

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Meloidogyne incognita (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949'nun AVİRÜLENT ve
Mi-1 VİRÜLENT POPÜLASYONLARI ARASINDAKİ DNA DİZİLİM
FARKLILIKLARININ YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

İbrahim MISTANOĞLU

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

TEMMUZ 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Meloidogyne incognita (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949'nun AVİRÜLENT ve
Mi-1 VİRÜLENT POPÜLASYONLARI ARASINDAKİ DNA DİZİLİM
FARKLILIKLARININ YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

İbrahim MISTANOĞLU

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

TEMMUZ 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Meloidogyne incognita (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949'nun AVİRÜLENT ve
Mi-1 VİRÜLENT POPÜLASYONLARI ARASINDAKİ DNA DİZİLİM
FARKLILIKLARININ YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

İbrahim MISTANOĞLU

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FDK-2018-3487 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEMMUZ 2020

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949'nun AVİRÜLENT ve
Mi-1 VİRÜLENT POPÜLASYONLARI ARASINDAKİ DNA DİZİLİM
FARKLILIKLARININ YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ**

İbrahim MISTANOĞLU

BİTKİ KORUMA

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez/...../2020 tarihinde jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zübeyir DEVRAN(Danışman)

Prof. Dr. İbrahim Halil ELEKCİOĞLU

Prof. Dr. Galip KAŞKAVALCI

Prof. Dr. Uğur GÖZEL

Doç. Dr. Fatih DAĞLI

ÖZET

***Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949'nun AVİRÜLENT ve *Mi-1* VİRÜLENT POPÜLASYONLARI ARASINDAKİ DNA DİZİLİM FARKLILIKLARININ YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ**

İbrahim MISTANOĞLU

Doktora Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zübeyir DEVRAN

Temmuz 2020; 68 sayfa

Domates, yetiştiriciliği yapılan en önemli sebzelerdendir. Kök-ur nematodları domates bitkilerine saldırarak verim kaybına neden olurlar. *Meloidogyne* spp.'ye dayanıklı domates bitkileri, kök-ur nematodlarının mücadelesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Domatesdeki *Mi-1* geni, *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* ve *M. luci*'ye dayanıklılık sağlamaktadır. Fakat, virülene kök-ur nematod popülasyonları *Mi-1* genini aşabilmektedir. *Mi-1* virülene kök-ur nematodları domates yetiştirilen alanlarda büyük bir sorundur ve giderek yaygınlaşmaktadır. Bu nedenle, kök-ur nematodlarıyla bulaşık alanlarda virülene popülasyonların hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanması gerekir. Laboratuvarında virülene nematod popülasyonlarını tanımlamak için yapılan geleneksel testler 3-6 ay kadar sürebilmektedir. Böylece bu testler çok zaman alır ve yoğun emek gerektirir. Buna karşın virülenele ilgili moleküler markörler analiz süresini kısaltabilmektedir. Bu nedenle, kök-ur nematodlarının mücadelesi için virülenele ilgili moleküler markörlerin geliştirilmesi gereklidir.

Bu çalışmada, üç avirülene *M. incognita* ve üç *Mi-1* virülene *M. incognita* popülasyonunun genom analizleri HiSeq X10 Illumina cihazında 150 bp çift yönlü okuma teknikleri kullanılarak yapılmıştır. Biyoinformatik analizler için ham verilerden adaptör dizilimleri ile kısa ve düşük kaliteli okumalar çıkarılmıştır. Daha sonra biyoinformatik analizler için beş yaklaşım kullanılmıştır. İlk olarak, sekanslar *M. incognita* referans genomuna (GCA_900182535.1) eşleştirilmiş ve SNP'ler ile INDEL'ler tanımlanmıştır. Sadece *Mi-1* virülene izolatlarında toplam 17512 polimorfizm tespit edilmiştir. İkinci olarak, tüm izolatlarda ortak bulunan 229696 polimorfizm verilerden çıkarılmıştır. Üçüncü olarak kalan farklılıklar okuma derinliklerine ($DP \geq 20$) göre filtrelenmiş ve *Mi-1* virülenele ilgili olabilecek 12122 farklılık tanımlanmıştır. İzolatlarda tespit edilen bu farklılıkların 207 genle ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Dördüncü olarak, N1 izolatında "de novo" analizi yapılmıştır. Bu izolat referans genom olarak seçilmiş ve *Mi-1* virülenele avirülenele izolatlar arasındaki polimorfizmler araştırılmıştır. Bu son yaklaşımda elde edilen sonuçlar, *M. incognita* referans genomu kullanılarak elde edilen verilere göre ilave bir bilgi sağlamadığı görülmüştür. Beşinci yaklaşım olarak, avirülenele ve virülenele izolatlardan elde edilen DNA dizileri, farklı biyoinformatik araçlar kullanılarak analiz edilmiş ve virülenelele ilişkili olabilecek 161 adet SNP belirlenmiştir.

Bu çalışma, Türkiye'de yeni nesil sekanslama kullanılarak virülenele ve avirülenele kök-ur nematodlarını tanımlayan ilk çalışmadır. Tanımlanan SNP'ler ve INDEL'ler

gelecekteki çalışmalarda virölensliğe bağlı moleküler markörlerin geliştirilmesi için kullanılabilir.

ANAHTAR KELİMELELER: Domates, Kök-ur nematodu, *Meloidogyne incognita*, *Mi-1* geni, *Mi-1* virölent, Yeni Nesil Dizileme

JÜRİ: Prof. Dr. Zübeyir DEVRAN (Danışman)

Prof. Dr. İbrahim Halil ELEKCİOĞLU

Prof. Dr. Galip KAŞKAVALCI

Prof. Dr. Uğur GÖZEL

Doç. Dr. Fatih DAĞLI

ABSTRACT

DETERMINATION OF DIFFERENCES OF DNA SEQUENCING BETWEEN AVIRULENT AND *Mi-1* VIRULENT POPULATIONS OF *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 BY NEXT GENERATION SEQUENCING METHODS

İbrahim MISTANOĞLU

PhD Thesis in Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Zübeyir DEVRAN

July 2020; 68 pages

Tomato is one of the most important vegetables cultivated. Root-knot nematodes (RKNs) attack tomato plants and cause yield losses. The tomato plants which are resistant to *Meloidogyne* spp. are commonly used for controlling root-knot nematodes in the tomato growing areas. The *Mi-1* gene in tomato controls resistance to *Meloidogyne incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* and *M. luci*. However, virulent root-knot nematode populations can overcome the *Mi-1* gene. *Mi-1* virulent RKNs are a major problem in tomato growing areas and are becoming increasingly common. Therefore, rapid and accurate identification of virulent RKN populations is needed in fields infested with RKNs. Traditional tests to identify virulent nematode populations in laboratory take up to 3-6 months. Therefore, it takes time and requires much labor. Whereas molecular markers linked virulence, it will be able to shorten the analysis time. For this reason, the development of molecular markers linked virulence is necessary for management of RKNs

In this study, the whole genome analyses of three avirulent *M. incognita* and three *Mi-1* virulent *M. incognita* populations from Turkey were sequenced using Illumina HiSeq X10 150 bp paired-end sequencing techniques. The adapter sequences and the short and low quality readings were removed from raw data for bioinformatical analysis. Five approaches were then used in bioinformatics analysis. First, the sequences were mapped to *M. incognita* reference genome (GCA_900182535.1) and SNPs or INDELS were identified. A total of 17512 polymorphisms were detected only in *Mi-1* virulent isolates. Second, common 229696 variants identified in all isolates were removed from data. Third, the remaining differences were then filtered according to the reading depths ($DP \geq 20$). As a result, 12122 variants that could be related to *Mi-1* virulence were identified in the virulent populations. Results also showed that these differences obtained from isolates can correlate with 207 genes. Fourth, “de novo” analyse was performed on N1 isolate. This isolate was chosen as the reference genome and variants were investigated. Results showed that this last approach did not provide additional information according to data obtained using *M. incognita* reference genome. The fifth approach, DNA sequencings from avirulent and virulent isolates were analysed using different bioinformatic tools and 161 SNP that will be associated with virulence were identified.

This is the first study to identify virulent and avirulent RKNs using next generation sequencing in Turkey. The identified SNPs and INDELS can be used for development of molecular markers linked virulence in the future studies.

KEYWORDS: *Meloidogyne incognita*, *Mi-1* gene, *Mi-1* virulent, root-knot nematode, next generation sequencing, tomato

COMMITTEE: Prof. Dr. Zübeyir DEVRAN

Prof. Dr. İbrahim Halil ELEKCİOĞLU

Prof. Dr. Galip KAŞKAVALCI

Prof. Dr. Uğur GÖZEL

Assoc. Prof. Fatih DAĞLI

ÖNSÖZ

Domates, anavatanı Orta ve Güney Amerika olmasına rağmen dünya üzerinde hemen hemen tüm bölgelerde üretimi yapılabilen en önemli sebzelerden birisidir. Kök-ur nematodları (*Meloidogyne* spp.) domates üretiminde ürün kayıplarına neden olan önemli zararlılardan biridir. Bu zararlılarla mücadelede dayanıklı çeşitler kullanılmaktadır. Domateslerde kök-ur nematodlarına dayanıklılık *Mi-1* geni tarafından sağlanmaktadır ve ıslah çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte *Mi-1* geni dayanıklılığı, *Mi-1* virulent kök-ur nematod popülasyonları tarafından aşılabilir. Sebze üretim alanlarında *Mi-1* virulent popülasyonların hızlı ve doğru tanımlanması mücadele için çok önemlidir. Bu çalışmada avirulent ve *Mi-1* virulent *Meloidogyne incognita* popülasyonlarının yeni nesil dizileme teknikleri kullanılarak genomlarının dizilenmesi ve popülasyonlar arasındaki SNP'lerin ve INDEL'lerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar için gerekli olanakları sağlayan, çalışmam için maddi ve manevi desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Zübeyir DEVRAN'a,

Tez izleme komitesi süresince değerli katkıları için Sayın Prof. Dr. Galip KAŞKAVALCI (Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü)'ya ve Sayın Doç. Dr. Fatih DAĞLI (Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü)'ya,

Biyoinformatik çalışmaları kapsamında bilgi ve deneyimleri ile destek olan Sayın Prof. Dr. Mahmut TÖR (University of Worcester, School of Science and the Environment, Department of Biology, United Kingdom)'e ve Sayın Doç. Dr. David J. Studholme (University of Exeter, College of Life and Environmental Sciences, United Kingdom)'e,

Çalışmada kullanılan domates çeşitlerini veren Multi Tohum Tar. San. Tic. A.Ş. (Antalya, Türkiye)'ne,

Tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen ve destekleriyle beni yalnız bırakmayan bölümümüz Nematoloji grubu üyelerinden Zir. Yüksek Müh. Tevfik ÖZALP'a, Dr. Elvan SERT ÇELİK'e ve Zir. Yüksek Müh. Seren SARGIN'a,

Tez çalışmalarım ve tezimin yazım sürecinde büyük bir sabır ve fedakârlık göstererek desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili eşim Zeliha MISTANOĞLU'na, pek kıymetli annem Havva MISTANOĞLU, babam Şaban MISTANOĞLU ve kardeşim Ayşenur MISTANOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
AKADEMİK BEYAN	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. Kök-ur Nematodlarının Sistematikteki Yeri ve Biyolojisi.....	4
2.2. Kök-ur Nematodlarının Beslenmesi.....	5
2.3. Sebze Alanlarında Tespit Edilen Kök-ur Nematodları.....	7
2.4. Kök-ur Nematodlarıyla Mücadele.....	10
2.5. Domateste Kök-ur Nematodlarına Dayanıklılık.....	12
2.5.1. <i>Mi-1</i> geni.....	12
2.5.2. Domateste <i>Mi-1</i> genini kıran popülasyonlar.....	13
2.5.3. Virü lent kök-ur nematodlarının tanımlanması.....	15
2.6. DNA'nın Dizilenmesi.....	18
2.7. Bitki Paraziti Nematodların Tam Genom Dizilimleri Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	20
3. MATERYAL VE METOT	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Domates fideleri.....	25
3.1.2. <i>Meloidogyne incognita</i> popülasyonları.....	25
3.2. Metot	26
3.2.1. <i>Meloidogyne incognita</i> saf kültür popülasyonlarının oluşturulması	26
3.2.2. Seçilmiş <i>Mi-1</i> virü lent <i>Meloidogyne incognita</i> popülasyonunun oluşturulması.....	27
3.2.3. <i>Meloidogyne incognita</i> popülasyonlarının moleküler tanımlanması.....	27
3.2.3.1. DNA izolasyonu.....	27

3.2.3.2. PCR çalışması	28
3.2.4. Bitki materyallerinde <i>Mi-1</i> geninin moleküler analizi.....	28
3.2.4.1. DNA izolasyonu.....	28
3.2.4.2. PCR çalışması	28
3.2.5. <i>Meloidogyne incognita</i> popülasyonlarından izole edilen DNA'ların miktarlarının ölçümü	29
3.2.5.1. Lambda (λ) DNA	29
3.2.5.2. PicoGreen tekniği.....	29
3.2.6. <i>Meloidogyne incognita</i> popülasyonlarının tüm genom dizilimleri.....	29
3.2.6.1. DNA parçalarının kümeleştirilmesi	30
3.2.6.2. DNA parçalarının dizilenmesi	31
3.2.6.3. Biyoinformatik analizler	32
3.2.7. Virülenslikle ilgili moleküler markörlerin geliştirilmesi.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. <i>Meloidogyne incognita</i> Popülasyonlarının Saf Kültürlerinin Oluşturulması	35
4.2. Seçilmiş <i>Mi-1</i> virulent <i>Meloidogyne incognita</i> İzolatının Oluşturulması	35
4.3. <i>Meloidogyne incognita</i> Popülasyonlarının PCR ile Doğrulanması.....	35
4.4. Bitki Materyallerindeki <i>Mi-1</i> Geninin PCR ile Belirlenmesi.....	36
4.5. <i>Meloidogyne incognita</i> Popülasyonlarından Elde Edilen DNA'ların Lambda (λ) DNA ile Miktar Ölçümü.....	36
4.6. <i>Meloidogyne incognita</i> Popülasyonlarından İzole Edilen DNA'ların PicoGreen Tekniği ile Miktar ve Kalite Ölçümü	37
4.7. <i>Meloidogyne incognita</i> Popülasyonlarının Tüm Genom Dizilim Analizleri	37
4.7.1. <i>Meloidogyne incognita</i> referans genomunun (GCA_900182535.1) kullanılması.....	37
4.7.2. “De Novo Assembly” Çalışmaları.....	39
4.8. <i>Mi-1</i> Virulent ve Avirulent <i>Meloidogyne incognita</i> İzolatları Arasındaki Genom Dizilim Farklılıklarının Belirlenmesi	39
4.8.1. Örneklerin <i>Meloidogyne incognita</i> referans genomu (GCA_900182535.1) ile farklılıklarının belirlenmesi	39
4.8.2. Örneklerin N1 genomu ile farklılıklarının belirlenmesi	46
4.9. Virülenslikle İlgili Moleküler Markörlerin Belirlenmesi.....	46

5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇLAR	53
7. KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949'nın Avirulent ve *Mi-1* Virulent Populasyonları Arasındaki DNA Dizilim Farklılıklarının Yeni Nesil Dizileme Yöntemiyle Belirlenmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

22/07/2020

İbrahim MISTANOĞLU



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

~	: Yaklaşık
°C	:Santigrad derece
µg	: Mikrogram
µm	: Mikrometre
dk	: Dakika
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
sn	: Saniye
λ	: Lambda
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
Φ	: Phi

Kisaltmalar

1,3-D	: 1,3-Dichloropropene
A	: Adenine
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
AM	: Arbusküler Mikorhiza
Bp	: Base Pair
BWA-MEM	: Burrows-Wheeler Alignment tool
C	: Cytosine
cDNA	: Complementary Deoxyribonucleic Acid
CGH	: Comparative Genomic Hybridization

CNV	: Copy Number Variation
DBCP	: 1,2-Dibromo-3-Chloropropane
D-D mixture	: 1,3-Dichloropropene ve 1,2-Dichloropropane
ddNTP	: 2',3'- Dideoxynucleotide Triphosphate
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
dNTP	: Deoxynucleotide Triphosphate
EDB	: Ethylene Dibromide
EtBr	: Ethidium Bromide
FAO	: Food and Agriculture Organization
G	: Guanine
GAI	: Genome Analyser I
Gb	: Gigabyte
H ₂ O ₂	: Hydrogen Peroxide
IGV	: Integrative Genomics Viewer
INDEL	: Insertion and Deletion
J	: Juvenile
Kb	: Kilobase
LRR	: Leucine-Rich Repeat
<i>Map-1</i>	: <i>Meloidogyne</i> Avirulence Protein-1
Mbp	: Mega Base Pairs
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
<i>Mi-1</i>	: Dayanıklılık geni (<i>Mi-1.2</i>)
MiGHs	: <i>Mi</i> Gene Homologs
mRNA	: Messenger Ribonucleic Acid
MVC	: <i>Meloidogyne</i> Virulence Correlated
NBS	: Nucleotide-Binding Site

NBS-LRR	: Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat
NIL	: Near-Isogenic Lines
O ₂ ⁻	: Superoxide
OH	: Hydroxyl Molecule
PacBio	: Pacific Biosciences
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PE	: Paired-End
Ppi	: Pyrophosphate
Q score	: Quality Score
qPCR	: Quantitative Polymerase Chain Reaction
RAPD	: Random Amplified Polymorphic Deoxyribonucleic Acid
ROS	: Reactive Oxygen Species
RT-PCR	: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SA	: Salicylic acid
SBS	: Sequencing By Synthesis
SCAR	: Sequence Characterized Amplified Region
SMRT	: Single Molecule Real-Time
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism
T	: Timine
TAE	: Tris-Acetate-EDTA
TDF	: Transcript-Derived Fragments
TRG	: Taxonomically Restricted Genes
tRNA	: Transfer Ribonucleic Acid
UNEP	: United Nations Environment Programme
UV	: Ultraviolet
YAC	: Yeast Artificial Chromosome

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 3.1.** *Meloidogyne incognita* izolatlarının saf kültürlerinin elde edilmesi; **a)** yumurta kümesi yüzeyinin yıkanması; **b)** bitkilere inokulasyon; **c)** köklerde oluşan yumurta paketleri.....26
- Şekil 3.2.** Yumurta kümelerinden larvaların elde edilmesi..... 27
- Şekil 3.3.** Sekiz kanallı Flow cell ve yüzey görüntüsü (Lakdawalla vd. 2013)..... 30
- Şekil 3.4.** Klonal kümelerin üretilmesi: **a)** flow cell yüzeyine tutunma; **b)** orijinal DNA parçasının denatürasyonu; **c)** loop yapısı oluşumu; **d)** köprü amplifikasyonu; **e)** çift sarmal DNA'ların denatürasyonu; **f-g-h)** sıkı bir küme oluşana kadar amplifikasyonun devamı; **i)** DNA primer ilavesi (Lakdawalla vd. 2013) 31
- Şekil 3.5.** Kümelerin dizilenmesi: **a)** flow cell yüzeylerine bağlı kümelerin floresan etiketli nükleotitlerle dizilenmesi; **b)** flow cell'in görüntülenmesi ve görüntülenme haritası (ölçek çubuğu 10 µm) (Lakdawalla vd. 2013) 32
- Şekil 4. 1.** MincF1/MincR1 primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünleri: (M: Moleküler markör (100 bp DNA ladder, GeneAll); 1:N1; 2:N2; 3:N3; 4:N4; 5:N5; 6:N6; S:Su)..... 35
- Şekil 4. 2.** Mi23F/Mi23R primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünleri; [M: Moleküler markör (100 bp DNA ladder, GeneAll); B: Brown F1 (Homozigot dayanıklı), T: Tueza F1 (Homozigot duyarlı), S: Seval F1 (Heterozigot dayanıklı)] 36
- Şekil 4. 3.** *Meloidogyne incognita* DNA'larının miktarının Lambda (λ) DNA ile ölçülmesi: a) \approx 1000 bireyden elde edilen DNA'ların ölçümü; b) \approx 10000 bireyden elde edilen DNA'ların ölçümü [M: Moleküler markör (100 bp DNA ladder, GeneAll); 1: 1 µl λ DNA (0.3 µg); 2: 0,5 37
- Şekil 4. 4.** N1, N2 ve N4 örneklerinin farklılıklar açısından ortak ve farklı yönlerinin sayısal venn şeması 41
- Şekil 4. 5.** $DP \geq 20$ 'ye göre filtrelenmiş N1, N2 ve N4 farklılık sayılarının venn şeması 43
- Şekil 4. 6.** Farklılık tespit edilen genlerin N1, N2, N32 ve N4 popülasyonlarına göre değerlendirilmesi.....45
- Şekil 4. 7.** Farklılık tespit edilen genlerin N1, N2 ve N4 popülasyonlarına göre değerlendirilmesi.....45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. <i>Meloidogyne incognita</i> popülasyonlarının adı, dizileme kodu ve lokasyonları	25
Çizelge 3.2. <i>Meloidogyne incognita</i> popülasyonlarının moleküler tanılanmasında kullanılan primerlerin dizisi ve beklenen bant uzunluğu	28
Çizelge 3.3. <i>Mi-1</i> geni analizinde kullanılan Mi23F/Mi23R primer dizisi ve beklenen bant uzunluğu	29
Çizelge 4. 1. Dizilim analizleri ile ilgili okuma verileri	39
Çizelge 4. 2. Örneklerin <i>Meloidogyne incognita</i> referans genomu (GCA_900182535.1) kullanılarak filtrelenmiş ve anotasyonu gerçekleştirilmiş varyant sayıları.....	40
Çizelge 4. 3. Filtrelenmiş (ortak varyantlar uzaklaştırılmış) ve anote edilmiş varyant sayıları.....	42
Çizelge 4. 4. Farklılıkların kapsama derinliğine göre filtrelenmiş sayıları.....	42
Çizelge 4. 5. Popülasyonlarda farklılık tespit edilen gen sayıları.....	44

1. GİRİŞ

Domates (*Solanum lycopersicum* L.) 3000'den fazla türü içeren Solanaceae familyasına ait en önemli sebzelerden biridir (Knapp 2002). Domates ve yabani akrabaları Güney Amerika (Ekvador, Şili ve Peru) kökenlidir. Birçok çalışmada kullanılan yabani domates cinsleri ise hala Güney Amerika'nın batı kıyıları boyunca uzanan And Dağları ve Galapagos Adaları'nda bulunabilmektedir (Kimura ve Sinha 2008). Günümüze kadar çok çeşitli fenotipler sergileyen ve yetiştiriciliği yapılan domateslerle melezlenebilen 13 yabani domates türü tespit edilmiştir (Peralta vd. 2005).

16. yy'da Andean bölgesinden Avrupa'ya getirilen domatesin bugün tüm dünyada yetiştiriciliği yapılabilmektedir (Bergougnoux 2014). Ülkemize yaklaşık bir buçuk asır önce Çukurova'dan girdiği tahmin edilmekte olup, günümüzde hala yoğun bir şekilde üretilmektedir (Yazgan ve Fidan 1996). 2016 verilerine göre domates dünya genelinde yaklaşık 177.042.359 tonluk üretime ve 47.827.530 da'lık üretim alanına sahiptir (FAO 2018). Ülkemiz ise 12.600.000 tonluk domates üretimiyle Çin, Hindistan ve Amerika'dan sonra dördüncü sırada; 1.882.700 da'lık üretim alanıyla da Çin, Hindistan, Nijerya ve Mısır'dan sonra beşinci sırada yer almaktadır (FAO 2018).

Önemli bir tarımsal ürün olan domateste verim kaybına neden olan fungal, bakteriyel, viral hastalık etmenleri ile akarlar, böcekler, nematodlar gibi birçok zararlı bulunmaktadır (Jones vd. 1991a, b). Domateste ciddi zararlara yol açan bitki paraziti nematodların en önemlilerinden birisi kök-ur nematodları (*Meloidogyne* spp.)'dır (Bleve-Zacheo vd. 2007). Bu zararlılar tüm dünyaya yayılmış olan, geniş bir konukçu dizisine sahip obligat parazitlerdir (Karssen ve Moens 2006). Kök-ur nematodlarının tarımsal üretimde önemli kayıplara neden oldukları ve bu kayıpların domates üretiminde % 42-54, patlıcan üretiminde ise % 30-60 düzeylerinde olduğu belirtilmektedir (Netscher ve Sikora 1990). Birçok bitkide meydana getirdikleri ekonomik zarardan dolayı sabit endoparazit özellikteki kök-ur nematodları bitki paraziti nematodlar içerisinde ilk sırada yer almaktadır (Jones vd. 2013). Dünya üzerinde çok geniş bir yayılım alanına sahip olan kök-ur nematodlarının günümüzde 98 türü tanımlanmıştır (Jones vd. 2013). Bu türlerin en önemlileri ise "major species" olarak bilinen tropikal iklimlerde yaygınlık gösteren *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949, *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889) ve *Meloidogyne javanica* (Treub, 1885) ile ılıman iklimlerde yaygınlık gösteren *Meloidogyne hapla* (Chitwood, 1949) (Jones vd. 2013)'dır.

Kök-ur nematodları beslenmeleri esnasında bitki köklerinin floem ve ksilem parankima hücreleri veya kortikal hücrelerinde dev hücre "giant cell" olarak adlandırılan özel beslenme hücreleri oluşturmaktadırlar (Karssen ve Moens 2006). Beslenmenin ilerleyen dönemlerinde ise nematod etrafındaki kök dokuları, hiperplazi (hyperplasia) ve hipertrofi (hypertrophy) sonucu genellikle *Meloidogyne* enfeksiyonları ile karakterize olan urlara dönüşmektedirler (Karssen ve Moens 2006; Moens vd. 2009). Nematodların beslenmeleri ve köklerde oluşturdıkları urlanmalar nedeniyle hasar görmüş kök sisteminden su ve besin maddesi alımı azalmakta, bu da bitkilerde solgunluğa, bodurlaşmaya, zayıf ve verimsiz gelişmeye neden olmaktadır. Ayrıca çok fazla enfeksiyona maruz kalan bitkiler tamamen kuruyabilmektedir (Trudgill ve Blok 2001; Abad vd. 2003). Kök-ur nematodları beslenmeleriyle direkt verdikleri bu zararların yanında, kökte açtıkları yaralardan hastalık etmenlerinin girmesine neden olmakta ve bitkilerde kompleks hastalıkların ve dolayısıyla önemli zararların oluşmasını

sağlamaktadır (Atkinson 1892; Chawla vd. 2012). Ayrıca kök-ur nematodları bitkilerin çeşitli hastalık etmenlerine karşı olan dayanıklılıklarının kırılmasına ya da söz konusu hastalıkların bitkilerde daha erken dönemlerde ölmelerine neden olmaktadır (Bowman ve Bloom 1966; Garber vd. 1979).

Kök-ur nematodlarının, yaşamlarının tamamını toprak altında, büyük bir kısmını ise bitki dokusu içerisinde geçirmeleri, bir yetiştiricilik döneminde birden fazla döl verebilmeleri, çok geniş bir konukçu dizisine sahip olmaları, direk beslenmeleri ya da çeşitli hastalık etmenleriyle birlikte yapmış oldukları zararlarının çok önemli boyutlara ulaşmaları nedeniyle mücadeleleri de oldukça zordur (Nyczepir ve Thomas 2009). Bu zararlılarla mücadele kimyasal, kültürel ve biyolojik olarak adlandırılmaktadır (Gheysen vd. 1996; Nyczepir ve Thomas 2009).

Kimyasal mücadele özellikle 20. yüzyılda tarımsal üretim alanlarında etkin bir şekilde kullanılmıştır (Johnson 1985). Fakat uygulamadaki zorluklar, ekonomik olmama ve çevresel bazı nedenlerden dolayı kullanımı son yıllarda azalmaktadır (Rich vd. 2004). Toprak işleme, tuzak bitki kullanımı, yabancı ot kontrolü gibi yöntemler ise kültürel mücadele içerisinde hâlihazırda etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Bridge 1996; Halbrendt ve LaMondia 2004). Solarizasyon yalnız veya diğer uygulamalar ile kombine edilerek kullanılmaktadır (D'Addabbo vd. 2009). Biyolojik mücadele çevre ve insan sağlığına herhangi bir zararının olmaması nedeniyle önemlidir (Tian vd. 2007). Bu mücadele kapsamında ise çeşitli funguslar, bakteriler, bazı akarlar ve böcek türleri kullanılabilir (Stirling 1991; Viaene vd. 2006). Kök-ur nematodları ile mücadelede kullanılan yöntemlerin en önemlileri dayanıklı çeşit ya da anaçların kullanımınıdır (Tzortzakakis ve Gowen 1996; Xu vd. 2001). Bu yöntem çevre ve insan sağlığına zararının olmaması, herhangi bir uygulama ekipmanına gereksinim duyulmaması ve sürdürülebilir olması gibi birçok avantaja sahiptir (Cook ve Evans 1987; Boerma ve Hussey 1992; Williamson 1998). Dayanıklı çeşitler, nematodun üreme kabiliyetini azaltmakta veya engellemektedirler (Stanton ve Stirling 1997). Kök-ur nematodlarına karşı bitkilerde geliştirilen en önemli dayanıklılık mekanizması ise beslenme hücresi ve etrafındaki hücrelerde gözlemlenen ölümler (nekrozlar) ya da hipersensitif reaksiyonlardır (Dropkin 1969a; Milligan vd. 1998). Bu reaksiyonlar nedeniyle nematodlar bitkilerde özel beslenme hücreleri oluşturamamakta dolayısıyla ya ölmekte ya da köklerden ayrılmaktadır (Milligan vd. 1998). Günümüze kadar bitkilerde gözlemlenen en iyi dayanıklılık genlerinden biri ise *M. incognita*, *M. arenaria* ve *M. javanica*'ya karşı etkin bir şekilde kullanılan ve ilk kez yabani bir domates çeşidi olan *Lycopersicon peruvianum*'da (PI128657) tespit edilen *Mi-1* genidir (Bailey 1941; Williamson 1998). Yapılan çalışmalar sonucunda bu genin 7 adet homologunun (*MiGHs*) olduğu (*Mi-1.1*, *Mi-1.2*, *Mi-1.3*, *Mi-1.4*, *Mi-1.5*, *Mi-1.6* ve *Mi-1.7*) tespit edilmiştir (Seah vd. 2004; Seah vd. 2007a). Bu homolog genler içerisinde ise dayanıklılığın *Mi-1.2* aracılığıyla sağlandığı belirlenmiştir (Milligan vd. 1998).

Mi-1 geni (*Mi-1.2*) günümüzde ticari domates çeşitlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Roberts ve Thomason 1986). Yüksek toprak sıcaklığı ve kök-ur nematodlarına ait *Mi-1* virulent popülasyonlar bu genin kullanımını sınırlandırmaktadır. Yapılan çalışmalarda 28°C'nin üzerindeki toprak sıcaklıklarında *Mi-1* geninin sağladığı dayanıklılığın kırıldığı tespit edilmiştir (Dropkin 1969b; Özalp ve Devran 2018). Nematodun enfeksiyonundan sonraki ilk 24-48 saatlik süreçte dayanıklılığın kırıldığı belirlenmiştir (Dropkin 1969b; Özalp ve Devran 2018). Domates üretiminde *Mi-1* geninin

kullanımını sınırlandıran virüent kök-ur nematodu popülasyonları ilk kez Kaliforniya'daki pamuk üretim alanlarından alınan 6 farklı kök-ur nematodu popülasyonundan 2'sinin *L. peruvianum* üzerinde geliştiği belirlenmiştir (Allen 1952). Sonraki yıllarda Girit (Tzortzakakis ve Goven 1996), Fas (Eddaoudi vd. 1997), İspanya (Ornat vd. 2001), Türkiye (Devran ve Söğüt 2010; Uysal ve Söğüt 2016a) ve İsrail (Iberkleid vd. 2014)'de *Mi-1* virüent kök-ur nematodu popülasyonlarının buldukları tespit edilmiştir. Dayanıklı çeşitlerin kullanıldığı alanlarda önemli sorunlara neden olan bu popülasyonlar, arazi koşullarında doğal olarak görülebileceği gibi, aynı üretim bölgesinde sürekli olarak dayanıklı bitkilerin kullanımıyla da oluşabilmektedir (Jarquin-Barberena vd. 1991; Roberts 1995; Xu vd. 2001). Tarımsal üretim yapılan alanlarda var olan ya da farklı nedenlerden dolayı oluşan bu popülasyonların erken dönemde belirlenmesi üretimin planlanması ve sürdürülebilirliği için önemlidir. Günümüzde virüent kök-ur nematodlarının belirlenebilmesi için bitki testlemeleri yapılmaktadır. Bu çalışmalar ise yaklaşık 2-6 ay sürmekte, zaman almakta ve fazla iş gücü gerektirmektedir (Castagnone-Sereno vd. 1993; Semblat vd. 2000). Oysaki virüent popülasyonların moleküler olarak belirlenebilmesi, hem analiz süresinin kısaltılmasını sağlayacak, hemde bu zararlılarla mücadelenin daha etkin bir şekilde yapılmasına imkân sunabilecektir. Bu nedenle virüenslikle ilgili moleküler markörlerin geliştirilmesi mücadele için gereklidir. Bu konuyla ilgili sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. Ayrıca bu çalışmalarda elde edilen markörlerin farklı bölgelere ait *Mi-1* virüent popülasyonlarda beklenen sonuçları vermediği de tespit edilmiştir (Semblat vd. 2000; Xu vd. 2001; Cortada vd. 2011; Mıstanoglu vd. 2020). Şu ana kadar, yeni nesil dizileme teknikleri kullanılarak *Mi-1* virüent ve avirüent kök-ur nematod popülasyonlarının tüm genom dizilimlerinin (Whole Genome Sequence) karşılaştırıldığı sınırlı sayıda (Castagnone-Sereno vd. 2019) çalışma bulunmaktadır.

Bu çalışmada a) *Mi-1* virüent kök-ur nematod popülasyonlarını moleküler olarak belirleyebilmek için yeni nesil dizileme teknikleri [Illumina HiSeq X 10 ve çift yönlü okuma (PE 2X150 bp) (Illumina Inc., ABD)] kullanılarak *M. incognita*'nın 2 adet doğal *Mi-1* virüent, 1 adet seçilmiş *Mi-1* virüent ve 3 adet *Mi-1* avirüent popülasyonlarının tam genom dizilimleri yapılmış; b) Dizilimlerin karşılaştırılarak virüent ve avirüent *M. incognita* popülasyonları arasındaki SNP'ler ve INDEL'ler (Single Nucleotide Polymorphism) belirlenmiş; c) SNP'lerin ve INDEL'lerin virüenslikle ilişkisi araştırılmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Kök-ur Nematodlarının Sistematikteki Yeri ve Biyolojisi

Kök-ur nematodlarının zararına ilişkin ilk resimli kayıt, 19. yüzyılın ortalarında, Miles Joseph Berkeley (1855)'in serada yetiştirdiği salatalık köklerinde tespit ettiği galleri nematodlara atfettiği rapor olarak bilinmektedir. Kök-ur nematodlarının ilk tanımlanması ise Cornu (1879) tarafından *Anguillula marioni* Cornu, 1897 olarak yapılmıştır. Bu çalışma Fransa, Loire vadisinde korunga (*Onobrychis sativus* Lam.)'da tespit edilen kök urlarındaki nematodlara dayanmaktadır. Kök-ur nematodları cins düzeyinde, uzun süre boyunca kist nematodlarıyla karıştırılmıştır. Öyle ki 1884 ile 1932 arasında kök-ur nematodları genellikle *Heterodera radicolica* (Greeff, 1872) Müller 1884 olarak adlandırılmıştır (Müller 1884). Fakat Göldi (1887; 1892) tarafından Brezilya'daki kahve bitkilerinde tespit edilen kök-ur nematodları kısaca tarif edilmiş ve resmedilmiştir. Ancak bu zararlı yeni bir cins ve tür olarak (*Meloidogyne exigua* Göldi, 1887) tanımlanmıştır. Kök-ur nematodları için 1932-1949 yılları arasında ise *Heterodera marioni* (Cornu, 1879) Marcinowski, 1909 ismi yaygın olarak kullanılmıştır (Chitwood 1949). Daha sonraları Chitwood (1949) tarafından yapılan çalışma ile kök-ur nematodlarının *Meloidogyne* cinsi içerisinde tanımlanması konusunda ilk ana düzenleme yapılmıştır. Ayrıca bu çalışma ile kök-ur ve kist nematodları arasındaki farklılıklar belirlenmiş ve anal kesit (perineal patern)'ler kök-ur nematodlarının tanımlanmalarında kullanılmaya başlanmıştır.

Yunanca'da melon = elma, meyva; eidos = şekil, benzeme ve gyne = diş kelimelerinden türemiş olan *Meloidogyne* cinsinin (Karssen ve Moens 2006; Moens vd. 2009) sistematikteki yeri Hunt (1993) ve Siddiqi (2000)'a göre aşağıdaki gibidir:

Alem	: Animalia	Linnaeus, 1758
Şube	: Nematoda	Rudolphi, 1808 (Lankester, 1877)
Sınıf	: Secernentea	Von Linstow, 1905
Alt Sınıf	: Tylenchia	Inglis, 1983
Takım	: Tylenchida	Thorne, 1949
Familya	: Meloidogynidae	Skarbilovich, 1959
Cins	: <i>Meloidogyne</i>	Goeldi, 1887

Kök-ur nematodları, dünya çapında yaygınlık gösterebilen ve yüksek yapılı bitkilerin neredeyse tamamında beslenebilen obligat (zorunlu) bitki parazitleridirler (Karssen ve Moens 2006; Moens vd. 2009; Jones vd. 2013). Günümüze kadar yaklaşık 98 kök-ur nematod türü tanımlanmıştır (Jones vd. 2013). Bu türlerden *M. incognita*, *M. arenaria* ve *M. javanica* tropik bölgelerde, *Meloidogyne hapla* Chitwood, 1949,

Meloidogyne fallax Karssen, 1996 ve *Meloidogyne chitwoodi* Golden, O'Bannon, Santo & Finley, 1980'nin ise ılıman bölgelerde yaygın türler olduğu bildirilmiştir (Netscher ve Sikora 1990; Eisenback ve Triantaphyllou 1991; Adam vd. 2007).

Kök-ur nematodları embriyonik (yumurta) döneminden sonra 4 larva dönemi ve ergin dönem geçirirler. Bu zararlıların ergin dişileri yumurtalarını vulva çevresinde oluşturdukları jelatinimsel bir salgı içerisine bırakırlar (Siddiqi 2000). Yumurtaların içerisine bırakıldığı ve bir kese halini alan bu yapının bir kısmı köke gömülü şekilde bulunmaktadır. Yumurtaların bırakıldığı bu yapı yumurta kümesi olarak adlandırılmakta ve ortalama 500-2000 adet yumurta içerebilmektedir (Bleve-Zacheo vd. 2007).

Meloidogyne türlerinin erkekleri ile köke girmemiş ve yumurtalarından çıkmış olan ikinci dönem larvaları toprakta serbest halde bulunurlar. İkinci, üçüncü ve dördüncü larva dönemleri ile ergin dişi bireyleri bitkilerin kökleri içerisinde sabit ve endoparazit olarak yaşarlar. Kök-ur nematodları, 26-27°C toprak sıcaklığında, bir neslini yaklaşık 28 günde tamamlamaktadır (Bleve-Zacheo vd. 2007). Bu süre; toprağın yapısına, sıcaklığına, nemine ve konukçu bitki türüne göre değişkenlik göstermektedir. Dişi bireyler, yumurtalarını bıraktıktan sonra larvalar yumurta içerisinde embriyo gelişimine devam eder ve ikinci larva dönemine kadar yumurta içerisinde kalır. Yumurta içindeki ikinci dönem larva, uygun ortam koşullarının sağlanmasıyla yumurtadan çıkar ve toprağa geçer. Konukçusu tarafından kök salgıları vasıtasıyla uyarılan larva konukçusunu bulur ve kök büyüme noktasının hemen gerisinden doku içerisine giriş yapar. Köke giren ikinci dönem larva beslenmesi için uygun bölgeyi bulduktan sonra kendisini oraya sabitler (Wyss vd. 1992). Bitki kökü içinde üçüncü ve dördüncü larva dönemlerini tamamlayan nematod vücudunda şekilsel olarak farklılıklar gözlemlenir ve dördüncü larva döneminden sonra ise erkek ve dişi bireyler birbirlerinden ayırt edilebilmektedir (Eisenback ve Triantaphyllou 1991). Dişinin boyunda kısalma ve vücudunda şişme gözlemlenir. Bunun sonucunda ise ergin dişi birey armut veya limon şeklini alır ve yumurta bıraktıktan sonra ise ölür. Erkek bireyler ise iplik formunda ve toprakta serbest olarak yaşarlar (Eisenback ve Triantaphyllou 1991).

Eşeyli üreyen kök-ur nematod türlerinde erkek ve dişi bireylerin bulunma oranları 1:1'dir. Eşeysiz üreyen türlerde ise bu oranda değişkenlikler gözlemlenebilmektedir. (Karssen ve Moens 2006). *Meloidogyne* cinsine ait türlerde, üreme tipi eşeyli ve eşeysiz olmak üzere iki farklı şekilde gözlemlenmektedir. Bu üreme tipleri türlere göre değişkenlik göstermektedir. Bazı kök-ur nematod türleri incelendiğinde; *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* ve *Meloidogyne ethiopica* Whitehead, 1968 zorunlu eşeysiz üreme (apomixis), *M. chitwoodi* zorunlu olmayan eşeysiz üreme (automixis), *M. hapla* ırklarının bazıları zorunlu olmayan bazıları ise zorunlu eşeysiz üreme ve *Meloidogyne kikuyensis* De Grisse, 1961 gibi türlerde eşeyli üreme gözlenmektedir (amphimixis) (Karssen ve Moens 2006).

2.2. Kök-ur Nematodlarının Beslenmesi

Kök-ur nematodları, yaşamlarını sürdürebilmeleri için canlı bitki dokularına ihtiyaç duymaktadır. Genellikle bitki kök ucunun hemen ardından bitkilere ilk giriş gerçekleşmektedir. Bitki dokusunun parçalanması ve besinin alımında sitilet (stylet:

sokucu-emici iğne) adı verilen organ kullanılmaktadır. Bu yapı, ileri geri hareket edebilir özellikte ve dar bir lümenle özofagusa (oesophagus) bağlanmaktadır (Bilgrami ve Gaugler 2004). Bitki hücre duvarına öncelikle sitilet vasıtasıyla fiziksel olarak zarar verilmekte, ardından selülitik ve pektolitik enzimler vasıtasıyla da hücre duvarının yapısı yıkıma uğratılmaktadır (Jaubert vd. 2002; Abad vd. 2003). Fiziksel ve kimyasal yollarla hücre duvarının yapısını bozan ve bu yolla bitki içerisine giriş yapan nematodlar daha sonra kortekse ve buradan da kökün büyüme noktasına doğru hareket etmektedir. Ardından iletim sistemine giriş yaparak kök boyunca hücreler arasında ilerlemekte ve beslenme bölgesini belirlediğinde kendini sabitlemektedir (Wyss vd. 1992).

Sitilet, bitki paraziti nematodların ürettiği salgıları konukçularına iletimde görev yapmaktadır. Bu salgılardan özofagusta üretilenler bir dorsal ve iki subventral bez tarafından oluşturulmaktadır. Bu salgılardan subventral bezler tarafından üretilenler nematodun daha çok hareketli döneminde, dorsal bezlerinden üretilenler ise daha çok beslenme yerine sabitlendikten sonra üretilmektedir (Hussey ve Mims 1990; Abad vd. 2003). Beslenme esnasında nematod sitileti ve özofagal salgıları vasıtası ile hücre duvarını delmekte ve plazma membranının üzerinde bir çöküntüye neden olmaktadır. Besin maddelerini alabilmek için ayrıca sitilet ucunda bir beslenme tüpü oluşturulmaktadır. Bu tüp, nematodun beslenme hücrelerine sitiletini her sokuşunda oluşmaktadır (Hussey ve Mims 1991). Beslenme tüpü, hücrelerden besinlerin seçilmesi ve alınımında görev yapmaktadır. Yapılan detaylı çalışmalar, bu tüpün beslenme esnasında moleküler bir elek gibi görev yaptığını göstermiştir (Bockenhoff ve Grundler 1994). Kendisini bitki dokusuna sabitleyen her nematod 5 ila 7 beslenme hücresi oluşturur (Williamson ve Hussey 1996). Nematodun beslenmeye başladığı bu hücrelerde metabolik aktivite artmakta, sitoplazma yoğunlaşmakta, merkezi koful kaybolup çok sayıda küçük koful oluşmaktadır. Ayrıca bu hücreler iyi gelişmiş golgi aygıtı ve endoplazmik retikulumun yanında çok sayıda mitokondri, plastid ve ribozomlara sahiptir (Jones ve Payne 1978; Karssen ve Moens 2006). Bu hücrelerde sitoplazma bölünmesi (cytokinesis) olmadan çekirdek bölünmesi (karyokinesis) gerçekleşmektedir. Bu nedenle söz konusu hücrelerde 100'den daha fazla çekirdek, normal hücrelere göre 14-16 kat daha fazla DNA gözlemlenebilmekte ve bu hücreler normal hücrelerden yaklaşık 400 kat daha büyük olabilmektedir (Williamson ve Hussey 1996; Abad vd. 2003). Kök-ur nematodları tarafından konukçu hücrede beslenme amacıyla özelleştirilmiş olan bu çok çekirdekli beslenme hücreleri dev hücre "giant cell" olarak adlandırılmaktadır (Williamson ve Hussey 1996; Bleve-Zacheo ve Mellilo 1997; Williamson ve Gleason 2003; Karssen ve Moens 2006). Bu hücreler büyük oranda floem ve ksilem parankima hücrelerinden veya kortikal hücrelerden oluşmaktadır. Dev hücrelerin oluşturulması ile nematod etrafındaki kök dokuları, hücre sayılarındaki (hyperplasia) ve hücre hacimlerindeki (hypertrophy) artış sebebiyle genellikle *Meloidogyne* enfeksiyonları ile karakterize olan kök urlarına dönüşürler (Karssen ve Moens 2006; Moens vd. 2009). Köklerde gözlemlenen bu urlanma *Meloidogyne* cinsine ait türlere ve konukçuya göre oldukça değişkenlik göstermektedir (Moens vd. 2009). Zarar görmüş kök sistemi nedeniyle bitkilerde su ve besin maddesi alımı azalır, bu da bitkilerde solgunluğa, bodurlaşmaya, zayıf ve verimsiz gelişmeye neden olmaktadır. Ayrıca çok bulaşık bitkiler tamamen kuruyabilmektedir (Trudgill ve Blok 2001; Abad vd. 2003).

2.3. Sebze Alanlarında Tespit Edilen Kök-ur Nematodları

Kök-ur nematodları üzerine 1980'li yıllardan sonra çalışmalar yoğunlaşmıştır. Burada ise 2000'li yıllardan sonraki çalışmalar kısaca özetlenmiştir.

Dünya genelinde günümüze kadar yaklaşık 98 kök-ur nematodu türü belirlenmiştir (Jones vd. 2013). Sebze üretim alanlarında *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica* ve *M. hapla* türlerinin yaygın olarak bulunduğu bildirilmiştir (Moens vd. 2009).

Dautova ve Gommers (2000), Makedonya'da yaptıkları çalışmada, 9 farklı bölgeden (açık alan ve seralardan) 73 kök-ur nematodu popülasyonu toplamışlardır. Elde ettikleri bu örneklerde yapmış oldukları tanımlama çalışmaları sonucunda % 47.9'unun *M. incognita*, % 35.6'sının *M. javanica*, % 13.7'sinin *M. arenaria* ve % 2.7'sinin *M. hapla* olduğunu ve bütün bölgelerde türlerin karışık popülasyon halinde bulunduğunu bildirmişlerdir.

Söğüt ve Elekçioğlu (2000) tarafından Akdeniz Bölgesi'ndeki Adana, Hatay, İçel ve Antalya illeri sebze alanlarında bulunan kök-ur nematodlarının ırklarını belirlemek için yapılan çalışmada toplanan örneklerin % 55'inin *M. javanica*, % 42'sinin *M. incognita* ve % 3'ünün de *M. hapla* türlerinden oluştuğu bildirilmiştir. Irk tespiti çalışmalarında ise *M. incognita* ırk 2 ve 4 ve *M. javanica* ırk 1 olmak üzere sadece 3 adet kök-ur nematodu ırkı tespit etmişlerdir.

Mennan ve Ecevit (2001), Bafra ve Çarşamba ovalarında yapılan çalışmalarda en yaygın türün *M. incognita* olduğunu ve araştırmaya konu olan alanlarda bu türe ait sadece ırk-2'nin tespit edildiğini belirtmişlerdir.

Kepekençi vd. (2002), Eskişehir, Isparta, Burdur ve Antalya illerindeki örtüaltı sebze üretim alanlarında sorun olan kök-ur nematodlarının belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada *M. incognita*, *M. hapla*, *M. javanica*'nın yanı sıra, *M. exigua*'yı da Türkiye'de ilk kez bu çalışmada tespit etmişlerdir.

Castillo ve Jimenez (2003), Güney İspanya [Encinarejo (Córdoba)]'da ıspanak üretim alanlarında yaptıkları sörveylerde aldıkları örneklerde morfolojik, biyokimyasal ve Kuzey Karolina Konukçu Testi kullanılarak tanımlama çalışmaları yapmışlardır. Bu çalışmalar sonucunda alınan toprak örneklerinin tamamının *M. incognita* ile bulaşık olduğunu belirlemişlerdir.

Kepekençi ve Evlice (2003), Antalya, Burdur, Isparta ve Eskişehir illerindeki domates, biber ve sera alanlarında yaptıkları çalışmada, biber, domates ve börülce (*Dolichos lubia* Fornk.) köklerinde *M. incognita*'yı tespit etmişler ve *D. lubia*'nın Türkiye'deki bu nematod türü için yeni bir konukçu olduğunu bildirmişlerdir.

Hallmann vd (2007), Almanya'da organik tarım yapılan tahıl ve sebze üretim alanlarında gerçekleştirilen sörvey çalışması sonucunda söz konusu alanların % 51'inin kök-ur nematodlarıyla bulaşık olduğu tespit edilmiştir.

Devran ve Söğüt (2009), kök-ur nematodlarının Batı Akdeniz Bölgesi'ndeki yaygınlıklarını tespit etmek amacıyla yaptıkları çalışmada topladıkları 95 popülasyonu

türe özgü primerler kullanarak teşhis etmişler ve bu bölgede *M. incognita*'nın % 64.2, *M. javanica*'nın % 28.4, *M. arenaria*'nın % 7.3 oranında yaygınlık gösterdiğini belirlemişlerdir.

Ercan ve Elekçioğlu (2009), Adana ve Mersin'de tarımsal üretim yapılan alanlardan toplanan ve 17 yabancı ot türünden yapılan örneklemede, *M. javanica* (24), *M. incognita* (22) ve *M. arenaria* (4) türleri tespit edilmiştir.

Devran ve Söğüt (2011), Türkiye'nin Batı Akdeniz Bölgesi'nde örtü altı sebze üretim alanlarından toplanan 95 örnekle yapılan çalışmada, öncelikle elde edilen örneklerin 60'nın *M. incognita*, 28'inin *M. javanica* ve 7'sinin *M. arenaria* türlerine ait olduğu tespit edilmiştir. Bu türlerin ırklarının belirlenmesi amacıyla Kuzey Karolina Konukçu Testi kullanılmıştır. Buna göre alınan örneklerde *M. javanica*'nın ırk 1'i, *M. incognita*'nın ırk 2 ve 6'sı ve *M. arenaria*'nın ırk 2 ve 3'ü belirlenmiştir.

Özarslandan ve Elekçioğlu (2010), Türkiye'nin 28 farklı ilinden toplanan 79 kök-ur nematodu popülasyonunu morfolojik ve moleküler yöntemler kullanarak teşhis etmişlerdir. Elde edilen popülasyonların *M. javanica* (28), *M. incognita* (22), *M. arenaria* (21) ve *M. chitwoodi* (8) türleri olduğu, bunların bulunma oranlarının da sırasıyla % 35, % 28, % 27 ve % 10 olduğu bildirilmiştir.

Akyazı ve Ecevit (2011), Tokat ili Niksar ve Erbağa ilçeleri sebze üretim bölgelerinde yaptıkları çalışma sonucunda *M. incognita*'nın ırk 1 ve ırk 2'sini belirlemişlerdir.

Akyazı vd. (2012), Karadeniz Bölgesi'ndeki Samsun ve Ordu'da pepino (*Solanum muricatum* Aiton) yetiştirilen alanlardan elde edilen nematodlarda morfolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanarak yaptıkları sörvey çalışmasında, Türkiye'de ilk defa bu bitki için Samsun'da *M. arenaria*'yı, Ordu'da ise *M. hapla*'yı tespit etmişlerdir.

Talavera vd (2012), Kök-ur nematodlarının sebze üretimi üzerindeki etkisinin belirlenebilmesi amacıyla İspanya'nın güney-doğusunda 120 üretici ile yapılan sörvey çalışması sonucunda tarlaların % 17.7'sinin kök-ur nematodlarıyla bulaşık olduğu ve bu zararlılar nedeniyle sebze üretim alanlarında oluşan zararın yaklaşık % 30.8 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca söz konusu alanlardan alınan toprak ve bitki örneklerinde yapılan tanımlama çalışmaları sonucunda ise en yaygın türlerin sırasıyla *M. javanica*, *M. incognita* ve *M. arenaria* olduğu tespit edilmiştir.

Aydınlı vd. (2013), 2009 yılında Samsun'da yaptıkları sörvey çalışmasında, kök-ur nematodu ile bulaşık domates ve hıyar üretim seralarından aldıkları örneklerde, Türkiye için yeni bir tür olan *M. ethiopica*'yı belirlemişlerdir.

Aydınlı (2014), Orta Karadeniz Bölgesi'nde kök-ur nematodlarının yayılış ve bulaşıklık oranlarının belirlenmesi amacıyla yapılan sörveyler sonucunda, elde edilen kök-ur nematodlarının türlerini belirleyebilmek amacıyla yapılan morfolojik, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerden elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirilerek yapılan teşhis çalışmasında, popülasyonların sırasıyla 38'i *M. arenaria* (% 42.22), 37'si *M. ethiopica* (% 41.11), 11'i *M. javanica* (% 12.22) ve 4'ü *M. incognita* (% 4.44) olarak

belirlenmiştir.

Ghule vd (2014), Hindistan genelinde 14 farklı kök-ur nematodu türünün belirlendiği, bunlardan en yaygın olanların ise *M. incognita*, *M. javanica*, *Meloidogyne graminicola* Golden & Birchfield 1965 ve *M. arenaria* olduğunu belirtmişlerdir.

Çetintaş ve Çakmak (2016), Kahramanmaraş'ta sebze üretim alanlarında yapılan sörvey çalışmasında elde edilen popülasyonların teşhisinde morfolojik ve biyokimyasal yöntemler sonucu *Meloidogyne incognita* türü tespit edilmiş ve üretim alanlarının yaklaşık %24'ünün bu nematod ile bulaşık olduğu belirlenmiştir.

Uysal ve Söğüt (2016b), Göller Bölgesi'nde sebze üretimi yapılan alanlarda yürütülen çalışmalar sonucunda elde edilen kök-ur nematodu türleri morfolojik, moleküler ve Kuzey Karolina Konukçu Testi yöntemleri kullanılarak karakterize edilmiş ve yayılışları belirlenmiştir. Toplanan 160 örneğin % 51.8'nin kök-ur nematodları ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. Türlerin yaygınlık oranlarının ise % 36.7 *M. incognita*, % 32.3 *M. hapla*, % 26.5 *M. javanica* ve %1.5 *M. arenaria* olarak tespit edilmiş, iki popülasyon ise tanımlanamamıştır. Ayrıca, konukçu testine göre, *M. javanica*'nın ırk 1 ve ırk 3'ü, *M. incognita*'nın ise ırk 2, ırk 4 ve ırk 6'sı belirlenmiştir. Türkiye'de ilk kez *M. javanica* ırk 3 bu çalışma ile rapor edilmiştir.

Devran vd. (2017), Türkiye'nin en önemli sebze üretim merkezlerinden Antalya'nın Kumluca ilçesinde örtüaltı üretim alanlarında yaptıkları çalışmada toplamda 300 adet kök ve 300 adet toprak örneğinden elde edilen nematodların moleküler analizi sonucu, *M. incognita*, *M. arenaria* ve *M. javanica* ile yoğun bir şekilde bulaşık oldukları ve bu türlerin üretim alanlarında karışık bir şekilde buldukları belirlenmiştir.

Geriç Stare vd. (2017), diğer Avrupa ülkelerinde ve Türkiye'de *M. ethiopica* olarak tanımlanan popülasyonların *Meloidogyne luci* Carneiro, Correa, Almeida, Gomes, Deimi, Castagnone-Sereno & Karssen, 2014 olarak yeniden adlandırıldığını bildirmişlerdir.

Aydınlı (2018), Samsun ili sebze üretim alanlarında yaptıkları çalışmada alınan 50 örneğin % 20'sinde kök-ur nematodları tespit edilmiştir. En yaygın türler ise bulunma sıklıklarına göre, *Meloidogyne luci*, *M. arenaria* ve *M. incognita* olarak sıralanmıştır. Ayrıca Türkiye'de açık sebze üretim alanlarda *M. luci*'nin varlığı ilk defa bu çalışma ile belirlenmiştir.

Gürkan vd. (2019), Gaziantep ve Osmaniye illerinde sebze üretim alanlarında 2016 ve 2017 yıllarında 177 kök örneğinde yapılan çalışmalar sonucunda 69 örneğin kök-ur nematodları ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir. *Meloidogyne* türlerinin biyokimyasal esteraz izoenzim fenotipleri ve morfolojik perineal pattern teşhis yöntemleri kullanılarak teşhisleri yapılmıştır. Ayrıca Kuzey Karolina Konukçu Testi yardımı ile 20 popülasyonun ırkı belirlenmiştir. Bu çalışmalara göre bölgenin *M. incognita*, *M. arenaria*, *M. javanica*, ve *M. luci* türleri ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. Çalışma kapsamında Osmaniye ilinde tespit edilen *M. luci* türü Doğu Akdeniz Bölgesi için bir ilktir. Ayrıca yapılan ırk tespiti çalışmaları sonucunda da bölgede *M. incognita* ırk 1, ırk 2, ırk 3, *M. javanica* ırk 3, *M. arenaria* ırk 1 ve ırk 3 tespit edilmiştir.

2.4. Kök-ur Nematodlarıyla Mücadele

Kök ur nematodları, yaşamlarının tamamını toprak altında, büyük bir kısmını ise bitki dokusu içerisinde geçirmeleri, bir yetiştiricilik döneminde birden fazla döl verebilmeleri, çok geniş bir konukçu dizisine sahip olmaları, doğrudan beslenmeleri ya da çeşitli hastalık etmenleriyle birlikte yapmış oldukları zararların çok önemli boyutlara ulaşmaları nedeniyle ile mücadele oldukça zordur (Nyczepir ve Thomas 2009). Bu zararlılarla mücadele yöntemleri temelde kimyasal, kültürel ve biyolojik olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Gheysen vd. 1996; Nyczepir ve Thomas 2009).

Kimyasalların ticari olarak kullanımı 1900'lü yıllarda başlamış ve 20. yüzyılın büyük bir bölümünde bitki paraziti nematodların sorun olduğu tarımsal alanlarda etkin bir şekilde kullanılmıştır (Johnson 1985). Bu mücadele yönteminde kullanılan kimyasallar; fumigantlar [EDB (1,2-dibromoethane ya da ethylene dibromide); D-D mixture (1,3-dichloropropene ve 1,2-dichloropropane); 1,3-dichloropropene (1,3-D); DBCP (1,2-dibromo-3-chloropropane)], fumigant olmayanlar [Organik fosforlar (Organophosphates), Karbamatlar (Carbamates) vb.] ve diğer nematisitler ya da biyotik kaynaklardan elde edilenler (Avicta®, DiTera® vb.) olarak sınıflandırılabilir (Rich vd. 2004; Nyczepir ve Thomas 2009).

Bitki paraziti nematodlarla mücadelede çok büyük avantajlar sağlanmasına rağmen uygulamadaki zorluklar, ekonomik olmama, kullanılan bazı geniş spektrumlu ilaçların insan ve çevre sağlığına olan zararları nedeni ile son yıllarda nematodlarla mücadelede kimyasal kullanımı azalmaktadır (Rich vd. 2004). Nematodlarla mücadelede çok etkin bir şekilde kullanılan metil bromid (methyl bromide)'in nematisidal etkileri ilk kez 1940 yılında tespit edilmiştir (Christie ve Cobb 1940). Fakat sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda metil bromid gibi fumigantların insan sağlığına, çevreye ve özellikle ozon tabakasına büyük zararlar verdiği belirlenmiştir (Arıkan 1991; UNEP 1995; Barry vd. 2012). Bu nedenle Birleşmiş Milletler Montreal protokolüne göre metil bromid gelişmiş ülkelerde 2005, gelişmekte olan ülkelerde ise 2015 yılında kullanımı sonlandırılmıştır (UNEP 1995). Ülkemizde ise Metil bromidin taşıma öncesi ve karantina amaçlı uygulamalar dışında 2004 yılında tütün ve depolanmış ürünlerde, 2007 yılında ise toprakta kullanımı tamamen sonlandırılmıştır (Anonim 2020). Bu da nematodlarla mücadelede kullanılan kimyasallarda alternatif arayışlarını arttırmıştır.

Kimyasal mücadelede gözlemlenen bu olumsuzluklar nedeniyle kök-ur nematodlarıyla mücadelede kültürel önlemler hem bulaşmamış arazileri korumak, hem de bulaşmış arazilerde nematod popülasyon seviyelerini etkili bir şekilde azaltabilmek için oldukça önemlidir (Halbrendt ve LaMondia 2004). Sanitasyon yöntemleri (bitkisel üretim materyallerinin denetlenmesi ve sertifikalandırılması, tarımsal karantina önlemleri, toprak işleme aletlerinin temizliği), solarizasyon, dikim tarihi, toprak işleme, nadasa bırakma, antagonistik ve tuzak bitki kullanımı [*Tagetes* spp., susam, kuşkonmaz, hardal, neem bitkisi (*Azadirachta indica*)], su altında bırakma, bitki artıklarının temizlenmesi ve yabancı ot kontrolü kültürel önlemler arasında gösterilebilmektedir (Bridge 1996; Halbrendt ve LaMondia 2004; Thomas vd. 2005; Bacha vd. 2007).

Biyolojik mücadele çevre ve insan sağlığına herhangi bir zararının olmaması, güvenli ve etkili olması nedeniyle önemlidir (Tian vd. 2007). Bitki paraziti nematodların doğada birçok doğal düşmanı saptanmıştır. Bunlar içinde en etkili olanları sırasıyla

funguslar [Nematofag funguslar (*Arthrobotrys dactyloides* Drechsler, 1937, *Dactylella candida* (Nees) de Hoog & van Oorschot, 1985, *Monacrosporium cionopagum* (Drechsler) Subram, 1964, *Arthrobotrys oligospora* Fresen, 1850, *Hirsutella rhossiliensis* Minter & Brady, 1980, *Drechmeria coniospora* (Drechsler) Gams & Jansson, 1985, *Nematoctonus* spp. *Verticillium balanoides* (Drechsler) Zare & Gams, 2001, *Catenaria anguillulae* Sorokin, 1876, *Nematophthora gynophila* Kerry & Crump, *Cylindrocarpon destructans* (Zinssmeister) Scholten, 1964, *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & Gams, 2001 (sinonimi *Verticillium chlamydosporium*) ve *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) olarak sıralanabilmektedir. Endofitik funguslar ise bitki dokusu içerisinde bitkiye zarar vermeden gelişen organizmalardır. En iyi bilinenleri ise obligat simbiyotik özellikte olan Arbusküler mikorhizal (AM) funguslardır. Bu funguslar bitkileri nematod zararından koruyabilmekte ve nematod popülasyon yoğunluğunu azaltabilmektedir. En iyi bilinenleri ise (*Neotyphodium* spp.)'dir.], bakteriler (*Pasteuria penetrans* (Thorne, 1940) Sayre & Starr, 1986) ve predatörler (nematodlar, akarlar, böcekler ve tardigrade'ler gibi omurgasızlar)'dir (Stirling 1991; Viaene vd. 2006). Fakat predatörler içerisinde sıralanan akarlar ve böcekler bitki paraziti nematodlara özelleşmiş değillerdir. Kitle üretimleri ve toprağa bulaştırılmaları da pratik ve uygulanabilir değildir (Viaene vd. 2006). Ayrıca bazı rizosfer bakterileri gibi (*Pseudomonas* spp., *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus subtilis*) besinler için yarışan, toksinler üreten veya konukçu direncini indükleyen organizmalar, nematod zararını azaltabilmektedir. Fakat toprak ekosistemindeki baskılayıcı koşullar nedeniyle bu etmenlerle de nematod popülasyonlarının uzun süreli kontrolü sağlanamamaktadır (Viaene vd. 2006).

Dayanıklı çeşit ya da anaçlar, kök-ur nematodları ile mücadelede kullanılmaktadır (Tzortzakakis ve Gowen 1996; Xu vd. 2001). Bu yöntem mücadelede nematodların üremelerinin baskılanması, bitki rotasyon sürelerinin azaltılması, çevre ve besin zincirinde toksik kalıntı riskinin azaltılması, özel uygulama teknolojisi veya ekipman gereksiniminin olmaması gibi birçok avantaj sağlayabilmektedir (Cook ve Evans 1987; Boerma ve Hussey 1992; Williamson 1998).

Bitkilerdeki dayanıklılık, nematodun üreme kabiliyetini azaltma veya engelleme özelliği olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle nematodlar, dayanıklı bitkilerde çoğalamamakta ya da zayıf şekilde çoğalabilmektedir (Stanton ve Stirling 1997). Bitkilerde nematodlara (özellikle sabit endoparazit nematodlara) karşı geliştirilen en yaygın direnç mekanizmaları beslenme hücresi ve etrafındaki hücrelerde gözlemlenen ölümler (nekrozlar) ya da hipersensitif reaksiyonlardır (Dropkin 1969a; Milligan vd. 1998). Bu reaksiyonlar vasıtası ile nematodun bitkiden beslenmesi ile sonuçlanan uyumlu ilişki oluşturulamamaktadır (Stanton ve Stirling 1997). Dolayısıyla beslenme yerleri oluşturamayan nematodlar ya ölmekte ya da köklerden ayrılmaktadır (Milligan vd. 1998). Bu da bitkilerde gözlemlenen dayanıklılığın nematodlara karşı etkin ve sürdürülebilir bir şekilde kullanılmasını sağlamaktadır.

2.5. Domateste Kök-ur Nematodlarına Dayanıklılık

Kök-ur nematodlarının polifag olmaları ve tarımsal üretimin yapıldığı birçok alanda yaygınlık gösterebilmeleri nedeniyle bunlara karşı farklı konukçu bitkilerde çok sayıda dayanıklılık geni tespit edilmiştir (Williamson ve Roberts 2009). Bitkilerde belirlenen bu dayanıklılık genleri nematodlardaki üreme ya da gelişmeyi engelleyebilmektedir (Roberts 2002). Dolayısıyla kök-ur nematodlarının bitkilerde neden oldukları zararlar azalmakta ve ürün kaybı en aza inmektedir. Kök-ur nematodlarına karşı günümüze kadar bitkilerde tespit edilmiş en etkili dayanıklılık geni ise domateslerdeki *Mi-1* genidir (Williamson ve Roberts 2009). Bu gen kök-ur nematodları ile mücadelede ticari domates çeşitlerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Devran vd. 2010; Seid vd. 2015).

2.5.1. *Mi-1* geni

Bitkilerde en iyi karakterize edilmiş nematod direnç genlerinden biri *M. incognita*, *M. arenaria* ve *M. javanica* 'ya karşı dayanıklılık sağlayan domateslerdeki *Mi-1* genidir (Williamson 1998). Bu gen ilk kez yabani domates çeşidi olan *L. peruvianum*'da (PI128657) tespit edilmiştir (Bailey 1941). Bu domates çeşidi kültür formlarıyla normal bir şekilde çaprazlanamadığı için *Mi-1* geni embriyo kurtarma tekniği kullanılarak ticari çeşitlere aktarılmıştır (Smith 1944).

Birçok bitki dayanıklılık geni bir nükleotit bağlama bölgesi (NBS), bir lörin bakımından zengin tekrar bölgesi (LRR) ve çeşitli amino-terminal bölgelerin varlığı ile karakterize edilen proteinleri kodlamaktadır (Takken vd. 2006). NBS-LRR genlerinden biri olan *Mi-1* geni de 1257 amino asitlik bir protein kodlayabilmekte ve domatesin 6. kromozomunun kısa kolunda 650 kb'lik bir bölgede bulunmaktadır (Ho vd. 1992; Kaloshian vd. 1998). Ayrıca bu bölgede *Mi-1* geninin 7 homoloğu (MiGHs), 1p (*Mi-1.1*, *Mi-1.2*, *Mi-1.3*) ve 2p (*Mi-1.4*, *Mi-1.5*, *Mi-1.6*, *Mi-1.7*) olmak üzere yaklaşık 300 kb ile ayrılmış iki küme halinde bulunmaktadır. Bu homologlardan *Mi-1.3* ve *Mi-1.5* ise pseudogendir (Seah vd. 2004; Seah vd. 2007a). Homolog genlerin bitkilere aktarılması sonucu yapılan çalışmalarda, dayanıklılığın *Mi-1.2* (yaklaşık 14.7 kb'lik DNA bölgesi) tarafından oluşturulduğu tespit edilmiştir (Milligan vd. 1998).

Mi-1.2 tarafından oluşturulan dayanıklılıkta ilk belirtiler nematod inokulasyonundan yaklaşık 12 saat sonra hızlı ve bölgesel hücre ölümleri olarak gözlemlenmektedir (Paulson ve Webster 1972). Domateslerde gözlemlenen bu dayanıklılığın salisilik asit (SA) temelli bir savunma sistemi tarafından oluşturulduğu bilinmektedir (Molinari ve Loffredo 2006). Ayrıca kök-ur nematodlarıyla dayanıklı domates arasındaki uyumsuz ilişkinin erken dönemlerinde superoksit (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından oksidatif bir yanmanın oluşturulduğu da kanıtlanmıştır (Melillo vd. 2006). Bu kadar karmaşık bir sistem tarafından oluşturulan *Mi-1.2* dayanıklılığı önemli *Meloidogyne* türlerinin yanı sıra pamuk beyazsineğinin [*Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae)] B ve Q biyotiplerine (Nombela vd. 2003) ve patates afidinin [*Macrosiphum euphorbiae* (Thomas, 1878) (Hemiptera: Aphididae)] bazı izolatlarına da (Rossi vd. 1998) dayanıklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla *Mi-1.2* geninin, üç farklı

organizmaya (kök-ur nematodları, yaprak bitleri ve beyaz sinekler) karşı dayanıklılık gösterebilen tek gen olduğu bilinmektedir (Nombela vd. 2003).

2.5.2. Domateste *Mi-1* genini kıran popülasyonlar

Dayanıklı çeşitlerin kök-ur nematodları ile mücadelede kullanılması çevresel sorunları azaltmakta ve mücadele için en yaygın ve etkin yöntemlerden birisini oluşturmaktadır (Tzortzakakis ve Gowen 1996). Dayanıklı çeşitlerin kullanımını sınırlayan en önemli etkenlerden biri ise virüent (*Mi-1* virüent) kök-ur nematodu popülasyonlarıdır. Dayanıklı bitkilerde, üreyebilme yeteneği gösteren popülasyonlar virüent olarak ifade edilir. Buna karşın avirüent popülasyonlar ise hassas bitkide beslenip üreyebilen fakat dayanıklı bitkilerde üreyemeyen popülasyonlar için kullanılmaktadır (Roberts 2002). Virüent popülasyonlar arazi koşullarında doğal olarak görülebileceği gibi (doğal virüent popülasyonlar), aynı üretim bölgesinde sürekli olarak dayanıklı bitkilerin yetiştirilmesiyle de oluşabilmektedir (seçilmiş virüent popülasyonlar) (Jarquin-Barberena vd, 1991; Roberts 1995; Xu vd, 2001). *Mi-1* virüent kök-ur nematodu popülasyonları, hem ülkemizde hem de dünyanın farklı yerlerinde yapılan birçok çalışmada tespit edilmiştir.

Allen (1952), ilk kez Kaliforniya'daki pamuk üretim alanlarından alınan 6 farklı kök-ur nematodu popülasyonundan 2'sinin dayanıklı domates çeşiti olan *L. peruvianum* üzerinde geliştiğini belirlemiştir.

Netscher (1977), Senegal, Gambiya ve Moritanya'da börülce ve sebze üretim alanlarından elde edilen 18 kök-ur nematodu popülasyonundan 4 tanesinin domateslerdeki dayanıklılığı kırabilen biyotipler olduğu tespit etmiştir.

Viglierchio (1978), Kaliforniya'nın farklı tarımsal üretim alanlarından elde edilen 10 kök-ur nematodu popülasyonundan 2 tanesinin dayanıklı domateslerde gelişebildiği tespit etmiştir.

Prot (1984), Senegal'de yapılan sömürme çalışmasında elde edilen bir kök-ur nematodu (*M. arenaria*) popülasyonunun domateslerdeki dayanıklılığı kırabildiği belirlemiştir.

Roberts ve Thomason (1986), sekiz adet *M. incognita* ve yedi adet *M. javanica* popülasyonu ile dayanıklı domates çeşitleri üzerinde yapılan testleme çalışmaları sonucunda *M. javanica* popülasyonlarından beş tanesinin *Mi-1* virüent özellikte olduğu tespit etmiştir.

Berthou vd (1989), Senegal'de iki büyük sebze üretim alanında yapılan sömürme çalışmaları sonucunda *Mi-1* virüent kök-ur nematodu popülasyonlarını tespit etmişlerdir.

Jarquin-Barberena vd (1991), *Mi-1* genine karşı *M. incognita*'ya ait dört izolat analiz edilmiş ve bu izolatlardan sadece bir tanesinin doğal virüent olduğu tespit etmiştir. Bu popülasyonun hassas ve dayanıklı domates çeşitlerinde 9 nesil boyunca üretildiklerinde virülensliklerinde herhangi bir azalma olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca,

avirüent bir *M. incognita* popülasyonunun, dayanıklı domates üzerindeki yapay seleksiyonu sonucunda *Mi-1* virüent özellik kazandığı tespit edilmiştir.

Castagnone-Sereno vd (1993), doğal ve seçilmiş virüent özellikteki *M. incognita* popülasyonlarını 18 döl boyunca dayanıklı ve hassas domates çeşitlerinde çoğaltmışlardır. Belirli aralıklarla (her 3 dölde bir) bu popülasyonların, oluşturdukları yumurta kümelerini sayarak, avirüent özellik kazanıp kazanmadıklarını değerlendirmişlerdir. Yaptıkları incelemelerde, söz konusu popülasyonlardan hiçbirinin virüent özelliklerini yitirmediklerini bildirmişlerdir. Virüentliğin en azından fenotipik düzeyde stabil bir karakter olduğunu belirtmişlerdir.

Kaloshian vd (1996), Kaliforniya’ da yapılan bir diğer çalışmada da iki farklı bölgede dayanıklı domates çeşitlerinde gelişebilen *Mi-1* virüent kök-ur nematodu (*M. incognita*) popülasyonlarının olduğu tespit etmiştir.

Tzortzakakis ve Goven (1996), Girit’in üç farklı bölgesinden toplanan beş farklı kök-ur nematodu popülasyonu (*M. javanica*) ile yapılan çalışma sonucunda ise elde edilen popülasyonlar içerisinde *Mi-1* virüent popülasyonların olduğu belirlemişlerdir.

Eddaoudi vd (1997), Fas’da yürüttükleri çalışmada, örtüaltı sebze üretim alanlarından toplanan 25 farklı kök-ur nematodu popülasyonundan 9 tanesinin (*M. javanica*) *Mi-1* virüent olduğu tespit etmiştir.

Molinari ve Miacola (1997), laboratuvar koşullarında avirüent *M. incognita* ve *M. hapla* popülasyonları ile *Mi-1* virüent *M. javanica* popülasyonlarının dayanıklı domates bitkileri üzerinde yaptıkları testleme çalışmaları sonucunda avirüent *M. hapla* popülasyonunun *Mi-1* virüent özellik kazandığı belirlemiştir.

Ornat vd (2001), İspanya’da 14 farklı kök-ur nematodu popülasyonu ile yapılan çalışmada *M. javanica* türüne ait virüent bir popülasyon tespit edilmiştir.

Karajeh vd (2005), Ürdün’de üç kök-ur nematodu türüne (*M. incognita*, *M. arenaria* ve *M. javanica*,) ait 83 izolatla yapılan bir çalışmada *M. javanica* türüne ait üç popülasyonun dayanıklı domates bitkileri üzerinde gelişebildiği ve *Mi-1* virüent özellikte olduğu belirlenmiştir.

Tzortzakakis vd (2005), Yunanistan’da elde edilen ve *M. incognita* ve *M. javanica* oldukları tespit edilen 9 kök-ur nematodu popülasyonunun virüentliği araştırmışlardır. Yapılan saksı denemeleri sonucunda, dayanıklı domates çeşitleri üzerinde *M. javanica*’ya ait beş, *M. incognita*’ya ait bir popülasyonun *Mi-1* virüent özellikte olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada tespit edilen virüent *M. incognita* popülasyonunun Yunanistan’da ilk kez tespit edildiği, virüent *M. javanica* popülasyonlarının ise Yunanistan ana karası için yeni kayıt olduğu bildirilmiştir.

Devran ve Söğüt (2010), Batı Akdeniz Bölgesi’nden toplanan 95 kök-ur nematodu popülasyonu kontrollü iklim odasında hassas ve dayanıklı domates çeşitleri üzerinde testlemiştir. Bitkilerin köklerindeki yumurta paketi ve urlanma indeksine göre yapılan değerlendirmede *M. incognita*’ya ait yedi ve *M. javanica*’ya ait altı popülasyonun *Mi-1* virüent olduğu bildirmiştir. Ayrıca *Mi-1* virüent *M. incognita* ve *M. javanica*

popülasyonlarının bulunma sıklıkları sırasıyla % 11.7 ve % 21.4 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışma ile *Mi-1* virüent kök-ur nematodu popülasyonları Türkiye’de ilk kez tespit edilmiştir.

Verdejo-Lucas vd (2012), İspanya’nın güney doğusundaki sebze üretim alanlarında yapılan sörvey çalışmaları sonucunda bölgeden toplanan 29 adet *Meloidogyne* spp. popülasyonunun % 48’inin *Mi-1* virüent özellikte olduğunu tespit etmişlerdir.

Iberkleid vd (2014), İsrail’de yapılan bir çalışmada farklı bölgelerdeki örtü altı üretim alanlarından toplanan örneklerde *M. javanica*’nın virüent popülasyonlarının bulunduğunu bildirmişlerdir.

Uysal ve Söğüt (2016a), Türkiye’nin Göller Bölgesi’ndeki sebze üretim alanlarında yaptıkları çalışma sonucunda bölgeden elde edilen 25 *M. incognita* popülasyonunda 3 izolatın, 18 *M. javanica* popülasyonunda ise 4 izolatın *Mi-1* virüent reaksiyon gösterdiğini belirlemişlerdir.

2.5.3. Virüent kök-ur nematodlarının tanımlanması

Kök-ur nematodlarıyla mücadelede en önemli yöntemlerden birisi dayanıklı domates çeşitlerinin kullanımınıdır. Dayanıklı çeşitlerin kullanımını sınırlayan en önemli etken ise *Mi-1* virüent kök-ur nematodu popülasyonlarıdır. Geleneksel olarak kök-ur nematodu türlerinin virüent olup olmadığının belirlenebilmesi için bitki testlemeleri yapılmaktadır. Bu çalışmalar ise yaklaşık 2-6 ay sürmekte, zaman almakta, yüksek bir maliyete neden olmakta ve fazla iş gücü gerektirmektedir (Castagnone-Sereno vd. 1993; Semblat vd. 2000). Oysaki *Mi-1* virüent popülasyonların moleküler olarak belirlenebilmesi, hem analiz süresini kısaltabilecek, hemde bu zararlılarla mücadelenin daha etkin bir şekilde yapılmasına imkân sunabilecektir. Bu nedenle virüenslikle ilgili moleküler markör geliştirilmesi mücadele için gereklidir.

Semblat vd (2000), kök-ur nematodlarıyla önemli bir mücadele yöntemi olan dayanıklı çeşit kullanımının sınırlandırılmasına neden olan virüent kök-ur nematodu popülasyonlarının tanımlanabilmesi amacıyla yaptıkları çalışmada, farklı tarımsal üretim alanlarından elde edilen *M. incognita*, *M. arenaria* ve *M. javanica* türlerine ait virüent ve avirüent 17 popülasyon arasındaki polimorfizmi (farklılığı) 32 farklı AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markörü kullanılarak belirlemişler ve elde edilen 1550 farklılığın virüenslikle ilişkisinin bulunmadığını ve virüensliğin ortak bir kökene ait olmadığını bağımsız mutasyon olaylarının sonucu olarak ortaya çıkabileceğini belirtmişlerdir.

Xu vd (2001), tarımsal üretim alanlarından elde ettikleri *M. incognita*, *M. arenaria* ve *M. javanica* türlerine ait seçilmiş virüent, doğal virüent ve avirüent popülasyonlarda RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markörleri kullanmışlar ve polimorfik DNA bantlarını SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) primerlerine dönüştürmüşlerdir. Bu primerlerle (MVC-VF/R1) 3 kök-ur nematodu türüne ait seçilmiş virüent kök-ur nematodu popülasyonlarındaki genetik mekanizmanın benzer olduğu fakat bu benzerliğin doğal virüent popülasyonlarda bulunmadığını tespit etmişlerdir.

Bunun sebebinin ise doğal virulent popülasyonların *Mi-1* geninin seleksiyon baskısına maruz kalmadan gelişmiş olabileceği şeklinde belirtmişlerdir. Bu primerlerle *M. incognita*, *M. arenaria* ve *M. javanica* türlerine ait yalnızca seçilmiş *Mi-1* virulent popülasyonların tanılamaları gerçekleştirilmiştir.

Semblat vd (2001), AFLP tekniği kullanılarak *M. incognita*'nın *Mi-1* virulent ve avirulent 3 yakın izogenik hattı (Near-Isogenic Lines-NILs) arasındaki farklı markörler belirlenmeye çalışmışlardır. Bu çalışma sonucunda sadece avirulent popülasyonlarda *Map-1* (*Meloidogyne* Avirulence Protein-1) olarak adlandırılan bir cDNA tespit edilmiştir. Bu salgı proteininin yaklaşık 458 aminoasitlik bir bölüm kodlayabildiğini; ayrıca, 13 ve 58 aminoasitlik korunmuş tekrar bölgelerine sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *Map-1*'in diğer nematod türlerinde bulunup bulunmadığını belirleyebilmek amacıyla *Xiphinema index* Thorne & Allen, 1950, *Globodera pallida* Stone, 1973, *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900) Dougherty, 1955, *M. hapla*, *M. fallax* Karsen, 1996, *M. arenaria* ve *M. javanica* ile yapılan çalışmada ise söz konusu salgı proteininin *Mi-1* geninin dayanıklılık gösterdiği *M. javanica* ve *M. arenaria* türlerinde de bulunduğu tespit edilmiştir. Yapılan poliklonal antibody çalışmaları sonucunda ise söz konusu proteinin kök-ur nematodlarının 2. juvenil dönemlerinde amfidlerden salgılandığı tespit edilmiştir. Bu nedenle söz konusu proteinin dayanıklı bitki ile avirulent nematodun beslenme ilişkilerinin erken dönemlerinde salgılanabileceği belirtilmiştir.

Neveu vd (2003), cDNA AFLP tekniği kullanılarak *M. incognita*'nın *Mi-1* virulent ve avirulent yakın izogenik hatları arasında farklı şekilde ifade edilmiş genleri belirlemeye çalışmışlardır. Bu çalışma sonucunda transcript-derived fragments (TDF) olarak adlandırılan 24025 adet fragment belirlenmiş bunlardan 22 tanesinin ise *Mi-1* virulent ve avirulent hatlar arasında farklı olduğu tespit edilmiştir. Bu 22 fragment için infektif juvenillerden (J2) elde edilen mRNA'larda yapılan reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) çalışmaları sonucunda 9 tanesinden cDNA AFLP çalışmalarıyla benzer sonuçların elde edildiği belirlenmiştir. *Mi-1* virulent ve avirulent hatlar arasında farklı olduğu tespit edilen bu fragmentlerin nematodların hangi organlarından salgılandıklarını belirlemek amacıyla yapılan In situ hibridizasyon çalışmaları sonucunda ise infektif juvenillere ait intestinal hücrelerden (HM10 ve PM1), subventral özofagal bezlerden (HM1) ve dorsal özofagal bezlerden (HM7 ve HM12) üretildikleri tespit edilmiştir. Ayrıca bu fragmentlerin nematodların patojenisiteleri ile virülsellik ve avirülslikle ilişkili olabilecekleri belirtilmiştir.

Gleason vd (2008), DNA blot ve AFLP tekniği kullanılarak *M. javanica*'nın *Mi-1* virulent (VW5) ve avirulent (VW4) yakın izogenik hatları arasındaki farklılıkları belirlemek için yaklaşık 12000 parçadan sadece bir tanesinin (B1) tekrarlanabilir bir farklılık ortaya koyduğunu belirlemişlerdir. Yaklaşık 727-nükleotidlik genom dizisi tanımlayan bu bölge *Cg-1* olarak adlandırılmıştır. Bu bölgeyi tanımlayabilmek amacıyla yapılan çalışmalar sonucunda a5/a6 primerleri dizayn edilmiş fakat bu gen bölgesinin ürününün ne olduğu belirlenememiştir. Bu ürünün *Mi-1* geni ile doğrudan veya dolaylı olarak etkileşime girebileceği veya aktivitesini değiştirebileceği tespit edilmiştir. Ayrıca kök-ur nematodlarındaki virülselliğin tanımlanması ile ilgili yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırılması sonucunda virülselliğin oluşumunda birden fazla mekanizmanın etkili olabileceği de ifade edilmiştir.

Adam vd (2009), *M. javanica*'larda *Map-1* geninin homoloğu olan iki yeni gen

(MJAP-1 ve MJAP-2) tespit edilmiştir. *Mi-1* virüent ve avirüent özellikteki 15 *M. javanica*, 4 *M. incognita* ve 1 *Meloidogyne mayaguensis* Rammah & Hirschmann, 1988 üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda bu genlerin tanımlanması amacıyla geliştirilen primerler (Mjap-F1 ve Mjap-R1) vasıtasıyla hem virüent hem de avirüent *M. javanica* popülasyonlarında tespit edilmiştir. Ayrıca bu genlere ait ürünlerin kök-ur nematodlarının subventral bezlerinde, yumurta ve ergin dışı dönemleri haricinde J2'lerde salgılandıkları belirlenmiştir. Bu genlerin konukçu etkileşimindeki rolleri, virüent ve avirüent popülasyonlar arasındaki farklılıkların tespitinin daha detaylı yapılacak olan çalışmalarla tespit edilebileceği belirtilmiştir.

Castagnone-Sereno vd (2009), *M. incognita*'nın *Mi-1* virüent ve avirüent yakın izogenik hatları arasındaki farklılıkları belirleyebilmek amacıyla *Map-1* genlerinde yer alan 13 ve 58 amino asitlik korunmuş tekrar bölgelerinin sayılarındaki ve düzenlerindeki varyasyonları araştırmışlardır. *Map-1* bölgesinden geliştirilen m1-m2 primerleri ile yapılan çalışmalar sonucunda virüent popülasyonlardaki *Map-1.1*'in dışında avirüent popülasyonlarda *Map-1.2* ve *Map-1.3* olarak adlandırılan yeni *Map-1* gen ailesi üyeleri tespit edilmiştir. Bu proteinlerin varlığının bitki savunma mekanizmalarını tetikleyebileceği, bu gen bölgelerinin silinmesinin ise nematodlarda virüensliğe neden olabileceği ve korunmuş tekrar bölgelerinin sayı ve yeniden oluşan düzenlerinin bitki-nematod etkileşiminin spesifikliğinde rol oynayabileceğini belirtmişlerdir.

Cortada vd (2011), farklı coğrafyalardan toplanan *M. incognita* ve *M. javanica* türlerine ait avirüent, seçilmiş ve doğal virüent 7 kök-ur nematodu popülasyonu ile daha önceki çalışmalarda (Xu vd. 2001) *Meloidogyne* virulence correlated (MVC) lokuslarından elde edilen moleküler markörler (MVC-VF/R1) kullanılarak yapılan çalışma sonucunda beklenen seçilmiş virüent kök-ur nematodu popülasyonlarını tanımlayamamışlardır. In silico çalışmaları sonucunda daha önceki tanımlanan MVC lokuslarına ait dizilimlerin ökaryotik organizmalardan çok prokaryotik organizmaların dizilimlerine benzediği ve bu dizilimlerin özellikle Comamonadaceae familyasından Betaproteobacteria cinsine ait birçok organizmanın [*Acidovorax* spp. (accession no. CP000512.1 ve CP001392.1), *Delftia* spp. (accession no. CP000884.1), *Rhodopherax* spp. (accession no. CP000267.1), *Polaromonas* spp. (accession no. CP000316.1), *Variovorax* spp. (accession no. CP001635.1) ve *Verminephrobacter* spp. (accession no. CP000542.1)] dizimlerine % 71'den % 88'e değişen oranlarda benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Tomalova vd (2012), biyoinformatik ve PCR temelli moleküler teknikler kullanılarak *Map-1* gen ailesinin Nematoda şubesi içerisindeki filogenetik dağılımını ve çeşitliliğini incelemişlerdir. Nematoda şubesinden 7 takıma ait 12 familyadan 53 nematod türünde yapılan çalışmalar sonucunda *Map-1* gen ailesinin Taxonomically restricted genes (TRG) olduğu ve yalnızca *Meloidogyne* cinsine bağlı türlerde bulunduğunu ve incelenen 21 kök-ur nematodu türünden yalnızca 13 tanesinde *Map-1* genlerinin bulunduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca *Map-1* genlerinin homologlarının belirlenmesi amacıyla M1/M2 ve MrepF/MrepR primerleri kullanılarak yapılan çalışmada genlerdeki tekrar bölgelerinde gözlemlenen farklılıklardan dolayı *Map-1* gen ailesine ait 7 üye tespit etmişler ve bunlardan 3 tanesini ise ilk kez bu çalışmada belirlemişlerdir. Elde edilen tüm veriler incelendiğinde *Map-1* gen ailesinde gözlemlenen mutasyonlar ve izolatların virüensliği arasında bir ilişkinin olmadığını bildirmişlerdir.

Castagnone-Sereno vd (2015), cDNA-AFLP tekniği kullanılarak *M. incognita*'nın virü lent ve avirü lent popü lasyonlarının tanımlanabilmesi amacıyla yürüttükleri çalışmada, virü lenslikle ilgili olduğu düşünö len ve ö nceki çalışmada (Neveu vd. 2003) belirlenen 4 farklı gen bölgesinden (HM1, HM2, HM11, HM12) elde edilen primerler kullanılarak söz konusu popü lasyonlar arasında farklılıkları incelemiş ve primerlerle çok farklı coğrafyalardan elde edilen (Kursk, Rusya ve Morelos, Meksika) virü lent ve avirü lent *M. incognita* popü lasyonlarının ayrımlarını yapabilmışlerdir.

Castagnone-Sereno vd (2019), Rusya, Kursk ve Meksika, Morelos'dan elde edilen iki farklı avirü lent ve aynı popü lasyonlardan elde edilen seçilmiş *Mi-1* virü lent *M. incognita* popü lasyonlarının genomlarında Comparative Genomic Hybridization (CGH) tekniği kullanılarak belirlenen Copy Number Variation (CNV)'lerin *Mi-1* virü lensliği ile ilişkileri belirlenmeye çalışılmışlardır. Yapılan çalışmalar sonucunda seçilmiş *Mi-1* virü lent ve avirü lent popü lasyonlar arasında 184 gende farklılıklar tespit edilmiştir. Bu genlerde qPCR'la yapılan çalışmalar sonucunda da 33 gendeki farklılıkların virü lenslikle ilişkili olabileceği belirlenmiştir. Çalışma kapsamında *M. incognita* genomlarında tespit edilen CNV'lerin, bu organizmaların *Mi-1* dayanıklılık genine adaptasyonları konusunda etkili olabilecekleri belirlenmiştir. Ayrıca, bu genlerin tespiti içinde çalışma kapsamında 33 adet primer ü retilmiştir.

Mı stanoglu vd (2020), 7 farklı primer çiftinin (M1/M2, MRepF/MRepR, HM1.F2/HM1.R2, HM2.F/HM2.R, HM11.F2/HM11.R2, HM12.F2/HM12.R2 ve a5/a6) Türkiye'nin örtü altı tarımsal üretim alanlarından elde edilen *Mi-1* virü lent ve avirü lent 69 farklı *M. incognita* ve *M. javanica* popü lasyonunda testlenmesi sonucunda primerlerin virü lent ve avirü lent popü lasyonları ayıramadığı belirlenmişlerdir. Ayrıca HM1.F2/HM1.R2 primerlerinden elde edilen PCR ürünlerini 30 farklı kesim enzimiyle kesmişler fakat popü lasyonlar arasında herhangi bir farklılık bulamamışlardır.

2.6. DNA'nın Dizilenmesi

DNA dizi analizi, bir DNA parçasını oluşturan A, C, G, T nükleotid sıralarının tespit edilmesi olarak tanımlanmaktadır. Bu diziler DNA bölgesinin hangi proteini kodlayabileceğine, gen aktivitesine, evrimsel akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Dönmez vd. 2015).

Elde edilen veri boyutu, maliyeti, işlem süresi gibi konularda çok geliştirilen DNA dizileme ile ilgili çalışmalar maya hücresinden izole edilen 77 nükleotitlik alanin-tRNA polinükleotid diziliminin oligonükleotidlerinin ilk olarak kâğıt elektroforezi ile ayrılması ve ardından nükleotid bileşimlerinin iki boyutlu kâğıt kromatografisi ile belirlenmesi ile başlamıştır (Holley vd. 1965).

Maxam ve Gilbert (1977), DNA molekülünün kimyasallarla modifikasyonuna ve elektroforezle ayrıştırılmasına dayanan bir teknik geliştirmişlerdir.

Sanger vd. (1977), daha uzun DNA parçalarının dizilenmesine imkân sağlayan ve normal deoxynucleotide triphosphate (dNTP)'ın yanı sıra deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ve bu molekülün bir analogu olan 2',3'- dideoxynucleotide

triphosphate (ddNTP)'in substrat olarak kullanılabilmesine dayanan zincir sonlandırma (Chain-termination) yöntemini geliştirmişlerdir. Bu yöntemde, sentezlenen DNA'ya 3' pozisyonunda OH grubu olmayan bir ddNTP'nin katılması, sentezi durdurmaktadır. Elde edilen farklı uzunluktaki DNA parçaları elektroforezle ayrıştırılarak bazlar belirlenebilmektedir. Ayrıca bu çalışmayla bir bakteriofaj olan ϕ X 174' ün 5,38 kb büyüklüğündeki genomu dizilenmiş ve dizilenen ilk genom olarak kayıtlara geçmiştir.

Smith vd. (1986), yaptıkları çalışmada DNA dizileme tekniklerini otomatize hale getirmişlerdir. Bu ilk nesil otomatize DNA dizileme çalışmalarında zincir sonlandırma yöntemi kullanılmış olup, floresan boya ile işaretli dNTP'ler yardımı ile tek reaksiyonda dizilemeyi yapabilen DNA dizileme cihazı geliştirilmiştir. Daha sonra elde edilen verilerin depolanması ve analizini yapabilen bilgisayar yazılımı ile kombine edilmiştir.

Sanger metodunun çok zaman ve iş gücü alması nedeniyle yeni dizileme yöntemleri geliştirilmiştir. Ronaghi vd. (1998), tarafından geliştirilen dizi analizi ile üretim dizileyerek sentezleme (sequencing by synthesis) ilkesine dayanan ve pirodizileme (pyrosequencing) olarak bilinen bu yöntem, DNA zincirine nükleotit eklenmesi sırasında açığa çıkan pirofosfat (Ppi) moleküllerini tespit etmesi özelliği ile dideoksinükleotit kullanımına bağlı zincir sonlandırılmasını esas alan geleneksel dizi analiz yöntemlerinden ayrılmaktadır. Bu yöntem ile 300-500 nükleotit arasında uzunluğa sahip DNA moleküllerinin analizi yapılabilmektedir. Bu çalışma sonrasında yeni nesil DNA dizileme olarak tanımlanan ve büyük hacimlerde DNA dizileme çalışmalarının yapılabilirdiği teknikler geliştirilmiştir. Bennet (2004), tarafından geliştirilen İllumina/Solexa yönteminde, her biri farklı bir floresan boya ile etiketlenmiş dört baz için geri dönüşümlü sonlandırma nükleotitleri ve bunlara bağlanabilen özel bir DNA polimeraz enziminden oluşan sentez yoluyla dizileme esasına dayanmaktadır. Bir ucunda adaptör kullanılarak sağlam bir yüzeye bağlanan DNA molekülüne daha sonra dört tip ddNTP eklenir (bridge amplification). Ardından yeni sentezlenen ipliğin yapısına girmeyen ddNTP'ler yıkanarak uzaklaştırılır. DNA, her yıkamadan sonra, bir nükleotid uzar. Floresan işaretli nükleotidler tespit edildikten sonra, 3' ucundaki sonlandırıcı uzaklaştırılır ve analiz için bir sonraki döngüye geçilmektedir.

Son yıllarda geliştirilen yeni nesil DNA dizileme teknolojileri yüksek doğrulukla ve hızlı dizileme yapabilme kapasiteleri sayesinde moleküler markır geliştirme, transkriptom analizi ve mRNA profilinin belirlenmesi gibi birçok çalışmada kullanılabilir (Dönmez vd. 2015).

Yeni nesil DNA dizileme yöntemleri temel olarak enzimatik reaksiyonlar vasıtasıyla DNA'nın kesilmesi, elde edilen DNA parçalarının kütüphanelerin oluşturulması ve bu kütüphaneleri oluşturan DNA parçalarının çoğaltılmasına dayanmaktadır. Bu işlem sonrasında çoğaltmada kullanılan ve DNA'da fazlalık olarak bulunan bazı diziler uzaklaştırılarak DNA parçaları temizlenmektedir. Ardından da DNA'nın dizilenmesi gerçekleştirilmektedir. Dizileme sonrası elde edilen ham veriler kullanılan farklı programlar vasıtası ile işlenip yüksek kaliteli veri haline dönüştürülmekte ve bu veriler üzerinde amaçlanan çalışmalar yapılabilmektedir (Kızmaz vd. 2017).

Yeni nesil dizileme metotları temelde sentezleyerek dizileme, tek molekül dizileme ve ligasyonla dizileme olmak üzere üç ana gruba ayrılabilir (Dönmez vd.

2015). Sentez aracılığıyla dizilemede belli uzunluktaki DNA parçalarına adaptör dizileri bağlanır ve ardından bu diziler floresan veya kimyasal sinyali geliştirmek için çoğaltılmaktadır. Daha sonra örnekler dizilimin gerçekleştiği flow cell döngüsü için sabitlenmektedir. Bu işlem sonrasında gerçekleşen DNA dizilerinin DNA polimeraz vasıtasıyla uzatılması esnasında da belirlenen floresan ya da kimyasal sinyaller üzerinden dizilim belirlenmektedir. Sentez yoluyla dizileme tekniğini kullanan sistemler Illumina, Roche 454 GS (Pirodizileme), ve İon Torrent olarak sıralanabilmektedir (Egan vd 2012). Ligasyon yoluyla dizilemede ise floresan etiket ile işaretlenmiş olan değişen uzunlukta probalar kullanılmaktadır. DNA dizilerine problemlerin bağlanabileceği kısa diziler eklenmektedir. Sonrasında floresan ya da kimyasal görüntüleme hangi problemin bağlandığını tespit etmek için kullanılmaktadır. Bu işlem farklı prob setleri kullanılarak tekrarlanır nükleotid dizileri belirlenir. Ligasyon yoluyla dizilemeye örnek olarak verilebilecek en iyi sistem ABI/Solid'dir (Egan vd 2012).

3. nesil DNA dizilime (Tek molekül dizileme) teknolojilerinde ise, sekansı yapılacak olan DNA bölgesinin ya da komple bir DNA'nın, katı bir yüzeye sabitlenerek veya bir gözenekten hareketi sağlanarak, sentez aşamasında çeşitli teknolojiler vasıtasıyla görüntülenmesi, tanınması ve tekrardan okunarak uzama zincirlerine eklenmesi esasına göre çalışmaktadır (Dönmez vd. 2015). Bu teknolojiler arasında Helicos sequencer, Single Molecule Real-Time (SMRT) sequencer, Nanopore sıralanabilmektedir (Kızmaz vd. 2017).

Kullanılan yeni nesil dizileme teknolojileri; okuma uzunluğu, maliyeti, hata oranı gibi olumlu ve olumsuz özelliklere sahiptir. Dolayısıyla yapılacak çalışmalarda bu özellikler göz önünde bulundurularak kullanılacak sistemler tercih edilmelidir.

Nematolojide genom dizileme çalışmaları *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900) Dougherty, 1955 ile başlamıştır. Bilindiği üzere toprakta serbest yaşayan bir nematod türü olan *C. elegans* genom sekanslaması yapılan ilk hayvan ve ilk çok hücreli organizmadır. Ayrıca genom sekanslanması yapılan ilk nematod türü olmasından dolayı çalışma nematoloji açısından da çok önemli bir yere sahiptir. Bu özellikleriyle model bir organizma olan *C. elegans*'ın yaklaşık olarak 97 Mbp büyüklüğünde bir genoma sahip olduğu belirtilmiştir. Ayrıca genomda 19000'in üzerinde gen tespit edilmiştir (The *C. elegans* Sequencing Consortium 1998).

Başka bir çalışmada toprakta serbest olarak yaşayan *Caenorhabditis briggsae* (Dougherty & Nigon, 1949) Dougherty, 1955'nin genom analizi Whole Genome Shotgun tekniği kullanılarak yapılmışlar ve toplam genom büyüklüğü 104 Mbp olarak tespit edilmiştir. Belirlenen 19500 adet protein kodlayan genin büyük bir kısmının *C. elegans* genomunda tespit edilen genlerle benzer oldukları, yaklaşık olarak 800 adedinin ise *C. elegans* genomunda tespit edilmediği belirtilmiştir (Stein vd. 2003).

2.7. Bitki Paraziti Nematodların Tam Genom Dizilimleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

Tarımsal üretim açısından önemli birçok bitki paraziti nematod türünün genom dizilemesi gerçekleştirilmiştir.

Abad vd. (2008), Whole Genome Shotgun tekniği kullanılarak partenogenetik üremenin gözlemlendiği *M. incognita* genomunun dizileme çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışma *M. incognita* gibi partenogenetik özellikteki bir tür için yapılan ilk genom analizidir. Çalışma sonucunda genomun toplam uzunluğunun yaklaşık 86 Mbp olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada yaklaşık olarak 1000873 okuma yapılmıştır. 19212 protein kodlayan gen tespit edilmiş bunların genoma oranının ise % 25.3 olduğu belirlenmiştir. Bu genlerden 81 tanesinin *M. incognita*'ya özgü olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kodlama yapmayan DNA tekrarlarının ve transpozon özellikli DNA kısımlarının toplam genomun % 36'sını oluşturduğu da belirlenmiştir.

Opperman vd. (2008), önemli bir bitki paraziti olan ve fakültatif mayotik partenogenez olarak üreyebilen *M. hapla*'nın genom dizilim analizi Whole Genome Shotgun tekniği kullanılarak yapmışlardır. Toplam genom büyüklüğü 54 Mbp olarak belirlenmiştir. Yapılan 1.04 milyon okuma sonucunda 587 milyon baz çiftinin dizilimi elde edilmiştir. Ayrıca protein kodlayan gen sayısının 14420 olduğu *M. hapla* genomunun tamamlanmış en küçük nematod genomu olduğu belirtilmiştir. *M. hapla* genomu üzerinde yapılan haritalama çalışmaları sonucunda ise 16 kromozomunun bulunduğu tespit edilmiştir. Yapılan genom dizileme çalışmalarına ait sonuçların ise patojenitenin oluşumu ve evrimsel gelişim ile ilgili yapılacak çalışmalara kaynak oluşturacağı belirtilmiştir.

Kikuchi vd. (2011), özellikle Asya ve Avrupa'da çam ağaçlarında neden olduğu solgunluk ve ölümlerle epidemik bir nematod türü haline gelen *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhner, 1934) Nickle, 1970'un genom dizilemesini gerçekleştirmişlerdir. Roche 454 FLX ve Illumina Genome Analyser I (GAI) sistemleri kullanılarak yapılan dizileme çalışmaları sonucunda söz konusu organizmanın 74.6 Mb boyutunda bir genoma sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu genomun yaklaşık % 22'sinin tekrar bölgelerinden ve bu tekrar bölgelerinin de % 1.3'ünün transpozon elementlerden oluştuğu belirlenmiştir. *Bursaphelenchus xylophilus* genomunun toplam protein sayısının 18074 adet, gen yoğunluğunun ise 242.3 gen/Mb olduğu tespit edilmiştir.

Cotton vd. (2014) tarafından *Globodera pallida* Stone, 1973'nin tüm genom dizilemesi yapılmıştır. Ayrıca özellikle köke girişleri ve beslenme bölgelerinin oluşturulması gibi birçok yaşam dönemindeki salgısal veriler de elde edilmiştir. Genom dizileme çalışmalarında Roche 454 FLX ve Illumina HiSeq teknolojileri kullanılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda *G. pallida* genomunun 9 kromozomdan oluştuğu ve büyüklüğünün yaklaşık 100 Mb olduğu tespit edilmiştir. Genom üzerinde yapılan detaylı çalışmalarla toplam gen sayısının 16419 olduğu, genomdaki gen yoğunluğunun ise 132 gen/Mb olduğu belirlenmiştir.

Lunt vd. (2014), *Meloidogyne floridensis* Handoo vd, 2004 genomu Illumina HiSeq 2000 cihazı (100 bazlık paired-end) kullanılarak dizilemişlerdir. Bu çalışma sonucunda 116 M'luk bir okuma (100X coverage) ile 14.5 gb'lık ham veri elde edilmiş, sekanslama esnasında eklenen adaptörlerin uzaklaştırılması ve filtrelemeler sonucunda ise 70 Mb'lık okuma, toplamda da 13.2 Gb'lık işlenmiş veriye ulaşılmıştır. Bu çalışma kapsamında *M. floridensis*, *M. incognita* ve grup dışı (Grup 2) bir tür olan *M. hapla*'nın genomlarının evrimsel geçişini izlemek için gen ailelerinin filogenomik analizleri yapılmıştır. Bu analizler sonucunda söz konusu türlere özgü olarak belirlenen protein sayısı sırasıyla, 3177 (*M. floridensis*), 5301 (*M. incognita*) ve 3796 (*M. hapla*); her üç türde de ortak olarak tespit edilen protein sayısı ise 4108 adet olarak belirlenmiştir. Ayrıca

çalışma sonucunda kök-ur nematodlarında gözlemlenen varyasyonların özgün markör bölgeleri üzerinden çalışılmasının, türlerin içiçe girmiş kökenleri nedeniyle başarısız olabileceği ifade edilmiştir. Dolayısıyla çok türlü popülasyon genomünün, bu önemli tür kompleksinin hibrit çeşitliliğini ve adaptif varyasyonunu anlamak için önemli olduğu belirtilmiştir

Eves-van Den Akker vd. (2016) tarafından *Globodera rosthochiensis* (Wollenweber, 1923) Skarbilovich, 1959 genomu üzerinde yapılan dizileme çalışmaları, Illumina HiSeq 2000 sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında *G. rosthochiensis*'in Ro1 patotipinin ve diğer dört ayrı patotip (Ro2, Ro3, Ro4 ve Ro5) içerisindeki sekiz popülasyonun genom dizilemesi ile dört temel yaşam döneminden (kist, yumurta, infektif juvenil (J2) ve beslenmeye başladıktan 14 gün sonraki dişi) kopyalanmış transkriptom verileri elde edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda *G. rosthochiensis*'in toplam genom büyüklüğünün 95.9 Mb olduğu, toplam gen sayısının 14378, protein sayısının ise 14309 olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda bitki dayanıklılığının kırılmasında efektör genlerdeki çeşitliliğin önemli olduğu belirlenmiştir. Bu amaçla çalışmaya konu olan *G. rosthochiensis* genomunda belirlenen efektör genlerin yaklaşık % 3.5'lik kısmının ise yatay gen transferi temelli olduğu ve çeşitliliği önemli oranda arttırdığı tespit edilmiştir.

Zheng vd. (2016), yapmış oldukları çalışmayla hareketli endoparazit bir tür olan ve özellikle patateslerdeki zararlarıyla önemli bir bitki paraziti nematod türü haline gelen *Ditylenchus destructor* Thorne, 1945'un genomu ve parazitizmiyle ilgili detaylı bilgilere ulaşmışlardır. Dizileme çalışmasında Illumina HiSeq 2500 ve PacBio RSII sistemleri kullanılmış ve genom büyüklüğünün yaklaşık 112 Mbp olduğu tespit edilmiştir. Genomun yaklaşık 23.4 Mbp (% 19.5)'luk kısmının tekrarlardan oluştuğu, bunların da 6 Mbp (% 28)'lik kısmının ise bilinen tekrarlama tiplerinden teşekkül ettiği belirlenmiştir. Ayrıca genomda 13938 adet protein kodlayan gen tespit edilmiş, gen yoğunluğu ise 124 gen/Mb olarak belirlenmiştir. Konukçularıyla etkileşiminde önemli bir role sahip efektör moleküllerle ilgili yapılan çalışmalarda ise *D. destructor*'a ait 20 proteinin kist nematodlarına, 36 proteinin ise kök-ur nematodlarına homolog olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışma ile bitki paraziti nematodların biyolojisi, biyolojik kontrolü ve nematod ve bitkiler arasındaki etkileşimin daha iyi anlaşılabilmesinin mümkün olabileceği düşünülmektedir.

Eşeysiz üreyen kök-ur nematodu türlerinden *M. javanica*, *M. incognita*, ve *M. arenaria* genomları Roche 454 single-end ve Illumina HiSeq 2000 (101 bp paired-end) sistemleri ile dizilenmiş ve sırasıyla ortalama olarak 184, 236 ve 258 Mb boyutlarında ham veri elde edilmiştir. Bu veriler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda *M. incognita*'da 45351; *M. javanica*'da 98578 ve *M. arenaria*'da 103269 gen (protein kodlayan, mRNA, tRNA üretebilen) tespit edilmiştir. Ardından elde edilen bu veriler, eşeyli üreyen *M. hapla*'nın genom verileri ile karşılaştırılmıştır. İncelenen türlerin genom boyutlarının, *M. hapla* genomundan $\sim 3\pm 5$ kat daha büyük olmasından dolayı bu türlerin poliploid oldukları düşünülmüş ve yapılan çalışmalar sonucunda bu bilgi doğrulanmıştır. Ayrıca bu türlerin homolog gen kopyaları arasındaki ekspresyon ifadelerinde gözlemlenen farklılıklardan da allopoliploid yapıda oldukları yani bir türde birkaç genomu bir araya getirerek, oluşan yeni genetik kombinasyon ve heterosis yoluyla ana türlerin genetik yapılarını daha da geliştiren saldırgan fenotipler oldukları belirlenmiştir (Blanc-Mathieu vd. 2017).

Yeni tanımlanan bir patates kist nematodu türü olan *Globodera ellingtonae* Handoo vd., 2012'nin genom dizilimi ile ilgili yapılan çalışma sonucunda 119.1 Mb boyutunda bir genoma sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada Illumina MiSeq ve HiSeq ile Pacific Biosciences (PacBio) sistemleri kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda dizilimi yapılan genomdan 14104 adet protein tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmaya konu olan *G. ellingtonae* önemli karantina etmenleri olan *G. rosthochiensis* ve *G. pallida*'ya yakın akraba olması nedeniyle elde edilen verilerin ekonomik olarak önemli olan bu kist nematodlarının daha iyi anlaşılması ve mücadelesinde kolaylıklar sağlayabileceği düşünülmektedir (Phillips vd. 2017).

Sato vd. (2018), küresel açıdan önemli birçok tarımsal üründe zararlara neden olan *M. arenaria*'nın genom sekansı Whole Genome Shotgun tekniği kullanılarak gerçekleştirmişlerdir. Toplamda 754356 okuma yapılmış ve okumalar sonucu birleştirilen genomun 2224 contig içerdiği tespit edilmiştir. Genomun toplam uzunluğunun ise 284.05 Mb olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışma ile belirlenen *M. arenaria*'nın yüksek kaliteli uzun genom sekansının, sıklıkla zengin tekrar bölgelerinde ya da çok değişken genom bölgelerinde bulunan virülenslikle ilişkili genlerin tespit edilmesini kolaylaştırabileceği ifade edilmiştir.

Somvanshi vd. (2018), Güney Doğu Asya ülkelerinin ekonomilerinde önemli bir ürün olan pirinçte son dönemlerde büyük zararlanmalara neden olan *Meloidogyne graminicola* Golden & Birchfield, 1965 genomunda taslak bir dizileme çalışması gerçekleştirmişlerdir. Illumina GAIx sekanslama platformu kullanılan bu çalışma 150X coverage ve 100 bp paired end ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan ~130 milyon ham okuma sonucunda ~13 Gb'lık veri elde edilmiştir. Kullanılan çeşitli programlar vasıtasıyla da yüksek kaliteli ~120 milyon okuma ve ~12 Gb veri haline dönüştürülmüştür. Söz konusu zararlı genomunda tespit edilen 10196 protein kodlayan genden 5427 tanesinin diğer kök-ur nematodlarıyla yüksek benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışma, araştırmacıların söz konusu zararlının biyolojisini araştırmasına, anlamasına ve yönetimi için yeni stratejiler belirlemesine yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Masonbrink vd. (2019), *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952 genomu üzerinde çalışmalar yapmışlardır. Genom dizileme çalışmaları PacBio sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan ~2.4 Milyon okuma sonucunda toplam genomun 123 Mb uzunluğunda olduğu ve 29769 adet gen içerdiği tespit edilmiştir. Genomun %34'ü tekrar (repeats) bölgelerinden, 18.7 Mb'lık kısmı ise ardışık kopyalardan (tandem duplicates) oluşmaktadır. Ayrıca genomda çok sayıda efektör geni tespit edilmiştir. Bu genlerin birçoğunun ise transpozon elementler içerisinde yer aldığı belirlenmiştir. Çalışma kapsamında genom içerisinde çok sayıda yatay gen transferi (horizontal gene transfer) ürünü de (yaklaşık 151 gen) tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu çalışma ile elde edilen, toplam gen sayısının beşte birinden fazlasının tandem kopyalardan oluştuğu, transpozon elementlerde hareket eden virülenslik genleri ve şimdiye kadar diğer bitki paraziti nematodlarda bildirilmeyen yatay gen transferleri gibi bilgilerin özellikle soya fasulyesi kist nematodlarında virülentliğe yol açan mekanizmaların çeşitliliğini açığa vurarak konukçu ve parazit etkileşimi ile ilgili detaylı bilgiler sağladığını iddia etmişlerdir.

Muz, turuncgiller ve birçok süs bitkisinde önemli zararlara neden olan *Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949'in genomu üzerinde Roche 454 dizileme sistemi (30X coverage) kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda genom büyüklüğünün

yaklaşık 65 Mb olduğu tespit edilmiştir. Protein kodlayan gen sayısı ise 18564 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen bilgilerin *R. similis*'in parazitizimde kullandığı çok sayıda mekanizmanın detaylı bir şekilde incelenebilmesi için önemli olduğu düşünülmektedir (Mathew vd. 2019).

Susič vd. (2020), *M. ethiopica* grubu içerisinde bulunan önemli kök-ur nematodu türlerinden *Meloidogyne luci* Carneiro, Correa, Almeida, Gomes, Deimi, Castagnone-Sereno & Karssen, 2014 genomunun dizilenmesini yapmışlardır. Bu dizileme çalışmasında kısa okumalarla dizileme yapan Illumina HiSeq X 10 ve de uzun okumalarla dizileme yapan Pacific Biosciences Single Molecule Real-Time (SMRT) gibi iki sistem kullanılmıştır. Çalışma sonucunda iki dizileme sistemiyle sırasıyla 206071630 ve 3617847 adet okuma yapılmış, 30.9 Gb ve 42.4 Gb boyutlarında veri elde edilmiştir. *Meloidogyne luci*'nin genom boyutunun yaklaşık 209.16 Mb olduğu ve de %GC oranının ise 30.2 olduğu belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen verilerin *M. luci* ile ilgili sonrasında yapılacak çalışmalara temel teşkil edeceği belirtilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Domates fideleri

Bitkisel materyal olarak *Mi-1* geni taşıyan Seval F₁ ve hassas Tueza F₁ domates çeşitleri kullanılmıştır. Bu çeşitlere ait fideler, Multi Tohum Tar. San. Tic. A.Ş. (Antalya) tarafından sağlanmıştır.

3.1.2. *Meloidogyne incognita* popülasyonları

Çalışmada TÜBİTAK TOVAG-107O016 nolu proje ve diğer arazi çalışmaları kapsamında sebze üretimi yapılan seralardan elde edilen *M. incognita*'ya ait izolatlar ile seçilmiş virulent izolat kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. *Meloidogyne incognita* popülasyonlarının adı, dizileme kodu ve lokasyonları

Popülasyon Adı	Dizileme Kodu	Orijini	Referans
S6	N1	Serik/Antalya	Devran ve Söğüt (2009, 2011)
K7	N2	Kumluca/Antalya	Devran ve Söğüt (2009, 2011)
S6 virulent	N3	Serik/Antalya	Laboratuvar kültürü ¹
V6	N4	Kepez/Antalya	Laboratuvar kültürü ²
K5	N5	Kumluca/Antalya	Devran ve Söğüt (2009, 2011)
V9	N6	Kepez/Antalya	Laboratuvar kültürü ²

¹ S6 popülasyonundan laboratuvarında elde edilmiş *Mi-1* virulent kültür

² Çatalkaya ve Devran (2019) çalışmasında elde edilen ve laboratuvarında saf kültürü oluşturulan popülasyon

3.2. Metot

3.2.1. *Meloidogyne incognita* saf kültür popülasyonlarının oluşturulması

Nematoloji laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan, N1, N2, N4, N5 ve N6 popülasyonlarının iklim odasında muhafazaları sırasında başka kök-ur nematodu popülasyonlarıyla bulaşmış olma ihtimalini ortadan kaldırmak için tekrar saf kültürleri yapılmıştır. Bu amaçla avirüent kök-ur nematodları için hassas Tueza F₁, *Mi-1* virüent popülasyonlar için de dayanıklı Seval F₁ domates fideleri, otoklavlanarak sterilize edilmiş toprak karışımı içeren 250 ml'lik plastik saksılara şaşırtılmıştır. Stereo mikroskop altında bozulmadan (deforme olmadan) çıkartılmış yumurta paketlerinden her biri seçilerek 3 ayrı su dolu petri kabında yüzeysel olarak temizlenmiş ve ependorf tüpüne alınmıştır (Şekil 3.1.a). Elde edilen tek yumurta paketleri 4-5 gerçek yapraklı dönemdeki domates fidelerinin kök boğazı yanında oluşturulan derinliğe (2 cm) inokule edilmiştir (Şekil 3.1.b). İnokulasyon esnasında avirüent popülasyonlara ait tek yumurta paketleri Tueza F₁, *Mi-1* virüent popülasyonlara ait tek yumurta paketleri ise Seval F₁ domates fidelerine bulaştırılmıştır. Domates fideleri, 25°C'de % 65 nem ortamına sahip Nematoloji grubuna ait iklim odasında yetiştirilmişler ve inokulasyondan yaklaşık 2 ay sonra söküm işlemi gerçekleştirilmiştir. Bitki kökleri, su altında yıkanarak üzerlerindeki yumurta kümeleri toplanmıştır (Şekil 3.1.c).



Şekil 3.1. *Meloidogyne incognita* izolatlarının saf kültürlerinin elde edilmesi; **a)** yumurta kümesi yüzeyinin yıkanması; **b)** bitkilere inokulasyon; **c)** köklerde oluşan yumurta paketleri.

3.2.2. Seçilmiş *Mi-1* virüent *Meloidogyne incognita* popülasyonunun oluşturulması

Çalışmada *M. incognita*'ya ait N1 (S6) nolu izolat kullanılmıştır (Devran ve Söğüt 2009, 2011). Saf kültürü oluşturulan avirüent özellikteki *M. incognita*'ya ait N1 izolatından elde edilen yumurta kümelerinden modifiye edilmiş Baermann Funnel Yöntemi kullanılarak larvalar elde edilmiştir (Hooper 1986) (Şekil 3.2). Elde edilen yaklaşık 1000 larva 4-5 yapraklı dönemdeki dayanıklı Seval F₁ fidelerinin kök boğazı yanında oluşturulan 2 cm derinliğindeki deliklere inokule edilmiştir (Şekil 3.1.b). İnokulasyon esnasında söz konusu larvalar virüentlik kazanabilmeleri için dayanıklı Seval F₁ domates fidelerine bulaştırılmıştır. Bitkiler, 25°C'de % 65 nem koşullarına sahip iklim odasında yetiştirilmiş ve inokulasyondan yaklaşık 2 ay sonra sökülüştür. Bitki kökleri, su altında dikkatlice yıkandıktan sonra üzerlerindeki yumurta kümeleri toplanmıştır. Bu yumurta kümeleri tekrar dayanıklı Seval F₁ bitkilerine inokule edilmiş ve 2 ay sonra bitkiler sökülüştür.



Şekil 3.2. Yumurta kümelerinden larvaların elde edilmesi

3.2.3. *Meloidogyne incognita* popülasyonlarının moleküler tanımlanması

3.2.3.1. DNA izolasyonu

Saf kültürleri oluşturulan *M. incognita* N1, N2, N3, N4, N5 ve N6 izolatlarına ait larvalardan DNAeasy Tissue and Blood Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır.

3.2.3.2. PCR çalışması

N1, N2, N3, N4, N5 ve N6 izolatlarının *M. incognita* olduklarını doğrulamak için bu türe özgü MincF1/MincR1 primerleri (Devran vd. 2018) kullanılmıştır (Çizelge 3.2). PCR reaksiyonu, 0.4 µM primer, 2 mM MgCl₂, 2.5 µL DNA, 200 µM dNTP, 2.5 µL 10X PCR buffer ve 1 Unit Taq DNA polymerase (Fermentas, Vilnius, Lithuania) ve saf sudan oluşan toplam 25 µL hacimde yapılmıştır. PCR, Veriti 96-Well (Applied Biosystems) cihazında yürütülmüştür. PCR döngüsü; 94°C'de 3 dk, daha sonra 94°C'de 30 sn, 56°C'de 30 sn ve 72°C'de 1 dk toplam 35 döngü ve 72°C'de 10 dk 1 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri, % 2'lik agaroz jelde TAE buffer yardımıyla 110 voltta 1.5 saat yürütülmüş ve EtBr (0.5 µg/ml) ile boyandıktan sonra UV ışığı altında görüntüleme cihazı (İntas Gel İX Imager) yardımıyla fotoğraflanmıştır.

Çizelge 3.2. *Meloidogyne incognita* popülasyonlarının moleküler tanılanmasında kullanılan primerlerin dizisi ve beklenen bant uzunluğu

Primer adı	Primer Dizisi (5-3)	Band Uzunluğu (bp)	Referans
MincF1	AAAAACACGCGATAACAAAAA	150	Devran vd. (2018)
MincR1	ATTCAAAACTTGGGGGAAAAA		

3.2.4. Bitki materyallerinde *Mi-1* geninin moleküler analizi

3.2.4.1. DNA izolasyonu

Tueza F₁, Brown F₁ ve Seval F₁, çeşitlerine ait fidelerin genç yapraklarından Wizard Magnetic Kit (Promega, Madison, WI, USA) kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır.

3.2.4.2. PCR çalışması

Domates çeşitlerinin *Mi-1* geni taşıyıp-taşımadığı, Mi23F/Mi23R (Seah vd. 2007b) primer seti kullanılarak moleküler düzeyde kontrol edilmiştir (Çizelge 3.3). PCR çalışmasında homozigot dayanıklı Brown F₁ domates çeşidi pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. PCR reaksiyonu; 0.4 µM primer, 2 mM MgCl₂, 2.5 µL DNA, 200 µM dNTP, 2.5 µL 10X PCR buffer ve 1 Unit Taq DNA polymerase (Fermentas, Vilnius, Lithuania) ve saf sudan oluşan toplam 25 µL hacimde yapılmıştır. PCR döngüsü; 94°C'de 3 dk, daha sonra 94°C'de 30 sn, 56°C'de 30 sn ve 72°C'de 1 dk 35 döngü ve 72°C'de 10 dk 1 döngü olarak Veriti 96-Well cihazında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri, % 2'lik agaroz jelde TAE buffer yardımıyla 110 voltta 1.5 saat yürütülmüş ve EtBr (0.5 µg/ml) ile boyandıktan sonra UV ışığı altında jel görüntüleme cihazı yardımıyla fotoğraflanmıştır.

Çizelge 3.3. *Mi-1* geni analizinde kullanılan Mi23F/Mi23R primer dizisi ve beklenen bant uzunluğu

Primer adı	Primer Dizisi (5-3)	Band Uzunluğu (bp)	Referans
Mi23F	TGGAAAAATGTTGAATTTCTTTTG	~380bp ¹	Seah vd. (2007b)
Mi23R	GCATACTATATGGCTTGTTTACCC	~430bp ²	

¹ Homozigot dayanıklı çeşit (Brown F₁)

² Homozigot hassas çeşit (Tueza F₁)

^{1,2} Heterozigot dayanıklı çeşit (Seval F₁)

3.2.5. *Meloidogyne incognita* popülasyonlarından izole edilen DNA'ların miktarlarının ölçümü

3.2.5.1. Lambda (λ) DNA

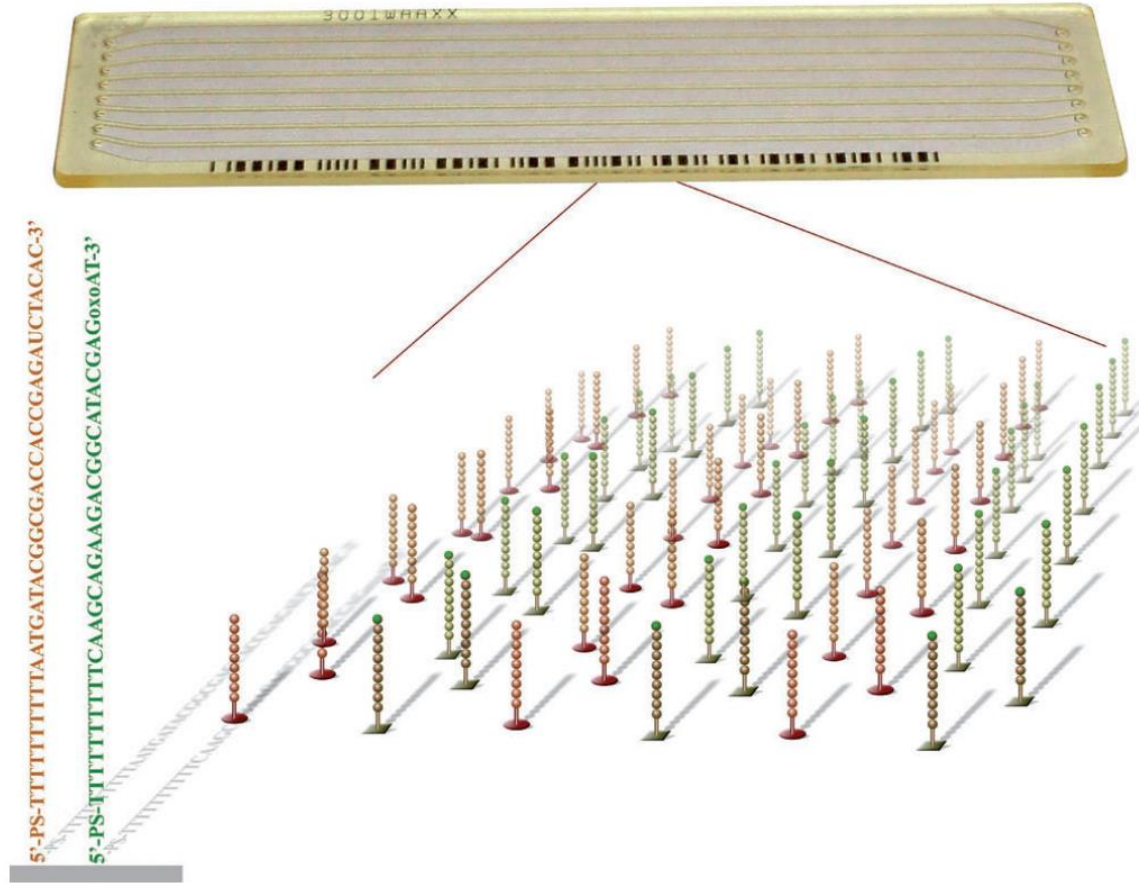
Meloidogyne incognita izolatlarından elde edilen DNA'lar Lambda (λ) DNA (SD0011, ThermoFisher Scientific) kullanılarak miktarları belirlenmiştir. Popülasyonlardan elde edilen DNA'lar ve ölçüm için hazırlanan Lambda (λ) DNA'lar %2'lik agaroz jelde TAE buffer yardımıyla 110 voltta yaklaşık 45 dakika boyunca yürütülmüş ve UV ışığı altında görüntülenmiştir.

3.2.5.2. PicoGreen tekniği

Meloidogyne incognita izolatlarından elde edilen DNA'ların dizileme için uygun kalitede olup olmadıkları çift zincirli DNA'ya bağlanabilme özelliğindeki floresan bir boya olan PicoGreen kullanılarak, dizileme hizmeti alınan firma tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. *Meloidogyne incognita* popülasyonlarının tüm genom dizimleri

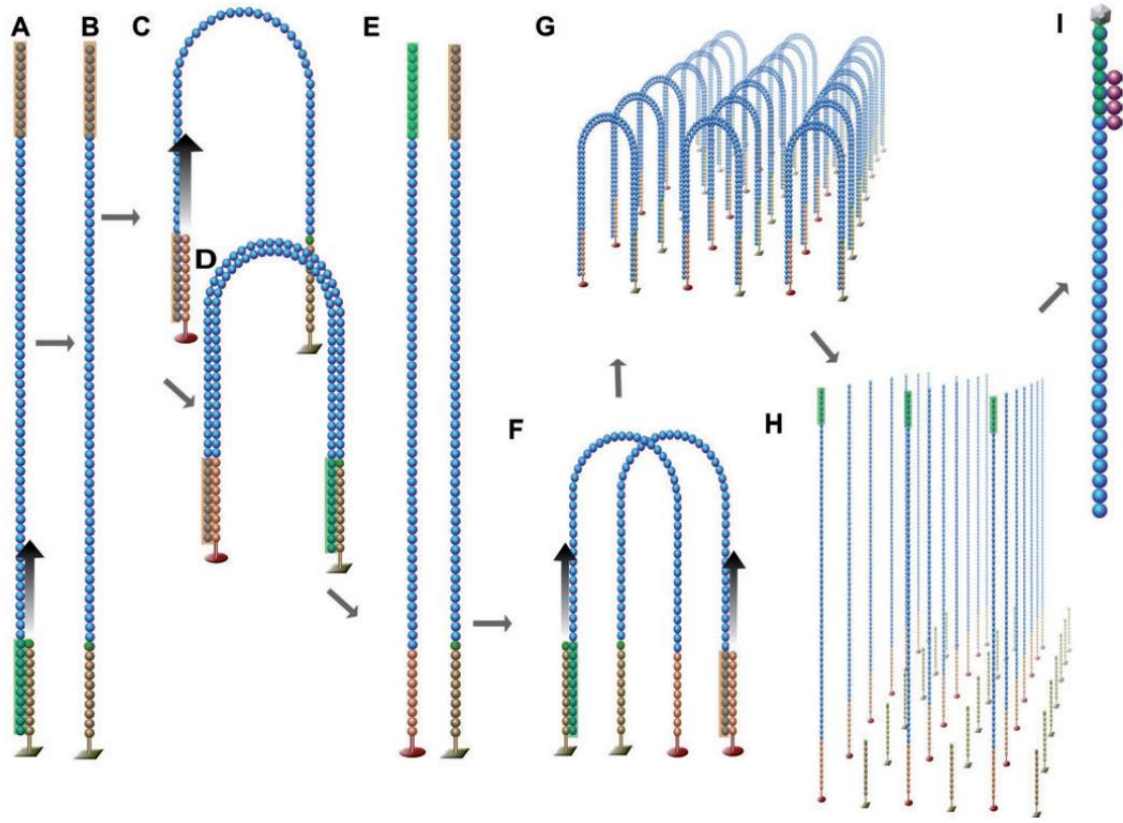
Meloidogyne incognita izolatlarından elde edilen ve kontrolleri yapılan genomik DNA'lar dizilim (sekans) analiz çalışmaları için Omega Bioservices (Norcross, Georgia, ABD) firmasına gönderilmiştir. Firma, Illumina HiSeq X 10 (Illumina Inc., ABD) cihazı kullanarak çift yönlü okuma (PE 2X150 bp) ile dizilim analizlerini gerçekleştirmiştir. Dizileme işlemleri "Flow cell" (Illumina Inc., ABD) adı verilen özel bir yüzeyde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). Flow cell, üzerinde DNA parçalarının bağlandığı ve adaptör oligonükleotidlerin yer aldığı, silika yapıda 8 şerite (lane) sahiptir. Görüntüleme esnasında her bir şerit 3 kolona (swath) ve her bir kolon da 8 hücreye (tile) ayrılmaktadır. Dizileme işlemleri bu hücreler içerisinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. Sekiz kanallı Flow cell ve yüzey görüntüsü (Lakdawalla vd. 2013)

3.2.6.1. DNA parçalarının kümeleştirilmesi

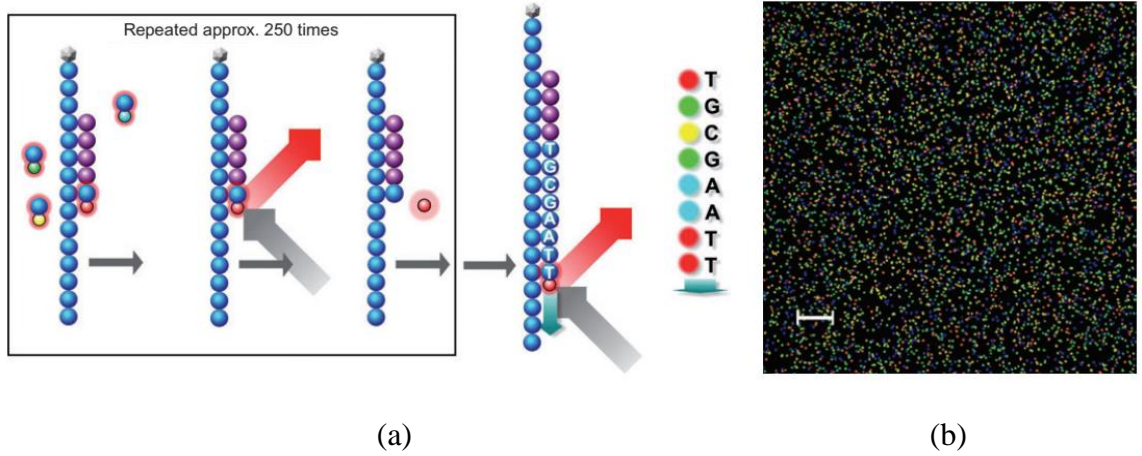
Dizileme işlemine başlamadan önce, DNA kütüphanesinin daha verimli bir okuma elde edilmesi için çeşitli adaptörlere bağlanarak kümeleştirilmesi yapılmıştır. Kümeleştirme reaksiyonlarının ilk aşamasında DNA parçalarının flow cell aparatının yüzeyinde bulunan adaptör dizileri vasıtasıyla sabitlenmesi yapılmıştır. Bu sabitleme işlemi sonrasında söz konusu tek sarmal DNA parçaları izotermal köprü amplifikasyon reaksiyonları ile çoğaltılmıştır. Yüze sabitlenen DNA'lar ilk olarak en yakındaki adaptöre bağlanarak bir "loop" yapısı oluşturmuştur. Ardından DNA polimeraz bu parçaları kopyalayarak çift sarmal yapıda DNA köprüleri oluşturmuştur. Ardından elde edilen bu çift sarmal köprü yapısı birbirinden ayrılarak 2 adet tek sarmal DNA elde edilmiştir. Çalışmanın sonraki döngülerinde elde edilen bu 2 adet tek sarmal DNA parçası tekrar "loop" yapısı oluşturarak çoğaltmaya devam edilmiştir. Amplifikasyon sonrası elde edilen çift sarmal DNA köprüleri enzimatik reaksiyonlar vasıtasıyla tek sarmal hale dönüştürülmüştür. 5' ucu flow cell yüzeyine bağlı tek sarmal DNA parçalarının bağlı olmayan diğer uçlarındaki adaptör dizilere ise dizileme primerleri bağlanarak, hedef kütüphane dizilemeye hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Klonal kümelerin üretilmesi: **a)** flow cell yüzeyine tutunma; **b)** orijinal DNA parçasının denatürasyonu; **c)** loop yapısı oluşumu; **d)** köprü amplifikasyonu; **e)** çift sarmal DNA'ların denatürasyonu; **f-g-h)** sıkı bir küme oluşana kadar amplifikasyonun devamı; **i)** DNA primer ilavesi (Lakdawalla vd. 2013)

3.2.6.2. DNA parçalarının dizilenmesi

Kümeleştirilip çoğaltılan DNA parçaları, Illumina HiSeq X 10 sistemi vasıtasıyla dizilenmiştir. Her bir okuma döngüsünde bir bazın saptanması şeklinde devam eden sentezleyerek dizileme (SBS-sequencing by synthesis) teknolojisi kullanılmıştır. Sistem hem düz hem de ters yönde (PE, Paired-End, 2X150 bp) iki defa okuma gerçekleştirerek daha doğru sonuçların alınması sağlanmıştır. Her bir döngüde dört farklı floresan boya ile işaretli ve 3' ucu bloke edilmiş deoksinükleozit trifosfatlar (dNTPs), primerler ve DNA polimeraz flow cell kanalına eklenmiştir. Döngülerde dNTP'nin nükleik asit zincirine bağlanmasından sonra polimerizasyon durarak ve yayılan floresan vasıtasıyla o noktadaki bazın görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5a). Bir sonraki döngüye geçmeden önce ise yıkama basamağı ile flow cell kanalındaki tüm kalıntılar uzaklaştırılmıştır. Sonraki döngülerde bu şekilde tekrar etmekte ve her bir döngüde bir bazın okunması gerçekleştirilmiştir. Bu döngüler DNA parçalarının büyüklüğüne göre devam ederek ve dizileme işlemi sonucunda elde edilen görüntüler birleştirilerek üzerinde çalışılan DNA parçalarının nükleotid dizileri belirlenmiştir (Şekil 3.5b).



Şekil 3.5. Kümelerin dizilenmesi: **a)** flow cell yüzeylerine bağlı kümelerin floresan etiketli nükleotitlerle dizilenmesi; **b)** flow cell'in görüntülenmesi ve görüntülenme haritası (ölçek çubuğu 10 μm) (Lakdawalla vd. 2013)

3.2.6.3. Biyoinformatik analizler

Dizileme işlemi sonucu elde edilen verilerin analizlerinde çeşitli programlar kullanılmıştır. Bu programlar hem nükleotid dizilerinin birleştirilmesi hem de filtreleme işlemleri için kullanılmıştır. Elde edilen veriler değerlendirmeye alınan popülasyonların virüslük durumlarına göre değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda virüslüğe neden olabilecek bölgelerin ya da farklılıkların taraması yapılmıştır.

Bu çalışmalar kapsamında yapılan dizileme işlemlerinin verileri ham (Raw) olarak elde edilmiştir. Ardından bu veriler içerisindeki işe yaramayan kısımlar belirlenmiştir. Dolayısıyla çalışmada kullanılacak veriler ayıklanıp gereksiz olanlar uzaklaştırılmıştır. Bu amaçla Illumina'ya ait adaptör sekansları ve diğer kirleticiler Trimmomatic (version 0.39), BBMap tool kit (versiyon 0.7.17) ve Sickle (versiyon 1.330) programları kullanılarak ham verilerden uzaklaştırılmıştır (Q score < 20 ve Okuma uzunluğu < 40bp) (Bolger vd. 2014; BBTools User Guide 2019; Sickle 2019). Ardından gerekli analiz işlemleri yapılabilmektedir. Bu analizler öncesinde ise FastQC gibi araçlar kullanılarak verilerin kalite değerlendirilmesi (Quality Score) yapılmıştır (FastQC 2019).

Kalite değerlendirilmesinin ardından filtrelenmiş ve doğrulukları tespit edilmiş olan dizilim verilerinin Burrows-Wheeler Alignment tool (versiyon 0.7.17) (BWA-MEM) programı kullanılarak *Meloidogyne incognita*'ya ait referans genomuna (*Meloidogyne incognita_V3*, GenBank assembly accession: GCA_900182535.1) hizalanması yapılmıştır (Li ve Durbin, 2009; BWA 2019; *Meloidogyne incognita* (Southern root-knot nematode) representative genome 2017). Ardından referans genom baz alınarak *Mi-1* virulent ve avirulent *M. incognita* popülasyonlarına ait genom dizilimleri arasındaki farklılıklar [(SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ve INDEL (Insertion ve Deletion)] GATK 4.1.6.0 iş akışı ile BCFtools programı kullanılarak tespit edilmiştir (BCFtools 2019; GATK 2020). Elde edilen farklılıkların konumlarının ve işlevlerinin belirlenmesi amacıyla Ensemble-VEP programı kullanılarak gen düzeyinde

(kodlanan bölgeler) anotasyonları yapılmıştır (Ensemble-VEP 2020). Bu çalışmalar sonucunda anotasyon verileri elde edilen farklılıklar karşılaştırılmıştır.

Elde edilen varyant listesinden daha anlamlı farklılıklara ulaşabilmek için 2 farklı filtreleme işlemi daha yapılmıştır. Bu filtrelemelerin ilkinde N1, N2 ve N4 örneklerinin üçünde de ortak olarak bulunan farklılıklar belirlenerek bu farklılıklar tüm bu örneklerden çıkarılmış, kalan farklılıklar arasında karşılaştırma yapılmıştır. N3 örneğinin dizileme çalışmasından kaynaklanmış olduğu düşünülen nedenlerden dolayı diğer örneklerle benzerliğinin çok düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle analizlerin bu aşamasına dâhil edilmemiştir. Bu şekilde ortak farklılıkların belirlenmesi ve filtrelenmesi yoluyla, referans genomla dizilenen türler arasındaki büyük farklılıkların ortadan kaldırılması amaçlanmıştır. Sonradan bu üç örnekte ortak olarak bulunan farklılıklar, N3 örneğinden de çıkarılmıştır.

Tüm örneklerde ortak olarak tespit edilen farklılıkların filtrelenmesinin ardından geriye kalan farklılıklar okuma derinliklerine (DP) göre ikinci bir filtrelmeye tabi tutulmuştur. Böylece, örneklerin ortalama okuma derinlik değerleri 10X civarı gibi düşük bir değerde olsa da, kaliteli okunmuş farklılıkların filtrelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla verilere sırasıyla $DP \geq 5$, $DP \geq 10$, $DP \geq 15$, $DP \geq 20$, $DP \geq 30$, $DP \geq 40$, $DP \geq 50$ filtreleri uygulanmış ve her bir örnek için toplam farklılık sayıları ve anote edilmiş farklılıklar elde edilmiştir. DP değeri 20 ve 20'den büyük olan farklılıklar daha güvenilir varyant listesi olarak kabul edilmiş ve böylelikle okuma derinliği açısından da farklılıklar değerlendirilmiştir. Ensemble-VEP programı kullanılarak anotasyonu yapılan bu farklılıkların *Mi-1* virüent ve avirüent popülasyonlar arasındaki karşılaştırılmaları da yapılmıştır (Ensemble-VEP 2020). Son olarak SNP veya INDEL bölgelerinin görüntülenmesinde Integrative Genomics Viewer (IGV) programı kullanılmıştır (Robinson vd. 2011).

Bu çalışmalar sonucunda referans genom ile çalışmamıza konu olan *Mi-1* virüent ve avirüent popülasyonlar arasında çok sayıda farklılık belirlenmiştir. Bu nedenle popülasyonlar arasındaki farklılıkları daha az düzeye düşürmek amacıyla N1 örneğinin referans genom olarak kullanılması üzerine ön çalışmalar yapılmıştır. Bunun için N1 örneğine ait okuma verisi kullanılarak genom montajı (Genome Assembly) gerçekleştirilmiştir. Ancak, bu çalışmaların *M. incognita* referans genomuyla (GCA_900182535.1) yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre ek bir bilgi vermediği ve bir avantaj sağlamadığı görülmüştür. O nedenle değerlendirmelerde *M. incognita* referans genomu ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar kullanılmıştır.

Nematod örneklerinde tespit edilen farklılıklar gen düzeyinde incelenmiş ve her örnek için farklılık tespit edilen gen sayıları belirlenmiştir. Bu genlerin örneklerdeki ortaklığına göre analizleri yapılmıştır.

Dizileme çalışmalarından elde edilen ham veriler biyoinformatik alanında çalışan uzmanlar (University of Worcester ve University of Exeter) tarafından farklı bakış açısı ile ikinci kez analizleri yapılmıştır. Bu analizler sonucunda tespit edilen farklılıkların görüntülenmesi Integrative Genomics Viewer (IGV) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Robinson vd. 2011).

3.2.7. Virüenslikle ilgili moleküler markörlerin geliştirilmesi

Mi-1 virüent ve avirüent *M. incognita* popülasyonlarında yapılan genom dizileme ve biyoinformatik çalışmaları sonucunda bu popülasyonlar arasında oldukça fazla sayıda farklılık (SNP'ler ve INDEL'ler) belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. *Meloidogyne incognita* Popülasyonlarının Saf Kültürlerinin Oluşturulması

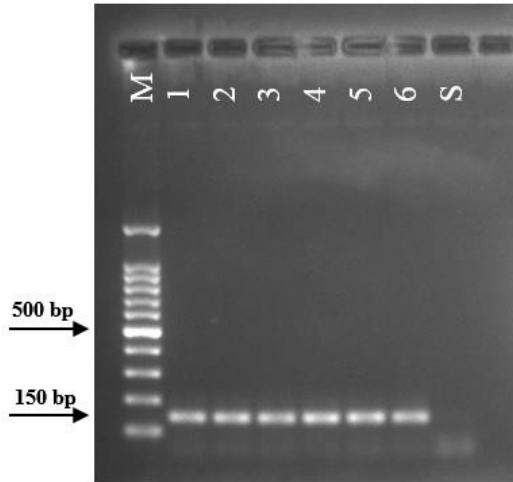
Saf kültürleri elde edilmiş olan kök-ur nematodu popülasyonlarından *Mi-1* virüent N4 ve N6'nın Seval F₁ domates fidelerinde, avirüent özellikteki N1, N2 ve N5'in ise Tueza F₁ domates fidelerinde tez çalışma süresince sürekli devam ettirilmiş ve moleküler tanımlama ve dizileme çalışmaları için yeterli miktarda çoğaltma işlemi sağlanmıştır.

4.2. Seçilmiş *Mi-1* virüent *Meloidogyne incognita* İzolatının Oluşturulması

Seçilmiş *Mi-1* virüent özellikte bir popülasyon elde edebilmek amacıyla avirüent *M. incognita* N1 popülasyonuna ait larvalar dayanıklı Seval F₁ domates fidelerine inokule edilmiş ve bu inokulasyon işlemi 5 (beş) kez tekrarlanmıştır. Böylelikle avirüent S6 popülasyonundan seçilmiş virüent bir izolat elde edilmiştir ve "N3" olarak adlandırılmıştır.

4.3. *Meloidogyne incognita* Popülasyonlarının PCR ile Doğrulanması

Saf kültürleri oluşturulan N1, N2, N3, N4, N5 ve N6 izolatlarının *M. incognita* oldukları bu türe özgü MincF1/MincR1 primerleri (Devran vd. 2018) kullanılarak doğrulanmıştır. Bu primer çifti *M. incognita*'nın tüm örneklerinde beklenen 150 bp'da PCR ürünü vermiştir (Şekil 4.1).

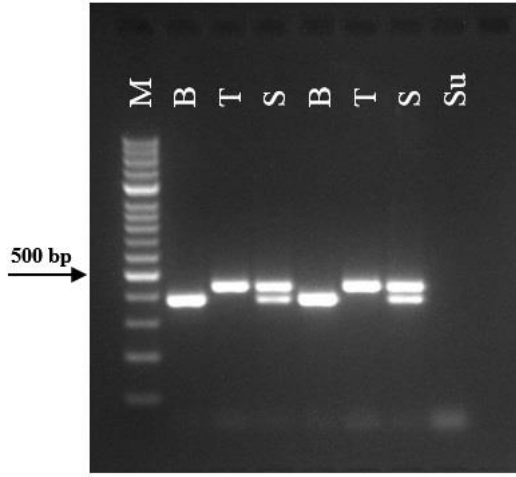


Şekil 4. 1. MincF1/MincR1 primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünleri: (M: Moleküler markör (100 bp DNA ladder, GeneAll); 1:N1; 2:N2; 3:N3; 4:N4; 5:N5; 6:N6; S:Su)

4.4. Bitki Materyallerindeki *Mi-1* Geninin PCR ile Belirlenmesi

Meloidogyne incognita popülasyonlarını çoğaltmak için dayanıklı Seval F₁ ve hassas Tueza F₁ domates çeşitleri kullanılmıştır. Domates çeşitlerinin *Mi-1* geni taşıyıp taşımadıkları Mi23F/Mi23R primerleri (Seah vd 2007b) kullanılarak kontrol edilmiştir. Brownly F₁ çeşiti PCR çalışmalarında kontrol örneği olarak kullanılmıştır.

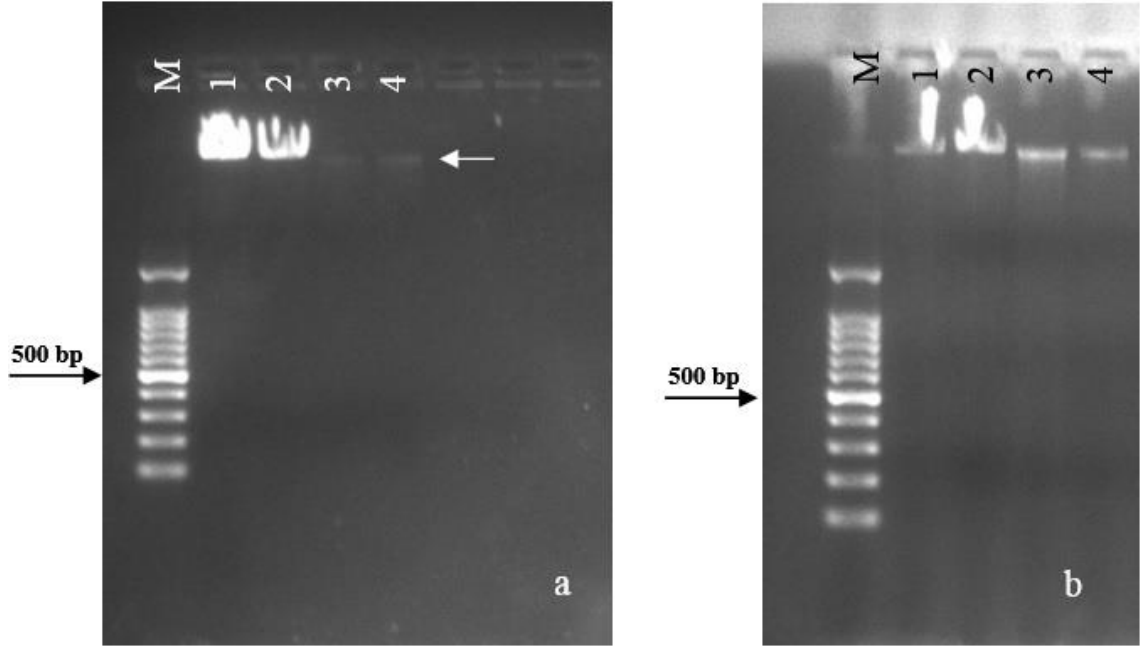
Domates çeşitlerine ait taze yapraklardan izole edilen DNA'lar kullanılarak yapılan PCR sonucunda beklendiği üzere hassas çeşit Tueza F₁'de 430 bp DNA bandı, homozigot dayanıklı Brownly F₁ çeşidinde ise 380 bp uzunluğunda DNA bandı ve heterozigot dayanıklı Seval F₁ çeşidin de ise 380 ve 430 bp uzunluğunda DNA bandları elde edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. Mi23F/Mi23R primerleri kullanılarak elde edilen PCR ürünleri; [M: Moleküler markör (100 bp DNA ladder, GeneAll); B: Brownly F₁ (Homozigot dayanıklı), T: Tueza F₁ (Homozigot duyarlı), S: Seval F₁ (Heterozigot dayanıklı)]

4.5. *Meloidogyne incognita* Popülasyonlarından Elde Edilen DNA'ların Lambda (λ) DNA ile Miktar Ölçümü

Çalışmamızda kullanılan *M. incognita*'lara ait yaklaşık 1000 ve 10000 bireyden izole edilen DNA'ların miktarının ölçümü Lambda (λ) DNA (SD0011, Thermo Fisher Scientific) kullanılarak agaroz jelde yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda 1000 bireyden elde edilen DNA'ların daha zayıf bant oluşturdukları ve istenilen miktarda olmadıkları, 10000 bireyden elde edilen DNA'ların ise daha parlak, istenilen seviyede ve sekanslama için yeterli miktarda oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4. 3. *Meloidogyne incognita* DNA'larının miktarının Lambda (λ) DNA ile ölçülmesi: a) \approx 1000 bireyden elde edilen DNA'ların ölçümü; b) \approx 10000 bireyden elde edilen DNA'ların ölçümü [M: Moleküler markör (100 bp DNA ladder, GeneAll); 1: 1 μ l λ DNA (0.3 μ g); 2: 0,5

4.6. *Meloidogyne incognita* Popülasyonlarından İzole Edilen DNA'ların PicoGreen Tekniği ile Miktar ve Kalite Ölçümü

Miktar ölçümü Lambda (λ) DNA kullanılarak yapılan DNA'ların sekanslama için yeterli kalitede olup olmadığı dizileme hizmeti alımı yapılan firmada PicoGreen tekniği kullanılarak yapılmış ve her bir popülasyon için yaklaşık 1000 larvadan elde edilen DNA'ların sekanslama için yeterli olmadığı (<50 ng/ μ l) fakat 10000 larvadan elde edilen DNA'ların miktarının ve kalitesinin dizileme için yeterli olduğu (>50 ng/ μ l) tespit edilmiştir.

4.7. *Meloidogyne incognita* Popülasyonlarının Tüm Genom Dizilim Analizleri

4.7.1. *Meloidogyne incognita* referans genomunun (GCA_900182535.1) kullanılması

Çalışmamızda *Mi-1* genine karşı farklı fenotipik özellikler ortaya koyan *Meloidogyne incognita* izolatlarının tanımlanabilmesi amacıyla genom dizilim analizleri Illumina HiSeq X 10 (Illumina, USA) cihazı kullanılarak Paired-End (PE 2X150 bp) şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Meloidogyne incognita'ya ait 6 örnekle yapılan dizileme çalışmalarında 4 örnekte dizileme işlemleri başarılı olmuş ve veriler elde edilmiştir. Fakat 2 örnekte ise (avirüent N5 ve *Mi-1* virüent N6 popülasyonları) elde edilen dizilim sonuçları biyoinformatik analizler için yeterli kalitede olmaması nedeniyle analizlere alınmamıştır. Böylece sonraki çalışmalar ve biyoinformatik analizler *M. incognita*'ya ait avirüent (N1 ve N2),

seçilmiş *Mi-1* virulent (N3) ve doğal *Mi-1* virulent (N4) olmak üzere 4 örnek üzerinden gerçekleştirilmiştir. Bu dört izolat üzerinde yapılan ilk dizileme çalışmasında tüm izolatlar (4 örnek), ikinci çalışmada ise ilk çalışmada yeterli veri elde edilemeyen sadece N3 örneği ile çalışılmıştır. Dizileme çalışmalarının N3 popülasyonunun iki defa yapılmasının nedeni N3 popülasyonunun dizileme hata oranının diğer popülasyonlardan elde edilen hata oranlarından çok daha yüksek olmasıdır. Çalışma sonucunda N1’de hata oranı 0.48; N2’de 0.47 ve N4’de 0.49 iken N3’de 6.84 olarak tespit edilmiştir.

Yeterli dizilim verisi elde edilen bu 4 örneğe ait verilere FastQC programı kullanılarak analizler yapılmıştır. Bu analizler kapsamında baz düzeyinde dizilim kaliteleri, okuma kalite değerlerinin tüm genomu dağılımı, baz ve genom düzeyinde GC içeriği, okunamayan dizilim içeriği, ve dizilimdeki tekrar düzeyi hakkında kalite raporu oluşturularak problemleri olabilecek kısımlar hakkında detaylı bir değerlendirme yapılmıştır. Toplam dizilim sayısı ve ortalama sekans uzunluğunun çarpımının genom boyutuna bölünmesiyle elde edilen kapsam (coverage) değeri ise 30X coverage olarak tespit edilmiştir. Tüm bu değerlendirmelere göre Paired-End olarak gerçekleştirilen ve çalışmaya konu olan dört popülasyonda okuma çalışmaları sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.1’de belirtilmiştir.

Avirulent özellikteki N1 izolatında yapılan dizileme çalışması sonucunda toplamda 49818360 okuma gerçekleştirilmiş ve yaklaşık 18.6 GB veri elde edilmiştir. Bu okuma için kapsam (coverage) değeri 40.83 olarak hesaplanmıştır. Popülasyondaki GC yüzdesi % 48 ve tekrar yüzdesi % 13.1 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Avirulent özellikteki N2 izolatında yapılan dizileme çalışması sonucunda toplamda 39563170 okuma gerçekleştirilmiştir. Bu okuma için 14.8 GB veri elde edilmiştir. Bu okuma için kapsam (coverage) değeri 32.42 olarak hesaplanmıştır. İzolattaki GC yüzdesi % 35 ve tekrar yüzdesi % 17.3 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

Mi-1 virulent özellikteki N3 izolatı ile iki kez dizileme yapılmıştır. Birinci dizileme sonucunda 46417454 okuma, ikinci dizileme sonucunda 112831126 okuma elde edilmiştir. İki okuma sonucunda toplam 159248580 okuma gerçekleştirilmiş ve yaklaşık 58 GB veri elde edilmiştir. N3 popülasyonu ile ilgili yapılan ilk çalışma için kapsam (coverage) değeri 38.04, ikinci çalışma için 92.48 ve iki çalışmanın kapsam (coverage) değeri ortalaması 65.26 olarak hesaplanmıştır. İzolattaki ortalama GC yüzdesi % 41 ve ortalama tekrar yüzdesi % 21 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Mi-1 virulent özellikteki N4 izolatında yapılan dizileme çalışması sonucunda toplam 33142412 okuma gerçekleştirilmiş ve yaklaşık 12.4 GB veri elde edilmiştir. Bu okuma için kapsam (coverage) değeri 27.16 olarak hesaplanmıştır. İzolattaki GC yüzdesi % 36 ve tekrar yüzdesi % 15.7 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4. 1. Dizilim analizleri ile ilgili okuma verileri

Popülasyon Adı	GC (%)	Duplicate (Tekrar Oranı) (%)	Unique Reads (Tekrarsız Okumalar)	Duplicate Reads (Tekrarlı Okumalar)	Toplam	Ham Okuma Boyutları (GB)	Coverage (Kapsam)
N1 ¹	48	13.1	43275620	6542740	49818360	18.6	40.83
N2 ¹	35	17.3	32698411	6864759	39563170	14.8	32.42
N3 ¹	41	17.7	38177929	8239525	46417454	17.2	38.04
N3 ²	41	24.3	85375657	27455469	112831126	40.8	92.48
N4 ¹	36	15.7	27937913	5204499	33142412	12.4	27.16

¹İlk yapılan analiz²İkinci (tekrar) yapılan analiz

4.7.2. “De Novo Assembly” Çalışmaları

Meloidogyne incognita referans genomu (GCA_900182535.1) kullanılarak yapılan dizilim analizlerinde avirüent ve virüent popülasyonlar arasında SNP ve INDEL sayıları oldukça fazla bulunmuştur. Bu nedenle N1 popülasyonuna ait okuma verileri referans genom olarak seçilmiş ve diğer örnekler (N2, N3 ve N4) buna haritalanmıştır. Ancak bu çalışmalar sonucunda elde edilen sonuçların *M. incognita* referans genomuyla (GCA_900182535.1) yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre SNP ve INDEL sayılarını azaltmak için ek bir bilgi vermediği ve bir avantaj sağlamadığı görülmüştür.

4.8. *Mi-1* Virüent ve Avirüent *Meloidogyne incognita* İzolatları Arasındaki Genom Dizilim Farklılıklarının Belirlenmesi

4.8.1. Örneklerin *Meloidogyne incognita* referans genomu (GCA_900182535.1) ile farklılıklarının belirlenmesi

Dizileme işlemi sonucunda elde edilen verilerin *M. incognita*'ya ait referans genomuna (*Meloidogyne incognita_V3*, GenBank assembly accession: GCA_900182535.1) hizalanması yapılmıştır. Bu işlem sonucunda referans genom ile çalışmada kullanılan *Mi-1* virüent ve avirüent *M. incognita* popülasyonlarının genom dizilimleri arasındaki farklılıklar [(SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ve INDEL (Insertion ve Deletion)] belirlenmiştir. Elde edilen farklılıkların konumlarının ve işlevlerinin belirlenmesi amacıyla Ensemble-VEP programı kullanılarak gen düzeyinde (kodlanan bölgeler özelinde) anotasyonları yapılmıştır (Ensemble-VEP 2020). Bu çalışmalar sonucunda anotasyon verileri elde edilen farklılıklar karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4. 2. Örneklerin *Meloidogyne incognita* referans genomu (GCA_900182535.1) kullanılarak filtrelenmiş ve anotasyonu gerçekleştirilmiş varyant sayıları

Popülasyon Adı	SNP Sayısı	INDEL Sayısı	Toplam	Anote Edilmiş Toplam
N1	229594	113142	342736	68331
N2	221653	124671	346324	65889
N3 ¹	254709	229333	484042	224900
N3 ²	242186	248757	490943	220032
N4	211051	118859	329910	63343

Bu çalışmalar sonucunda dört popülasyonda tespit edilen farklılıkların 642495 adedinin anotasyonu yapılmıştır (Çizelge 4.2). Sonrasında anotasyon verileri elde edilen bu farklılıklar arasında karşılaştırılmalar yapılarak ilişkilendirilmeye çalışılmıştır.

Referans genom baz alınarak yapılan değerlendirmeler sonucunda avirüent N1 ve seçilmiş virüent N3¹ karşılaştırıldığında; sadece N1’de bulunan farklılık sayısı 66901; sadece N3¹’de bulunan farklılık sayısı 223472; N1 ve N3¹’de ortak olarak bulunan farklılık sayısı ise 1431’dir.

N3 örneğinin ikinci kez yapılan okuma sonucu elde edilen verilere göre analizler yapılmıştır. Referans genom baz alınarak yapılan değerlendirmeler sonucunda avirüent N1 ve seçilmiş virüent N3² karşılaştırıldığında; sadece N1’de bulunan farklılık sayısı 67009; sadece N3²’de bulunan farklılık sayısı 218709; N1 ve N3²’de ortak olarak bulunan farklılık sayısı ise 1323’tür.

N3 örneğinin ilk okuma sonucuna göre; avirüent popülasyonlar (N1 ve N2) ile *Mi-1* virüent popülasyonlar (N3¹ ve N4) arasında; N1 ve N2’de bulunan ortak farklılık sayısı 52091; N3¹ ve N4’te bulunan ortak farklılık sayısı 1398; N1-N2 ve N3¹-N4’te ortak bulunan farklılık sayısı 1102; sadece N1-N2’de bulunan farklılık sayısı 50989; sadece N3¹-N4’te bulunan farklılık sayısı ise 296’dır.

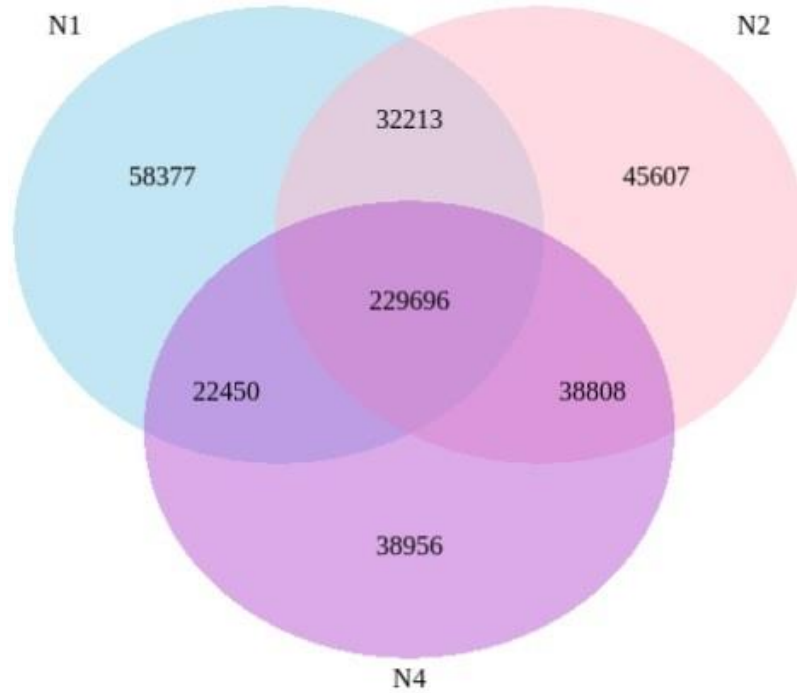
N3 örneğinin ikinci okuma sonucuna göre; avirüent popülasyonlar (N1 ve N2) ile *Mi-1* virüent popülasyonlar (N3² ve N4) arasında; N3² ve N4’te bulunan ortak farklılık sayısı 1299; N1-N2 ve N3²-N4’te ortak bulunan farklılık sayısı 1009; sadece N1-N2’de bulunan farklılık sayısı 51082; sadece N3²-N4’te bulunan farklılık sayısı ise 290’dır.

Avirüent popülasyonlar (N1-N2) ile doğal *Mi-1* virüent popülasyon (N4) arasında; N1-N2 ve N4’te ortak bulunan farklılık sayısı 45845; sadece N1-N2’de bulunan farklılık sayısı 6252; sadece N4’te bulunan farklılık sayısı ise 17512’dir. Çalışmanın bu kısmında sadece *Mi-1* virüent popülasyonlarda tespit edilen farklılıkların kök-ur nematodlarında gözlemlenen *Mi-1* virüensliği açısından önemli olabileceği tahmin edilmektedir.

Elde edilen varyant listesinden daha anlamlı farklılıklara ulaşabilmek için iki farklı filtreleme daha yapılmıştır. Bu filtrelemelerin ilkinde N1, N2 ve N4 örneklerinin üçünde de ortak olarak bulunan farklılıklar belirlenmiş ve tüm bu örneklerden çıkarılmış, kalan farklılıklar arasında ise karşılaştırma yapılmıştır. N3 örneklerinin diğer örneklerle örtüşmesi çok düşük olduğu için bu analize bu aşamada dâhil edilmemişlerdir. Bu şekilde ortak farklılıkların belirlenmesi ve filtrelenmesi yoluyla, referans genomla dizilenen türler arasındaki büyük farklılıkların ortadan kaldırılması amaçlanmıştır.

Eğer bir farklılık tüm bu örneklerde tespit edilmişse, bu üç tür arasında ilgili genom bölgesi açısından bir farkın olmadığını göstermektedir. Tersine bir durum ise farklılığı belirtmektedir. Bu üç örnek verilerinin karşılaştırılma sonuçları Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

Bu filtrelemeler sonucunda N1, N2 ve N4 örneklerinin hepsinde de ortak bulunan 229696 varyant her bir örnek dosyasından çıkarılmış, kalan dosyalar N1yeni, N2yeni, N3yeni ve N4yeni olarak adlandırılmıştır. Farklılık sayıları ve anote edilmiş farklılıklar Çizelge 4.3'te listelenmiştir. Üç örnekte ortak olarak bulunan farklılıklar, dizileme çalışmasının ikinci kez yapıldığı ve daha güvenilir sonuçların elde edildiği N3² örneğinden de çıkarılmıştır. Fakat N1, N2 ve N4 örneklerinde ortak olarak tespit edilen bu 229696 farklılık N3² örneği ile karşılaştırıldığında sadece 1816 adedinin N3² örneğinde bulunduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4. 4. N1, N2 ve N4 örneklerinin farklılıklar açısından ortak ve farklı yönlerinin sayısal venn şeması

Çizelge 4. 3. Filtrelenmiş (ortak varyantlar uzaklaştırılmış) ve anote edilmiş varyant sayıları

Popülasyon Adı	Toplam Farklılık Sayısı	Anote Edilmiş Toplam	Popülasyon Adı	Farklılık Sayısı	Örneğe Özgü Farklılıklar ¹	Anote Edilmiş Örneğe Özgü Farklılıklar ¹
N1	342736	68331	N1yeni	113040	58377	11833
N2	346324	65889	N2yeni	116628	45607	7570
N3 ²	490943	220032	N3 ² yeni	489127	-	-
N4	329910	63343	N4yeni	100214	38956	6659

¹ N1yeni, N2yeni ve N4yeni üçlü karşılaştırma sonucu sadece bir örneğe ait farklılıklar ve anotasyonlar

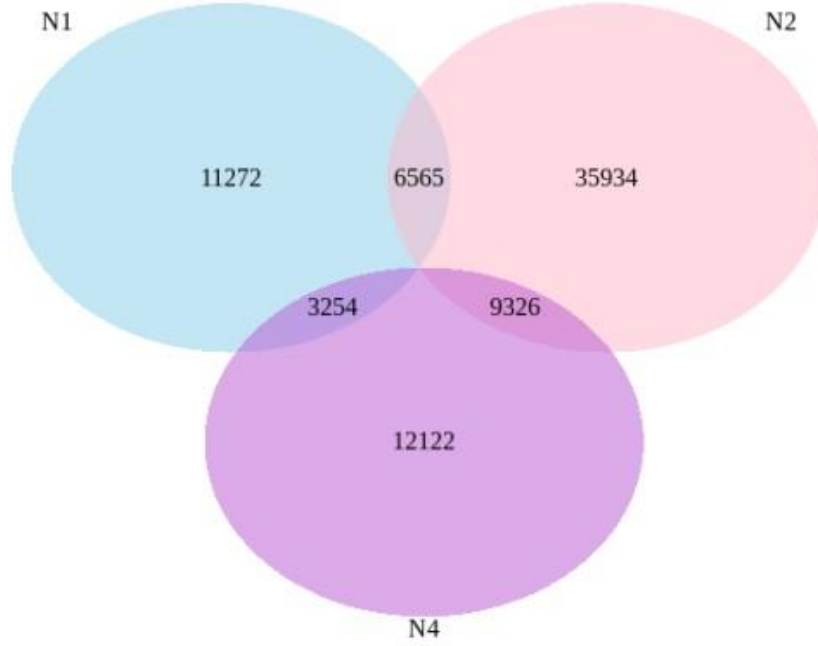
Yapılan ikinci filtrelemede ise tüm popülasyonlarda ortak olan farklılıkların verilerden çıkarılması ile elde edilen farklılıklar, okuma derinliğine göre bir filtrelemeye daha tabi tutulmuştur. Böylece yapılan okuma çalışmalarından kaliteli okunmuş varyantların filtrelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla, N1yeni, N2yeni, N3²yeni, N4yeni dosyalarındaki varyantlarda kapsama derinliği (DP) üzerinden filtreleme yapılmıştır. Çalışmalarda sırasıyla DP \geq 5, DP \geq 10, DP \geq 15, DP \geq 20, DP \geq 30, DP \geq 40, DP \geq 50 filtreleri uygulanmıştır. Çalışma sonucu elde edilen farklılıklar ve anotasyonları Çizelge 4.4'te listelenmiştir.

Çizelge 4. 4. Farklılıkların kapsama derinliğine göre filtrelenmiş sayıları

Popülasyon Adı	Farklılık Sayıları	DP \geq 5	DP \geq 10	DP \geq 15	DP \geq 20	DP \geq 30	DP \geq 40	DP \geq 50
N1yeni	113040	91675	66899	40186	21091	5734	1835	1014
N2yeni	116628	102338	88029	72541	51825	18704	7066	2668
N3 ² yeni	489127	421709	345426	291401	247578	171996	111300	65182
N4yeni	100214	83867	66803	45122	24702	6350	1892	770

DP değeri 20 ve 20'den büyük olan varyantlar daha güvenilir varyant listesi olarak kabul edilmiştir. Bu filtreyi geçen farklılıklar arasında yapılan üçlü karşılaştırma sonucu Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4. 5. $DP \geq 20$ 'ye göre filtrelenmiş N1, N2 ve N4 farklılık sayılarının venn şeması

N1, N2 ve N4 örneklerinde ortak olarak yer alan varyantların tüm örneklerden çıkarılması ve okuma derinliği 20'den yüksek varyantların filtrelenmeleri sonucunda kalan farklılıkların anotasyonları yapılmıştır. Anotasyon verileri elde edilen bu farklılıklar arasında karşılaştırmalar yapılarak söz konusu farklılıklar ilişkilendirilmeye çalışılmıştır.

Avirüent N1 ve seçilmiş virüent N3² karşılaştırıldığında; sadece N1'de bulunan farklılık sayısı 21009 olarak tespit edilmiş, bunlardan 4095 tanesi anote edilmiştir. Sadece N3²'te bulunan varyant sayısı 247496, bunlardan 131069 tanesi anote edilmiştir. N1 ve N3²'te ortak olarak bulunan varyant sayısı ise 82 olarak bulunmuş ve bunlardan sadece 43 tanesi anote edilebilmiştir.

Avirüent popülasyonlar (N1 ve N2) ile *Mi-1* virüent popülasyonlar (N3² ve N4) arasında; N1 ve N2 birleşiminde olup N3² ve N4 birleşiminde olmayan varyant sayısı 60159 olarak tespit edilmiş, bunlardan 11677 tanesi anote edilmiştir. N1 ve N2 birleşiminde olmayıp N3² ve N4 birleşiminde olan varyant sayısı 259486 olarak bulunmuş, bunlardan 133342 tanesi anote edilmiştir. N1 ve N2 birleşimi ile N3² ve N4 birleşiminde ortak bulunan varyant sayısı ise 12811 olarak belirlenmiştir. Fakat bu farklılıklardan sadece 2528 adedinin anotasyonu yapılabilmektedir.

Avirüent popülasyonlar (N1-N2) ile *Mi-1* virüent popülasyon (N4) arasında ise; N1 ve N2 birleşiminde olup N4'te olmayan varyant sayısı 53771 olarak bulunmuştur. Bu varyantlardan sadece 11795 tanesi anote edilmiştir. N1 ve N2 birleşiminde olmayıp N4'te olan varyant sayısı 12122, bunlardan 2364 tanesi anote edilmiştir. N1 ve N2 birleşimi ile N4'te ortak bulunan varyant sayısı ise 12580 olarak bulunmuş ve bunlardan yalnızca 2382 adedinin anotasyonu yapılabilmektedir.

Yapılan bu çalışmalar sonrasında *M. incognita*'ya ait referans genomuna (*Meloidogyne incognita_V3*, GenBank assembly accession: GCA_900182535.1) *Mi-1* virü lent ve avirü lent popü lasyonların genom dizilimlerinin hizalanması sonucunda tüm izolatlarda 941408 adet farklılık (SNP ve INDEL) tespit edilmiştir.

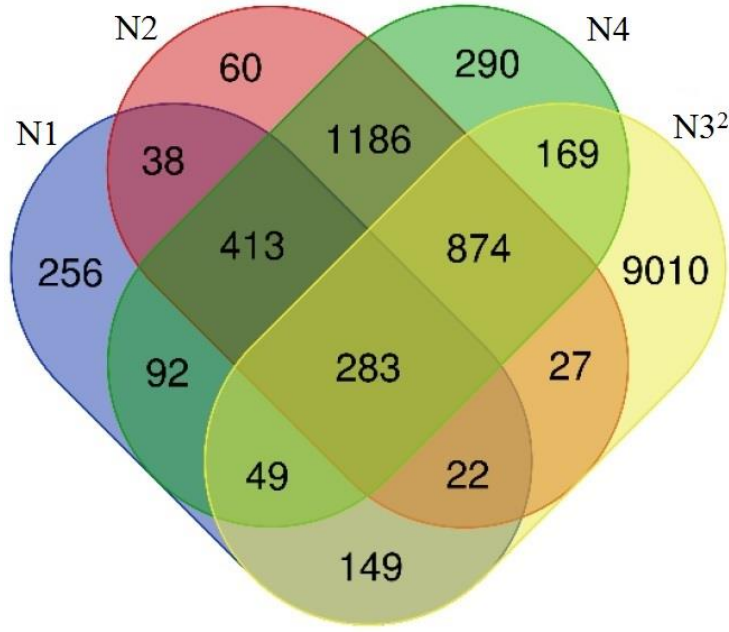
Tüm örneklerde elde edilen bu farklılıklar gen düzeyinde de incelenmiş ve her örnek için farklılık tespit edilen gen sayıları belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4. 5. Popü lasyonlarda farklılık tespit edilen gen sayıları

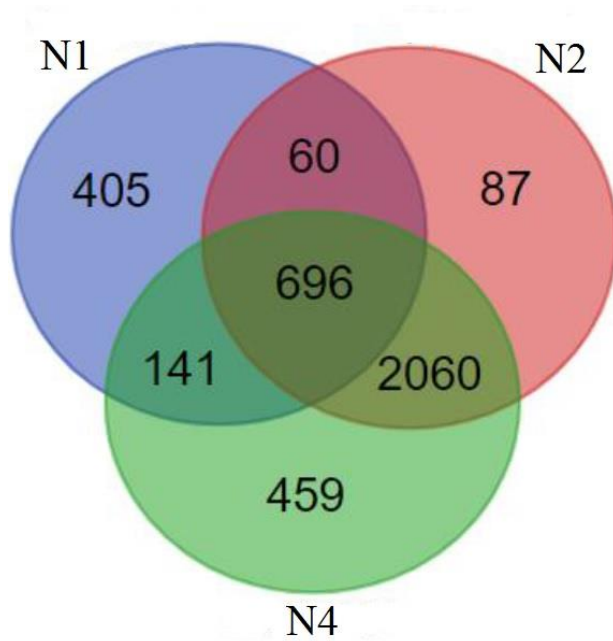
Popü lasyon Adı	Farklılık Tespit Edilen Gen Sayısı
N1	1302
N2	2903
N3 ²	10583
N4	3356

Herbir örnekteki farklılık tespit edilen genlerin örnekler açısından ortak olanlarının belirlenmesi amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar N3² izolatu ile ve bu izolat olmadan ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Tüm izolatlarla yapılan çalışmalar sonucu elde edilen veriler Şekil 4.6'da verilmiştir. Bu verilerden sadece avirü lent popü lasyonlarda (N1-N2) ortak olarak tespit edilen 38 adet gen ile sadece *Mi-1* virü lent popü lasyonlarda (N3²-N4) ortak olarak tespit edilen 169 genin *Mi-1* virü lensliği açısından önemli olabileceği düşünölmektedir.

N3² izolatu olmaksızın yapılan analizler sonucunda ise elde edilen veriler Şekil 4.7'de verilmiştir. Bu verilerde ise özellikle sadece avirü lent popü lasyonlarda (N1-N2) ortak olarak tespit edilen 60 gen ile sadece *Mi-1* virü lent popü lasyonda (N4) tespit edilen 459 genin *Mi-1* virü lensliği açısından önemli olabileceği düşünölmektedir.



Şekil 4. 6. Farklılık tespit edilen genlerin N1, N2, N3 ve N4 popülasyonlarına göre değerlendirilmesi



Şekil 4. 7. Farklılık tespit edilen genlerin N1, N2 ve N4 popülasyonlarına göre değerlendirilmesi

N1, N2 ve N4 örneklerine ait ham dizileme verileri başka bir biyoinformatik grubu tarafından analiz edilmiştir. Yapılan ilk analizlerde *M. incognita* referans genomuna (GCA_900182535.1) göre izolatlarda toplamda 136508 adet SNP tespit edilmiştir. Elde edilen bu farklılıklardan N1 ve N2’de bulunmayıp, N4’te bulunanların filtrelemeleri sonucunda 159 adet SNP belirlenmiştir. N1 ve N2’de bulunup, N4’te bulunmayan farklılıkların filtrelenmeleri sonucunda ise yalnızca 2 adet SNP tespit

edilmiştir. Dolayısıyla bu çalışmalar sonucunda avirüent özellikteki N1, N2 ile *Mi-1* virüent özellikteki N4 izolatlarında *M. incognita* referans genomuna göre tespit edilen toplamda 161 adet farklılığın *M. incognita*'larda gözlemlenen *Mi-1* virülensliği açısından önemli olabileceği düşünülmektedir.

4.8.2. Örneklerin N1 genomu ile farklılıklarının belirlenmesi

Referans genomun dizilenen örneklerle arasındaki büyük farklılıklardan dolayı, N1 örneğinin referans genom olarak kullanılması üzerine de ayrıntılı çalışmalar yapılmıştır. Burada, N1 örneğine ait okuma verisi kullanılarak genom montajı (Genome Assembly) gerçekleştirilmiştir. N1 tabanlı genom montajının referans genom olarak kullanılması üzerine ayrıntılı çalışmalar yapılmış, ancak bu çalışmaların *M. incognita* referans genomunu (GCA_900182535.1) baz alan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre ek bir bilgi vermediği ve bir avantaj sağlamadığı görülmüştür. Dolayısıyla biyoinformatik çalışmalarda ve sonrasında yapılan analizlerde *M. incognita* referans genomu temel alınmıştır.

4.9. Virülenslikle İlgili Moleküler Markörlerin Belirlenmesi

Mi-1 virüent ve avirüent *M. incognita* popülasyonlarından elde edilen genom dizilimlerinde çok sayıda SNP ve INDEL belirlenmiştir. Polimorfizm oranının beklenenden yüksek olması PCR bazlı moleküler markör geliştirme sürecini uzatmıştır. Çünkü bu polimorfik bölgelere özgü primerlerin dizaynı, bunların PCR çalışmalarının yapılması ve fenotipik verilerle uyumluluğunun belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmalar yoğun iş gücü, zaman ve maliyet gerektirecektir. Bunun için sonraki araştırmalarda bu farklılıklar üzerine yoğunlaşılacaktır. Ayrıca *Mi-1* virüent ve avirüent *M. incognita* popülasyonlarında tespit edilen ve virülenslikle ilgili olabileceği düşünülen farklılıkların çalışılan popülasyonlar başta olmak üzere daha geniş popülasyonlarda doğrulanması bu markörlerin güvenilirliğini artıracaktır.

5. TARTIŞMA

Kök-ur nematodları, kültür bitkilerinde meydana getirdikleri ekonomik zararlar ile bitki paraziti nematodlar içerisinde ilk sırada yer almaktadır (Jones vd. 2013). Bu zararlılarla mücadelede çok farklı yöntemler kullanılmaktadır. Dayanıklı çeşitlerin kullanımı en etkili yöntemlerden biridir (Xu vd. 2001). Domateste kök-ur nematodlarına dayanıklılık, *Mi-1* geni tarafından sağlanmaktadır (Bailey 1941; Williamson 1998) ve bu geni taşıyan dayanıklı domates çeşitleri domates yetiştiriciliğinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Roberts ve Thomason 1986; Devran vd. 2010; Seid vd. 2015). Yüksek toprak sıcaklığı ve *Mi-1* virulent kök-ur nematod popülasyonları bu genin kullanımını sınırlandıran önemli etkenlerdir. Yapılan çalışmalarda 28°C'nin üzerindeki toprak sıcaklıklarında *Mi-1* geninin sağladığı dayanıklılığın kırıldığı tespit edilmiştir (Dropkin 1969b; Özalp ve Devran 2018). *Mi-1* virulent kök-ur nematod popülasyonları Amerika (Kaloshian vd. 1996), Yunanistan (Tzortzakakis ve Goven 1996), Fas (Eddaoudi vd. 1997), İspanya (Ornat vd. 2001), Türkiye (Devran ve Söğüt 2010; Uysal ve Söğüt 2016a) ve İsrail (Iberkleid vd. 2014) gibi dünyanın farklı yerlerinde yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Dolayısıyla tarımsal üretim yapılan alanlarda *Mi-1* virulent kök-ur nematodlarının olup-olmadığının bilinmesi nematodlarla mücadele için önemlidir (Devran ve Söğüt 2010). Geleneksel olarak virulent kök-ur nematodu türlerini tanımlamak için bitki testlemeleri yapılmaktadır. Bu çalışmalar ise yaklaşık 2-6 ay sürmekte, zaman almakta ve fazla iş gücü gerektirmektedir (Castagnone-Sereno vd. 1993; Semblat vd. 2000). Oysa ki virulent popülasyonların moleküler olarak belirlenebilmesi, hem analiz süresinin kısaltılmasını sağlayacak, hem de bu zararlılarla mücadelenin daha etkin bir şekilde yapılmasına imkân sunabilecektir. Günümüzde farklı çalışmalarda *Mi-1* virulent popülasyonlarla ilişkili moleküler markörlerin Türkiye'den elde edilen kök-ur nematodlarında etkin sonuç vermediği belirlenmiştir (Mıstanoğlu vd. 2020). Bu çalışmada *Mi-1* virulent *M. incognita* ve avirulent *M. incognita* popülasyonları arasındaki farklılıkları DNA düzeyinde belirleyebilmek için yeni nesil dizileme teknikleri kullanılarak popülasyonların tüm genom dizilim analizleri (Whole Genome Sequence) yapılmıştır. Popülasyonlar arası dizilim analizleri karşılaştırılarak elde edilen farklılıkların [SNP (Single Nucleotide Polymorphism), INDEL (Insertion ve Deletion)] virüleksizlikle ilişkisi olup-olmadığı araştırılmıştır.

Çalışmada kullanılan popülasyonların *M. incognita*'ya ait ve saf kültür (monoxenic pure culture) olmaları dizilim çalışmalarından elde edilen sonuçların doğruluğu için gereklidir. Bunun için önceki çalışmalarda sebze üretim alanlarından elde edilen ve nematoloji kültür koleksiyonunda bulunan *M. incognita*'ya ait N1, N2, N4, N5 ve N6 popülasyonlarının iklim odasında muhafazaları sürecinde başka kök-ur nematodu popülasyonlarıyla bulaşmış olma ihtimalini ortadan kaldırmak için tekrar saf kültürleri yapılmıştır. *M. incognita*'nın saf kültür işlemleri önceki çalışmalarda da olduğu gibi kök-ur nematodu popülasyonlarının tek yumurta paketlerinden aynı türe ait saf kültürler elde edilebilmiştir (Devran ve Söğüt 2009; Mıstanoğlu vd. 2016; Çatalkaya ve Devran 2019). Saf kültürü yapılan izolatlar, sonraki çalışmalarda kullanmak üzere çoğaltılmıştır. Avirulent *M. incognita*'ya ait N1 izolatu dayanıklı domates bitkisi üzerinde sürekli çoğaltılarak *Mi-1* virulent özellik kazandırılmıştır. Bunun için N1 popülasyonuna ait yaklaşık 1000 larva dayanıklı Seval F₁ domates fidelerine inokule edilmiştir. İnokulasyon için bitkilerin 4-5 gerçek yapraklı dönemde olması tercih edilmiştir. Mıstanoğlu vd. (2016), kök-ur nematod inokulasyonu için domatesin 4-5 gerçek yapraklı dönemde

olmasının uygun olduğunu rapor etmişlerdir. İlk inokulasyondan elde edilen az sayıdaki yumurta kümelerinin dayanıklı domates fidelerine inokulasyonu ve bunun 5 (beş) kez tekrarlanması sonucunda avirüent özellikteki N1 popülasyonunun virüent özellik kazandığı görülmüştür. Jarquin-Barberena vd. (1991), *Mi-1* genine karşı *M. incognita*'ya ait avirüent, doğal virüent ve avirüent popülasyondan elde edilen 2 adet seçilmiş virüent olmak üzere dört izolatin virüensliklerini analiz etmişler ve seçilmiş virüent popülasyonlardan birinin 12 (recent virulent), diğerinin ise 21 (old virulent) nesil boyunca dayanıklı domates fidelerinde üretimine devam edilmiştir. Çalışma sonucunda popülasyonlardan doğal virüentin 9 nesil boyunca hassas fideler üzerinde çoğaltıldığı fakat virüensliğini kaybetmediği, seçilmiş virüent popülasyonlardan "old virulent" in ise 21 nesil çoğaltılması sonucunda virüensliğinin arttığı tespit edilmiştir. Xu vd. (2001), virüenslikle ilişkili moleküler markör belirlemek için, *M. incognita*, *M. javanica* ve *M. arenaria* türlerine ait avirüent, doğal virüent ve seçilmiş virüent popülasyonları üzerinde çalışmışlar ve seçilmiş virüent popülasyonu, avirüent bir popülasyonun dayanıklı domates çeşitinde 16 nesil boyunca çoğaltılması ile elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada, Molinari ve Caradonna (2003), *M. incognita*, *M. arenaria* ve *M. javanica*'ya ait avirüent, virüent ve seçilmiş virüent 16 farklı kök-ur nematodu popülasyonunun üreme indekslerini belirleyebilmek amacıyla yapılan çalışmada virüent popülasyonların dayanıklı ve hassas fideler üzerinde virüensliklerini korudukları ve elde edilen seçilmiş virüent popülasyonların da virüensliklerinin nesiller ilerledikçe arttığını belirtmişlerdir. Çalışma kapsamında elde edilen "N3" popülasyonunun nesiller ilerledikçe dayanıklı bitkiler üzerinde oluşturdukları ur ve yumurta kümelerinde de artış olduğu tespit edilmiştir. Avirüent N1 izolattan virüent izolatin oluşturulması izolatlarda arasındaki genomların virüenslik açısından karşılaştırılmasına imkân vermiştir. Böylece *M. incognita* popülasyonlarında gözlemlenen *Mi-1* virüensliği hakkında daha fazla veri elde etmemize imkân sağlayabilmiştir.

Saf kültürleri oluşturulan *M. incognita* izolatlarının (N1, N2, N3, N4, N5 ve N6) türe özgü MincF1/MincR1 primer çifti (Devran vd. 2018) kullanılarak doğrulanması yapılmış ve beklendiği gibi *M. incognita*'ya özgü DNA bandı elde edilmiştir. Bu sonuçlar, Devran vd (2018) ile uyumluluk göstermiştir. Böylece dizileme çalışmalarında kullanılan *M. incognita* izolatları moleküler düzeyde türe özgü primerle doğrulanmıştır.

Meloidogyne incognita avirüent izolatlarını çoğaltmak için Tueza F₁, virüent izolatlarını çoğaltmak için ise Seval F₁ domates çeşitleri kullanılmıştır. Bu çeşitlere ait fidelerin *Mi-1* geni taşıyıp taşımadığı Mi23F/Mi23R primerleri (Seah vd. 2007b) kullanılarak belirlenmiştir. Bu primer çifti kullanılarak homozigot duyarlı, homozigot dayanıklı ve heterozigot dayanıklı bitkilerden elde edilen bantlar adı geçen primer seti kullanılarak yapılan önceki çalışmalarla paralellik göstermiştir (Seah vd. 2007b; Devran vd. 2013). İzolatların avirüent ve virüent özelliklerine göre gerekli olan bitkilerde çoğaltma işlemleri başarıyla ve sorunsuz bir şekilde yapılmıştır.

Kök-ur nematod popülasyonlarında gözlemlenen virüensliğe bağlı moleküler markörler geliştirmek üzerine bazı çalışmalar yürütülmüştür. Semblat vd. (2000) *M. incognita*, *M. javanica* ve *M. arenaria* türlerine ait *Mi-1* virüent ve avirüent popülasyonlar arasında AFLP markörleri kullanılarak belirlenen 1550 farklılığın (polimorfizm) virüenslikle ilgili olmadığını tesbit etmişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada farklı tarımsal üretim alanlarından elde edilen *M. incognita*, *M. javanica* ve *M.*

arenaria türlerine ait seçilmiş virüent, doğal virüent ve avirüent popülasyonlar RAPD markörler kullanılarak araştırılmış ve bulunan polimorfizmler SCAR primerlerine çevrilmiştir. Geliştirilen SCAR primerleri doğal ve seçilmiş virüent popülasyonları birbirlerinden ayıramamıştır (Xu vd. 2001). Bir diğer çalışmada bu SCAR markörleri vasıtasıyla elde edilen *Meloidogyne* cinsine ait virüenslik lokuslarına (MVC) ait sekans bilgilerinin *Caenorhabditis elegans*'da dâhil hiçbir nematod türünün ya da herhangi bir ökaryotik organizmanın genom bilgisiyle ilişkili olmadığı ve bunların Comamonadaceae familyasından *Betaproteobacteria*'nın yedi cinsine (2 adet *Acidovorax* spp., *Delftia* spp., *Polaromonas* spp., *Rhodopherax* spp., *Variovorax* spp. ve *Verminephrobacter* spp.) ait genom bilgileri ile % 71-88 oranında yakın ilişkili olduğu belirlenmiştir (Cortada vd. 2011). Önceki çalışmalarda virüenslikle ilgili olduğu belirtilen moleküler markörlerin Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan *Mi-1* virüent ve avirüent kök-ur nematod popülasyonlarını ayırmadığı belirlenmiştir (Mıstanoğlu vd. 2020). Bu durumda kök-ur nematodlarında gözlemlenen varyasyonların özgün markör bölgeleri üzerinden çalışılmasının, türlerin iç içe girmiş kökenleri nedeniyle başarısız olabileceği düşünülmektedir (Lunt vd. 2014).

Virüenslikle ilgili moleküler markörler arasındaki farklılıkların olması daha fazla bilgi edinmek için çalışmaların genom düzeyinde yapılmasının gerekli olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada *M. incognita*'ya ait virüent ve avirüent izolatlar arasındaki farklılıklar tam genom düzeyinde yürütülmüştür. Genom dizileme çalışmaları için elde edilen DNA'nın miktarı ve kalitesi önemli bir kriteri oluşturmaktadır. Bunun için öncelikle *M. incognita* izolatlarına ait larvalardan izole edilen DNA'ların kantite ve kalite ölçümleri yapılmıştır. Nükleik asit konsantrasyonları rutin olarak agaroz jel elektroforezi, absorbans, floresan boya bağlama ve dijital PCR yöntemleri ile ölçülebilmektedir (Vinod 2004; Lee vd. 2014; Li vd. 2014; He vd. 2017). Bu teknikler içerisinde en ekonomik, basit ve en hızlı yöntem Lambda (λ) DNA'nın bir standart olarak kullanıldığı agaroz jel elektroforez ölçümleridir (Vinod 2004; Lee vd. 2014). Bu çalışmada öncelikle her izolata ait 1000 ve 10000 bireyden izole edilen DNA'ların ölçümleri Lambda (λ) DNA kullanılarak agaroz jelde yapılmıştır. 1000 bireyden elde edilen DNA'ların agaroz jelde daha silik bantlar oluşturdukları, buna karşın beklendiği gibi 10000 bireyden elde edilen DNA'ların ise daha parlak bantlar oluşturdukları belirlenmiştir. Lambda DNA kullanılarak DNA'ların yaklaşık olarak miktarlarının tespit edildiği önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Bhat vd. 2010; Sedlackova vd. 2013). Çalışmada elde edilen sonuçlar önceki çalışmalar ile benzerlik göstermiştir. DNA örneklerinin dizilim analizine alınmadan önce kalitelerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bunun için dizilim analizi hizmeti alınan firmada PicoGreen tekniği kullanılarak ölçümler yapılmıştır. PicoGreen, DNA kalitesinin ölçülmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Ahn vd. 1996; Dragan vd. 2010). Bu yöntem DNA'nın büyüklüğünden, karmaşıklığından etkilenmeden DNA kalitesinin belirlenmesinde kullanılabilen en uygun yöntemlerden biridir (Bhat vd. 2010; Dragan vd. 2010). Çalışma kapsamında, 1000 ve 10000 adet *M. incognita* bireylerinden elde edilen DNA'lar PicoGreen yöntemi kullanılarak dizileme hizmeti alınan firmada ölçülmüştür. 1000 bireyden elde edilen DNA'ların dizileme için yeterli olmadığı, 10000 bireyden elde edilen DNA'ların ise dizilemede kullanılacak kalitede oldukları tespit edilmiştir. Böylelikle dizileme çalışmalarında kullanılacak DNA'ların her bir *M. incognita* popülasyonunun 10000 bireyinden elde edilmesi gerektiği belirlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan iki ayrı teknik ile elde edilen bulgular birlikte değerlendirildiğinde dizileme için en uygun olan DNA kalitesine ulaşabilmek için gerekli olan *M. incognita*

birey sayısı tespit edilmiş ve çalışma bu bilgilere göre yapılmıştır.

Çalışmada tüm genom dizilim analizleri Illumina HiSeq X 10 (Illumina Inc., ABD) cihazı ve Illumina sekanslama ya da sentezleyerek dizileme (SBS-sequencing by synthesis) tekniği kullanılarak çift yönlü okuma (PE 2X150 bp) şeklinde gerçekleştirilmiştir. Bu teknikte çoğaltılan DNA parçaları herbir döngüde bir bazın belirlenmesiyle okunmaktadır. Bu işlem düz ve ters yönde iki defa gerçekleştirilerek tekrarlı ve daha doğru sonuçların alınması sağlanmaktadır (Lakdawalla vd. 2013). Bu nedenle Illumina HiSeq dizileme sistemi özellikle ikinci nesil dizileme sistemleri içerisinde en başarılı olan ve son zamanlarda en çok tercih edilen sistem olarak bilinmektedir (Greenleaf ve Sidow 2014). Nematoloji alanında yapılan dizileme çalışmalarından *Caenorhabditis elegans*'la ilgili çalışmada Yeast Artificial Chromosome (YAC) temelli parmak izi (fingerprinting) tekniği kullanılırken, diğer çalışmaların tamamına yakınında whole-genome shotgun sequencing tekniği kullanılmıştır (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; Stein vd. 2003; Ghedin vd. 2007; Dieterich vd. 2008; Opperman vd. 2008; Abad vd. 2008). Son dönemde yapılan sekanslama çalışmalarında ise Illumina HiSeq diğer dizileme platformlarına göre daha basit bir kullanıma sahip olması, dizileme maliyeti en düşük sistem olması, her bir işlem sonrası en büyük çıktıyı verebilmesi, daha fazla kullanım alanına sahip olması gibi nedenlerden dolayı daha çok tercih edilmektedir (Liu vd. 2012; Cotton vd. 2014; Lunt vd. 2014; Evesvan Den Akker vd. 2016; Zheng vd. 2016; Sato vd. 2018; Somvanshi vd. 2018; Masonbrink vd. 2019; Susič vd. 2020). Bu çalışmada da Illumina HiSeq kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

Dizileme işlemleri için 6 örnek (N1, N2, N3, N4, N5 ve N6) analizlere alınmıştır. Dizileme çalışmaları sonrası 6 örnekten 2'sinin (N5 ve N6) verilerinin biyoinformatik analizler için yeterli kalitede olmadığı tespit edilmiştir. Bu durumda Illumina protokollerinin uygulanması sırasında çapraz bağlar, kırılmalar, tek sarmallı DNA birikimi ve diğer DNA hasar biçimleri gibi olası nedenlerden dolayı enzimatik kesim ve dizileme işlemlerinden sağlıklı sonuçlar alınmadığı düşünülmektedir. Ayrıca söz konusu popülasyonlara ait kalıp DNA'ların kirletici unsurlarla bulaşık olması ya da uzun süre eriyik kalmasından kaynaklı olabileceği de düşünülmektedir. Çok fazla, çok az veya düşük kaliteli bir DNA'nın kullanımı, DNA' da bulaşıklığın olması ya da DNA yapısının bozulması gibi nedenlerden dolayı dizileme işlemlerinde sağlıklı sonuçlar elde edilemediği bilinmektedir (Anonymous 2020a, 2020b). Özellikle DNA'nın uzun süre eriyik kalması gibi bir nedenden dolayı yapısının bozulması ve dizileme çalışmalarından sonuç alınamaması oldukça sık görülen bir durum olduğu belirtilmiştir (Anonymous 2020c). Biyoinformatik analizlerinde istenilen sonucu vermeyen iki örneğin bu durumdan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Referans genoma göre genom analizleri başarı ile yapılan *M. incognita*'ya ait 4 izolatın (N1, N2, N3 ve N4) biyoinformatik analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu 4 izolatın dizilim çalışmaları ortalama 30X coverage değeriyle yapılmış ve önemli verilerin elde edilmesini sağlamıştır. Bununla birlikte coverage sayısının daha yüksek olması daha fazla verinin elde edilmesine imkân verebilecektir. Fakat bu durum analiz maliyetini oldukça artıracaktır.

Çalışmanın ilk aşamasında *Mi-1* virulent ve avirulent popülasyonlardan elde edilen dizilim verilerinin *M. incognita* referans genomuna (GCA_900182535.1)

hizalanması sonucunda SNP'ler ve INDEL'ler tespit edilmiş ve bunların anotasyonu yapılmıştır. Bu çalışmalarda özellikle *Mi-1* virüent (N3¹, N3² ve N4) ve avirüent (N1 ve N2) popülasyonlarda tespit edilen farklılıkların değerlendirilmeleri sonucunda avirüent (N1 ve N2) ve *Mi-1* virüent popülasyonlarda (N3¹ ve N4) ortak bulunan 1102 farklılık ile, (N3² ve N4) 1009 farklılık ve de sadece virüent popülasyonlarda (N3¹ ve N4) bulunan 296 farklılık ile, (N3² ve N4) 290 farklılık dikkat çekicidir. Çalışma kapsamında sadece *Mi-1* virüent popülasyonlarda tespit edilen bu farklılıkların kök-ur nematodlarında gözlemlenen *Mi-1* virülensliği açısından önemli olabileceği tahmin edilmektedir.

Bu çalışmalara ilave olarak varyant listesinden daha anlamlı farklılıklara ulaşabilmek için iki farklı filtreleme gerçekleştirilmiştir. Bu filtrelemelerin birincisinde N1, N2 ve N4 örneklerinin üçünde de ortak olarak bulunan farklılıklar tespit edilmiş ve tüm örneklerden çıkarılmıştır. Bunun nedeni eğer bir farklılık tüm bu örneklerde tespit edilmişse, aslında bu üç tür arasında ilgili genomik bölgede bir farkın bulunmamasıdır.

Bu çalışmada seçilmiş virüent özellikte olan N3 popülasyonuna ait verilerin, farklılıkların belirlenmesi aşamasında kullanımı analiz yöntemlerini güçleştirmiştir. Çünkü N3 örneklerinden elde edilen verilerin diğer örneklere ait verilerle benzerlikleri oldukça düşük bulunmuştur. Buda örneklerdeki ortak farklılıkların belirlenmesinde farklılıklara neden olabileceği görülmüştür. Nitekim N1, N2 ve N4 popülasyonlarında tespit edilen ortak farklılıkların dizileme çalışmasının ikinci kez yapıldığı ve daha güvenilir sonuçların elde edildiği N3² örneği ile analizleri sonucunda bu üç popülasyonda belirlenen 229696 adet farklılıktan sadece 1816 adedinin N3² örneğinde bulunduğu tespit edilmiştir. İkinci analizde ise ortak farklılıkların çıkarılması sonucu elde edilen veriler okuma derinliklerine göre bir filtrelemeye tabi tutulmuştur. Böylece tespit edilen varyantlardan kaliteli okunmuş olanlarının filtrelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmalarda okuma derinliği 20'den büyük olan varyantlar filtrelenmiş ve daha güvenilir farklılıklar olarak raporlanmıştır. Bu filtrelemeler sonucunda özellikle sadece avirüent popülasyonlarda ortak bulunan 6565 adet farklılık ile, *Mi-1* virüent popülasyonlarda bulunup avirüent popülasyonlarda olmayan 272280 adet farklılığın *Mi-1* virülensliği ile ilgili yapılacak çalışmalarda önemli olabileceği tahmin edilmektedir.

Nematoloji alanında genom dizileme çalışması ilk kez model organizma olan *C. elegans* ile yapılmıştır (The *C. elegans* Sequencing Consortium 1998). Daha sonra sırasıyla *C. briggsae* (Stein vd. 2003), *Brugia malayi* (Brug 1928) Buckley 1960 (Ghedini vd. 2007), *Pristionchus pacificus* Sommer vd. 1996 (Dieterich vd. 2008), *M. hapla* (Opperman vd. 2008), *M. incognita* (Abad vd. 2008), *Bursaphelenchus xylophilus* (Kikuchi vd. 2011), *M. floridensis* (Lunt vd. 2014), *Globodera pallida* (Cotton vd. 2014), *Globodera rostochiensis* (Wollenweber 1923) Skarbilovich 1959 (Eves-van Den Akker vd. 2016), *Ditylenchus destructor* (Zheng vd. 2016), *Globodera ellingtonae* (Phillips vd. 2017), *M. arenaria* (Sato vd. 2018) ve *M. graminicola* (Somvanshi vd. 2018), *Heterodera glycines* (Masonbrink vd. 2019), *Radopholus similis* (Mathew vd. 2019) ve *M. luci* (Susič vd. 2020) türlerinin dizileme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. *M. incognita* türünün tüm genomunun dizilenmiş olması önemli bir bilgi sunmaktadır (Abad vd. 2008; BWA 2019; *Meloidogyne incognita* (Southern root-knot nematode) representative genome 2017). *M. incognita* referans genomunun kullanımının yanında farklı bir yaklaşım olarak çalışmayı zenginleştirmek için popülasyonlardan N1'i referans genom kabul ederek "de novo" çalışmada yapılmıştır. Benzer yaklaşım önceki çalışmalarda da kullanılmıştır (Blanc-Mathieu vd. 2017; Sato vd. 2018). Elde edilen verilerin mevcut dizileme verileri ile

eşleşmemesi ya da çok fazla eşleşmeyen bölgelere sahip olması *M. incognita*'nın allopoliploid (genetik olarak birbirinden farklı kromozom takımlarının bir araya gelmesi ile oluşan organizma) yapısından ya da dizilemede kullanılan programlar-sistemler vasıtasıyla daha detaylı verilere ulaşılmış olmasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir (Blanc-Mathieu vd. 2017).

Meloidogyne incognita'nın avirüent ve *Mi-1* virüent popülasyonlarının tam genom dizilemesi yapılarak ilk kez bu çalışmada karşılaştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda doğal *Mi-1* virüent popülasyonda (N4) avirüent popülasyonlardan (N1 ve N2) 12122 adet farklılık tespit edilmiştir. Seçilmiş *Mi-1* virüent popülasyonun (N3²) ise avirüent popülasyonlardan (N1 ve N2) 247578 adet farklılığı olduğu belirlenmiştir. Ancak doğal ve seçilmiş *Mi-1* virüent popülasyonlarda (N3² ve N4) ortak olarak tespit edilen 290 adet farklılığın kök-ur nematodlarındaki *Mi-1* virülensliği ile ilgili olabileceği tahmin edilmektedir.

Çalışma kapsamında belirlenen farklılıklar etkinliklerinin anlaşılabilmesi amacıyla gen düzeyinde de incelenmiştir. Tespit edilen farklılıkların üç popülasyonda (N1, N2 ve N4) toplamda 7561 adet gende buldukları belirlenmiştir. Bu genler üzerinde yapılan detaylı çalışmalar sonucunda ise özellikle avirüent popülasyonlarda (N1-N2) ortak olarak tespit edilen 60 adet gen ile sadece *Mi-1* virüent popülasyonda (N4) tespit edilen 459 adet genin *Mi-1* virülensliği açısından önemli olabileceği düşünülmektedir.

Dizileme çalışmalarından elde edilen ham verilerden daha anlamlı sonuçlara ulaşabilmek amacıyla University of Worcester ve University of Exeter'deki biyoinformatik uzmanları tarafından ayrıca analizler yapılmıştır. Bu analizlerde N3² örneği, referans genomu ve diğer örnekler göre çok fazla farklılık göstermesinden dolayı analize dâhil edilmemiş ve analizler sadece N1, N2 ve N4 örneklerinde gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda ise üç popülasyonda (N1, N2 ve N4) referans genomu (GCA_900182535.1) göre 136508 adet farklılık tespit edilmiştir. Tespit edilen bu farklılıklardan avirüent özellikteki N1 ve N2'de bulunmayıp, *Mi-1* virüent özellikteki N4'te bulunanların 159 adet olduğu, avirüent özellikteki N1 ve N2 bulunup, *Mi-1* virüent özellikteki N4'te bulunmayanların ise 2 adet olduğu tespit edilmiştir. Özellikle *M. incognita* referans genomuna (GCA_900182535.1) göre tespit edilen bu 161 adet farklılığın *Mi-1* virülensliği açısından önemli olabileceği düşünülmektedir.

Meloidogyne incognita'nın gelişmesine ve konukçularına adaptasyonunun epigenetik (gen ifadesi veya hücre fenotipinde DNA dizisinden bağımsız olan mekanizmaların yol açtığı nesilden nesile aktarılabilen değişiklikler) kontrol altında olup olmadığı araştırılmıştır. Kök-ur nematodlarının kromatin yapısındaki değişiklikler ya da DNA metilasyonu ve post transkripsiyonel histon modifikasyonları gibi çeşitli gelişim aşamalarında elde edilen ekspresyon verileri incelenmiş fakat kök-ur nematodlarında gözlemlenen virülensliğin epigenetik temelli olup olmadığı ile ilgili net sonuçlara ulaşılamamıştır (Perfus-Barbeoch vd. 2014; Prax vd. 2018). Ancak söz konusu çalışmalardan farklı olarak *Mi-1* virüent ve avirüent *M. incognita* popülasyonlarının genomlarında yeni nesil dizileme teknikleri sonucu tespit edilen SNP'ler ve INDEL'lerin virülenslikle ilişkilerinin olabileceği gösterilmiştir.

6. SONUÇLAR

Domates tek yıllık bir bitki olup, anavatanı Orta ve Güney Amerika olmasına rağmen dünya üzerinde hemen hemen tüm bölgelerde üretimi yapılabilen en önemli sebzelerden biridir. Hastalık ve zararlılar domates üretiminde önemli verim kayıplarına neden olmaktadır. Bu zararlıların en önemlilerinden biri ise kök-ur nematodlarıdır. Kök-ur nematodlarının (*Meloidogyne* spp.) dünya genelinde sadece domateslerde neden oldukları verim kayıplarının % 42-54 oranlarında olduğu belirtilmektedir (Netscher ve Sikora 1990). Tarımsal üretimde kök-ur nematodlarıyla mücadelede ise toprak solarizasyonu, biyolojik mücadele, kimyasal mücadele ve kültürel mücadele (dayanıklı çeşitlerin ve anaçların kullanımı) gibi çok farklı yöntemler bulunmaktadır (Devran vd. 2010; Karssen ve Moens 2006). Kimyasalların kullanılması çevresel açıdan önemli sorunlara neden olabilmektedir (Ornat vd. 2001; Hockland vd. 2006). Bu nedenle dayanıklı çeşitlerin kullanılması kimyasalların neden olduğu çevresel sorunları azaltmakta ve mücadele için en yaygın ve etkin yöntemlerden birisini oluşturmaktadır (Tzortzakakis ve Gowen 1996). Kök-ur nematodlarına karşı dayanıklılık ilk kez yabani domates türlerinden *Solanum peruvianum*'da bulunmuştur (Bailey 1941). Domateste, kök-ur nematodlarına karşı mücadelede kullanılan ve dayanıklılık sağlayan ise *Mi-1* olarak adlandırılan dominant bir genidir (Williamson, 1998). *Mi-1* geninin kullanımını sınırlayan en önemli etken ise virüent kök-ur nematodu popülasyonlarıdır (Devran ve Söğüt 2010). *Mi-1* virüent kök-ur nematod popülasyonları Amerika (Kaloshian vd. 1996), Yunanistan (Tzortzakakis ve Goven 1996), Fas (Eddaoudi vd. 1997), İspanya (Ornat vd. 2001), Türkiye (Devran ve Söğüt 2010; Uysal ve Söğüt 2016a) ve İsrail (Iberkleid vd. 2014) gibi dünyanın farklı yerlerinde yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir.

Mi-1 virüent kök-ur nematodu popülasyonlarının tarımsal üretim yapılan alanlardaki varlıklarının bilinmesi nematodlarla mücadele için önemlidir (Devran ve Söğüt 2010). Geleneksel olarak kök-ur nematodu türlerine ait bu özelliğin belirlenebilmesi için bitki testlemeleri yapılmaktadır. Bu çalışmalar ise yaklaşık 2-6 ay sürmekte, zaman almakta ve fazla iş gücü gerektirmektedir (Castagnone-Sereno vd. 1993; Semblat vd. 2000). Oysa ki virüent popülasyonların moleküler olarak belirlenebilmesi, hem analiz süresinin kısaltılmasını sağlayacak, hem de bu zararlılarla mücadelenin daha etkin bir şekilde yapılmasına imkân sunabilecektir. Günümüze kadar AFLP (Semblat vd. 2000; Neveu vd. 2003), RAPD ve SCAR (Xu vd. 2001), *Map-1* genleri (Semblat vd. 2001; Castagnone-sereno vd. 2009; Tomalova vd. 2012) ya da virüentlikle ilgili olduğu düşünülen HM1, HM2, HM11, HM12 (Castagnone-Sereno vd. 2015) gibi farklı gen bölgeleri ve teknikler kullanılarak yapılan çalışmalarda elde edilen moleküler markörlerin virüensliğin tanımlanmasında kullanılabileceği rapor edilmiştir. Fakat bu moleküler markörlerin Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan *Mi-1* virüent ve avirüent kök-ur nematod popülasyonlarını ayırmadığı belirlenmiştir (Mıstanoglu vd. 2020). Dolayısıyla kök-ur nematodlarında gözlemlenen *Mi-1* virüentliği ile ilgili daha detaylı bilgilerin elde edilebilmesi amacıyla *Mi-1* virüent ve avirüent kök-ur nematodu popülasyonlarının genom düzeyinde farklılıkları araştırılmıştır. Illumina HiSeq X 10 cihazı kullanılarak çift yönlü okuma (PE 2X150 bp) ile *M. incognita*'nın avirüent ve *Mi-1* virüent popülasyonlarında tüm genom dizilim analizleri gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler anlamlandırılabilme amacıyla ilk olarak *M. incognita* referans genomuna (GCA_900182535.1) haritalanmıştır. Avirüent ve *Mi-1* virüent popülasyonlar arasında 17512 adet polimorfizm tespit edilmiştir. İkinci

yaklaşım olarak tüm izolatlarda ortak bulunan 229696 adet varyant analizden çıkarılmıştır. Üçüncü yaklaşım olarak geri kalan veriler okuma derinliğine göre ($DP \geq 20$) yapılan filtreleme çalışmaları sonucunda *Mi-1* virüent ve avirüent popülasyonlar arasında 12122 adet polimorfizm tespit edilmiştir. Dördüncü yaklaşım olarak da polimorfizm sayısını azaltmak için N1 popülasyonuna ait veriler referans genom olarak değerlendirilerek “de novo” analizleri yapılmıştır. Fakat “de novo” çalışmalarından elde edilen verilerin *M. incognita* referans genomu ile yapılan çalışmalara göre ek bir bilgi vermediği ve bir avantaj sağlamadığı belirlenmiştir.

Dizileme çalışmaları sonucunda üç popülasyondan (N1, N2 ve N4) elde edilen ham verilerin başka bir biyoinformatik grubu tarafından referans genomuna (GCA_900182535.1) göre analiz edilmiş ve izolatlarda tespit edilen 161 adet SNP’in *Mi-1* virülenslikle ilişkili olabileceği belirlenmiştir. Bu SNP’lerin gelecekte yapılacak çalışmalarda doğrulanması gerekmektedir.

M. incognita’nın seçilmiş, doğal *Mi-1* virüent ve avirüent popülasyonlarında yeni nesil dizileme tekniklerinin kullanılarak tüm genom dizileme çalışmalarının yapılması ülkemiz nematoloji çalışmaları açısından bir ilk olma özelliği taşımaktadır.

Çalışmada hem doğal virüent popülasyonun hem de seçilmiş virüent popülasyonun olması konuyla ilgili daha fazla bilgi oluşturulmasına imkân verebilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen farklılıklar (SNP’ler ve INDEL’ler), ileride yapılacak çalışmalarda PCR markörlerine dönüştürülebilecektir. Bu markörler daha geniş kök-ur nematodu popülasyonlarında testlenerek etkinlikleri belirlenebilecektir. Böylece farklı tarımsal üretim alanlardan elde edilen kök-ur nematodlarında gözlemlenen *Mi-1* virülensliğinin aynı genetik mekanizmalar tarafından gerçekleşip gerçekleşmediği tespit edilebilecektir. Ayrıca çalışmada kullanılan yeni nesil dizileme analizlerinin diğer bitki paraziti nematodlarda da kullanımına imkân verebilecektir.

7. KAYNAKLAR

- Abad, P., Favery, B. Rosso, M.N. and 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.J., Deleury, E., Perfus-Barbeoch, L., Anthouard, V., Artiguenave, F., Blok, V.C., vd. 2008. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nature Biotechnology*, 26(8): 909–915.
- Adam, M.A.M., Phillips, M.S. and 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.
- Adam, M.A.M., Phillips, M.S., Tzortzakakis, E.A. and Blok, V.C. 2009. Characterisation of mjad genes encoding novel secreted proteins from the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Nematology*, 11: 253–265.
- Ahn, S.J., Costa, J. and Retting Emanuel, J. 1996. PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. *Nucleic Acids Research*, 24(13): 2623-2625.
- Akyazı, F. ve Ecevit, O. 2011. Tokat İli sebze alanlarındaki kök-ur nematod (*Meloidogyne* spp.)'lerinin yayılışları ve tür tespiti. *Anadolu Tarım Bilim Dergisi*, 26(1):1-9.
- Akyazı, F., Han, H., Çetintaş, R. and Felek, A.F., 2012. First report of root-knot nematodes, *Meloidogyne arenaria* and *M. hapla* (Nemata: Meloidogynidae) from pepino in Turkey. *Nematologia Mediterranea*, 40: 107-110.
- Allen, M.W. 1952. Observations on the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 19: 44-51.
- Anonim 2020: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2004/04/20040408.htm#4> [Son erişim tarihi: 05.01.2020]
- Anonymous 2020a: UC DNA Sequencing Facility (Troubleshooting). <http://dnaseq.ucdavis.edu/Troubleshooting.html> [Son erişim tarihi: 15.01.2020].
- Anonymous 2020b: Troubleshooting Guide to Sanger Sequencing. https://cgrb.oregonstate.edu/sites/cgrb.oregonstate.edu/files/files/CoreLab/ab_sanger_troubleshooting_guide.pdf [Son erişim tarihi: 15.01.2020].
- Anonymous 2020c: Automated DNA Sequencing Chemistry Guide. <https://www.yumpu.com/en/document/read/18020749/automated-dna-sequencing-chemistry-guide-pdf-biotech-core> [Son erişim tarihi: 15.01.2020]
- Arıkan, N. 1991. Metil bromit ile fümige edilmiş kuru incirdeki bromür kalıntı miktarının tesbiti. *Turkish Journal of Chemistry*, 15: 52-56.
- Atkinson, G.F. 1892. Some diseases of cotton. III, Frenching. *Alabama Agricultural Experiment Station Bulletin*, 41: 19-29.
- Aydınlı, G., Mennan, S., Devran, Z., Sirca, S. and Urek, G. 2013. First report of the root-knot nematode *Meloidogyne ethiopica* on tomato and cucumber in Turkey. *Plant*

- Disease*, 97(9):1262.
- Aydınlı, G. 2014. Orta Karadeniz bölgesi seralarındaki kök-ur nematodu (*Meloidogyne* spp.) popülasyonları üzerinde araştırmalar. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, 143s.
- Aydınlı, G. 2018. Detection of the root-knot nematode *Meloidogyne luci* Carneiro et al., 2014 (Tylenchida: Meloidogynidae) in vegetable fields of Samsun Province, Turkey. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 42(3): 229-237.
- Bacha, N., Ayub, N., Ahmad, Y., Abbas, M. and Rafi, A. 2007. Soil solarization: A safe, affective and practicable technique for the control of soil born fungi and nematodes. *Pakistan Journal of Biological Science*, 10(1): 57-64.
- Bailey, D.M. 1941. The seedling method for root-knot nematode resistance. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 38: 573-575.
- Barry, K.H., Koutros, S., Lubin, J.H., Coble, J.B., Barone-Adesi, F., Freeman, L.E.B., Sandler, D.P., Hoppin, J.A., Ma, X., Zheng, T. and Alavanja, M.C.R. 2012. Methyl bromide exposure and cancer risk in the agricultural health study. *Cancer Causes Control*, 23(6): 807-818.
- BBTools User Guide, 2019. BBDuk Guide. <https://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/bbtools-user-guide/bbduk-guide/> [Son erişim tarihi: 04.09.2019].
- BCFtools, 2019. BCFtools latest development version. <https://samtools.github.io/bcftools/bcftools.html> [Son erişim tarihi: 04.09.2019].
- Bennett, S. 2004. Solexa Ltd. *Pharmacogenomics*, 5: 433-438.
- Bergougnoux, V. 2014. The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, 32: 170-189.
- Berkeley, M.J. 1855. Vibrio forming cysts on the roots of cucumbers. *Gardeners' Chronicle and Agricultural*, 7 April, 14: 220.
- Berthou, F., Ba-Diallo, A., De Maeyer, L. and De Guiran, G. 1989. Caracterisation chez les nematodes *Meloidogyne* Goeldi (Tylenchida) de types virulents visa-vis du gene *Mi* de la tomate dans deux zones ma raichres au Senegal. *Agronomie*, 9: 877-884.
- Bhat, S., Curach, N., Mostyn, T., Singh Bains, G., Griffiths, K.R. and Emslie, K.R. 2010. Comparison of methods for accurate quantification of DNA mass concentration with traceability to the international system of units. *Analytical Chemistry*, 82(17): 7185-7192.
- Bilgrami, A.L. and Gaugler, R. 2004. Feeding Behaviour. In: Bilgrami, A.L. and Gaugler, R. (Eds.), *Nematode Behaviour*. CABI Publishing, London, pp. 91-119.
- Blanc-Mathieu, R., Perfus-Barbeoch, L., Aury, J.-M., Da Rocha, M., Gouzy, J., Sallet, E., Martin-Jimenez, C., Bailly-Bechet, M., Castagnone-Sereno, P., Flot, J.-F., vd. 2017. Hybridization and polyploidy enable genomic plasticity without sex in the most devastating plant-parasitic nematodes. *PLoS Genetics*, 13(6): e1006777. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006777>.
- Bleve-Zacheo, T. and Melillo, M.T. 1997. The biology of giant cells. In: Grundler, F., Ohl, S. and Fenoll, C. (Eds.), *Cellular and Molecular Basis of Plant- Nematode*

- Interactions. Kluwer Academic Publishers, Dordrech, pp. 65-79.
- Bleve-Zacheo, T., Melillo M.T. and Castagnone-Sereno, P. 2007. The contribution of biotechnology to root-knot nematode control in tomato plants. *Pest Technology, Global Science Books*, 1: 1-16.
- Bockenhoff, A. and Grundler, F.M.W. 1994. Studies on the nutrient uptake by beet cyst nematode *Heterodera schachtii* by in situ microinjection of fluorescent probes into the feeding structures in *Arabidopsis thaliana*. *Parasitology*, 109: 249-254.
- Boerma, H.R. and Hussey, R.S. 1992. Breeding plants for resistance to nematodes. *Journal of Nematology*, 24(2): 242-252.
- Bolger, A.M., Lohse, M. and Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15): 2114-2120.
- Bowman, P. and Bloom, J.R., 1966. Breaking the resistance of tomato varieties to Fusarium wilt by *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology*, 56:871.
- Bridge, J. 1996. Nematode management in sustainable and subsistence agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, 34: 201 -225.
- BWA, 2019. Manual Reference Pages-BWA(1). <http://bio-bwa.sourceforge.net/> [Son erişim tarihi: 04.09.2019].
- Castagnone-Sereno, P., Bongiovanni, M. and Dalmasso, A. 1993. Stable virulence against the tomato resistance *Mi* gene in the parthenogenetic Root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Phytopathology*, 83: 803–805.
- Castagnone-Sereno, P., Semblat, J.P. and Castagnone, C., 2009. Modular architecture and evolution of the *map-1* gene family in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Genetics and Genomics*, 282: 547–554.
- Castagnone-Sereno, P., Mulet, K. and Iachia, C., 2015. Tracking changes in life-history traits related to unnecessary virulence in a plant-parasitic nematode. *Ecology and Evolution*, 5(17): 3677- 3686.
- Castagnone-Sereno, P., Mulet, K., Danchin, E.G.J., Koutsovoulos, G.D., Karaulic, M., Da Rocha, M., Bailly-Bechet, M., Pratx, M., Perfus-Barbeoch, L. and Abad, P., 2019. Gene copy number variations as signatures of adaptive evolution in the parthenogenetic, plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Ecology*, 28(10): 2559-2572.
- Castillo, P. and Jimenez, R.M., 2003. First Report of *Meloidogyne incognita* infecting Spinach in Southern Spain. *Plant Disease*, 87: 874.
- Chawla, S., Woodward, J.E., Wheeler, T.A. and Wright, R.J. 2012. Effect of Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum inoculum density, *Meloidogyne incognita* and cotton cultivar on fusarium wilt development. *The Texas Journal of Agriculture and Natural Resources*, 25: 46-56.
- Chitwood, B.G. 1949. Root-knot nematodes – Part 1. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 16: 90–104.
- Christie, J.R. and Cobb, G.S. 1940. The inefficiency of methyl bromide fumigation against the chrysanthemum foliar nematode. *Proceedings of the Helminthological*

- Society of Washington*, 7: 62.
- Cook, R., and Evans, K. 1987. Resistance and tolerance. In: Brown, R.H. and Kerry, B.R. (Eds.), *Principles and Practice of Nematode Control in Crops*. FL: Academic Press, Orlando, pp. 179-231.
- Cornu, M., 1879. Etudes sur le Phylloxera vastatrix. *Mémoires Divers Savants à l'Académie Royale des Sciences de l'Institut de France*, 26: 1–357.
- Cortada, L., Sakai, H., Verdejo-Lucas, S., and Mizukubo, T. 2011. *Meloidogyne* virulence locus molecular marker for characterization of selected *Mi*-virulent populations of *Meloidogyne* spp. is correlated with several genera of *Betaproteobacteria*. *Phytopathology*, 101(4): 410-415.
- Cotton, J.A., Lilley, C.J., Jones, L.M., Kikuchi, T., Reid, A.J., Thorpe, P., Tsai, I.J., Beasley, H., Blok, V. and Cock, P.J. vd. 2014. The genome and life-stage specific transcriptomes of *Globodera pallida* elucidate key aspects of plant parasitism by a cyst nematode. *Genome Biology*, 15(3):R43. doi: 10.1186/gb-2014-15-3-r43.
- Çatalkaya, M. ve Devran, Z. 2019. Integrated management of *Mi-1* virulent *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 (Tylenchida: Meloidogynidae) in greenhouse tomatoes. *Turkish Journal of Entomology*, 43: 157-169.
- Çetintaş, R. and Çakmak, B. 2016. *Meloidogyne* species infesting tomatoes, cucumbers and eggplants grown in Kahramanmaraş Province, Turkey. *Turkish Journal of Entomology*, 40 (4): 355-364.
- D'Addabbo, T., Miccolis, V., Basile, M. and Candido, V. 2009. Soil Solarization and Sustainable Agriculture. In: Lichtfouse, E. (Ed.), *Sociology, Organic Farming, Climate Change and Soil Science*. Springer, Netherlands, pp. 217-274.
- Dautova, M. and Gommers, F.J. 2000. *Meloidogyne* spp. in Macedonia: Distribution and virulence for *Mi* resistance in tomato. *Nematologia Mediterranea*, 28: 121-128.
- Devran, Z. and Söğüt, M.A. 2009. Distribution and identification of root-knot nematodes from Turkey. *Journal of Nematology*, 41:128-133.
- Devran, Z. and Söğüt, M.A. 2010. Occurrence of virulent root-knot nematode populations on tomatoes bearing the *Mi* gene in protected vegetable-growing areas of Turkey. *Phytoparasitica*, 38: 245-251.
- Devran, Z., Söğüt, M.A. and Mutlu, N. 2010. Response of tomato rootstocks with the *Mi* resistance gene to *Meloidogyne incognita* race 2 at different soil temperatures. *Phytopathologia Mediterranea*, 49: 11-17.
- Devran, Z. and Söğüt, M.A. 2011. Characterizing races of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* in the West Mediterranean region of Turkey. *Crop Protection*, 30(4): 451-455.
- Devran, Z., Başköylü, B., Taner, A. and Doğan, F. 2013. Comparison of PCR-based molecular markers for identification of *Mi* gene. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil And Plant Science*, 63:395-402.
- Devran, Z., Mistanoglu, I. and Özalp, T. 2017. Occurrence of mixed populations of root-knot nematodes in vegetable greenhouses in Turkey, as determined by PCR screening. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 124: 617-630.

- Devran, Z., Polat, İ., Mistanoğlu, İ. and Baysal, Ö., 2018. A novel multiplex PCR tool for simultaneous detection of three root-knot nematodes. *Australasian Plant Pathology*, 47(4): 389-392.
- Dieterich, C., Clifton, S.W., Shuster, L.N., Chinwalla, A., Delehaunty, K., Dinkelacker, I., Fulton, L., Fulton, R., Godfrey, J., Minx, P., vd 2008. The *Pristionchus pacificus* genome provides a unique perspective on nematode lifestyle and parasitism. *Nature Genetics*, 1193-1198.
- Dönmez, D., Şimşek, Ö. ve Aka Kaçar, Y., 2015. Yeni nesil DNA dizileme teknolojileri ve bitkilerde kullanımı. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8(1): 30-37.
- Dragan, A.I., Casas-Finet, J.R., Bishop, E.S., Strouse, R.J., Schenerman, M.A. and Geddes, C.D., 2010. Characterization of PicoGreen interaction with dsDNA and the origin of its fluorescence enhancement upon binding. *Biophysical Journal*, 99: 3010-3019.
- Dropkin, V.H. 1969a. Cellular responses of plants to nematode infections. *Annual Review of Phytopathology*, 7: 101–122.
- Dropkin, V.H. 1969b. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. *Phytopathology*, 59: 1632–1637.
- Eddaoudi, M., Ammati, M. and Rammah, H. 1997. Identification of resistance breaking populations of *Meloidogyne* on tomatoes in Morocco and their effect on new sources of resistance. *Fundamental and Applied Nematology*, 20: 285-289.
- Egan, A.N., Schlueter, J. and Spooner, D.M. 2012. Applications of next-generation sequencing in plant biology. *American Journal of Botany*, 99(2):175–185.
- Eisenback, D.E. and Triantaphyllou, H.H. 1991. *Meloidogyne* species and race. In: Nickle, W.R. (Eds.), *Manual of Agricultural Nematology*. Marcel Dekker Inc., Newyork, USA, pp. 191-250.
- Ensamble-VEP, 2020. Ensembl Variant Effect Predictor (VEP). <https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html> [Son erişim tarihi: 16.05.2020].
- Ercan, H. ve Elekçioğlu, İ.H., 2009. Adana ve Mersin illerinde yabancı otlarda bulunan kök-ur nematod türlerinin (*Meloidogyne* spp.) (Nemata: Meloidogynidae) belirlenmesi. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 33(3): 179-192.
- Eves-van Den Akker, S., Laetsch, D.R., Thorpe, P., Lilley, C.J., Danchin, E.G.J., Da Rocha, M., Rancurel, C., Holroyd, N.E., Cotton, J.A., Szitenberg, A., vd. 2016. The genome of the yellow potato cyst nematode, *Globodera rostochiensis*, reveals insights into the basis of parasitism and virulence. *Genome Biology*, 17:124.
- FAO 2018. Crops <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> [Son erişim tarihi: 26.11.2018].
- FastQC, 2019. FastQCtoolkit. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> [Son erişim tarihi: 11.12.2019].
- Garber, R.H., Jorgenson, E.C., Smith, S. and Hyer, A.H. 1979. Interaction of population levels of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *Meloidogyne incognita* on

- cotton. *Journal of Nematology*, 11(2): 133-137.
- GATK, 2020. Introduction to the GATK Best Practices. <https://software.broadinstitute.org/gatk/best-practices/> [Son erişim tarihi: 15.05.2020].
- Gerič Stare, B., Strajnar, P., Susic, N., Urek, G. and Širca, S., 2017. Reported populations of *Meloidogyne ethiopica* in Europe identified as *Meloidogyne luci*. *Plant Disease*, 101(9): 1627-1632.
- Ghedini, E., Wang, S., Spiro, D., Caler, E., Zhao, Q., Crabtree, J., Allen, J.E., Delcher, A.L., Guiliano, D.B., Miranda-Saavedra, D., vd 2007. Draft genome of the filarial nematode parasite *Brugia malayi*. *Science*, 317: 1756-1760.
- Gheysen, G., Van Der Eycken, W., Barthels, N., Karımı, M., and Van Montagu, M., 1996. The exploitation of nematode-responsive plant genes in novel nematode control methods. *Pesticide Science*, 47: 95-101.
- Ghule, T.M., Singh, A., Khan, M.R. 2014. Root-knot nematodes: Threat to Indian agriculture. *Popular Kheti*, 2(3): 126-130.
- Gleason, C.A., Liu, Q.L. and Williamson, V.M., 2008. Silencing a candidate nematode effector gene corresponding to the tomato resistance gene *Mi-1* leads to acquisition of virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21: 576–585.
- Göldi, E.A. 1887. Relatório sobre a moléstia do cafeeiro na provincia do Rio de Janeiro. Extrahido do VIII Vol. dos. *Archivos do Museu Nacional*, 8: 1–121.
- Göldi, E.A. 1892. Relatoria sobre a molestia do cafeeiro na provincial da Rio de Janeiro. *Archiivos do Museu Nacional do Rio de Janeiro*, 8: 1–112.
- Greenleaf, W.J. and Sidow, A. 2014. The future of sequencing: Convergence of intelligent design and market Darwinism. *Genome Biology*, 15(3): 303.
- Gürkan, B., Çetintaş, R. ve Gürkan, T. 2019. Gaziantep ve Osmaniye sebze alanlarında bulunan kök-ur nematodu türleri (*Meloidogyne* spp.)'nin teşhisi ile bazı nematod popülasyon ırklarının belirlenmesi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 22(1): 113-124.
- Halbrendt, J.M. and La Mondia, J.A. 2004. Crop rotation and other cultural practices. In: Chen, Z.X., Chen, S.Y. and Dickson, D.W. (Eds.), *Nematology Advances and Perspectives*, Vol. 2. CAB International, Wallingford, UK, pp. 909–930.
- Hallmann, J., Frankenberg, A., Paffrath, A., Schmidt, H. 2007. Occurrence and importance of plant-parasitic nematodes in organic farming in Germany. *Nematology*, 9: 869-879.
- He, H.J., Stein, E.V., DeRose, P. And Cole, K.D., 2017. Limitations of methods for measuring the concentration of human genomic DNA and oligonucleotide samples. *Biotechniques*, 64(2): 59-68.
- Ho, J.-Y., Weide, R., Ma, H.M., Van Wordragen, M.F., Lambert, K.N., Koornneef, M., Zabel, P. and Williamson, V.M. 1992. The root-knot nematode resistance gene (*Mi*) in tomato: construction of a molecular linkage map and identification of dominant cDNA markers in resistant genotypes. *The Plant Journal*, 2: 971–982.
- Hockland, S., Inserra, R. N., Millar, L. and Lehman, P.S. 2006. International Plant

- Health–Putting Legislation into Practice. In: R. N., Perry, and M. Moens. (Eds.), Plant Nematology. British Library, London, UK, pp. 327-345.
- Holley, R.W., Everett, G.A., Madison, J.T., Zamir, A., 1965. Nucleotide sequences in the yeast alanine transfer ribonucleic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 240(5): 2122-2128.
- Hooper, D. J., 1986, Handling, Fixing, Staining and Mounting Nematodes. In: J.F. Southey (Eds.), Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes. Her Majesty's Stationery Office, London, pp. 59-80.
- Hunt, D.J. 1993. Aphelenchida, longidoridae and trichodoridae: their systematics and bionomics. CAB International, Wallingford, UK., 368 p.
- Hussey, R.S. and Mims, C.W. 1990. Ultrastructure of esophageal glands and their secretory granules in root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Protoplasma*, 156: 9-18.
- Hussey, R.S. and Mims, C.W. 1991. Ultrastructure of feeding tubes formed in giant-cells induced by root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Protoplasma*, 162: 99-107.
- Iberkleid, I., Ozalvo, R., Feldman, L., Elbaz, M., Patricia, B. and Horowitz, S.B., 2014. Responses of tomato genotypes to avirulent and *Mi*-virulent *Meloidogyne javanica* isolates occurring in Israel. *Nematology*, 104(5): 484-496.
- Jarquín-Barberena H., Dalmaso, A., De Guiran, G. and Cardin, M.C. 1991. Acquired virulence in the plant parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. I. Biological analysis of the phenomenon. *Revue de Nématologie*, 14: 299-303.
- Jaubert, S., Ledger, T.N., Laffaire, J.B., Pottie, C., Abad, P. and Rosso, M.N. 2002. Direct identification of stylet secreted proteins from root-knot nematodes by a proteomic approach. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 121: 205-211.
- Johnson, A.W. 1985. The role of nematicides in nematode management. In: Sasser, J.N. and Carter, C.C. (Eds.), An Advanced Treatise on Meloidogyne, Vol. I Biology and Control. North Carolina State University Graphics, Raleigh, North Carolina, pp. 249–267.
- Jones, M.G.K. and Payne, H.L. 1978. Early stages of nematode-induced giant cell formation in roots of *Impatiens balsamina*. *Journal of Nematology*, 10: 70–84.
- Jones, J.B., Zitter T.A., Momol, T.M. and Miller, S.A. 1991a. Infectious disease. In: Jones, J.B., Zitter, T.A. Momol, T.M. and Miller, S.A. (Eds.), Compendium of Tomato Diseases and Pests. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, pp. 15-119.
- Jones, J.B., Zitter T.A., Momol, T.M. and Miller, S.A. 1991b. Arthropod pests. In: Jones, J.B., Zitter, T.A. Momol, T.M. and Miller, S.A. (Eds.), Compendium of Tomato Diseases and Pests. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, pp. 120-127.
- Jones, J.T., Haegeman, A., Danchin, E.G., Gaur, H.S., Helder, J., Jones, M.G., Kikuchi, T., Manzanilla-López, R., Palomares-Rius, J.E., Wesemael, W.M.L. and Perry, R.N. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14(9): 946-961.

- Kaloshian, I., Williamson, V.M., Miyao, G., Lawn, D.A. and Westerdahl, B.B., 1996. "Resistance-breaking" nematodes identified in California tomatoes. *California Agriculture*, 50: 18-19.
- Kaloshian, I., Yaghoobi, J., Liharska, T., Hontelez, J., Hanson, D., Hogan, P., Jesse, T., Wijbrandi, J., Simons, G., Vos, P., Zabel, P., Williamson, V.M. 1998. Genetic and physical localization of the root-knot nematode resistance locus *Mi* in tomato. *Molecular and General Genetics*, 257:376–385.
- Karajeh, M., Abu-Gharbieh, W. and Masoud, S., 2005. Virulence of root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., on tomato bearing the *Mi* gene for resistance. *Phytopathologia Mediterranea*, 44: 24-28.
- Karssen, G. and Moens, M. 2006. Root-knot nematodes. In: Perry, R.N. and Moens, M. (Eds.), *Plant Nematology*, CABI, London, pp. 59-90.
- Keşenkeçi, İ., Öztürk, G. ve Evlice, E. 2002. Ülkemiz örtü altı sebze üretiminde sorun olan yeni bir kök-ur nematodu türü (*Meloidogyne exigua* Goeldi, 1887) ve diğer kök-ur nematodu türleri. IV. Sebze Tarımı Sempozyumu, 55s, Bursa.
- Keşenkeçi, I. and Evlice, E., 2003. *Dolichos lubia*, a new host of *Meloidogyne incognita* in Turkey. *Pakistan Journal of Nematology*, 21(2): 139.
- Kızmaz, M.Z., Paylan, İ.C. ve Erkan, S., 2017. DNA dizilemenin tarihsel gelişimi. *Gaziosmanpaşa Journal of Scientific Research*, 6(2): 47-53.
- Kikuchi, T., Cotton, J.A., Dalzell, J.J., Hasegawa, K., Kanzaki, N., McVeigh, P., Takanashi, T., Tsai, I.J., Assefa, S.A., Cock, P.J.A. vd. 2011. Genomic insights into the origin of parasitism in the emerging plant pathogen *Bursaphelenchus xylophilus*. *PLOS Pathogens* 7:(9) e1002219, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002219>.
- Kimura, S. and Sinha, N. 2008. Tomato (*Solanum lycopersicum*): A Model Fruit-Bearing Crop. *Cold Spring Harbor Protocols*, 3 (11): 1-9.
- Knapp, S. 2002. Solanum Section Geminata (Solanaceae). *Flora Neotropica*, 1-404.
- Lakdawalla, A., Fisher, J., Ronaghi, M., and Fan, J.B. 2013. Analytical techniques: analysis of DNA- Cancer genome sequencing. In: Gelmann, E.P., Sawyers C.L. and Rauscher F.J. (Eds.), *Molecular Oncology: Causes of Cancer and Targets for Treatment*. Cambridge University Press, UK, pp. 1-9.
- Lee, S.B., McCord, B. and Buel, E. 2014. Advances in forensic DNA quantification: A review. *Electrophoresis*, 35: 3044–3052.
- Li, H. and Durbin, R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25: 1754–1760.
- Li, X., Wu, Y., Zhang, L., Cao, Y., Li, Y., Li, J., Zhu, L. And Wu, G. 2014. Comparison of three common DNA concentration measurement methods. *Analytical Biochemistry*, 451: 18-24.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L. and Law, M. 2012. Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012: 251364.

- Lunt, D.H., Kumar, S., Koutsovoulos, G. and Blaxter, M.L. 2014. The complex hybrid origins of the root knot nematodes revealed through comparative genomics. *Peer J*, 2:e356 <https://doi.org/10.7717/peerj.356>.
- Masonbrink, R., Maier, T.R., Muppirala, U., Seetharam, A.S., Lord, E., Juvale, P.S., Schmutz, J., Johnson, N.T., Krokin, D., Mitchum, M.G., vd. 2019. The genome of the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) reveals complex patterns of duplications involved in the evolution of parasitism genes. *BMC Genomics*, 20:119, <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5485-8>.
- Mathew, R., Burke, M. and Opperman, C.H. 2019. A Draft Genome Sequence of the Burrowing Nematode *Radopholus similis*. *Journal of Nematology*, 51: DOI: 10.21307/jofnem-2019-051.
- Maxam, A.M. and Gilbert, W.A., 1977. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 74(2): 560-564.
- Melillo, M.T., Leonetti, P., Bongiovanni, M., Castagnone-Sereno, P. and Bleve-Zacheo, T. 2006. Modulation of reactive oxygen species activities and H₂O₂ accumulation during compatible and incompatible tomato-root knot nematode interactions. *New Phytologist*, 170:501–512.
- Meloidogyne incognita* (Southern root-knot nematode) representative genome, 2017. *Meloidogyne incognita* (assembly *Meloidogyne incognita_V3*). https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_900182535.1/ [Son erişim tarihi: 13.04.2020].
- Mennan, S. ve Ecevit, O. 2001. Bafra ve Çarşamba Ovaları'ndaki bazı *Meloidogyne incognita* (Nemata; Heteroderidae) popülasyonlarının ırk tespiti. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 25(1): 33-39.
- Mistanoğlu, İ., Özalp, T. and Devran, Z. 2016. Response of tomato seedlings with different number of true leaves to *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949. *Turkish Journal of Entomology*, 40 (4): 377-383.
- Mistanoğlu, İ., Özalp, T., Devran, Z. 2020. The efficacy of molecular markers associated with virulence in root-knot nematodes. *Nematology*, 22(2):147-154.
- Milligan, S.B., Bodeau, J., Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Zabel, P. and Williamson, V.M. 1998. The root-knot resistance gene Mi from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine rich repeat family of plant genes. *Plant Cell*, 10(8): 1307-1319.
- Moens, M., Perry, R.N. and Starr, J.L. 2009. *Meloidogyne* species- a diverse group of novel and important plant parasites. In: Perry, R.N., Moens, M. and Starr, J.L. (Eds.), *Root-Knot Nematodes*. CAB International, UK, pp. 1-17.
- Molinari, S. and Miacola, C. 1997. Interactions between resistant tomato cultivars and *Meloidogyne* spp. in vitro. *Nematologia Mediterranea*, 25(1): 63–71.
- Molinari, S. and Caradonna, S. 2003. Reproduction of natural and selected resistance-breaking *Meloidogyne* population on near-isogenic tomato lines. *Nematologia Mediterranea*, 31: 181-185.
- Molinari, S. and Loffredo, E. 2006. The role of salicylic acid in defense response of tomato to root-knot nematodes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68:

69–78.

- Müller, C. 1884. Mittheilungen über die unseren Kulturpflanzen schädlichen, das Geschlecht *Heterodera* bildenden Wurmer. *Landwirtschaftliche Jahrbücher*, 13: 1–42.
- Netscher, C. 1977. Observations and preliminary studies on the occurrence of resistance breaking biotypes of *Meloidogyne* spp. on tomato. *Cahiers ORSTOM, Serie Biologie*, 11: 173-178.
- Netscher, C. and Sikora, R.A. 1990. Nematode parasites on vegetables. In: Luc, M., Sikora, R.A. and Bridge, J. (Eds.), *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. CAB International, UK, pp. 231-283.
- Neveu, C., Jaubert, S., Abad, P., and Castagnone-Sereno, P. 2003. A set of genes differentially expressed between avirulent and virulent *Meloidogyne incognita* near-isogenic lines encode secreted proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 16: 1077-1084.
- Nombela, G., Williamson, V.M. and Muniz, M. 2003. The root-knot nematode resistance gene Mi.1.2 of tomato irresponsible for resistance against the whitefly *Bemisia tabaci*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16: 645-649.
- Nyczepir, A.P. and Thomas, S.H. 2009. Current and future management strategies in intensive crop production systems. In: Perry, R.N., Moens, M. and Starr, J.L. (Eds.), *Root-Knot Nematodes*. CAB International, UK, pp. 412-443.
- Opperman, C.H., Bird, D.M., Williamson, V.M., Rokhsar, D.S., Burke, M., Cohn, J., Cromer, J., Diener, S., Gajan, J., Graham, S., vd. 2008. Sequence and genetic map of *Meloidogyne hapla*: a compact nematode genome for plant parasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 105(39): 14802–14807.
- Ornat, C., Verdejo-Lucas, S. and Sorribas, F.J., 2001. A population of *Meloidogyne javanica* in Spain virulent to the *Mi* resistance gene in tomato. *Plant Disease*, 85: 271-276.
- Özalp, T. ve Devran, Z. 2018. Response of tomato plants carrying *Mi-1* gene to *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 under high soil temperatures. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 42(4): 313-322.
- Özarslandan, A. ve Elekçioğlu, İ.H. 2010. Türkiye'nin farklı alanlarından alınan kökür nematodu türlerinin (*Meloidogyne* spp.) (Nemata: Meloidogynidae) moleküler ve morfolojik tanılama ile belirlenmesi. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 34(3): 323-335.
- Paulson, R.E. and Webster, J.M. 1972. Ultrastructure of the hypersensitive reaction in roots of tomato *Lycopersicon esculentum* L., to infection by the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Physiological Plant Pathology*, 2: 227–234.
- Peralta, I., Knapp, S., and Spooner, D. 2005. New species of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*: Solanaceae) from northern Peru. *Systematic Botany*, 30: 424–434.
- Perfus-Barbeoch, L., Castagnone-Sereno, P., Reichelt, M., Fneich, S., Roquis, D., Prax, L., Cosseau, C., Grunau, C. and Abad, P., 2014. Elucidating the molecular bases of epigenetic inheritance in non-model invertebrates: the case of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Frontier in Physiology*, 6: 211. doi:

10.3389/fphys.2014.00211.

- Phillips, W.S., Howe, D.K., Brown, A.M.V., Eves-van Den Akker, S., Dettwyler, L., Peetz, A.B., Denver, D.R. and Zasada, I.A., 2017. The Draft Genome of *Globodera ellingtonae*. *Journal of Nematology*, 49(2):127–128.
- Pratx, L., Rancurel, C., Da Rocha, M., Danchin, E.G.J., Castagnone-Sereno, P., Abad, P., & Perfus-Barbeoch, L., 2018. Genome-wide expert annotation of the epigenetic machinery of the plant-parasitic nematodes *Meloidogyne* spp., with a focus on the asexually reproducing species. *BMC Genomics*, 19: 321. doi: 10.1186/s12864-018-4686-x.
- Prot, J.C. 1984. A naturally occurring resistant breaking biotype of *Meloidogyne arenaria* on tomato. Reproduction and pathogenicity on tomato cultivars Roma and Rossol. *Revue de Nématologie*, 7: 23-28.
- Rich, J.R., Dunn, R.A. and Noling, J.W. 2004. Nematicides: past and present uses. In: Chen, Z.X., Chen, S.Y. and Dickson, D.W. (Eds.), *Nematology Advances and Perspectives*, Vol. 2. CAB International, Wallingford, UK, pp. 1179–1200.
- Roberts, P.A. and Thomason, I.J. 1986. Variability in reproduction of isolates of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* on resistant tomato genotypes. *Plant Disease*, 70: 547-551.
- Roberts, P.A. 1995. Conceptual and practical aspects of variability in root-knot nematodes related to host plant resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 33: 199-221.
- Roberts, P.A. 2002. Concepts and consequences of resistance. In: Starr, J.L., Cook, R., Bridge, J. (Eds.), *Plant Resistance to Parasitic Nematodes*. CAB International, Oxon, UK. pp. 23-41.
- Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E.S., Getz, G., and Mesirov, J.P. 2011. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*, 29: 24–26.
- Ronaghi, M., Uhlen, M. and Nyren, P., 1998, A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, 281(5375): 363-365.
- Rossi, M., Goggin, F.L., Milligan, S.B., Kaloshian, I., Ullman, D.E. and Williamson, V.M. 1998. The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 9750-9754.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R., 1977. DNA Sequencing with chain-terminator inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12): 5463-5467.
- Sato, K., Kadota, Y., Gan, P., Bino, T., Uehara, T., Yamaguchi, K., Ichihashi, Y., Maki, N., Iwahori, H., Suzuki, T., Shigenobu, S., Shirasu, K. 2018. High quality genome sequence of the root-knot nematode *Meloidogyne arenaria* genotype A2-O. *Genome Announcements*, 6:(26): e00519-18.
- Seah, S., Yaghoobi, J., Rossi, M., Gleason, C.A. and Williamson, V.M. 2004. The nematode-resistance gene, *Mi-1*, is associated with an inverted chromosomal segment in susceptible compared to resistant tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 108(8): 1635–1642.

- Seah, S., Tellen, A.C. and Williamson, V.M. 2007a. Introgressed and endogenous *Mi-1* gene clusters in tomato differ by complex rearrangements in flanking sequences and show sequence exchange and diversifying selection among homologs. *Theoretical and Applied Genetics*, 114: 1289-1302.
- Seah, S., Williamson, V.M., Garcia, B.E., Mejia, L. Salus, M.S. Martin, C.T. and Maxwell, D.P. 2007b. Evaluation of a codominant SCAR marker for detection of the *Mi-1* locus for resistance to root-knot nematode in tomato germplasm. *Tomato Genetics Cooperative Reports*, 57: 37-40.
- Sedlackova, T., Repiska, G., Celec, P., Szemes, T. and Minarik, G. 2013. Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. *Biological Procedures Online*, 15(5): 1-8.
- Seid, A., Fininsa, C., Mekete, T., Decraemer, W. and Wesemael W.M.. 2015. Tomato (*Solanum lycopersicum*) and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.)—a century-old battle. *Nematology*, 17(9): 995-1009.
- Semblat, J. P., Bongiovanni, M., Wajnberg, E., Dalmasso, A., Abad, P. and Castagnone-Sereno, P. 2000. Virulence and molecular diversity of parthenogenic root-knot nematodes. *Heredity*, 1: 81-89.
- Semblat, J.P., Rosso, M.N., Hussey, R.S., Abad, P., Castagnone-Sereno, P. 2001. Molecular cloning of a cDNA encoding an amphid secreted putative avirulence protein from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14: 72-79.
- Sickle, 2019. A windowed adaptive trimming tool for FASTQ files using quality. <https://github.com/najoshi/sickle> [Son erişim tarihi: 04.09.2019].
- Siddiqi, M.R., 2000. Tylenchida Parasites of Plants and Insects, 2 nd. Editon. CAB International, Wallingford, UK., 805 p.
- Smith, P.G. 1944. Embryo culture of a tomato species hybrid. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 44: 413-416.
- Smith, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C., Kent, S.B. and Hood, L.E., 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321(6071): 674- 679.
- Stanton, J.M. and Stirling, G. 1997. Nematode as plant parasites. In: Browm, J.F. and Ogle, H.J. (Eds.), *Plant Pathogens and Plant Disease*. Armidale, Australia: University of New England. pp. 127-141.
- Stein, L.D., Bao, Z., Blasiar, D., Blumenthal, T., Brent, M.R., Chen, N., Chinwalla, A., Clarke, L., Clee, C., Coghlan, A., vd. 2003 The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: a platform for comparative genomics. *PLoS Biology*, 1(2): 166-192.
- Stirling, G.R. 1991. *Biological Control of Plant Parasitic Nematodes: Progress, Problems and Prospects*. CAB International, Wallingford, UK, 282 p.
- Somvanshi, V.S., Tathode, M., Shukla, R.N. and Rao, U. 2018. Nematode genome announcement: A draft genome for rice root-knot nematode, *Meloidogyne graminicola*. *Journal of Nematology*, 50(2): 111-116.

- Söğüt, M.A. ve Elekçioğlu, İ.H. 2000. Akdeniz Bölgesi'nde sebze alanlarında bulunan *Meloidogyne Goeldi*, 1892 (Nemata: Heteroderidae) türlerinin ırklarının belirlenmesi. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 24(1): 33–40.
- Susič, N., Koutsovoulos, G.D., Riccio, C., Danchin, E.G.J., Blaxter, M.L., Lunt, D.H., Strajnar, P., Širca, S., Urek, G. and Stare, B.G., 2020. Genome sequence of the root-knot nematode *Meloidogyne luci*. *Journal of Nematology*, 52: e2020-25. doi: 10.21307/jofnem-2020-025.
- Takken, F.L.W., Albrecht, M. and Tameling, W.I.L. 2006. Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 9:383–390.
- Talavera, M., Sayadi, S., Chiroso-Ríos, M., Salmerón, T., Flor-Peregrín, E., Verdejo-Lucas, S. 2012. Perception of the impact of root-knot nematode-induced diseases in horticultural protected crops of southeastern Spain. *Nematology*, 14: 517-527.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science*, 282 (5396): 2012-2018.
- Thomas, S.H., Schroeder, J. and Murray, L.W. 2005. The role of weeds in nematode management. *Weed Science*, 53: 923-928.
- Tian, B., Yang, J. and Zhang, K.Q., 2007. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: Populations, mechanisms of action, and future prospects. *FEMS Microbiology Ecology*, 61: 197–213.
- Tomalova, I., Iachia, C, Mulet, K. and Castagnone-Sereno, P., 2012. The *Map-1* gene family in Root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp.: A set of taxonomically restricted genes specific to clonal species. *PLoS ONE*, 7(6): 1-9.
- Trudgill, D.L. and Blok, V.C., 2001. Apomictic polyphagous root knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 39: 53–77.
- Tzortzakakis, E.A. and Gowen, S.R. 1996. Occurrence of a resistance-breaking pathotype of *Meloidogyne javanica* on tomatoes in Crete, Greece. *Fundamental & Applied Nematology*, 19: 283–288.
- Tzortzakakis, E.A., Adam, M.A.M., Blok, V.C., Paraskevopoulos, C. and Bourtzis, K. 2005. Occurrence of resistance-breaking populations of root-knot nematodes on tomato in Greece. *European Journal of Plant Pathology*, 113: 101-105.
- UNEP, 1995. Montreal Protocol on substances that deplete the ozone layer. 1994 Report of the Methyl Bromide Technical Options Committee. 1995 Assesment. UNEP, Nairobi, Kenya, 304p.
- Uysal, G. ve Söğüt, M.A. 2016a. Göller bölgesinde *Mi-1* virulent *Meloidogyne incognita* ve *Meloidogyne javanica* popülasyonlarının belirlenmesi. Türkiye 6. Bitki Koruma Kongresi, ss. 223, 5-8 Eylül, Konya.
- Uysal, G. ve Söğüt, M.A. 2016b. Göller bölgesinde sebze üretim alanlarında kök-ur nematodu türleri (*Meloidogyne* spp.)'nin karakterizasyonu ve yayılışları. Türkiye 6. Bitki Koruma Kongresi, ss. 225, 5-8 Eylül, Konya.
- Verdejo-Lucas, S., Talavera, M. and Andres, M.F. 2012. Virulence response to the *Mi-1* gene of *Meloidogyne* populations from tomato in greenhouse. *Crop protection*,

39: 97-105.

- Viaene, N., Coyne, D.L. and Kerry, B.R. 2006. Biological and cultural management. In: Perry, R.N. and Moens, M. (Eds.), *Plant Nematology*. CABI, London, pp. 346-369.
- Viglierchio, D.R. 1978. Resistant host responses to 10 California populations of *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*, 10: 224–227.
- Vinod, K.K. 2004. Total Genomic DNA Extraction, Quality Check and Quantitation. Classical and Modern Plant Breeding Techniques — A Hands on Training, pp. 109–121, 1-21 November, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, India.
- Williamson, V.M. and Hussey, R.S. 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *The Plant Cell*, 8: 1735-1745.
- Williamson, V.M., 1998. Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 277-293.
- Williamson, V.M. and Gleason, C.A. 2003. Plant-nematode interactions. *Plant Biology*, 6: 327-333.
- Williamson, V.M. and Roberts, P.A. 2009. Mechanism and genetics of resistance. In: Perry, R.N., Moens, M. and Starr, J.L. (Eds.), *Root-Knot Nematodes*. CAB International, UK, pp. 301-319.
- Wyss, U., Grundler, F.M.W. and Munch, A. 1992. The parasitic behaviour of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in root of *Arabidopsis thaliana*. *Nematologica*, 38: 98- 111.
- Xu, J., Narabu, T., Mizukubo, T., Hibi, T., 2001. A molecular marker correlated with selected virulence against the tomato resistance gene *Mi* in *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, and *M. arenaria*. *Phytopathology*, 91: 377-382.
- Yazgan, A. ve Fidan, S. 1996. Tokat koşullarına uygun kiraz domates (*Lycopersicon esculentum* Mill. var. *Cerasiforme*) çeşitlerinin belirlenmesi. GAP 1. Sebze Tarımı Sempozyumu, ss. 19-23, 7-10 Mayıs, Şanlıurfa.
- Zheng, J., Peng, D., Chen, L., Liu, H., Chen, F., Xu, M., Ju, S., Ruan, L. and Sun, M. 2016. The *Ditylenchus destructor* genome provides new insights into the evolution of plant parasitic nematodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1835):20160942. doi: 10.1098/rspb.2016.0942.

ÖZGEÇMİŞ

İBRAHİM MİSTANOĞLU

i_mistanoglu@hotmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Ege Üniversitesi
2010-2013	Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, İzmir
Lisans	Ege Üniversitesi
2006-2010	Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, İzmir

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Uzman	Tarım ve Orman Bakanlığı
2016-Devam Ediyor	Bolvadin İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, Ziraat Yüksek Mühendisi, Bolvadin, Afyonkarahisar
Araştırma Görevlisi	Ege Üniversitesi
2011-2013	Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, İzmir

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1- Mıstanoğlu, İ., Özalp, T., Devran, Z. 2020. The efficacy of molecular markers associated with virulence in root-knot nematodes. *Nematology*, 22:147-154.
- 2- Sert Çelik, E., Özalp, T., Mıstanoğlu, İ., Devran, Z. (2019). Identification of plant- parasitic nematodes associated with cut fowers. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 126: 409-420.

- 3- Devran, Z., Polat, İ., Mıstanoğlu, İ., Baysal, Ö. (2018). A novel multiplex PCR tool for simultaneous detection of three root-knot nematodes. *Australasian Plant Pathology*, 47: 389-392.
- 4- Özalp, T., Mıstanoğlu, İ., Devran, Z. (2017). The reaction of tomato plants carrying *Mi-1* gene to different inoculation densities of *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919) Chitwood, 1949. *Journal of Plant Protection Research*, 58: 124-129.
- 5- Devran, Z., Mıstanoğlu, İ., Özalp, T. (2017). Occurrence of mixed populations of root-knot nematodes in vegetable greenhouses in Turkey, as determined by PCR screening. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 124:617-630.
- 6- Devran, Z., Tülek, A., Mıstanoğlu, İ., Çiftçigil, T.H., Özalp, T. (2017). A rapid molecular detection method for *Aphelenchoides besseyi* from rice tissues. *Australasian Plant Pathology*, 46: 43-48.
- 7- Mıstanoğlu, İ., Devran, Z., Özalp, T. (2016). Comparison of reaction to *M. incognita* of tomato seedlings with different true leaves. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 40: 377-383.
- 8- Mıstanoğlu, İ., Kaşkavalcı, G., Devran, Z. (2015). İzmir ve Manisa İllerinde Bağ Alanlarında Ekonomik Öneme Sahip Bitki Paraziti Nematodların Morfolojik ve Moleküler Yöntemlerle Tanılanması. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 39: 297-309.
- 9- Kaşkavalcı, G., Peçen, A., Mıstanoğlu, İ. (2013). Organik domates yetiştiriciliğinde Kök-ur nematodları (*Meloidogyne* spp.)'na karşı bazı organik ve mikrobiyal gübrelerin nematisidal etkinlikleri. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 37:513-522.

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

- 1- Mıstanoğlu, İ., Devran, Z. (2017). Bitki paraziti nematodların beslenme stratejileri. *Türkiye Entomoloji Bülteni*, 7: 7-16.
- 2- Mıstanoğlu, İ., Devran, Z. (2016). Nematod parazitizm enzimleri ve fonksiyonları. *Türkiye Entomoloji Bülteni*, 6: 291-299.
- 3- Devran, Z., Mıstanoğlu, İ. (2015). Kök-ur Nematodları ve Konukçuları Arasındaki İlişkiler. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 29: 37-46.
- 4- Kaşkavalcı, G., Mıstanoğlu, İ. (2013). Virüs Vektörü Olarak Nematodlar. *Türkiye Entomoloji Bülteni*, 3: 45-53.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

- 1- Mıstanoğlu, İ., Özalp, T., Devran, Z. (2018). Kök-ur nematodlarında virülenslikle ilgili moleküler markırların etkinliğinin belirlenmesi. Türkiye VII. Bitki Koruma Kongresi, 14-17 Kasım, Muğla, Türkiye, cilt.-, ss. 46-46. (Sözlü Sunum)
- 2- Sert Çelik, E., Özalp, T., Mıstanoğlu, İ., Devran, Z. (2018). Identification of plant parasitic nematodes in cut flower growing areas in Antalya. 6th ASM International

Congress of Agriculture and Environment, 11-13 October, Antalya, Turkey, 31 p. (Sözlü Sunum)

3- Devran, Z., Tülek, A., Mıstanoğlu, İ., Çiftçiğil, T.H, Özalp, T. (2017). Molecular Detection of *Aphelenchoides besseyi* from rice tissues. International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies (ICAFOF), 15-17 May, Nevşehir, Turkey, p.943 (Sözlü Sunum)

4- Mıstanoğlu, İ., Özalp, T., Devran, Z. (2017). Comparison of reactions of tomato seedlings with different true leaf stages to *M. incognita*. International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies (ICAFOF), 15-17 May, Nevşehir, Turkey, p.1024. (Poster Sunumu)

5- Devran, Z., Mıstanoğlu, İ., Özalp, T., (2016). Moleküler Teknikler Kullanarak Karışık Kök-ur Nematod Popülasyonlarının Tanımlanması, Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi, 5-8 Eylül 2016 Konya, s. 255. (Sözlü Sunum)

6- Devran, Z., Polat, İ., Mıstanoğlu, İ., Göze, F.G., Söğüt, M.A. (2015). Development of the simultaneous detection of *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* by a multiplex PCR assay. 54th Annual Meeting of the Society of Nematologists, 19-24 July, East Lansing, Michigan. p.101 (Poster Sunumu)

7- Kaşkavalcı, G., Peçen, A., Mıstanoğlu, İ., (2013). Organik domates yetiştiriciliğinde Kök-ur nematodları (*Meloidogyne spp.*)'na karşı bazı organik ve mikrobiyal gübrelerin nematisidal etkinlikleri. 31st International Symposium of the European Society of Nematologists, 23-27 September, Adana-Turkey. (Sözlü Sunum)

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1- Özalp, T., Mıstanoğlu, İ., Devran, Z. (2017). Responses of Tomato Plants Carrying *Mi-1* Gene to Different Inoculation Densities of *Meloidogyne incognita*. 2. Ulusal Uygulamalı Biyolojik Bilimler Kongresi, 9-12 Temmuz 2017 Afyonkarahisar, s. 65 (Poster Sunumu)

2- Kaşkavalcı, G., Peçen, A., Mıstanoğlu, İ. (2013). Organik domates yetiştiriciliğinde Kök-ur nematodları (*Meloidogyne spp.*)'na karşı bazı organik ve mikrobiyal gübrelerin nematisidal etkinlikleri. Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, 3-5 Şubat, Antalya, s. 158. (Poster Sunumu)

3- Kaşkavalcı, G., Mıstanoğlu, İ. (2013). İzmir ve Manisa illerinde bağ alanlarında ekonomik öneme sahip bitki paraziti nematodların morfolojik ve moleküler yöntemlerle tanımlanması. Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, 3-5 Şubat, Antalya, s. 159. (Poster Sunumu)

4- Mıstanoğlu, İ., Emre, E., Peçen, A., Elmacı, A., Demirci, M., Kaşkavalcı, G. (2013). *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (Eurotiales: Trichocomaceae)'un farklı bitki paraziti nematod türleri üzerindeki etkisinin araştırılması. Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, 3-5 Şubat, Antalya, s.168. (Poster Sunumu)

Projeler

- 1- Proje Adı: “Yeni Nesil Dizileme Yöntemi Kullanılarak *Meloidogyne incognita*’nın Tam Genom Dizilenmesi”. Bilimsel Araştırma Projesi (BAP), FBG-2019-5000, Araştırmacı, Devam ediyor.
- 2- Proje Adı: “*Meloidogyne incognita* (Kofoid & White 1919) Chitwood 1949’nın Avirüent ve *Mi-1* Virüent Popülasyonları Arasındaki DNA Dizilim Farklılıklarının Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing) Yöntemiyle Belirlenmesi”. Bilimsel Araştırma Projesi (BAP), FDK-2018-3487, Araştırmacı, Doktora Tezi Devam ediyor.
- 3- Proje Adı: “Moleküler Teknikler Kullanılarak Çeltik Beyaz Uç Nematodunun (*Aphelenchoides besseyi*) Tanımlanması İçin Sistemin Oluşturulması”, Bilimsel Araştırma Projesi (BAP), FBA-2014-124, Araştırmacı, 2016
- 4- Proje Adı: “Örtüaltı hıyar yetiştiriciliğinde kök-ur nematodları (*Meloidogyne* spp. Goeldi)’na karşı Brassicaceae familyasına bağlı bazı bitkilerle biyofümigasyonun etkisi”. TAGEM-BS-13/09-01/01-07, Bursiyer, 2016.
- 5- Proje Adı: “Kök-ur nematodlarının hızlı ve doğru tanımlanması için multiplex PCR sisteminin geliştirilmesi ve Batı Akdeniz Bölgesi’nde sisteme bağlı olarak uygun ürün rotasyon modelinin oluşturulması”. TOVAG-112O116 Nolu Proje, Bursiyer, 2015.