

## ***In Vitro* Koşullarda Yetiştirilen Bazı Sert Çekirdekli Meyve anaçlarının Kök-Ur Nematodları (*Meloidogyne incognita* ve *Meloidogyne javanica*, [Tylenchida: Meloidogynidae])’na Karşı Dayanıklılık Düzeylerinin Saptanması Üzerine Araştırmalar**

**Burcu ÖZBEK<sup>1</sup> Mukaddes KAYIM<sup>2</sup> İ. Halil ELEKÇİOĞLU<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Ç.Ü. Pozantı MYO Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü-Pozantı/Adana

<sup>2</sup> Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü-Balçalı/Adana

e-posta: bozbek@cu.edu.tr

**Özet:** Çalışmada, *in vitro* koşullarda yetiştirilen anaçlardan Garnem, Cadaman ve Myrobalan 29 klonunun kök-ur nematodları *Meloidogyne incognita* ve *M. javanica*’ya dayanıklılık düzeyleri araştırılmıştır. Bu amaçla, Garnem, Cadaman genotiplerine ait sürgün uçları, 2.0 mg/l BAP + 0.05 GA<sub>3</sub> hormonu içeren katılaştırılmış MST ortamında, Myrobalan 29 klonu ise 1.0 mg/l BAP içeren katılaştırılmış MS ortamında kültüre alınmışlardır. Farklı IBA konsantrasyonlarını içeren MS ve MST ortamları sürgünlerin köklendirilmesi amacıyla kullanılmıştır.

*In vitro* koşullarda üretimi yapılan Garnem, Cadaman ve Myrobalan 29 klonunun *Meloidogyne incognita* ırk 2 ve *M. javanica*’nın 1000 adet 2. dönem larvası ile inokule edilmiştir. İnokulasyondan 3 ay sonra anaçların köklerinde kök-ur nematodlarının oluşturduğu gal oranı ve topraktaki nematod popülasyonu saptanmıştır. *M. incognita* ve *M. javanica* ile inokule edilen anaçlarda her iki kök-ur nematodu türünün üreme göstermediği tespit edilmiştir (RF=0). Ayrıca köklerdeki gal oranı değerlendirildiğinde, Cadaman anaçının gal indeksi 1 olarak saptanırken, diğer anaçlar gal indeksine göre 0 olarak değerlendirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Dayanıklılık, *Meloidogyne* spp., Mikroçoğaltım, PCR, Prunus anaçları.

### **Evaluation of Resistance for Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica* [Tylenchida: Meloidogynidae]) of Some Prunus Rootstocks Grown *in vitro* Conditions**

**Abstract:** In this study, *in vitro* grown Garnem, Cadaman, and Myrobalan 29C were tested for resistance to root-knot nematodes, *M. incognita* race 2 and *M. javanica*. *In vitro* clonal propagation of Garnem and Cadaman rootstocks were used MST medium with 2.0 mg/l BAP + 0.05 GA<sub>3</sub>. *In vitro* clonal propagation of Myrobalan 29 C was used MS medium supplemented with 1.0 mg/l of BAP. MS and MST media supplemented with different concentration of IBA were used for rooting of shoots.

Potted plants were inoculated with 1000 second stage of juveniles (J2) of *M. incognita* race 2 and *M. javanica*. Three months after inoculation, the ratio of galling in the roots and the number of nematod in the soil of infested rootstocks were recorded. Reproduction ratio of *M. incognita* race 2 and *M. javanica* was calculated as 0 for all tested rootstocks. According to evaluation of gall ratio, gall index of Cadaman was 1 and the gall index of the rest of rootstocks was 0.

**Key Words:** Micropropagation, *Meloidogyne* spp., PCR, Prunus rootstocks, Resistance.

## Giriş

Ülkemizin coğrafik şekli, toprak yapısı ve ekolojik koşulları her ne kadar meyve yetiştiriciliğine uygun olsa da bazı hastalıklar, zararlılar ve nematodlar nedeniyle önemli derecede ürün kayıpları gözlenmekte ve ekonomik düzeyde zarar meydana gelmektedir. Bu zararlı nematod grubundan, *Meloidogyne* (Tylenchida, Meloidogynidae) cinsine bağlı kök-ur nematodları Dünya genelinde ekonomik değeri yüksek bir çok bitki türünde ve (sert ve yumuşak çekirdekli meyveler, sebzeler, endüstri bitkileri, çilek ve süs bitkileri) oldukça geniş konukçu dizisini etkileyen obligat bitki parazitleridir (Sasser, 1977; Lamberti, 1979). Kök-ur nematodlarından *M. arenaria*, *M. incognita* ve *M. javanica* meyve ağaçlarının aktif gelişimini yavaşlatarak ağaçların mukavemetini (direncini) azaltmak ve verim kaybına neden olmaktan dolayı *Prunus* cinsi meyve ağaçlarının (şeftali, badem, kayısı, erik ve kiraz) en büyük sorunlarından birisi olarak ortaya çıkmaktadır (Rom and Carlson, 1987; Nyczepir ve Halbrendt, 1993). Ülkemizde sert çekirdekli meyve gruplarından kayısı ve erik için Myrobalan erik anacı, şeftali ve nektarin için Garnem, GF-677 ve Cadaman anaçları kullanılmaktadır. Myrobalan erik anaçlarında kök-ur nematodlarına en hassas klonlardan en dayanıklı klonlara kadar birçok klonlar bulunmaktadır. Myrobalan 29 kök-ur nematodlarına dayanıklı klon olarak seçilmiş olup, erik ve kaysı çeşitleri bu klon üzerine aşılanmaktadır. Şeftali ve nektarin anaçlarından Garnem ve Cadaman kök-ur nematodlarına dayanıklı (Pinochet ve ark., 1999), GF-677 anacının ise duyarlı olduğu bilinmektedir (Fernandez ve ark., 1994). Anaçların dayanıklılık durumları kök-ur nematodlarının ırklarına göre değişiklik gösterebilmektedir. Doğu Akdeniz Bölgesinde yürütülen bir çalışmada kök-ur nematodlarından *Meloidogyne incognita*'nın ırk 2 popülasyonunun hakim olduğu saptanmıştır (Söğüt ve Elekçioğlu, 2000). Bir çeşidin dayanıklı veya duyarlı olması birçok etmene bağlı olup, bunlar bazı durumlarda dayanıklılığın sürekliliğini etkilemektedir. Bu etmenlerden en önemlisi sıcaklık olup, toprak sıcaklığının ırkların virülensliğini etkileyen diğer bir faktör olarak ortaya çıktığı belirtilmektedir (Fernandez ve ark., 1993). Yine farklı coğrafik yapı ve toprak yapısında da nematodların farklı davrandıkları da yapılan çalışmalarla gözlenmiştir (Canals ve ark., 1992)

Bu çalışma, ülkemizde hızla yetiştiriciliğinin arttığı kaysı, erik, şeftali ve nektarin anaçlarında Doğu Akdeniz Bölgesinde sorun olan kök-ur nematodlarından *Meloidogyne incognita* ve *M. javanica*'ya karşı dayanıklılık düzeylerini araştırmak amacıyla yürütülmüştür. Bu amaçla *in vitro* koşullarda homojen olarak üretilen Myrobalan 29 klonu, Garnem ve Cadaman anaçları üzerinde kök-ur nematodlarının zarar seviyeleri ve gal oluşum oranı ile moleküler seviyede dayanıklılık markörleri araştırılmıştır.

## Materyal ve Yöntem

### Materyal

Bu çalışma 2009-2011 yılları arasında Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Biyoteknoloji ve Nematoloji laboratuvarında yürütülmüştür. *In vitro* koşullarda yetiştirilmiş Myrobalan 29 klonu, Garnem, ve Cadaman anaçları kök-ur nematodlarına dayanıklılık düzeylerinin saptanmasında bitki materyalleri olarak kullanılmıştır. Nematodların çoğaltılarak saf kültürlerinin elde edilmesinde domates bitkisi (Rio Grande) kullanılmıştır. Bölgemizde sert çekirdekli meyve anaçlarında zararlı olan *M. incognita* ve *M. javanica*'nın özellikle 2. dönem larvaları, anaçların enfeksiyonunda nematod kaynağı olarak kullanılmıştır.

### Yöntem

#### Myrobalan 29 Klonu, Garnem, ve Cadaman Anaçlarının *In Vitro* Sürgün Ucu Kültürü İle Çoğaltılması

Çalışmada Myrobalan 29 klonu için Murashige ve Skoog, (1962) makro ve mikro besin elementleri, vitaminleri ve Fe-NaEDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid iron (III) sodium salt), Garnem, ve Cadaman genotipleri için modifiye edilmiş Murashige ve Skoog makro ve mikro elementleri (MS, 1962), 0.4 mg/l thiamine, % 3 sakkaroz ve % 0.85 Sigma agar (MST) ortamı sürgün geliştirme, çoğaltma ve köklendirme aşamalarında kullanılmıştır. MST ve MS ortamlarının tüm bileşenleri eklendikten sonra, besi ortamının pH'sı otoklav ile steril edilmeden önce 5.75'e ayarlanmıştır. Çalışmada kullandığımız Garnem ve Myrobalan 29 klonu anaçlarına ait sürgün uçları nisan-ağustos aylarında taze sürgünlerden alınarak çoğaltılmıştır. Yüzey sterilizasyonu amacıyla 30 sn % 70'lik etil alkolde, daha sonra iki kez % 5'lik ticari sodyum hipoklorit çözeltisinde 5 dakika tutularak sterilize edilmiştir. Sterilize edilen sürgünlerden 3-5 mm büyüklüğünde kesilen Garnem, Cadaman genotiplerine ait sürgün uçları, BAP + GA<sub>3</sub> hormon kombinasyonları (2.0 mg/l BAP + 0.05 mg/l GA<sub>3</sub>) içeren katılaştırılmış MST ortamında, Myrobalan 29 klonu ise 1.0 mg/l BAP içeren katılaştırılmış MS ortamında cam deney tüplerinde (12 ml) kültüre alınmışlardır. Mikro çoğaltım amacı ile geliştirilen sürgünler yan sürgünlerinden ayrıştırılarak her bir macenta kutusunda (75x95 cm) en az 4, en fazla 9 bitki olacak şekilde alt kültürlere alınmıştır. Köklendirme amacıyla modifiye MST ve MS ortamları kullanılmıştır. Sürgün uçlarının kültüre alınmasından yaklaşık 8 hafta sonra gelişen sürgünler Garnem ve Cadaman anaçları için 1.5 mg/l IBA içeren Myrobalan 29 klonu ise 1.0 mg/l IBA + 0.05 mg/l GA<sub>3</sub> hormon kombinasyonunu içeren MST ve MS ortamlarına aktararak kök oluşumları teşvik edilmiştir. Köklenen bitkiler, içinde 0.5 litre hazır torf (Klasmann Potgrond P) bulunan 20 cm çapındaki plastik saksılara aktarılıp, naylon poşet ile kapatılmış ve 2500 lux ışıklandırma, 26±2 °C sıcaklıktaki kontrollü iklim odasında adaptasyonları sağlanmıştır.

#### Kök-Ur Nematodlarının Üretimi

Anaçların nematod ile inokulasyonunda *M. incognita* ırk 2 ve *M. javanica*'nın ikinci dönem larvaları kullanılmıştır. Her iki türün kitle üretimi Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Nematoloji laboratuvarı iklim odasında yapılmıştır.

Sürekli çoğaltılmakta olan kültürlerden mevcut populasyonun devamlılığını sağlamak için 2 ay aralıklarla kültürler yenilenmiştir. Denemede kullanılan yaklaşık 15 cm boyundaki domates fideleri 12 cm çapında 0.5 lt hacmindeki saksılara şaşırtılmıştır. Denemede 1:1 kum kil karışımından olan otoklav edilmiş toprak kullanılmış ve her saksıya bir domates fidesi şaşırtılmıştır. Şaşırtılan fidelerin kök bölgesi yakınına birer delik açılıp daha önceden sökülmiş ve çeşme suyunda yıkanmış *M. incognita* ve *M. javanica* ile bulaşık kökler küçük parçacıklara kesilerek açılan deliklere konulmuştur. Nematod ile bulaşık bitkiler en az 8 hafta  $26 \pm 3$  °C de %  $60 \pm 10$  oranlı neme sahip iklim odasında bekletilmiş ve 8 hafta sonunda fideler sökülüp kökleri yıkanmıştır.

## **Nematodların Elde Edilmesi**

Rio Grande domates bitkisinin köklerinde bulunan kök-ur nematodlarının dişi bireyleri ve 2. dönem larvalarının elde edilmesi için geliştirilmiş Baermann Huni yöntemi kullanılmıştır (Rodriguez ve ark.,1981).

## ***In Vitro* Sürgün Ucu Kültürü Yöntemi ile Elde Edilen Anaçların Kök-ur Nematodlarına Karşı Dayanıklılığının Araştırılması**

Denemeler iklim odasında tesadüf parselleri deneme desenine göre 4 tekerrürlü olacak şekilde saksılarda yürütülmüştür. *In vitro*'da yetiştirilmiş 15-30 cm boyunda toprağa adaptasyonu sağlamış olan Garnem, Cadaman ve Myrobalan 29 klonu 12 cm çapında, 0.5 lt hacminde otoklav edilmiş 1:1 oranında kum kil karışımı içeren saksılara şaşırtılmıştır. Saksılara aktarılmış anaçların kök bölgesinin yakınında bir delik açılmış ve *M. incognita* ve *M. javanica*'nın 1000 adet 2. dönem larvaları her bir anaca ayrı ayrı 4 tekerrürlü olacak şekilde pipet yardımıyla inokule edilmiştir. Nematod ile bulaştırılan anaçlar 12 hafta  $26 \pm 3$  °C de %  $60 \pm 10$  oranlı neme sahip iklim odasında bekletilmiştir. 12 hafta sonra anaçlar sökülüp bitkilerin hem kök sistemi hem de toprak analizleri yapılarak değerlendirme yapılmıştır. Topraktaki nematod varlığı geliştirilmiş Baermann-huni yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Ur indeksi yapılan köklerde Hartman ve Sasser (1985)'in 0-5 skalasına göre değerlendirme yapılarak köklerde nematod gelişimi olup, olmadığı dikkate alınmıştır. İndekse göre köklerde 0-2 skala değeri bulunan bitkiler dayanıklı, 3-5 skala değeri alan bitkiler ise duyarlı olarak değerlendirilmiştir.

## **Moleküler Çalışmalar**

### **DNA İzolasyonu**

Ahrens and Seemüller (1992) tarafından tanımlanan DNA izolasyonu modifiye edilerek kullanılmıştır. Genç yapraklardan DNA izolasyonu aşağıdaki basamaklara göre gerçekleştirilmiştir.

a) 1 g yaprak örneği 4 ml CTAB tampon çözelti (2 % w/v cetyltrimethylammonium bromide, 1.4 M NaCl, 0.2 % 2-mercaptoethanol, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-Base, 2 % polivinylpyrrolidone (PVP), pH 8.0) ile havanda ezilerek homojen duruma getirilmiştir.

b) Ezilen yaprak ekstraktının 0.5 ml'si 1.5 ml'lik endorf tüplere konularak ve 65 °C'de 30 dak. inkübe edilmiştir.

c) Elde edilen bitki doku ekstraktına eşit miktarda kloroform-izoamil alkol (24:1) eklenerek, 1 dak. vorteks ile karıştırılmış ve 14000 rpm de 10 dak. santrüfuj edilmiştir.

d) Santrüfujden sonra üstte biriken sıvı kısım alınmış ve yeni ependorf tüpe aktarılmış ve bu şekilde aynı işlem tekrar edilmiştir.

e) Ependorf tüpün üst kısmında nükleik asiti içeren sıvı kısım yeni ependorf tüpe aktarılmış üzerine eşit miktarda soğuk isopropanol ilave edilmiş ve çökmesi için -20 °C'de 1 gece bekletilmiştir.

f) Ertesi gün DNA ekstraktını içeren ependorflar 12.000 rpm'de 15 dak. santrifuj edilmiştir.

g) Ependorf tüpün alt kısmında biriken tortuya 250 µl % 98'lik etil alkol (EtOH) eklenerek sulandırılmış ve -20 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir.

h) Tüpler 15000 rpm'de 15 dak. santrifuj edilerek, pellet soğutulmuş, % 70'lik EtOH ile yıkanmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur.

i) Kurutulan pellet 50 µl steril saf su ile çözülerek daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de dondurucuda saklanmıştır.

## PCR Analizi

Kök-ur nematoduna karşı dayanıklılığı sağlayan Ma 1 allel gen markör primerleri olarak 2 adet ileri (sense) primer, SCAL19JF1(5'TTAGGTGCAGGAATACCA') SCAL19JF2 (5'CAAATTGATCACCAATGATAC-3') ve bir adet geri (antisense) primer SCAL19-2 (5'-CATTGGAGAAGATTGGCCC-3') kullanılmıştır (Promega). PCR analizi her bir örnek için toplam 25 µl hacimde gerçekleştirilmiş olup, PCR kokteyli 10 µM primerler, 200 µM dNTP, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1/10 hacim 10X tampon çözelti, 1 µl bitki DNA'sı, 1 unite Taq polimeraz ve 25 µl'ye tamamlayacak kadar steril miliQ su içermektedir. Yaklaşık 700 bç PCR sentez ürünü için başlangıçta 94 °C'de 3 dak. ve sonraki 35 döngü için 94 °C'de 45 sn, 55 °C'de 45 sn, 72 °C'de 1 dak. ve son bitiş döngüsü 72 °C'de 5 dak. olarak ayarlanmıştır.

## Agaroz Jel Elektroforez

Agaroz jel 1xTAE [(Trizma, Glacial acetic acid, EDTA)] elektroforez tampon çözeltisi içinde % 2'lik agaroz (Tip I, SIGMA) hazırlanarak kullanılmıştır. Agaroz katılaştıktan sonra jel kalıbı aynı tampon çözeltiyi içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir. DNA örnekleri 1/10 yükleme tampon çözeltisi (% 25 bromofenol mavisi ve % 25 Fikol (400.000)) içerisinde bir pipet yardımı ile çukurlara yerleştirilerek 50 Voltta 1.5 saat elektroforez edilmiştir. Daha sonra jel 0.5 µg/ml etidyum bromide ile boyanmış 260 nm dalga boyunda bir UV transillimünatör (Vilber Lourmat) üzerinde görülebilir duruma getirilmiş ve dijital fotoğrafı çekilmiştir.

## Araştırma Bulguları ve Tartışma

### Myrobalan 29 klonu, Garnem ve Cadaman Anaçların *Meloidogyne incognita* ırk 2 ve *M. javanica*'ya Karşı Dayanıklılığının Araştırılması

*M. incognita* ve *M. javanica*'nın 1000 adet 2. dönem larvası ile inokule edilen anaçlarda, inokulasyondan 3 ay sonra saksılardan sökümü yapılan anaçların topraklarından alınan örnekler incelendiğinde nematodların denemeye alınan 3 anaçta da gelişmediği ve çoğalamadığı görülmüştür (Çizelge 1, 2). Garnem ve Cadaman anaçlarının topraklarından alınan örneklerde *M. javanica*'nın 2. dönem larvalarına rastlanmamıştır. Myrobalan 29 klonunda ise 35 gibi önemsiz sayıda 2. dönem larva saptanmıştır. Bu sonuçlara göre, denemeye alınan *M. javanica* popülasyonu anaçlarda üreyememiştir. Üreme oranları (RF) 0 olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca denemeye alınan anaçların köklerinde gal oluşmadığı saptanmış ve gal indeksine göre 0 olarak değerlendirilmiştir. *M. javanica*'ya karşı denemeye alınan anaçların tümü dayanıklı bulunmuştur. Stalin ve ark., (1998) Myrobalan'ın *in vitro* da çoğaltılmış 9 klonunu kök-ur nematodunun sırasıyla Fransa, Fas ve İspanya orjinli 4 izolata karşı [*M. incognita* (2), *M. javanica* (1), *M. hispanica* (1)] testlemişler. Kök-ur nematodunun 10.000 inokulasyon yoğunluğunda bile Myrobalan'ın dayanıklı klonlarında herhangi bir gal oluşumuna rastlanmadığını bildirmişlerdir. *M. incognita*'nın 1000 adet 2. dönem larvası ile inokule edilen anaçlarda, inokulasyondan 3 ay sonra saksılardan sökümü yapılan anaçların topraklarından alınan örnekler incelendiğinde, Garnem ve Cadaman anaçlarının topraklarından alınan örneklerde *M. javanica*'nın 2. dönem larvalarına rastlanmamıştır. Myrobalan 29 klonunda ise 2. dönem larvalarında dikkate değer bir çoğalma (35 larva/cm<sup>3</sup> toprak) görülmemiştir. Başlangıçta verilen inokulasyon yoğunluğu ve sonuç popülasyon yoğunlukları karşılaştırıldığında (Pf/Pi) çoğalma oranları (RF) 0 olarak değerlendirilmiştir. *M. incognita*'nın denemeye alınan anaçlar üzerindeki gelişme durumu incelendiğinde, Myrobalan 29 klonu ve Garnem anaçlarının köklerinde herhangi bir gal oluşumu gözlenmemiş ve gal indeksine göre 0 olarak değerlendirilmiştir. Cadaman anacında ise bir bitkiye ait kökte 1 gal olduğu saptanmış olup, gal indeksine göre 1 olarak değerlendirilmiştir. *M. incognita*'ya karşı denemeye alınan anaçların tümü dayanıklı bulunmuştur. Sonuçlarımızın aksine, Di Vito ve ark., (2005) *M. javanica*'nın İtalyan popülasyonlarının şeftalilerde oldukça patojen olduğunu, bulaşık alanlarda şiddetli ürün kayıplarına neden olabileceğini vurgulamışlardır. Lu Zhen Xiang ve ark., (2000) ise kök ur nematodlarının (*M. incognita* ve *M. javanica*) duyarlı şeftali anaçlarında (Lovell) ve dayanıklı şeftali anaçlarında (Nemared) yaptıkları çalışmalarında, bu nematodların, bitkilerin büyümesinde gerilemeye neden olmadıklarını bildirmişlerdir.

**Çizelge 1.** *İn Vitro*'da üretilmiş Myrobalan 29, Garnem ve Cadaman meyve anaçları üzerinde nematod inokulasyonundan 3 ay sonra *M. javanica*'nın gelişme durumu ve gal indeksi

Anaçlar	Anaç sayısı (n)	Ort. Toprak sıcaklığı (°C)	İnokulasyon yoğunluğu (Pi)	Larva/cm <sup>3</sup> toprakta (Pf)	R (Pf/Pi) (Çoğalma oranı)	Gal indeksi (0-5)	Dayanıklılık durumu
MYROBALAN 29C	21	26 ± 3	1000	35	0	0	R
GARNEM	9	26 ± 3	1000	0	0	0	R
CADAMAN	3	26 ± 3	1000	0	0	0	R

Pi: İnokulasyon yoğunluğu Pf: Sonuç populasyon yoğunluğu R: reproduction (çoğalma oranı) R: dayanıklı (Resistant)

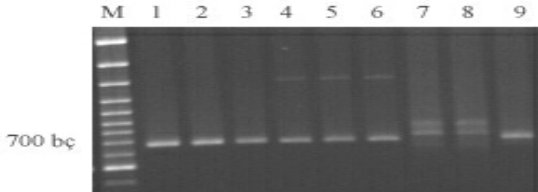
**Çizelge 2.** *İn Vitro*'da üretilmiş Myrobalan 29, Garnem ve Cadaman meyve anaçları üzerinde nematod inokulasyonundan 3 ay sonra *Meloidogyne incognita*'nın gelişme durumu ve gal indeksi

Anaçlar	Anaç sayısı (n)	Ort. Toprak sıcaklığı (°C)	İnokulasyon yoğunluğu (Pi)	Larva/cm <sup>3</sup> toprakta (Pf)	R (Pf/Pi) (Çoğalma oranı)	Gal indeksi (0-5)	Dayanıklılık durumu
MYROBALAN 29C	18	26 ± 3	1000	35	0	0	R
GARNEM	8	26 ± 3	1000	0	0	0	R
CADAMAN	3	26 ± 3	1000	0	0	1	R

Pi: İnokulasyon yoğunluğu Pf: Sonuç populasyon yoğunluğu R: reproduction (çoğalma oranı) R: dayanıklı (Resistant)

## PCR Analizi

Myrobalan erik anaçlarının dayanıklı hatlarında bulunan kök-ur nematodlarına dayanıklılık sağlayan Ma 1 allel genine spesifik SCAL19JF1, SCAL19JF2 ve SCAL19-2 primerleri (Claverie ve ark., 2004) ile yaklaşık 700 bç kadar DNA bandı denemeye alınan tüm anaçlarda sağlanmıştır (Şekil 1). Ma 1 allel geni ile bağlantılı SCAR markörü SCAL 19 primerleri Lecouls ve ark., (1999) tarafından *Prunus* anaçlarında dominant markör olarak kullanılmıştır. Bu markör dominant olup *Prunus*larda tek bir fragment vermektedir.



**Şekil 1.** *Meloidogyne javanica* ve *Meloidogyne incognita* ırk 2 ile inokule edilen Garnem, Myrobalan 29 ve Cadaman anaçlarının SCAL19JF1, SCAL19JF2 ve SCAL19-2 ile PCR analiz sonuçları. M: 100 bç plus marker, 1-3: Cadaman, 4-6: Garnem, 7-9: Myrobalan 29.

Myrobalan 29 klonunun 2 hattında (7 ve 8) birbirine yakın uzunlukta iki farklı DNA bandı elde edilmiş diğer hattında sadece beklenen bir adet DNA bandı elde edilmiştir. Ma 1 alel gene spesifik primerler homozigot dominant hatlarda bu DNA bantlarının hepsini vermektedir. Nitekim Lecouls ve ark., (1999) yaptığı PCR analizinde nematoda dayanıklı olduğu bilinmeyen bitkilerde tek bir fragment vermediği bildirilmiştir.

## Öneriler

Yapılan bu çalışmada denemeye alınan anaçların yanı sıra GF-305 gibi kök-ur nematodlarına çok duyarlı anaçlarında ilave edilmesi gerekmektedir. Ayrıca, nematodların farklı inokulasyon yoğunlukları ve kök-ur nematodunun gelişmesi ve çoğalması için gerekli optimum koşulların, önceden optimizasyon çalışması yaparak elde edilen en uygun testleme parametrelerinin kullanılmalıdır. Laboratuvar koşullarında denemeye alınan bitkilerin dış ortam koşullarında da testlenerek tekrar edilmesi, bu anaçların bölgede mevcut nematodlara karşı dayanıklılık ve duyarlılıklarını daha net olarak belirleyecektir. Mevcut literatür bilgilerine göre, Myrobalan erik anacının kök-ur nematodlarına çok duyarlı ve çok dayanıklı hatları olduğu bilinmektedir. Ülkemizde mevcut Myrobalan erik anaçlarının kök-ur nematodlarına dayanıklılık düzeyi tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışma bölgede mevcut kök-ur nematodlarına sert çekirdekli meyve anaçlarının dayanıklılık düzeylerinin saptanması açısından ilk çalışma olup, denemelerin tekrar edilmesi ve nematodla bulaşık açık alanlarda da testlenmesi zorunludur. Myrobalan erik anaçlarının dayanıklı hatlarında bulunan kök-ur nematodlarına dayanıklılık sağlayan Ma 1 allel genine spesifik SCAL19JF1, SCAL19JF2 ve SCAL19-2 primerleri ile yaklaşık 700 bç kadar DNA bandı denemeye alınan tüm anaçlarda sağlanmıştır. Ancak, burada kullanılan markör gen primerleri kök-ur nematodlarına dayanıklılığı belirleme açısından tam olarak yeterli olmayıp, ayrıca RAPD markörleri ile de testlenmesi gerekmektedir (Claverie ve ark., 2004a; Dirlwanger ve ark., 2004).

## Kaynaklar

- Ahrens, U., and Seemüller, E., 1992. Detection of DNA of Plant Pathogenic Mycoplasma-like Organisms by a Polymerase Chain Reaction That Amplifies a Sequence of the 16S rRNA Gene. *Phytopathology*, 82: 828-832.
- Canals, J., Pinochet, J., Felipe, A., 1992. Temperature and age of plant affect resistance in peach – almond hybrid rootstock infected with *Meloidogyne javanica*. *HortScience*, 27:1211-1637.
- Claverie, M., Bosselut, N., Lecouls, A. C., Voisin, R., Lafargue, B., Poizat, C., Kleinhentz, M., Laigret, F., Dirlwanger, E., Esmenjaud, D., 2004a. Location of independent root-knot nematode resistance genes in plum and peach. *Theor. Appl. Genet*, 108: 765-773.
- Claverie, M., Dirlwanger, E., Bosselut, N., Lecouls, A.C., Voisin, R., Kleinhentz, M., Lafargue, B., Caboche, M., Chalhoub, B., Esmenjaud, D., 2004b. High resolution mapping and chromosome landing at the root-knot nematode resistance locus Ma from Myrobalan plum using a large-insert BAC DNA library. *Theor. Appl. Genet*. 109:1318–1327.
- Dirlwanger, E., Graziano, E., Joobeur, T., Garriga-Calderé, F., Cosson, P., Howad, W., Arus, P., 2004b. Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101(26):9891–9896



- Di Vito, M., Simeone, A. M., Catalano, F., 2005. Effect of the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, on the growth of a peach (*Prunus persica*) rootstock in pots. *Nematol. Medit.*, 33:87-90.
- Esmenjaud, D., Minot, J.C., And Voisin, R., 1996 Effects of durable inoculum pressure and high temperature on root galling, nematode numbers and survival of Myrobalan plum genotypes (*Prunus cerasifera* Ehr.) highly resistant to *Meloidogyne* spp. *Fundam. Appl. Nematol.*, 19 (1): 85-90.
- Fernandez, C., Pinochet, J., Felipe, A., 1993. Influence of Temperature on the Expression of Resistance in Six *Prunus* Rootstocks Infected with *Meloidogyne incognita*. *Nematropica*, Vol. 23, No. 2.
- Fernandez, C., Pinochet, J., Esmenjaud, D., Salesses, G., Felipe, A., 1994. Resistance among new *Prunus* rootstocks and selections to root-knot nematodes in Spain and France. *HortScience*, 29: 1064 - 1067.
- Hartman K. M., Sasser J. N., 1985. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal-pattern morphology. In: Barker, K. R., Carter, C. C., Sasser, J. N., (eds). *An Advanced treatise on Meloidogyne*, Vol. 2. Methodology. Raleigh: North Carolina State University Graphics, 69-77.
- Lamberti, F., 1979. Economic importance of *Meloidogyne* spp. in subtropical and mediterranean climates. In: *Root-knot nematodes (Meloidogyne species): Systematics, biology and control* (Eds.: F. Lamberti, C.E. Taylor). Academic Press, London, pp. 342-357.
- Lecouls, A. C., Rubio-Cabetas, M. J., Minot, J. C., Voisin, R., Bonnet, A., Salesses, G., Dürlewanger, E., Esmenjaud, D., 1999. RAPD and SCAR markers linked to the Mal root-knot nematode resistance gene in Myrobalan plum. (*Prunus cerasifera* Ehr.) *Theor. Appl. Genet.*, 99:328-335.
- Lu ZhenXiang, Reghard G.L., Nyczepir A.P. and Beckman T.G., 2000. Inocula and media affect root-knot nematode infection of peach seedling roots. *Journal of American Pomological Society*, 54:76-78.
- Murashige, T. And Skoog, F. A., 1962. A Revised medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15, pp. 473-497.
- Nyczepir A.P. And Halbrendt, J.M. 1993. Nematode pests of deciduous fruit and nut trees. In: Evans K., Trudgill D.L. and Webster J.M. (eds) *Plant parasitic nematodes in temperate agriculture*, CAB, Oxon, pp. 381-425.
- Pinochet, J., Calvet, C., Hernandez-Dorrego, A., Bonet, A., Felipe, A., Moreno, M., 1999. Resistance of peach and plum rootstocks from Spain, France and Italy to root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *HortScience*, 34: 1259 - 1262.
- Rodriguez-Kabana, R., Pope, M.H., 1981. A simple incubation method for the extraction of nematodes from soil. *Nematropica* 11, 175-185.
- Rom, R.C., Carlson, R.F., 1987. *Rootstocks for fruit crops*. John Wiley and sons. New York.
- Sasser J.N. 1977. Worldwide dissemination and importance of the rootknot nematodes, *Meloidogyne* spp. *J. Nematol.* 9:26-29.
- Söğüt, M.A., ve Elekçioğlu, İ.H., 2000. Akdeniz Bölgesi'nde Sebze Alanlarında Bulunan *Meloidogyne* Goeldi, 1892 (Nemata:Heteroderidae) Türlerinin İrklarının Belirlenmesi. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 24 (1) : 33-40.
- Stalin, N., Salesses, G., Pinochet, J., Minot, J.C., Voisin, R., And Esmenjaud, D., 1998. Comparative host suitability to *Meloidogyne* spp. and *Pratylenchus vulnus* in Myrobalan Plum (*Prunus cerasifera*). *Plant pathology* 47 : 211-215.

