

## MUZ ALANLARINDA KÖK UR NEMATODLARI (*Meloidogyne* spp.)'NİN TEŞHİSİ\*

Adem ÖZARSLANDAN<sup>1</sup>

Dilek DİNÇER<sup>2</sup>

Mustafa ÜNLÜ<sup>3</sup>

**Özet:** Muz, tropik ve subtropik iklime sahip mikro klima alanlarında yetişen bir meyve olup ülkemizde ekonomik olarak Akdeniz Bölgesi'nde yetiştiriciliği yaygın olarak yapılmaktadır. Muz bitkisinin en önemli zararlılarından biri de bitki paraziti nematodlardır. Muz alanlarında spiral nematodu (*Helicotylenchus multicinctus*) ve Kök ur nematodları (*Meloidogyne incognita* ve *M. javanica*' *Meloidogyne* spp.) ekonomik olarak zarar yaptığı ve yaygın olarak karışık popülasyon olarak buldukları bilinmektedir. Survey çalışmasında Kök ur nematodu ile infekteli muz köklerinden nematodlar elde edilmiştir. Nematodlar domates fidelerine inokulasyonları yapılmıştır. Domates köklerinden nematodun yumurta kümeleri toplanarak Qiagen'nun DNA izalasyon kiti kullanılmıştır. 194/195 primerleri ile pcr yapılarak türlere bakılmıştır. Daha sonra türe spesifik primerler (Far/Rar, Fjav/Rjav, INC-K14F-INCK14R) ile PCR yapılmıştır. Kök ur nematodlarında kullanılan genel primer 194/195 primeri olup tropikal türlerde (*M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*) 720 bp de bant oluşturmuştur. *M. javanica* için spesifik primer olup 670 bp de, *M. incognita* için ise 399 bp de bant oluşturduğu saptanmıştır. *M. javanica*'nın *M. incognita*'dan daha yaygın olduğu saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Muz, kök ur nematodu, teşhis

## DIAGNOSIS of ROOT KNOT NEMATODES (*Meloidogyne* spp.) in BANANA FIELDS

**Abstract:** Banana is a fruit that grows in tropical and subtropical climate microclimate areas and cultivation is being done in the Mediterranean region in our country. One of the most important pests of the banana plant is plant parasitic nematodes. Spiral nematode (*Helicotylenchus multicinctus*) and root nematodes (*Meloidogyne* spp.) are known to cause economic damage in banana areas. Spiral nematode and root knot nematode in banana areas are found as a mixed population. However, it is known that *H. multicinctus* has high population level in banana areas than *Meloidogyne incognita* and *M. javanica*. In the survey, nematodes were obtained from the infected roots of banana by root knot nematode. Nematodes were inoculated onto tomato seedlings. The DNA isolation kit of Qiagen was used for DNA isolation from collected egg clusters of the nematodes on the roots of tomatoes. 194/195 primers were used to look at the species. Subsequently, species-specific primers (Far / Rar, Fjav / Rjav, INC-K14F-INCK14R) were used for PCR study. The primary primer used in root knot nematodes was 194/195 primer and formed a band at 720 bp in tropical species (*M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*). The specific primer for *M. javanica* was found to form bands at 670 bp and *M. incognita* at 399 bp. *M. javanica* was found to be more prevalent than *M. incognita*.

**Key Words:** Banana, root knot nematode, diagnosis

\* Bu çalışma "Akdeniz bölgesi Muz alanlarında önemli bitki paraziti nematodların yaygınlığı, popülasyon dalgalanması ve zarar durumlarının belirlenmesi" 1130473 nolu proje TÜBİTAK tarafından desteklenen projenin bir bölümüdür.

<sup>1</sup> Mersin Üniversitesi, Silifke Uygulamalı Teknoloji ve İşletmecilik Yüksekokulu Silifke Mersin Türkiye

Sorumlu yazar: aozarslandan@mersin.edu.tr

<sup>2</sup> Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü Yüreğir Adana Türkiye

<sup>3</sup> Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Erdemli / Mersin Türkiye

## GİRİŞ

Muz dünyada tropikal ve subtropikal iklim bölgelerinde büyük bir ekonomik öneme sahiptir. Ülkemizde Anamur, Bozyazı, Gazipaşa, Alanya, Silifke, Erdemli, İskenderun çevresinde, yoğun olarak Toros dağlarının koruduğu mikro klimalarda muz üretimi yapılmaktadır. Muz alanlarında bitki paraziti nematodlar ekonomik olarak ürün kayıplarına neden olmaktadır. Yapılan birçok çalışmada önemli bitki paraziti nematodlarından oyucu nematod (*Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949, (Tylenchida: Pratylenchidae); spiral nematodu (*Helicotylenchus multicinctus* Cobb, 1893 tylenchida: Hoplolaimidae); lezyon nematodu (*Pratylenchus* spp.) ve Kök ur nematodunun (*Meloidogyne* spp.) muz alanlarında ekonomik olarak zarar yaptığı bildirilmiştir (Mant and Hinai 1996, Brooks 2004, Chávez and Araya 2010). Ülkemizde muz alanlarında yapılan çalışmalarda *H. multicinctus*, *H. dihystra* (Cobb, 1893), *M. incognita* (Kofoid & White, 1919) ve *M. javanica* (Treub, 1885) tespit edilmiştir (Elekçioğlu ve Uygun 1994, Özarıslandan ve Elekçioğlu 2010). Mersin'in Bozyazı ilçesindeki muz seralarında *H. multicinctus*'un, *Meloidogyne incognita* ve *M. javanica*' dan daha fazla populusyona sahip olduğu tespit edilmiştir (Elekçioğlu ve ark., 2014; Özarıslandan ve Dincer, 2015). Nematodlar muz bitkisinin kök ve dokularına saldırarak bitkinin kök fonksiyonlarını bozmak suretiyle su ve besin alımını engellemektedirler. Dolayısıyla, bitkide bodurluk, gövdede incelme, yapraklarda sarılık, yaprak sayısı ve büyüklüğünde azalma, geç çiçeklenme, ürün döngüsünde uzama, hevenk ağırlığında azalma, meyve iriliği ve ağırlığının düşmesine neden olarak önemli verim kayıplarına yol açarlar (Fogain ve Gowen 1997, Araya ve ark., 1999). Köklerin toprağa tutunması azaldığından meyve döneminde veya sert rüzgarlar ile ağırlaşan muz ağaçlarının devrildiği bildirilmiştir (Whitehead 1998). Dünya çapında muz yetiştirilen alanlarda yapılan çalışmalarda nematodlardan dolayı oluşan ürün kaybının ortalama %19,7 olduğu (Sasser ve Freckman 1987), bu kayıp oranlarının Filipinler' de %14,3-60,5 (Davide 1994), Meksika Porto Riko'da %50 (Roman 1986), Güney Afrika'da %75-80 (Sarah 1989) civarında olduğu tespit edilmiştir. Davide (1995), oyucu ve spiral nematodların dünya çapında muz yetiştirilen alanlarda problem olduğunu, Kosta Rika ve Panama'da %30-50, Afrika'da %40, Hindistan'da %30-60 oranında ürün kaybına neden olduğunu saptamıştır. Tamil Nadu bölgesinde önemli muz yetiştirme alanlarında yürütülen çalışmalarda %30-60 oranında verim kaybına neden olan nematodların kök ur nematodu, kök oyucu nematodu ve spiral nematodu olduğu tespit edilmiştir (Jonathan 1994). Bu çalışmada muz alanlarından elde edilen Kök ur nematodlarının klasik ve moleküler olarak teşhis yapılarak türlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

Surveylerde alınan toprak ve kök örneklerinden kök ur nematodlarını elde etmek için hassas domates çeşitlerine verildi. İnokulasyondan 60 gün sonra köklerden yumurta paketleri toplandı. Yumurta paketleri suda bekletilerek larvalar elde edildi. Nematodlar Hooper, 1986'ya göre fikse edilmiş olup, fikse edilen nematodlar Seinhorst (1959) yöntemine göre saf gliserin içerisine alınmıştır. Saf gliserin içerisine alınan nematodlar cinslerine göre ayrılarak, balmumu-yüzük (wax-ring) yöntemiyle önceden hazırlanmış olan lam üzerine alınmış daha sonra lamel ile ısıtıcı üzerinde sabitleştirilmiş ve tür teşhisleri yapılmıştır (Hooper, 1986).

Morfolojik teşhis. Nematode teşhisi mikroskop altında *Meloidogyne* spp.'nin karakteristik özelliğine bakılarak karar verilmiştir. Kök ur nematodunun perinial kesiti, larva özelliklerine (Larva uzunluğu, larvanın hyalin uzunluğu, kuyruk uzunluğu, Dorsal ösafagus gland bezi açıklığı ile stilet tokmakçığı arasındaki uzaklık (DGO) gibi özelliklerine bakılmıştır (Siddiqi, 2000).

Moleküler Teşhis .DNA izolasyonu köklerden elde edilen 10-15 yumurta kümesinden yapılmıştır. Karışık popülasyonun olup olmadığı belirlemek için fazla yumurta kümesi kullanılmıştır. Qiagen'nin DNAeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, 69504) protokolüne göre DNA izalasyonu yapılmıştır.

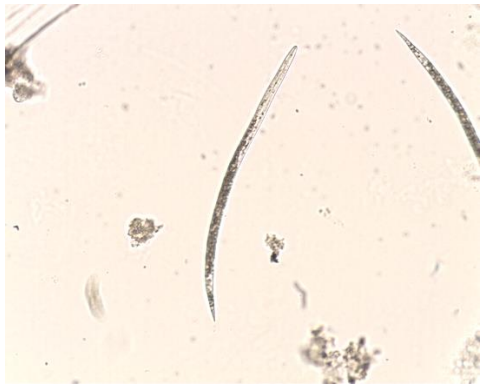
Akdeniz Bölgesi'nde muz alanlarında alınan örneklerde Kök ur nematodlarının moleküler teşhis çalışmaları yürütülmüştür. 194 TTAAGTTGCCAGATCGGACG 5S-18S ribosome region195 TCTAATGAGCCGTACGC Blok *et al.* (1997), *M. arenaria*-specific SCAR Far TCGGCGATAGAGGTAAATGAC, Rar TCGGCGATAGACACTACAAACT Zijlstra *et al.* (2000). *M. javanica*-specific SCAR Fjav GGTGCGCGATTGAACTGAGC, Rjav CAGGCCCTTCAGTGGAAGTATAC Zijlstra *et al.* (2000). JMV1 GGATGGCGTGCTTTCAAC *M. hapla-*, *M. chitwoodi*- ve JMV2 TTTCCCTTATGATGTTTACCC *M. fallax*-specific IGS-SCAR JMV hapla AAAAATCCCCTCGAAAAATCCACC Wishart *et al.* (2002). *M. incognita*-specific SCAR Inc-K14-F GGGATGTGTAATGCTCCTG Inc-K14-R CCCGCTACACCCTCAACTTC Randig *et al.* (2002)

PCR döngüsü 94 °C de 3 da, 94 °C de 30 sn, 50 °C(194/195 primerleri), 61 °C(Far/Rar), 64 °C(Fjav/Rjav), 50 °C(JMV primerleri), de 30 sn, 72 °C de 120 sn ve PCR 35 döngü, son olarak 72 °C 7 da süre olacak şekilde gerçekleştirmiştir. INC-K14F-INCK14R primer çifti için başlangıçta 95 °C 5 dk, 94 °C 30 sn, 58°C 45 sn, 70 °C 1dk 30 döngü ve sonunda72 °C 8 dk olarak tamamlanmıştır. (Adam ve ark., 2007).

#### SONUÇ ve TARTIŞMA

Bu çalışmada muz alanlarından elde edilen nematodun analizi sonucu *M. javanica* ve *M. incognita* olduğu saptanmıştır (Şekil 1; Şekil 2). *M. javanica* ve *M. incognita*'nın morfolojik özelliği ile ilgili daha önce yapılmış çalışmalar ile paralellik gösterdiği belirlenmiştir (Siddiqi, 2000).

Survey çalışmalarında muz alanlarında *H. multincinctus*, *M. javanica* ve *M. incognita* yaygın olarak tespit edilmiştir. Moleküler çalışmalarda her ne kadar *M. javanica*, *M. incognita*'dan fazla tespit edilse de mikroskop sayımlarında da larva olarak *M. javanica* larvaları baskın olup *M. incognita* larvalarına da rastlanmış karışık popülasyon olarak tespit edilmiştir. Fakat hemen hemen bütün seralarda karışık populasyon olmalarına rağmen moleküler çalışmalarda çok az sayıda serada karışık olarak tespit edilmiştir.



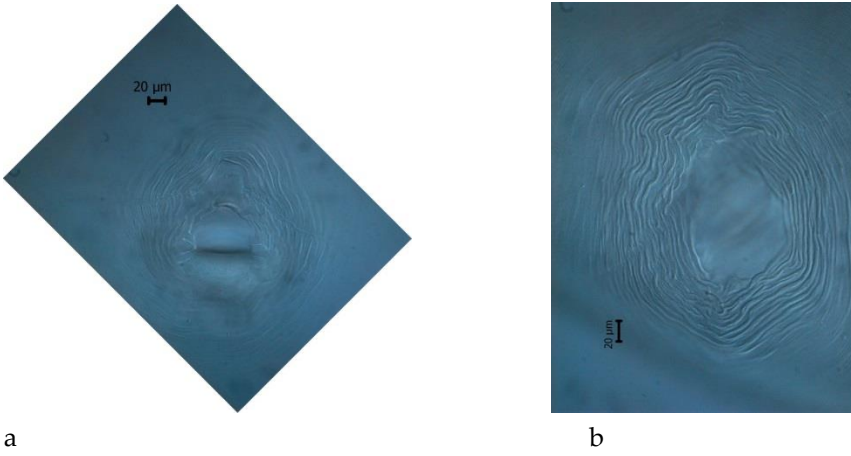
a



b



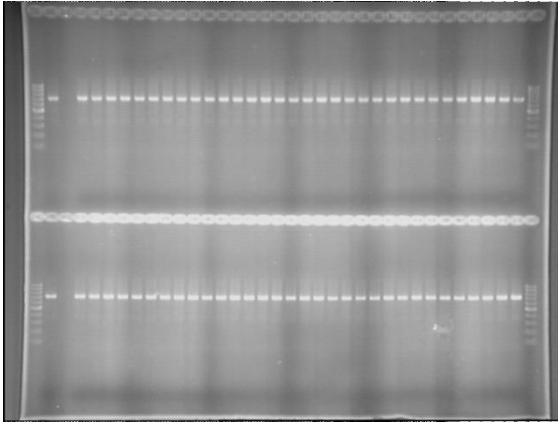
c d  
Şekil 1. *M. javanica* larvası (a, b) ve *M. incognita* larvası (c, d)



a b  
Şekil 2. *Meloidogyne javanica* (a) ve *Meloidogyne incognita* (b) perineal kesitleri

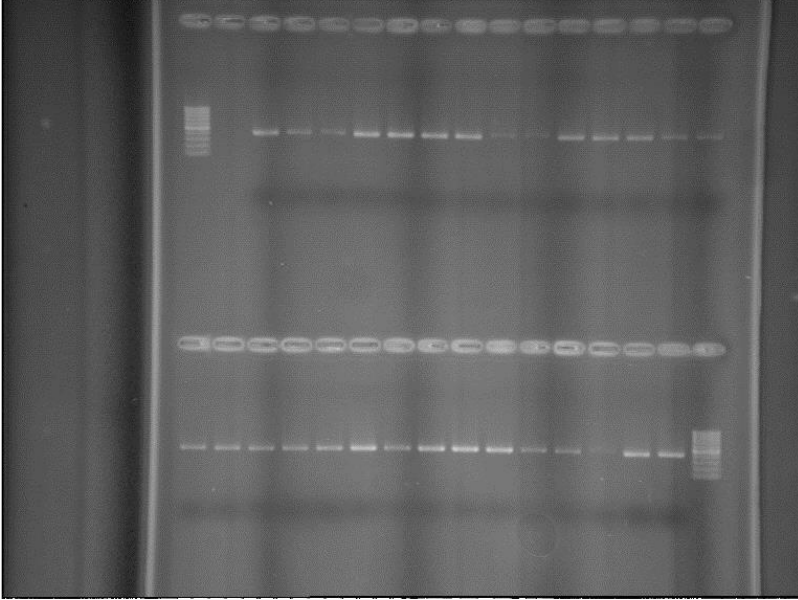
### Moleküler Teşhis

Kök ur nematodlarında kullanılan genel primer 194/195 primeri olup Tropikal türlerde (*M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*) 720 bp de bant oluşturmaktadır(Şekil 3). Diğer türlerde farklı yerlerde bant oluşturmaktadır. Adam vd., (2007). Yaptıkları çalışmada da Kök ur nematodları için (*M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*) 720 bp de bant oluşturduğunu saptamışlardır. Bizim bulgularımız önceki araştırma sonucu ile uyumluluk göstermiştir.

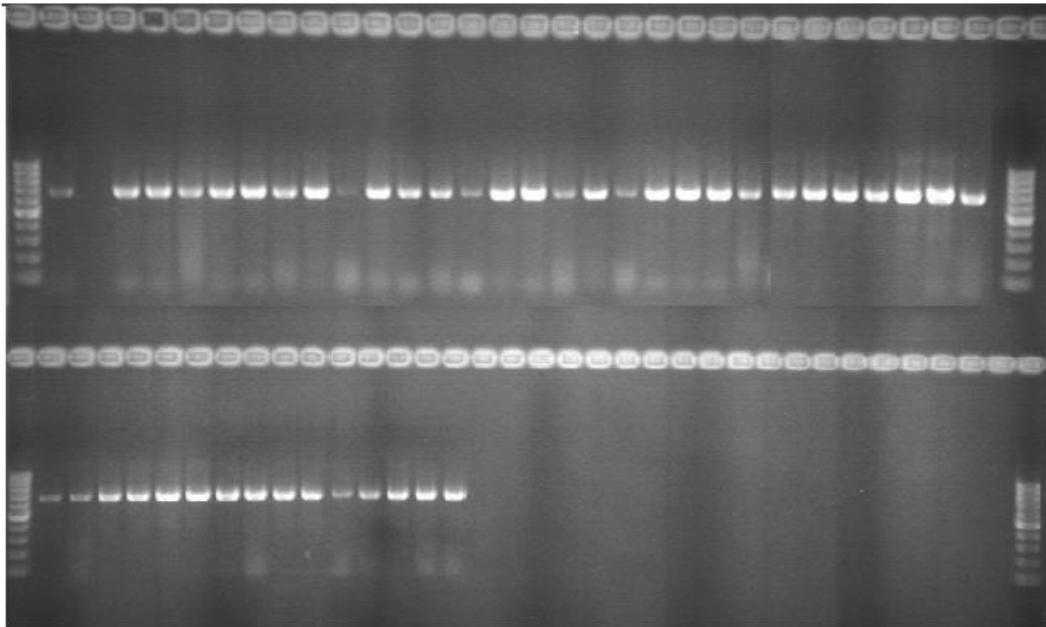


Şekil 3. Kök ur nematodlarını için 194/195 genel primer olup tropikal türlerde 720 bp de bant oluşturdu.

*Meloidogyne incognita*'nın moleküler tanımlanmasında, Inc-K14F ve Inc-K14R primerleri kullanılmıştır. Bu primerlerin, pozitif olan örneklerde yaklaşık 400 bp uzunlukta DNA bandı oluşturdukları saptanmıştır (Şekil 4). Randig vd., (2002). Inc-K14F ve Inc-K14R primerleri kullanarak dört farklı *M. incognita* popülasyonunda yaklaşık 400 bp DNA bandını elde etmişlerdir. Bir başka çalışmada da Devran ve Söğüt (2009). 60 farklı *M. incognita* popülasyonu üzerinde yapılan çalışmada beklenen DNA bandını elde etmişlerdir. Bizim bulgularımız önceki araştırma sonuçlarıyla uyumluluk göstermiştir.



Şekil 4. *M. incognita* için spesifik primer olup 400 bp de bant oluşturdu.



Şekil 5. *M. javanica* için spesifik primer olup 670 bp de bant oluşturdu.

*Meloidogyne javanica*'nın moleküler teşhisinde Fjav ve Rjav primerleri kullanılmıştır. Bu primerlerin, pozitif olan örneklerde yaklaşık 670 bp'da bant oluşturdukları saptanmıştır (Şekil 5). Fjav ve Rjav primerleri kullanılarak yapılan moleküler çalışmalarda *M. javanica*'ya ait popülasyonlarda 670 baz DNA bandı elde edilmiştir (Zijlstra vd., 2000; Tzortzakakis vd., 2005). Batı Akdeniz Bölgesi'nde Kök-ur

nematodu türlerinin moleküler tanımlanmaları amacıyla yürütülen çalışmada *M. javanica*' ya ait 28 popülasyonun tamamında beklenen 670 bp DNA bandını elde etmişlerdir (Devran ve Söğüt, 2009). Bizim sonuçlarımız önceki araştırma sonuçlarıyla benzerlik göstermiştir

#### KAYNAKLAR

- Adam, M.A.M. Phillips, M.S. ve 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.
- Araya, M. Vargas, A. ve Cheves, A. (1999). Nematode distribution in roots of banana (*Musa* AAA cv. Valery) in relation to plant height, distance from the pseudostem and soil depth. *Nematology* 1:711-716.
- Blok, V. C., Phillips, M. S. McNicol, J. W. ve Fargette. M.(1997). Genetic variation in tropical *Meloidogyne* spp. as shown by RAPD-PCR. *Fundamental and Applied Nematology* 20:127-133.
- Brooks, F. E. (2004). Plant-Parasitic Nematodes of Banana in American Samoa. *Nematropica* 34: 65-72.
- Chavez, C. ve Araya, M. (2010). Spatial-temporal distribution of plant-parasitic nematodes in banana (*Musa* AAA) plantations in Ecuador. *Journal of Applied Biosciences* 33: 2057 – 2069
- Davide, R. G. (1994). Status of nematode and weevil borer problems affecting banana in the Philippines. Pp. 79–89 in R. V. Valmayor, R. G. Davide, J. M. Stanton, N. L. Treverrow, and V. N. Roa, eds. *Banana nematodes and weevil borers in Asia and the Pacific*. Montpellier, France: INIBAP.
- Davide, R. G. (1995). Overview of nematodes as a limiting factor in *Musa* production. Pp. 27-31 in E. A. Frison, J- P. Horry, and D. DeWaele, eds. *New Frontiers in Resistance Breeding for Nematode, Fusarium and Sigatoka*. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France.
- Devran, Z. ve Söğüt, M.A. (2009). Distribution and identification of Root-knot nematodes from Turkey. *Journal of Nematology*,41 (2): 128-133.
- Elekçioğlu, İ.H. Yoraz G. ve Kasapoğlu, E.B. (2014). "Mersin ili Bozyazı ilçesinde muz seralarında spiral nematodlar (*Helicotylenchus dihystra* ve *H. multincinctus*) ile Kök-Ur nematodu türlerinin (*Meloidogyne incognita* ve *M. javanica*) popülasyon değişiminin araştırılması. ", Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi , ANTALYA, TÜRKİYE, 3-5 Şubat 2014, ss.6-6
- Elekçioğlu, İ. H. ve Uygun, N. (1994). Occurrence and distribution of plant parasitic nematodes in cash crop in Eastern Mediterranean Region of Türkiye. *Proc. of 9th Congress of The Mediterranean Phytopathological Union, Kuşadası Aydın, Türkiye*, 409-410.
- Fogain R. and Gowen S. R. (1997). Damage to roots of *Musa* cultivars by *Radopholus similis* with and without protection of nematicides. *Nematropica*, 27:27-32.
- Hooper, D. J. (1986). "Extraction of Free Living Stages From Soil, 5–30". In: *Labarotory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes*. (Ed. Southey, J.F.). Her Majesty's Stationery Office, London..
- Jonathan, E. I. (1994). Studies on the root knot nematode *Meloidogyne incognita* on banana cv. Poovan. Ph.D. Thesis, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, India, 185 pp.
- Mant, A. & S. AL Hinai, (1996). Population dynamics and control of plant parasitic nematodes on Banana in the Sultanate of Oman. *Nematologia Mediterranea*, 24: 295-299.
- Özarslandan A. ve Elekçioğlu İ. H. (2010). Identification of the Root-knot nematode species (*Meloidogyne* spp.) (Nemata: Meloidogynidae) collected from different parts of Turkey by molecular and morphological methods. *Türk. entomol. derg.*, 34(3): 323- 335

- Özarslandan, A. ve Dinçer, D. (2015). Türkiye’de muz alanlarında bulunan bitki paraziti nematodlar. Bitki Koruma Bülteni, 55 (4): 361-372.
- Randig, O. Bongiovanni, M. Carneiro, R.M.D.G. ve 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.
- Roman J. (1986). Plant-parasitic nematodes that attack banana and plantains. Pp. 6–19 in Plant-parasitic nematodes of banana, citrus, coffee, grapes, and tobacco. Research Triangle Park, NC: Union Carbide Agricultural Products.
- Sarah J. L. (1989). Banana nematodes and their control in Africa. *Nematropica*, 19: 199-216.
- Sasser, J. N. ve Freckman, D. W. (1987). A world perspective on nematology: The role of the society. Pp. 7–14 in J. A. Veech, and D. W. Dickson, eds. *Vistas on nematology*. Hyattsville, MD: Society of Nematologists.
- Seinhorst, J.W. (1959). A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica*, 4: 67–69.
- Siddiqi, MR. (2000). *Tylenchida parasites of plants and insects*. Wallingford, UK: CAB International.
- Tzortzakakis, E.A. Adam, M.A.M. Blok V.C. Paraskevopoulos, C. ve Bourtzis, K. (2005). Occurrence of resistance breaking populations of Root-knot nematodes on tomato in Greece, *European Journal of Plant Pathology*, 113: 101-105.
- Whitehead A. G. (1998). Semi-endoparasitic nematodes of roots (*Helicotylenchus*, *Rotylenchulus* and *Tylenchulus*). Pp. 90-137 in *Plant Nematode Control*. CAB International, Wallingford, UK
- Wishart, J., Phillips M. S. ve Blok, V. C. (2002). Ribosomal intergenic spacer: A polymerase chain reaction diagnostic for *Meloidogyne chitwoodi*, *M. fallax*, and *M. hapla*. *Phytopathology*, 92: 884-892.
- Zijlstra, C. Donkers – Venne, D.T.H.M. ve Fargette, M., (2000). Identification of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* using sequence characterized amplified region (SCAR) based PCR assays. *Nematology*, 2: 847- 853.