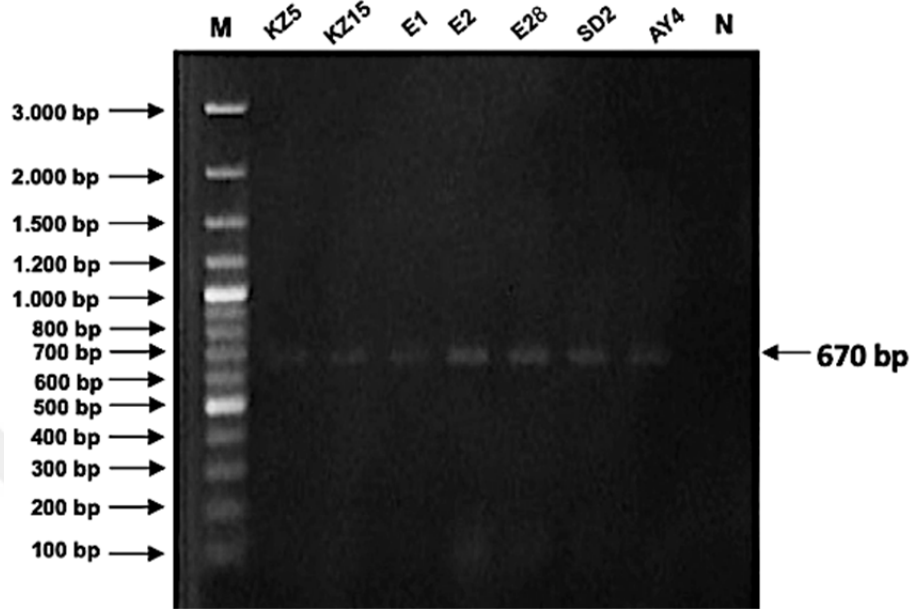
4.1. Bulgular

4.1.1. Kök-ur nematodu popülasyonlarının moleküler tanılanması

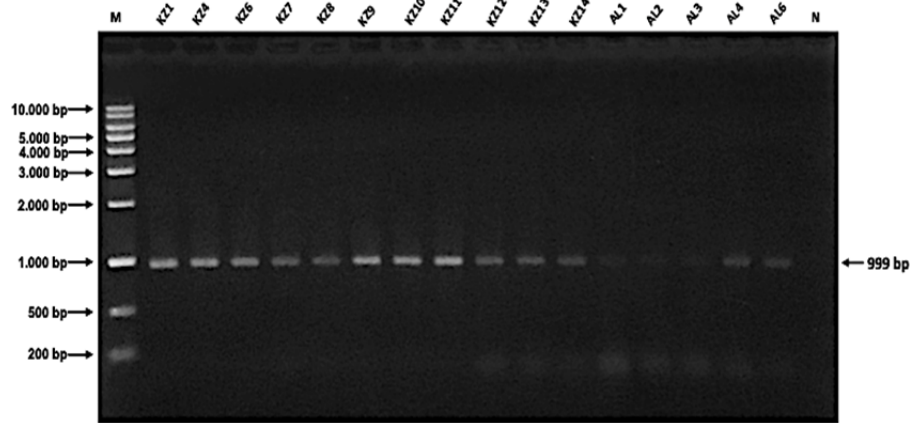
Doğu Akdeniz Bölgesi örtüaltı sebze (domates, biber, patlıcan ve hıyar) üretim alanlarından toplanan popülasyon örnekleri Wishart ve ark. (2002), Zijlstra ve ark., (2000) ve Correa ve ark., (2014) tarafından geliştirilen sırasıyla JMV/JMV1/JMV2 - FAR / RAR – METH F /METH R türe spesifik primerleri kullanılarak PCR işlemi yapılmıştır.

Meloidogyne javanica'yı belirlemek için Zijlstra ve ark., (2000), tarafından geliştirilen FJAV/RJAV primer çifti kullanarak yapılan PCR çalışması sonucunda beklenen 670 bp büyüklüğündeki DNA bandı görüntülenmiştir (Şekil 4.1.). Bu testleme sonucunda testlenen 46 örnekten 7 örnekte *M. javanica* saptanmıştır.

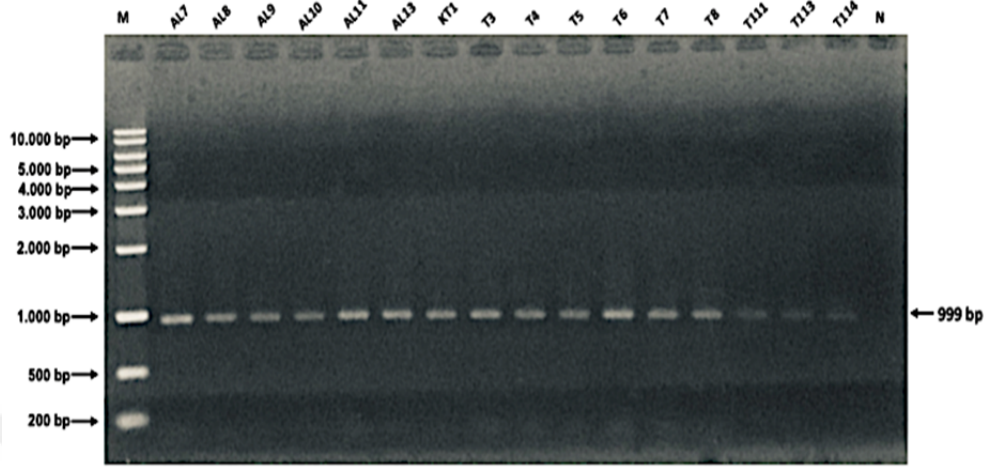
M. incognita popülasyonu Randing ve ark. (2000) tarafından geliştirilen MIF/MIR primer çifti kullanarak yapılan PCR çalışması sonucunda beklenen 999 bp uzunluğunda DNA bandı görüntülenmiştir (Şekil 4.2; Şekil 4.3; Şekil 4.4). Bu testleme sonucunda testlenen 46 örnekten 39 örnekte *M. incognita* saptanmıştır.



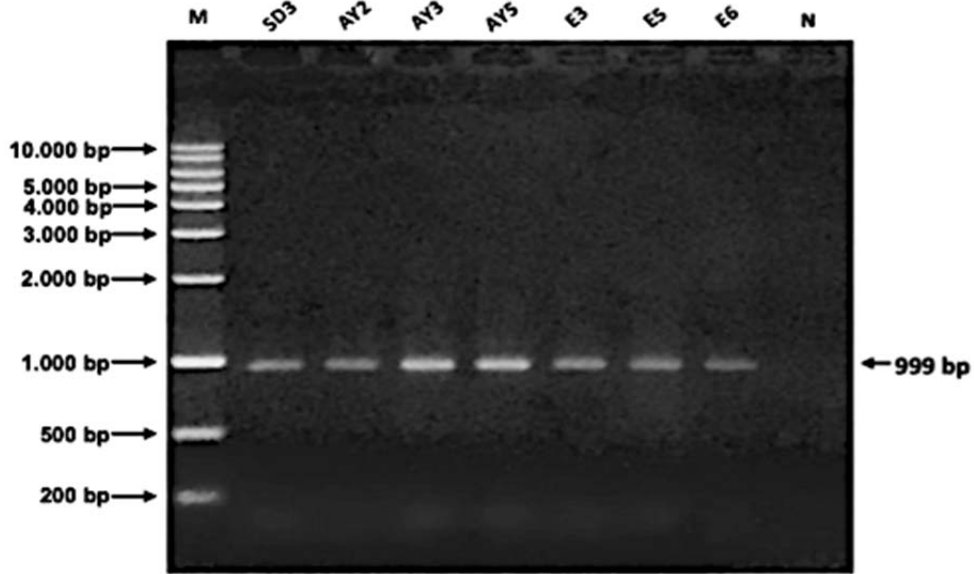
Şekil 4.1. *Meloidogyne javanica*'ya spesifik SCAR primerleri ile yapılan çalışma sonucunda görüntülenen 670 bp büyüklüğünde ki PCR ürünleri. M: 100 bp DNA Marker, N: PCR Mix (Su) Kontrol. KZ: Kazanlı, E: Erdemli, SD: Samandağ, AY: Aydıncık.



Şekil 4.2. *Meloidogyne incognita*'ya spesifik SCAR primerleri ile yapılan çalışma sonucunda görüntülenen 999 bp büyüklüğünde ki PCR ürünleri. M: 1000 bp DNA Marker, N: PCR Mix (Su) Kontrol. KZ: Kazanlı, AL: Adanalıoğlu.



Şekil 4.3. *Meloidogyne incognita*'ya spesifik SCAR primerleri ile yapılan çalışma sonucunda görüntülenen 999 bp büyüklüğünde ki PCR ürünleri. M: 1000 bp DNA Marker, N: PCR Mix (Su) Kontrol. AL: Adanalıoğlu, KT: Karataş, T: Tarsus.



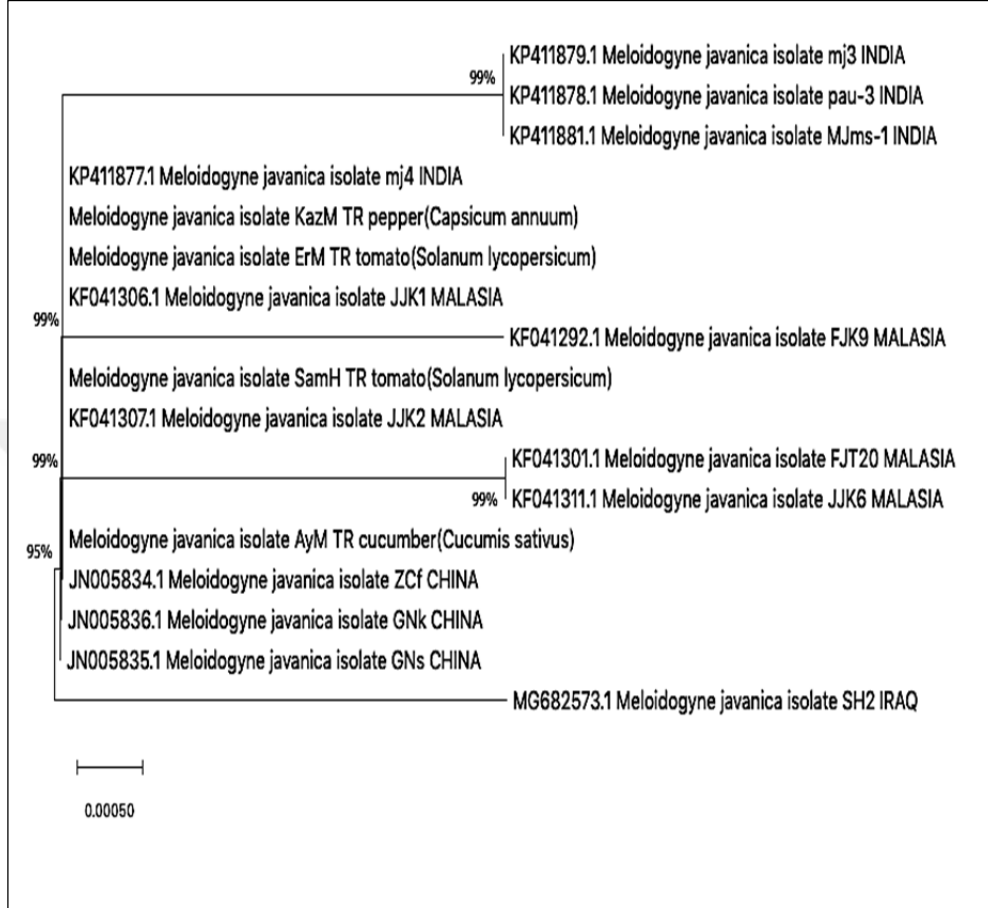
Şekil 4.4. *Meloidogyne incognita*'ya spesifik SCAR primerleri ile yapılan çalışma sonucunda görüntülenen 999 bp büyüklüğünde ki PCR ürünleri. M: 1000 bp DNA Marker, N: PCR Mix (Su) Kontrol. SD: Samandağ, AY: Aydıncık, E: Erdemli.

Doğu akdeniz bölgesinde örtüaltı sebze üretiminin yapıldığı Adana, Mersin ve Hatay illeri ve ilçelerinden toplanan örneklerin türe spesifik primer çiftleri kullanılarak yapılan moleküler (PCR) ve biyokimyasal (PAGE) yöntemleri ile testlenmesi sonucunda söz konusu örneklerde *Meloidogyne incognita* ve *Meloidogyne javanica* türleri saptanmıştır.

Toplanan popülasyonlarda 39 örnek *M. incognita* ve 7 örnek *M. javanica* saptanmış olup örneklerin dağılımı; 9 Tarsus, 11 Adanalıoğlu, 11 Kazanlı, 3 Aydıncık, 1 Samandağ, 1 Karataş, 3 Erdemli örneklerinde *M. incognita* saptanırken, 2 Kazanlı, 1 Aydıncık, 1 Samandağ, 3 Erdemli örneklerinde ise *M. javanica*'dır.

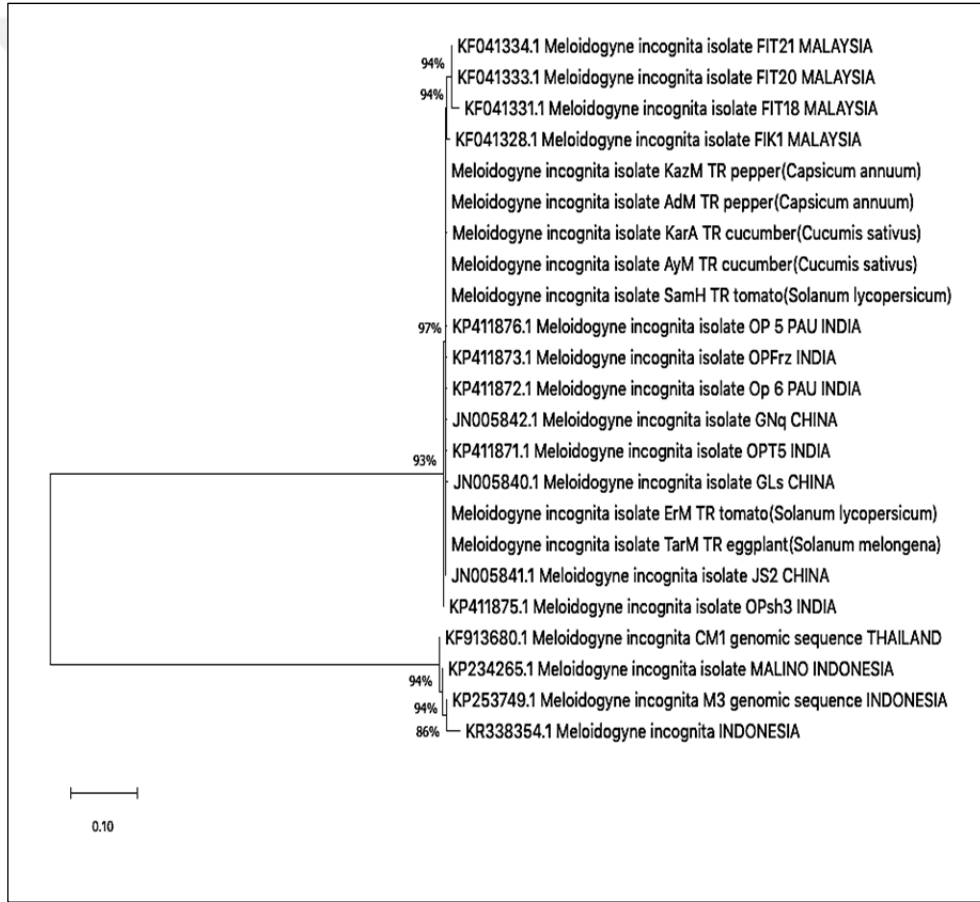
4.1.2. Kök-ur nematodu popülasyonlarının filogenetik analizi

M. javanica için filogenetik analiz çalışması, araştırmada kullanılan 4 izolat ve GenBank'tan alınan 13 izolat (Hindistan, Malezya, Çin ve Iraktan) olmak üzere toplam 17 izolatın DNA dizileri kullanılarak yapılmıştır. Bütün izolatların oluşturduğu filogenetik ağaç ana olarak farklı atadan gelen 2 soya ayrılmıştır. Analiz etmek istediğimiz *M. javanica* izolatları, Hindistan, Malezya ve Çin izolatlarının birlikte oluşturduğu soy grubunda bulunmuş olup, Irak izolatına uzak bir akrabalık sergilemiştir. Türk izolatları, Irak izolatından uzak olmakla beraber kendi grubu içerisinde çok azda olsa farklılıklar göstermektedir; KazM ve ErM izolatları Hindistan ve Malezya izolatlarına yakın olmakla birlikte SamH izolatı diğer bir Malezya izolatı ile AyM izolatı ise Çin izolatları ile yakın ilişki sergilemiştir (Şekil 4.5.). *M. javanica*'nın bütün izolatları kendi aralarında %99 benzerlik göstermektedir. Bütün Türk izolatları ve kendi grubu içerisinde bulunan Hindistan, Malezya ve Çin izolatları aynı atadan gelen bir soy sergilemiş olup, Çin izolatı farklı bir soy uzantısı göstermiştir.

Şekil 4.5. *Meloidogyne javanica* izolatlarına ait filogenetik analiz

M. incognita için filogenetik analiz çalışması, araştırmada kullanılan 7 izolat ve GenBank tan alınan 16 izolat (Malezya, Hindistan, Çin, Tayland ve Endonezya) olmak üzere toplam 23 izolatın DNA dizileri kullanılarak yapılmıştır. Bütün izolatların oluşturduğu filogenetik ağaç ana olarak farklı atadan gelen 2 soya ayrılmıştır. Analiz etmek istenilen *M. incognita* izolatları, Malezya, Çin ve Hindistan izolatlarının birlikte oluşturduğu soy grubunda bulunmuş olup, Tayland ve Endonezya izolatlarına uzak bir akrabalık sergilemiştir. Türk izolatları, Tayland ve Endonezya izolatlarından uzak olmakla beraber kendi grubu içerisinde de çok az da olsa farklılıklar göstermektedir; KazM, AdM, KarA, AyM ve SamM izolatları

Hindistan, Malezya ve Çin izolatlarına yakın olmakla birlikte ErM ve TarM izolatları kendi grubu içerisinde aynı soy sergilemekle birlikte Çin izolatlarına daha yakın bir akrabalık sergilemiştir. *M. incognita* izolatları içerisinde Karataş, Kazanlı, AdanaHoğlu, Aydınçık, Samadağ izolatları birbirileri ile %100 benzerlik göstermekte olup, bütün Türk izolatları ve kendi grubu içerisinde bulunan Malezya, Hindistan ve Çin izolatları aynı atadan gelen bir soy sergilemiş olup, Tayland ve Endonezya izolatları ise farklı bir soy sergilemiştir (Şekil 4.6.).

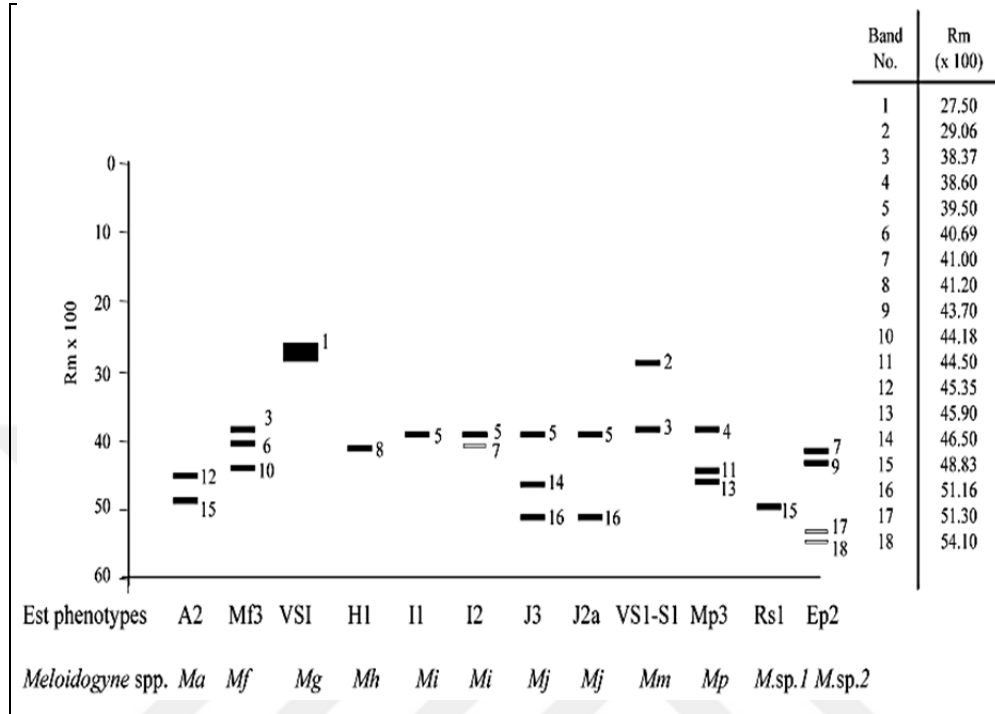


Şekil 4.6. *Meloidogyne incognita* izolatlarına ait filogenetik analiz

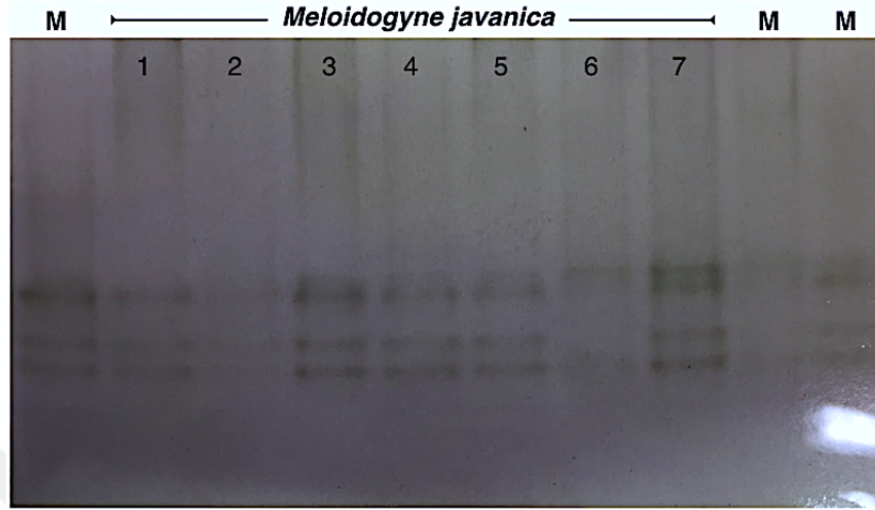
Saptanmış olan izolatların kendi arasındaki ve NCBI'dan aldığımız dünyadaki farklı izolatlar ile akrabalık ilişkilerinin ortaya konulması amacıyla izolatlara ait DNA dizileri kullanılmıştır. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde kök-ur nematodları ile yapılan sörvey sonucu literatür moleküler ve biyokimyasal yöntemler ile güncellenmiş olup, soy ağacı oluşturulmuştur.

4.1.3. Kök-ur nematodu PAGE yöntemi bulguları

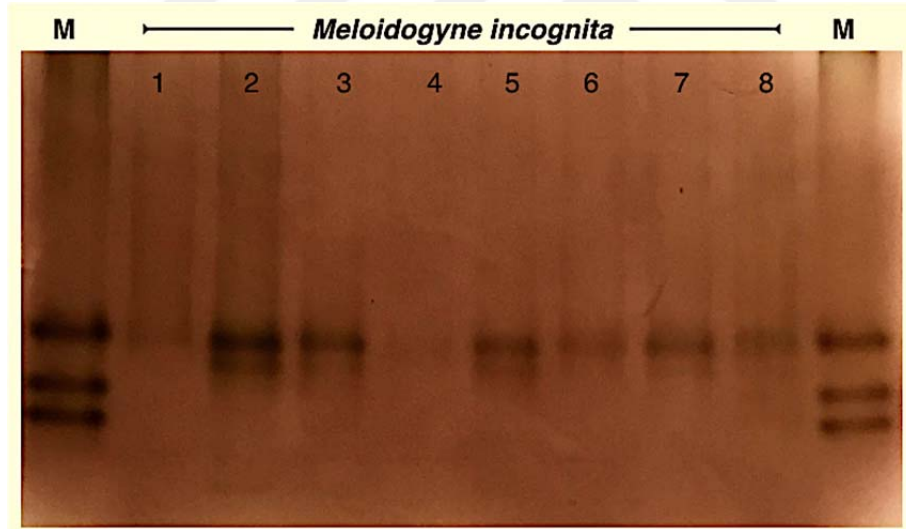
Doğu Akdeniz Bölgesi'nden toplanan kök-ur nematodu örneklerinden moleküler yöntemler ile tanılanmış olan 46 popülasyon poliakrilamid jel elektroforez yöntemi ile esterase enzimleri açısından testlenmiştir. Testlemeler sonucunda kullanılan referans izolatların esterase profilleri (Şekil 4.7.) moleküler çalışmalar sonucunda tanılanmış olan 7 *M. javanica* izolatının, *M. javanica* esterase profiline sahip olduğu ve sonuçta bu 7 izolatında *M. javanica* olduğu PAGE yöntemi ile desteklenmiştir (Şekil 4.8.). Diğer saptanan 39 *M. incognita* izolatının da *M. incognita* esterase profiline sahip olduğu ve sonuçta bu 39 izolatın *M. incognita* olduğu PAGE yöntemi ile desteklenmiştir (Şekil 4.9; Şekil 4.10; Şekil 4.11; Şekil 4.12; Şekil 4.13). Moleküler ve biyokimyasal analizlerden elde edilen sonuçlar birbirleri ile uyum göstermiştir. (Çizelge 4.1.). Bu tür araştırmalarda her iki yöntemin de ardışık olarak birlikte kullanılması test sonuçlarının güvenilirliği açısından önem arz etmektedir.



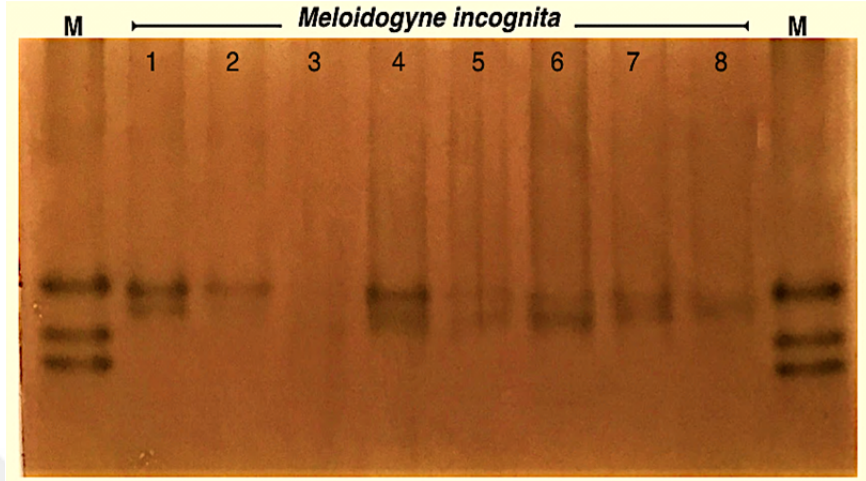
Şekil 4.7. *Meloidogyne* spp. esteraz enzim fenotipleri teşhis anahtarı Esbenshade ve Triantaphyllou (1985)'e göre dizayn edilmiştir. A2: *M. arenaria*; Mf3: *M. floridensis*; VS1: *M. graminicola*; H1: *M. hapla*; I1 & I2: *M. incognita*; J3 & J2a: *M. javanica*; VS1-S1: *M. mayaguensis*; Mp3: *M. partityla*; Rs1: *Meloidogyne* sp.1; Ep2: *Meloidogyne* sp. 2. (Brito ve ark., 2008).



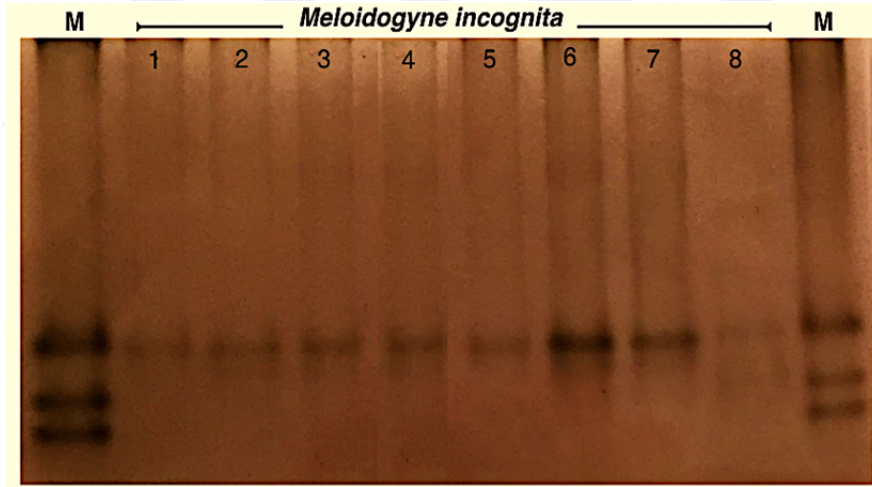
Şekil 4.8. *M. javanica* izolatlarına ait esteraz enzim profilinin poliakrilamid jelde J3 fenotipi. 1-2: Kazanlı Bölgesi, 3-5: Erdemli Bölgesi, 6: Aydınçık Bölgesi, 7: Samandağ Bölgesi. M: Marker - Referans popülasyon (*Meloidogyne javanica*)



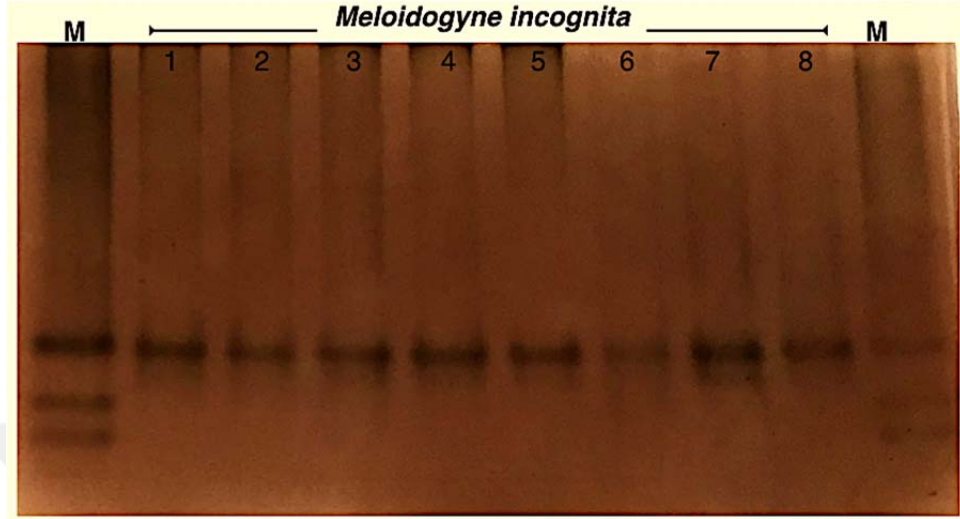
Şekil 4.9. *M. incognita* izolatlarına ait esteraz profili poliakrilamid jelde 1-4-6-8: I1 fenotipi, 2-3-5-7: I2 fenotipi. 1-8: Kazanlı Bölgesi. M: Marker - Referans popülasyon (*Meloidogyne javanica*)



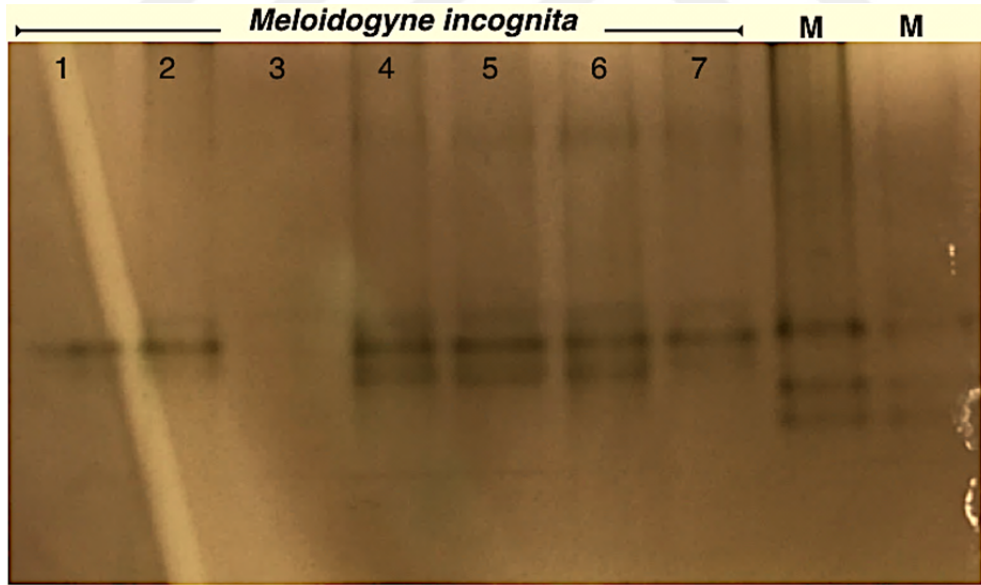
Şekil 4.10. *M. incognita* izolatlarına ait esteraz profilleri poliakrilamid jelde 3-8: I1 fenotipi, 1-2-4-5-6-7: I2 fenotipi. 1-3: Kazanlı Bölgesi, 4-8: Adanaoğlu Bölgesi. M: Marker - Referans popülasyon (*Meloidogyne javanica*)



Şekil 4.11. *M. incognita* izolatlarına ait esteraz profili poliakrilamid jelde 1-7: I1 fenotipi, 8: I2 fenotipi. 1-6: Adanaoğlu Bölgesi, 7: Karataş Bölgesi, 8: Samandağ Bölgesi. M: Marker - Referans popülasyon (*Meloidogyne javanica*)



Şekil 4.12. *M. incognita* izoaltlarına ait esteraz profili poliakrilamid jelde 1-8: I1 fenotipi. 1-8: Tarsus Bölgesi. M: Marker - Referans popülasyon (*Meloidogyne javanica*)



Şekil 4.13. *M. incognita* izolatlarına ait esteraz profili poliakrilamid jelde 1-2-3: I1 fenotipi, 4-5-6-7: I2 fenotipi. 1: Tarsus Bölgesi, 2-4: Erdemli Bölgesi, 5-7: Aydınçık Bölgesi. M: Marker - Referans popülasyon (*Meloidogyne javanica*)

Nematodlarda yaklaşık olarak 10 farklı esterase bulunmaktadır. Bu esterazların sayısı ve büyüklükleri nematod türleri arasında farklılık göstermektedir. Bilinen türlerdeki (*M. javanica*) esterase profili, PAGE’de marker (referans popülasyon) olarak kullanılmaktadır.

Diğer yandan esterase sayıları ve büyüklükleri nematodlarda tür teşhislerinde hem güvenilir ve hemde moleküler yöntemleri kontrol etmede çok önemli bir yöntemdir. Poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) yöntemi kullanılarak izolatların esterase profilleri ortaya konulmuş ve bu şekilde moleküler yöntemler onaylanarak tür teşhisi tam anlamıyla gerçekleştirilmiştir.

M. incognita ile *M. luci*’nin perinal bölgelerini birbirinden ayırt etmek oldukça zordur. *M. incognita*, *M. ethiopica*, *M. luci* akrabalık ilişkileri yakın derecededir ve bunları ayırt etmenin en iyi yolu esterase enzimi fenotipidir (Geric Stare ve ark., 2018).

Aydınlı ve ark. (2018), 2013 yılında Samsun ilinde morfolojik olarak tanımladığı *M. ethiopica*’yı Poliakrilamid Jel Elektroforez yöntemi ile esterase enzimlerine bakarak 2017 yılında *M. luci* olarak rapor etmiştir. Benzer şekilde Slovenya, Yunanistan ve İtalya’da *M. ethiopica*, *M. luci* olarak yeniden tanımlanmıştır (Aydınlı ve Mennan, 2018).

Çizelge 4.1. Doğu Akdeniz Bölgesinden *Meloidogyne* türlerinin moleküler ve biyokimyasal analiz sonuçlarının karşılaştırılması

Örneklerin toplandığı bölge	Kod	Konukçu bitki	EST	Primerler					Bulunan Türler
				MIF/ MIR	FJAV/ RJAV	JMV/ JMV/ JMV2	FAR/ RAR	METHF/ METHR	
Adana/ Karataş	KT1	Domates	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
Mersin/ Kazanlı	KZ1	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	KZ4	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	KZ5	Biber	+	-	+	-	-	-	<i>M. javanica</i>

Çizelge 4.1.'in devamı

	KZ6	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	KZ7	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	KZ8	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	KZ9	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	KZ10	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	KZ11	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	KZ12	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	KZ13	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	KZ14	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	KZ15	Biber	+	-	+	-	-	-	<i>M. javanica</i>
Mersin/ Adanalıoğlu	AL1	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	AL2	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	AL3	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	AL4	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	AL6	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	AL7	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	AL8	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	AL9	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	AL10	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	AL11	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	AL13	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
Mersin/ Tarsus	T3	Patlıcan	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	T4	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	T5	Patlıcan	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	T6	Patlıcan	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	T7	Patlıcan	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	T8	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	T11	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	T13	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	T14	Biber	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
Mersin/ Erdemli	E1	Domates	+	-	+	-	-	-	<i>M. javanica</i>
	E2	Domates	+	-	+	-	-	-	<i>M. javanica</i>
	E3	Domates	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	E5	Domates	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	E6	Domates	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	E8	Domates	+	-	+	-	-	-	<i>M. javanica</i>
Mersin/ Aydıncık	AY2	Hıyar	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	AY3	Hıyar	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
	AY4	Hıyar	+	-	+	-	-	-	<i>M. javanica</i>
	AY5	Patlıcan	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>
Hatay/ Samandağ	SD2	Domates	+	-	+	-	-	-	<i>M. javanica</i>
	SD3	Domates	+	+	-	-	-	-	<i>M. incognita</i>

+ : Pozitif, - : Negatif

Bu çalışmada poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) ile esteraz enzimlerine bakılarak teşhis anahtarı yardımı ile (Esbenshade ve Triantaphyllou, 1985) teşhisi yapılmış, *M. incognita* ve *M. javanica* bulunarak yapılan moleküler çalışmayı desteklemiştir. *M. incognita*'nın I1 ve I2 esteraz enzim fenotipleri *M. javanica*'nın J3 esteraz enzim fenotipi saptanmıştır. PCR ve PAGE sonuçları birbirlerini destekler şekilde bulunmuştur.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kök-ur nematodlarının örtüaltı sebze üretim alanlarında bulunan türlerin saptanması ve karakterizasyonun yapılması amacıyla, 2018 yılı Nisan-Mayıs-Haziran aylarında araştırmanın yürütüldüğü alanlarda yapılan sörveylerde 100 adet sebze üretim seralarından rastgele örnekleme yapılmıştır. Toplanan popülasyonların 46 tanesi simptomolojik olarak kök-ur nematoduyla bulaşık bulunmuştur. Söz konusu 46 adet popülasyonun SCAR primerler kullanılarak PCR yöntemi ile testlenmesi sonucunda Kazanlı, Aydıncık, Erdemli ve Samandağ'dan toplanan 7 adet örnekte *M. javanica* saptanmış olup testlenen örnekler üzerinden bulaşıklık oranı %15.2 olarak belirlenmiştir. Karataş, Tarsus, Adanalıoğlu, Kazanlı, Erdemli, Aydıncık, ve Samandağ'dan toplanan 39 adet örnekte *M. incognita* saptanmış olup testlenen örnekler üzerinden bulaşık oranı %84.7 olarak belirlenmiştir. Bulunan PCR sonuçları Türkiye'deki kök-ur nematodlarının morfolojik ve moleküler yöntemler ile tanılaması çalışmasındaki Doğu Akdeniz Bölgesi'ni kapsayan çalışmalar ile paralellik göstermektedir (Özarslandan ve Elekcioglu, 2010; Söğüt ve Elekcioglu, 2000; Elekcioglu ve Uygun, 1994).

Filogenetik analizlerde yöreleri temsil eden 4 adet *M. javanica* izolatu ve diğer 13 dünya izolatu (Hindistan, Malezya, Çin ve Irak) 2 farklı grupta toplanmıştır. Analiz etmek istediğimiz *M. javanica* izolatları, Hindistan, Malezya ve Çin izolatlarının birlikte oluşturduğu soy grubunda bulunmuş olup Irak izolatına uzak bir akrabalık sergilemiştir. Türk izolatları, Irak izolatından uzak olmakla beraber kendi grubu içerisinde çok azda olsa farklılıklar göstermektedir; KazM ve ErM izolatları Hindistan ve Malezya izolatlarına yakın olmakla birlikte SamH izolatu diğer bir Malezya izolatu ile AyM izolatu ise Çin izolatları ile yakın ilişki sergilemiştir. Bütün türk izolatları ve kendi grubu içerisinde bulunan Hindistan, Malezya ve Çin izolatları aynı atadan gelen bir soy sergilemiş olup, Çin izolatu farklı bir soy uzantısı göstermiştir.

Yörelere temsil eden 7 adet *M. incognita* izolatu ve diğere 16 dünya izolatu (Malezya, Hindistan, Çin, Tayland ve Endonezya) olmak üzere toplam 23 izolat kullanılarak yapılmıştır. *M. incognita*'ya ait bütün izolatlar oluşturduğu filogenetik ağaç 2 farklı grupta toplanmıştır. Türk izolatları, Tayland ve Endonezya izolatlarından uzak olmakla beraber kendi grubu içerisinde de çok az da olsa farklılıklar göstermektedir; KazM, AdM, KarA, AyM ve SamM izolatları Hindistan, Malezya ve Çin izolatlarına yakın olmakla birlikte ErM ve TarM izolatları kendi grubu içerisinde aynı soy sergilemekle birlikte Çin izolatlarına daha yakın bir akrabalık sergilemiştir.

Doğu Akdeniz Bölgesi'ndeki bütün *M. javanica* ve *M. incognita* izolatlarının ilk defa Poliakrilamid Jel Elektroforez (PAGE) yöntemi ile biyokimyasal analiz yapılarak esteraz enzim profilleri kontrol edilmiştir. Dört yöreden toplanan 7 örnekte saptanan ve karakterizasyonu yapılan *M. javanica*, yedi yöreden toplanan 39 örnekte saptanan ve karakterizasyonu yapılan *M. incognita*'nın gerçekten doğru türler olduğunu onaylamak için bütün örnekler esteraz enzim profillerinin kontrolü için PAGE yöntemleri ile tekrar analiz edilmiştir. *M. incognita* esteraz enzimi profilleri I1 ve I2, *M. javanica* esteraz enzim profile J3 olarak saptanmıştır. Saptanan esteraz enzimleri Pais ve Abrantes (1989), Carnerio ve ark. (1996, 2000), Castro ve ark. 2003, Cofcewicz ve ark. 2004 ve Kolombiya ve ark. 2017 araştırmalarındaki 2 esteraz enzimi (I1 ve I2) ile benzer fenotipler olup bu çalışmalar ile paralellik göstermiştir. PAGE yönteminde esteraz profilleri görüntülenmesi sırasında *M. javanica* (J3) referans popülasyon olarak kullanılmıştır. Biyokimyasal analiz sonuçları göstermiştir ki, spesifik primer çifti kullanılarak yapılan PCR sonucunda örneklerde saptanan *M. javanica* ve *M. incognita* türlerinin gerçekten doğru türler olup PCR ve PAGE sonuçları birbirlerini desteklemiştir. Araştırmada kullanılan bütün test sonuçları göstermiştir ki nematod türlerinin teşhis ve karakterizasyonunda moleküler (PCR) ve özellikle biyokimyasal (PAGE) yöntemlerin birlikte ve birbirlerini denetleyici olarak kullanılması tür teşhisinin doğru ve güvenilir şekilde yapılması açısından

önemlidir. Doğu Akdeniz Bölgesi'ndeki kök-ur tanılama çalışmaları ayrıntılı bir şekilde güncellenmiştir.

Kök-ur nematodlarının doğru tanınması mücadelenin başarısında önemlidir. Bu araştırma ve benzeri çalışmalar ileri ki dayanıklılık ve ıslah çalışmalarına önemli katkılar sağlayacağı ve yön verebileceği düşünülmektedir.

Kök-ur nematodlarının toprak üstünde simptomolojik belirtileri diğer hastalıklarla özellikle bitki besin elementi eksiklikleriyle benzerlik göstermektedir. Bu yüzden bu konuda bilgi sahibi olmayan üreticilerin bilgilendirilmesi ve kök-ur nematoduna karşı ilk olarak kimyasal mücadeleden ziyade uygun alternatif mücadele yöntemleri kullanılmalıdır. Üreticiye ekim nöbeti, münavebe yöntemleri ve dayanıklı çeşit kullanımı benimsetilmelidir. Solarizasyon uygulayarak toprak sıcaklığının yükseltilmesiyle toprakta kalan yumurta paketi ve ikinci dönem larva sayılarının azaltılması yönünden nematod mücadelesinde önemli olduğu bilinmektedir. Kök-ur nematodları çoğunlukla sulama suyuyla yayılmaktadır. Bu yüzden bulaşmanın olduğu arazilerde damlama sulama sistemi uygulanmalı ve aşırı sulamadan kaçınılmalıdır. Duyarlı çeşitlerinde yöreden alınan farklı kök-ur nematodu (*Meloidogyne* spp.) popülasyonlarda farklılıklar görülmüştür. Kök-ur nematodu türüne karşı dayanıklı bitki türlerinin bölgede kullanılması bu zararlının mücadele stratejilerinin yönetilmesi önerilmektedir.



KAYNAKÇA

- Abad, P., Favery, B., Rosso, M.N., Castagnone-Sereno, P., 2003. Root-knot nematode parasitism and host response: Molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology*, 4: 217-224.
- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J. M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E. G., Deleury, E., & Caillaud, M. C. 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology*, 26 (8): 909.
- Adam, M. A. M., Phillipps, M. S., Blok, V. C., 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
- Ağdacı, M., 1978. Güney Anadolu Bölgesi'nde Seralarda Yetiştirilen Kabakgillerde (Cucurbitaceae) Zarar Yapan Kök Ur Nematodu Türlerinin (*Meloidogyne* spp.) Tespiti ile Zarar Dereceleri ve Yayılış Alanları Üzerine Araştırmalar. T.C. Gıda Tar. ve Hayv. Bak. Zir. Müc. ve Zir. Karant. Gn. Md., Adana Bölge Ziraî Müc. Araş. Enst. Müd. Tek. Bülteni, No:47, Ankara, 56s.
- Ahrens, U., Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16 S rRNA gene. *Phytopathology*, 82 (8): 828-832.
- Anonymous. 2019a. Erişim tarihi: 30.03.2019. <https://en.wikipedia.org/wiki/Nematode>.
- Aydınlı, G. 2018. Samsun İli sebze alanlarında kök-ur nematodu *Meloidogyne luci* Carneiro 2014 (Tylenchida: Meloidogynidae)'nin belirlenmesi. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 42 (3): 229-237.

- Aydınlı, G., Mennan, S., 2018. Effect of Some Microbial Fertilizers on Tomato Growth and Root-Knot Nematode (*Meloidogyne incognita*). Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi, 5 (2): 143-151.
- Aydınlı, G., Mennan, S., Devran, Z., Şirca, S., Urek, G. 2013. First report of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* on tomato and cucumber in Turkey. Plant Disease, 97 (9): 1262-1262.
- Aydinli, G., Mennan, S., 2016. Identification of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) from greenhouse in the Middle Black Sea Region of Turkey. Turkish Journal of Zoology, 40: 675-685.
- Barker, K.R. 1985. Nematode extraction and bioassays. Pp. 19-35 in K. R. Barker, C. C. Carter, and J. N. Sasser, eds. An advanced treatise on Meloidogyne, Vol. II. Methodology. Raleigh: North Carolina State University Graphics 237.
- Boerma, H.R., Hussey, R.S., 1992. Breeding Plants for Resistance to Nematodes. Journal of Nematology, 24 (2): 242-252.
- Bora, T., Karaca, İ., 1970. Kültür bitkilerinde hastalığın ve zararın ölçülmesi. Ege Üniversitesi Yardımcı Ders Kitabı, Yayın No: 167, E.Ü. Mat., Bornova-İzmir, 8s.
- Brito, J. A., Kaur, R., Cetintas, R., Stanley, J. D., Mendes, M. L., McAvoy, E. J., Powers, T. O., Dickson, D. W., 2008. Identification and isozyme characterization of *Meloidogyne* spp. infecting horticultural and agronomic crops, and weed plants in Florida. Nematology 10: 757-766.
- Butler, M. H., S. M. Wallk., K. R. Luehrsen, G. E. Fox and R. M. Hecht, 1981 Molecular relationships between closely related strains and species of nematodes. J. Mol. Evol. 18: 18-23.
- Carneiro, R. M. D. G., Carneiro, R. G., Abrantes, I. D. O., Santos, M. D. A., & Almeida, M. R. A. 1996. *Meloidogyne paranaensis* n. sp. (Nemata: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitizing coffee in Brazil. Journal of Nematology, 28 (2): 177-189.

- Carneiro, R. M., Quénéhervé, P., Almeida, M. R. 2000. Enzyme phenotypes of *Meloidogyne* spp. populations. *Nematology*, 2 (6): 645-654.
- Castillo, P., Jimenez, R.M., 2003. First Report of *Meloidogyne incognita* infecting Spinach in Southern Spain. *Plant Disease*, 87 (7): 874-874.
- Castro, J. D. C., Lima, R. D., & Carneiro, R. M. D. G. (2003). Variabilidade isoenzimática de populações de *Meloidogyne* spp. provenientes de regiões brasileiras produtoras de soja. *Nematologia Brasileira*, 27 (1): 1-12.
- Célla S.P., Isabel M.O., 1989. Esterase and malate dehydrogenase phenotypes in Portuguese populations of *Meloidogyne* species. The Society of Nematologists. *Journal of Nematology*, 21 (3): 342–346.
- Chilton, N. B., Huby-Chilton, F., & Gasser, R. B. 2003. First complete large subunit ribosomal RNA sequence and secondary structure for a parasitic nematode: phylogenetic and diagnostic implications. *Molecular and Cellular Probes*, 17 (1): 33-39.
- Chitwood, B. G. 1957. "The English word "Nema" revised". *Systematic Zoology in Nematology Newsletter*. 4 (45): 1619.
- Cofcewicz, E. T., Carneiro, R. M. D. G., Randig, O., Chabrier, C., Quénéhervé, P. 2005. Diversity of *Meloidogyne* spp. on Musa in Martinique, Guadeloupe, and French Guiana. *Journal of Nematology*, 37 (3): 313-322.
- Collange B., Navarrete M., Peyre G., Mateille T., Tchamitchian M., 2011. Root-knot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: The challenge of an agronomic system analysis. *Crop Protection*, 30: 1251-1262.
- Correa, V. R., Almeida, M. R. A., Santos M. F. A., Tigano, M. S., Castagnone-Sereno, P., Carneriro, R.M. D. G., 2014. Genetic diversity of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* and development of a species-specific SCAR marker for its diagnosis. *Plant Pathology* 63: 476-483.

- Çetintaş, R., ve Çakmak, B., 2011. Kahramanmaraş ve çevresinde tarımı yapılan domates, hıyar ve patlıcan bitkilerinde mevcut *Meloidogyne* Türlerinin PAGE (Poliakrilamid Jel Elektrophorez) ve perineal morfolojik karakterler yardımı ile teşhisi. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, 28-30 Haziran 2011, Kahramanmaraş. 48 s.
- Dalmasso, A., Bergé, J. B. 1978. Molecular polymorphism and phylogenetic relationship in some *Meloidogyne* spp.: Application to the taxonomy of *Meloidogyne*. Journal of Nematology, 10 (4): 323-332.
- Devran, Z., Gözel, U., Söğüt M.A., Yıldız, Ş., Elekcioglu İ.H., 2002. Türkiye'nin Akdeniz Bölgesi'ndeki Kök-ur Nematodlarının rDNA ve mtDNA Markerleri ile Tanımlanması. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 26: 337-341.
- Dickson, D. W., 1969. The Application Of Disc Electrophoresis On Studying The Taxonomy Of Species Of *Meloidogyne* And Other Nematode Genera. Ph.D. Thesis, North Carolina State Univ., Raleigh: 100pp.
- Dickson, D. W., Huisinck, D., Sasser, J. N. 1971. Dehydrogenases, acid and alkaline phosphatases, and esterases for chemotaxonomy of selected *Meloidogyne*, *Ditylenchus*, *Heterodera* and *Aphelenchus* spp. Journal of Nematology, 3 (1): 1-16.
- Djian-Caporalino C., Molinari S., Palloix A., Ciancio A., Fazari A., Marteu N., Ris N., Castagnone-Sereno P., 2011. The reproductive potential of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* is affected by selection for virulence against major resistance genes from tomato and pepper, European Journal of Plant Pathology, 131: 431-440.
- Dong, K., Dean, R. A., Fortnum, B. A., Lewis, S. A. 2001. Development of PCR primers to identify species of root-knot nematodes: *Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* and *M. javanica*. Nematropica, 31 (2): 271-280.

- Elekcioglu, I. H. 1995. Occurrence of *Pasteuria* bacteria as parasites of plant-parasitic nematodes in the east Mediterranean region of Turkey. *Nematologia Mediterranea*, 23 (2): 213-215.
- Elekcioglu İ. H., ‘‘Untersuchungen Zum Auftreten Und Zur Verbreitung Phytoparasitär Nematoden In Den Landwirtschaftlichen Hauptkulturen Des Ostmediterranen Gebietes Der Türkei.’’, *PLITS*, vol.10, pp. 120-120, 1992.
- Elekcioglu, İ.H., Ohnesorge, B., Lung, G., Uygun, N., 1994. Plant Parasitic Nematodes in The Mediterranean Region of Turkey. *Nematologia Mediterranea*, 22: 59-63.
- Elekcioglu, İ.H., Uygun, N., 1994. Occurrence and Distribution of Plant Parasitic Nematodes in Cash Crop in Eastern Mediterranean Phytopathological Union, Kuşadası, Aydın, Türkiye: 409-410.
- 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), 129s, Ankara.
- Ercan, H., Elekcioglu, İ.H., 2009. Adana ve Mersin İllerinde Yabancı Otlarda Bulunan Kök-ur Nematodu Türlerinin Belirlenmesi Konusunda Araştırmalar. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 33 (3): 179-192.
- Esbenshade, P. R and A. C. Triantaphyllou, 1986. Partial characterization of esterases in *Meloidogyne* (Nematoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 83B: 31-38
- Esbenshade, P. R., & Triantaphyllou, A. C. 1985. Electrophoretic methods for the study of root-knot nematode enzymes. *An advanced treatise on Meloidogyne*, 2: 115-123.
- Esbenshade, P. R., & Triantaphyllou, A. C. 1987. Enzymatic relationships and evolution in the genus *Meloidogyne* (Nematoda: Tylenchida). *Journal of Nematology*, 19 (1): 8-18.

- Evlice, E., Bayram, Ş. 2016. Identification of root-knot nematode species (*Meloidogyne* spp.) (Nemata: Meloidogynidae) in the potato fields of Central Anatolia (Turkey) using molecular and morphological methods. Turkish Bulletin of Entomology, 6 (4): 339-347.
- Fargette, M. 1987. Use of the esterase phenotype in the taxonomy of the genus *Meloidogyne*. 2. Esterase phenotypes observed in West African populations and their characterization. Revue de Nématologie, 10 (1): 45-55.
- Felsenstein J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39 : 783-791.
- Galitelli, D., & Minafra, A., 1994. Elektrophoresis. Course on Plant Viruses Diagnosis. University of Cukurova, Department Plant Protection, Adana, Turkey, 89-114.
- Gerič Stare, B., P. Strajnar, N. Susic, G. Urek & S. Širca, 2017. Reported populations of *Meloidogyne ethiopica* in Europe identified as *Meloidogyne luci*. Plant Disease, 101 (9): 1627-1632.
- Gerič Stare, B., Strajnar, P., Širca, S., Susič, N., Urek, G., 2018. Record of a new location for tropical root knot nematode *Meloidogyne luci* in Slovenia. EPPO Bulletin, 48 (1): 135-137.
- Gürdemir, E., Ağdacı, M., 1975. Güney Anadolu Bölgesi Sebze Seralarında Zarar Yapan Kök-Ur Nematodları (*Meloidogyne* spp.) Üzerinde Sürvey Çalışmaları. Bitki Koruma Bülteni, 15 (3): 176-181.
- Hooper, D.J., 1986. Extraction of free living stages from soil. In: Laboratory Methods for Work with Plant Soil Nematodes. Southey, J.F. (ed). Her Majesty's Stationary Office, London: 5-30.
- Hunt, D. J., Handoo, Z. A. 2009. Taxonomy, identification and principal species. Root-knot nematodes, 1, 55-88.

- Hussey, R. S., Sasser, J. N., Huisling, D., 1972. Disc-electrophoretic studies of soluble proteins and enzymes of *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *Journal of nematology*, 4 (3): 183-189.
- Ibrahim, S. K., Perry, R. N., Burrows, P. R., & Hooper, D. J., 1994. Differentiation of species and populations of *Aphelenchoides* and of *Ditylenchus angustus* using a fragment of ribosomal DNA. *Journal of Nematology*, 26 (4): 412-421.
- Ibrahim, S. K., Rowe, J. A. 1995. Use of isoelectric focusing and polyacrylamide gel electrophoresis of nonspecific esterase phenotypes for the identification of cyst nematodes *Heterodera* species. *Fundamental and Applied Nematology*, 18 (2): 189-196.
- Johnson, A.V., Fassuliotis, G., 1984. *Nematode Parasites of Vegetable Crops*. W.R., Nickle. *Plant and Insect Nematodes*. Marcel Deccer Inc., New York and Basel, 323-372.
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G. J., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. K., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J. E., Wesemael, W. M. L., Karssen, G., Moens, M. 2006. *Taxonomy and Principal General Root-Knot Nematodes*. *Plant Nematology* (Perry, R. y Moens, M. Eds). CAB International, Wallingford, UK, (Part I), 60-90.
- Jones, J. T., Haegeman, A., Danchin, E. G., Gaur, H. S., Helder, J., Jones, M. G. & Perry, R. N. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14(9), 946-961.
- Jung, C., Wyss, U., 1999. New approaches to control plant parasitic nematodes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 439–446.
- Karssen, G., Moens, M. 2006. *Taxonomy and Principal General Root-Knot Nematodes*. *Plant Nematology* (Perry, R. y Moens, M. Eds). CAB International, Wallingford, UK, (Part I), 60-90.
- Karssen, G., Wesemael, W. M. L., & Moens, M. 2013. Root-knot nematodes. In *Plant nematology* (pp. 73-108). CABI.

- Kaşkavalcı, G., 1998. Aydın İli Yazlık Sebze Yetiştirilen Önemli Bölgelerinde Bulunan Kök-Ur Nematodları (*Meloidogyne* spp.)'nın Tanınmaları ve Ekonomik Önemleri Üzerine Araştırmalar. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Aydın.
- Kepenekci, İ., 2012. Nematoloji (Bitki Paraziti ve Entomopatojen Nematodlar) [Genel Nematoloji (Cilt-I), ISBN 978-605-4672-11-0, Taksonomik Nematoloji (Cilt-II) ISBN 978-605-4672-12-7] Eğitim. Tarım Bilim Serisi Yayın, 3, 1155.
- Kolombia, Y. A., Karssen, G., Viaene, N., Kumar, P. L., De Sutter, N., Joos, L., & Bert, W. 2017. Diversity of root-knot nematodes associated with tubers of yam (*Dioscorea* spp.) established using isozyme analysis and mitochondrial DNA-based identification. Journal of nematology, 49 (2): 177-188.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35: 1547-1549.
- Leslie J. F., G. D. Cain, G. K. Meffe and R. C. Vrijenhoek, 1982. Enzyme polymorphism in *Ascaris mum* (Nematoda). J. Parasitol. 68: 576-587.
- McGhee, J. D., and D. A. Cottrell., 1986 The major gut esterase locus in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Mol. Gen. Genet. 202: 30-34.
- McGhee, J. D., Birchall, J. C., Chung, M. A., Cottrell, D. A., Edgar, L. G., Svendsen, P. C., & Ferrari, D. C. 1990. Production of null mutants in the major intestinal esterase gene (*ges-1*) of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Genetics, 125 (3): 505-514.
- Meng, Q. P., Long, H., Xu, J.H., 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: 204–210.

- Meng, Q.P., Long, H., Xu, J.H., 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: 204–210.
- Mennan, S., Ecevit, O., 1996. Bafra ve Çarşamba Ovaları Yazlık Sebze Ekim Alanlarındaki Kök-ur Nematodları (*Meloidogyne* spp.)’nın Biyolojisi, Yayılışı ve Bulaşıklık Oranları Üzerine Araştırmalar. Türkiye III. Entomoloji Kongresi Bildirileri, 700-705 s.
- Moens M., Perry R. N., Starr J. L., 2009. *Meloidogyne* species-a diverse group of novel and important plant parasites, Editors: PERY R. N., MOENS M., STARR J. L., Root-knot nematodes, CAB International. Wallingford, UK, 1-17
- Özarslandan, A., Elekcioğlu, İ., H., 2010. Türkiye’nin Farklı Bölgelerinden Alınan Kök-ur Nematodu Türlerinin Tanısı ve Bazı Kök-ur Nematodu Popülasyonlarının Virülentliğinin Belirlenmesi. Türkiye Entomoloji Dergisi, 34 (3): 323-335.
- Özarslandan, A., Z. Devran, N. Mutlu and İ. H. Elekcioğlu, 2009. First report of Columbia Root-Knot nematode (*Meloidogyne chitwoodi*) in potato in Turkey. Plant Disease, 93 (3): 316.
- Öztüzün, N., 1970. Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi kültür bitkilerine arız olan Bitki Parazit Nematodları üzerinde sörvey çalışmaları. *Bitki Koruma Bülteni*, 10 (3): 180-197.
- Pais, C. S., & Isabel, M. D. O. (1989). Esterase and malate dehydrogenase phenotypes in Portuguese populations of *Meloidogyne* species. *Journal of Nematology*, 21 (3): 342-346.
- Perry, R. N., 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14(9): 946–961.
- Powers, T. O., Harris, T. S., 1993. A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species. *Journal of nematology*, 25 (1): 1-6.

- Quénéhervé, P., Cofcewicz, E., Castagnone-Sereno, P., & Carneiro, R. (2004). Enzyme phenotypes and genetic diversity of root-knot nematodes parasitising *Musa* in Brazil. *Nematology*, 6(1), 85-95.
- Randig, O., Almeida, M. R., Gomes, A. C., Carneiro, R. 2004. Additional information on *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968 (Tylenchida: Meloidogynidae), a root-knot nematode parasitising kiwi fruit and grapevine from Brazil and Chile. *Nematology*, 6 (1): 109-123.
- Randing, O., Bongiovanni, M., Carneiro, R.M.D.G., Castagnone-Sereno, P., 2002. Genetic diversity of root-knot nematodes from Brazil and development of SCAR marker specific for the coffee damaging species. *Genome*, 45: 862-870.
- Roberts, P.A., 1992. Current status of the availability development and use of host plant resistance to nematodes. *Journal of Nematology*, 24: 213-227.
- Saitou N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Sasser, J. N., 1986. Half a century dynamics and control of cotton diseases: nematodes. In *Proceedings-Beltwide Cotton Production Research Conferences (USA)*, 48-51.
- Siddiqi, M.R., 2000. *Tylenchida Parasites of Plants and Insects*. CABI publishing. CAB International, Wallingford, UK. 2nd. 805s.
- S     , M.A., Elekcioğlu,   . H., 2000a. Akdeniz Bölgesi'nde Sebze Alanlarında Bulunan *Meloidogyne* Goeldi, 1892 (Nemata: Heteroderidae) Türlerinin Irklarının Belirlenmesi. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 24 (1): 33-40.
- S     , M.A., Elekcioğlu,   . H., 2000b. *Meloidogyne incognita* Chitwood (Nemata: Heteroderidae) Irk-2'nin Farklı Domates      tlerinde Bazı Biyolojik   zellikleri   zerine Ara  tırmalar. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 24 (2): 113-124.

- Söğüt, M.A., Elekcioglu, İ. H., 2007. Methyl Bromide Alternatives for Controlling *Meloidogyne incognita* in Pepper Cultivars in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 32 (1): 31-40.
- Tamura K., Nei M., and Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 101: 11030-11035.
- Taylor, A. L. 1987. Identification and estimation of root-knot nematodes species in mixed populations. Bulletin 12, Florida Department of Agriculture, Division of Plant Industry, Gainesville., Florida. 73 pp.
- Tesarova, B., Zouhar, M., Rysanek., P., 2003. Development of PCR for Specific Determination of Root-knot Nematode *Meloidogyne incognita*. Plant Protection Science, 39: 23-28.
- Triantaphyllou, A., Dalmasso, A. 1982. Nouvelles données sur l'utilisation des isoestérases pour l'identification des *Meloidogyne*. Revue Nématol, 5(1), 147-154.
- Trudgill, D. L., Blok, V. C. 2001. Apomictic Polyphagous Root Knot Nematodes: Exceptionally Successful and Damaging Biotrophic Root Pathogens. Annual Review of Phytopathology. 39: 53–77.
- Trudgill, D. L., Blok, V. C. 2001. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. Annual review of phytopathology, 39 (1): 53-77.
- TÜİK, 2016. Türkiye İstatistik Kurumu, Ankara (<http://tuikrapor.tuik.gov.tr>). Bitkisel Üretim İstatistikleri (Erişim tarihi: Nisan 2019).
- Tzortzakakis, E.A., Adam, M.A.M., Blok, V.C., Paraskevopoulos, C., Bourtzis, K., 2005. Occurrence of resistance-breaking populations of root-knot nematodes on tomato in Greece. European Journal of Plant Pathology, 113 (1): 101-105.

- Uysal, G., Söğüt, M. A., Elekcioglu, İ. H. 2017. Türkiye Göller Bölgesi sebze üretim alanlarında kök-ur nematodu türleri (*Meloidogyne* spp.)'nin tanınması ve yaygınlıkları. Türkiye Entomoloji Dergisi, 41 (1): 105-122.
- Venkatachari, S., Payan, L. A., Dickson, D. W., & Hewlett, T. E., 1991. Comparisons of isozyme phenotypes in five *Meloidogyne* spp. with isoelectric focusing. Journal of Nematology, 23 (4): 457-461.
- Vrain, T.C., Wakarchuk, D.A., Levesque, A.C., Hamilton, I., 1992. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group. Fundamental Applied Nematology, 15: 563-573.
- Whitehead, A. G. 1968. Taxonomy of *Meloidogyne* (Nematoda: Heteroderidae) with description of four new species. Transactions of the Zoological Society of London, 31: 263-401.
- Wishart, J., Phillips, M.S., Bloak, V.C. 2002. Ribosomal intergenic spacer: A polymerase chain reaction diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax* and *M. hapla*. Phytopatology, 92: 884-892.
- Yüksel, H. 1966. Karadeniz Bölgesinde tesadüf edilen *Meloidogyne incognita* varyasyonu hakkında. Bitki Koruma Bülteni, 6(1).
- Yüksel, H. Ş. 1967. Iğdır Ovasında ilk defa bulunan *Meloidogyne hapla* ve bunun *Meloidogyne incognita*'nın kanatlı varyasyonundan ayırt edici özellikleri.
- Yüksel, H., 1974. Kök ur Nematodlarının (*Meloidogyne* spp.) Türkiye'deki Durumu ve Bunların Popülasyon Problemleri Üzerine Düşünceler. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 5 (1): 83-105.
- Yüksel, H., 1974. Kök ur Nematodlarının (*Meloidogyne* spp.) Türkiye'deki Durumu ve Bunların Popülasyon Problemleri Üzerine Düşünceler. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 5 (1): 83-105.
- Zijlstra, C., Donkers-venne, D., 2004. A PCR test to detect the cereal root-knot nematode *Meloidogyne naasi*. European Journal of Plant Pathology, 110 (8): 855-860.

Zijlstra, C., Donkers-Venne, D.T.H.M., and Fargette, M., 2000. Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* Using Sequence Characterised Amplified Region (SCAR) Based PCR Assays. *Nematology* (8): 847-853.





ÖZGEÇMİŞ

Ayşenur ASLAN, 26/10/1994 tarihinde Antalya’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Isparta’da tamamladı. 2012 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ziraat Mühendisliği Bitki Koruma Programını kazandı ve 2016 yılında Ziraat Mühendisliği Programı Bitki Koruma Bölümünü tamamladı. 2017 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitime başladı, 2019 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı.