

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***Mi-1.2* GENİ TAŞIYAN DOMATESLERİN *Meloidogyne incognita*'NIN
AVİRÜLENT VE *Mi-1* VİRÜLENT İZOLATLARINA TEPKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Nur ÜLGER

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***Mi-1.2* GENİ TAŞIYAN DOMATESLERİN *Meloidogyne incognita*'NIN
AVİRÜLENT VE *Mi-1* VİRÜLENT İZOLATLARINA TEPKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Nur ÜLGER

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Mi-1.2* GENİ TAŞIYAN DOMATESLERİN *Meloidogyne incognita*'NİN
AVİRÜLENT VE *Mi-1* VİRÜLENT İZOLATLARINA TEPKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Nur ÜLGER

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 23/06/2020 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zübeyir DEVRAN (Danışman)

Prof. Dr. Galip KAŞKAVALCI

Doç. Dr. Fatih DAĞLI

ÖZET

***Mi-1.2* GENİ TAŞIYAN DOMATESLERİN *Meloidogyne incognita*'NİN AVİRÜLENT VE *Mi-1* VİRÜLENT İZOLATLARINA TEPKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nur ÜLGER

Yüksek Lisans, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zübeyir DEVRAN

Haziran 2020; 50 sayfa

Domates, dünyada yetiştirilen en önemli sebzelerden biridir. Kök-ur nematodları, domateste ürün kayıplarına neden olmaktadır. Domatesteki *Mi-1.2* geni; *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* ve *M. arenaria* türlerine dayanıklılık sağlamaktadır. Bununla birlikte virulent kök-ur nematod popülasyonları bu geni aşabilmektedir. Bu çalışmada kontrollü koşullar altında *M. incognita*'nın avirulent G7 ve virulent V6 izolatlarına karşı *Mi-1.2* geninin ifade değişimi real time PCR (qPCR) ile incelenmiştir. Bunun için dayanıklı domates fidelerine, G7 ve V6 izolatları ile kontrollü koşullar altında ayrı ayrı inokulasyon yapılmıştır. Bitkiler, inokulasyondan 48, 96 ve 192 saat sonra sökülmüştür. Her bir tekerrürü oluşturan bitkilerin köklerinden toplam RNA izolasyonu yapılmış ve bu RNA'lerden cDNA'lar oluşturulmuştur. İki SYBR Green I primeri ve iki TaqMan probu kullanılarak örneklerin qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Real Time PCR analizlerinde, her bir örnek için üç biyolojik tekerrür kullanılmış ve ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ve değişim katsayısı değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar, avirulent ve virulent izolatlar ile inoküle edilen bitkilerin *Mi-1.2* gen ifade düzeylerinin primer setlerine ve zamana göre değişebildiği göstermiştir. Avirulent ve virulent izolatlara karşı *Mi-1.2* gen ifade değişimini daha güvenilir bir şekilde ölçmek için gelecek çalışmalarda kullanılacak materyallerin RNA seq analizleri yapılabilir.

ANAHTAR KELİMELE: *Meloidogyne incognita*, *Mi-1.2* geni, qPCR, domates

JÜRİ: Prof. Dr. Zübeyir DEVRAN

Prof. Dr. Galip KAŞKAVALCI

Doç. Dr. Fatih DAĞLI

ABSTRACT

INVESTIGATION OF RESPONSE OF TOMATOES CARRYING *Mi-1.2* GENE TO AVIRULENT AND *Mi-1* VIRULENT ISOLATES OF *Meloidogyne incognita*

NUR ÜLGER

MSc Thesis in Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Zübeyir DEVRAN

June 2020; 50 pages

Tomato is one of the most important vegetables grown in the world. Root-knot nematodes cause yield losses in tomatoes. *Mi-1.2* gene in tomato provides resistance to *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* and *M. arenaria* species. However, virulent root-knot nematode populations can overcome this gene. In this study, the expression of the *Mi-1.2* gene was investigated to avirulent G7 and virulent V6 isolates of *M. incognita* under controlled conditions using Real Time PCR (qPCR). Resistant tomato seedlings were separately inoculated with avirulent G7 and virulent V6 isolates of *M. incognita*. The plants were harvested at 48, 96 and 192 hours after inoculation. Total RNA was isolated from plant root systems of each biological replicate and cDNA was synthesized. Real time PCR was conducted with two SYBR Green I primers and two TaqMan probes. All reactions were performed in three technical replicates in one biological replicate and ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ and fold change values were calculated. Results showed the expression levels of plants inoculated with avirulent and virulent isolates could change according to primer sets and time period. RNA sequencing (RNA-seq) can be used to measure accurate expression levels of *Mi-1.2* gene between samples in further studies.

KEYWORDS: *Meloidogyne incognita*, *Mi-1.2* gene, qPCR, tomato

COMMITTEE: Prof. Dr. Zübeyir DEVRAN

Prof. Dr. Galip KAŞKAVALCI

Asst. Prof. Dr. Fatih DAĞLI

ÖNSÖZ

Domates sebzesinin beslenmede önemli bir yeri vardır. Kök-ur nematodları, geniş konukçu sayısına sahip olup, domates yetiştiriciliğinde en önemli zararlılardan biridir. Domateste kök-ur nematodlarına karşı *Mi-1.2* genini taşıyan dayanıklı çeşitler yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte virü lent kök-ur nematod popülasyonları *Mi-1.2* genini aşabilmektedirler. *Mi-1.2* geninin avirü lent ve virü lent popülasyonlara ifade düzeyinin belirlenmesi mücadele için önem taşımaktadır. Bu çalışmada, kontrollü koşullar altında dayanıklı domates fidelerine *Meloidogyne incognita*'nın avirü lent G7 ve virü lent V6 izolatları ayrı ayrı inoküle edilmiş, inokulasyondan 48 96 ve 192 saatler sonrasında bitki köklerinden RNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen örnekler cDNA'ya çevrilerek hızlı ve güvenilir bir yöntem olan Real-Time PCR ile *Mi-1.2* geninin ifade düzeyi değişimi araştırılmıştır.

Tez çalışmalarımda destekleri ve katkıları ile beni yönlendiren danışman hocam Prof. Dr. Zübeyir DEVRAN'a,

Real-Time PCR çalışmalarımda yardımcı olan Bahtiyar YILMAZ'a,

Çalışmalarımda kullandığım fideleri sağlayan Multi Tohum Tar. San. Tic. AŞ.'ye ve çalışanlarına, RNA izolasyonu ile Real-Time çalışmalarıma katkı sağlayan M.Y. Genetik Tarım Teknoloji Laboratuvar Tic. Ltd. Şti.'ne ve çalışanlarına,

Tez çalışmam boyunca yardımda bulunan bölümümüz Nematoloji Laboratuvarında Zir. Müh. Seren SARGIN'a, Dr. Elvan SERT ÇELİK'e, Zir. Yük. Müh. Tevfik ÖZALP'e, Zir. Yük. Müh. İbrahim MISTANOĞLU'na ve Mustafa ÇATALKAYA'ya,

Çalışmalarımda desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan sevgili aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. Domatesin Orijini ve Önemi	4
2.2. Kök-ur Nematodları	4
2.2.1. Yaygınlıkları	5
2.2.2. Virülene kök-ur nematodları.....	6
2.2.3. Mücadele yöntemleri.....	9
2.3. Real-Time PCR	11
2.3.1. <i>Mi-1.2</i> geninin ifadesi	12
3. MATERYAL VE METOT	13
3.1. Materyal	13
3.1.1. Domates bitkileri.....	13
3.1.2. <i>Meloidogyne incognita</i> izolatları	13
3.2. Metot	13
3.2.1. <i>Meloidogyne incognita</i> izolatlarının çoğaltılması.....	13
3.2.2. Bitkilerin <i>Meloidogyne incognita</i> izolatları ile inokülasyonu	14
3.2.3. Bitkilerin köklerinden RNA izolasyonu	14
3.2.3.1. RNA miktarlarının belirlenmesi	14
3.2.3.2. RNA'ların cDNA'ya çevrilmesi	15

3.2.4. Real-Time alışmaları	15
3.2.5. Sonuçların analizi.....	17
4. BULGULAR.....	18
4.1. <i>Meloidogyne incognita</i> İzolatlarının oğaltılması ve İnokülasyonu	18
4.2. Bitki RNA Miktarlarının Belirlenmesi	18
4.3. cDNA’ların Elde Edilmesi	19
4.4. Real-Time PCR alışmaları.....	20
4.4.1. SYBR Green I ile Real Time PCR.....	20
4.4.2. TaqMan Prob ile Real Time PCR	30
5. TARTIşMA	33
6. SONUÇLAR	39
7. KAYNAKLAR	43
ÖZGEçMİş	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Mi-1.2* geni taşıyan domateslerin *Meloidogyne incognita*’nın avirulent ve *Mi-1.2* virulent izolatlarına tepkilerinin araştırılması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

23/06/2020

Nur ÜLGER



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

<	: Küçüktür
>	: Büyüktür
±	: Artı-eksi
≥	: Büyük eşittir
°C	: Santigrat derece
∞	: Sonsuz
M	: Molarite
C _T	: Eşik döngü değeri

Kısaltmalar

μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
bp	: Base pair
cDNA	: Complementary DNA
DEGs	: Differentially Expressed Genes
dk	: Dakika
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
dsDNA	: Double Stranded Deoxyribonucleic Acid
F primer	: Forward primer
FAO	: Food and Agriculture Organization
J ₂	: İkinci dönem juvenile (larva)
kb	: Kilobaz
meJA	: Metil Jasmonate

mL	: Mililitre
mRNA	: Messenger Ribonucleic Acid
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
PCR	: Polimerase Chain Reaction
qPCR	: Quantitative Polimerase Chain Reaction
qRT-PCR	: Real-Time reverse transcription PCR
R primer	: Reverse primer
R-genleri	: Dayanıklılık (Resistance) genleri
RNA	: Ribonucleic acid
RNAseq	: Ribonucleic acid sequencing
ROS	: Reactive Oxygen Species
rpm	: Revolutions per minute
siRNA	: Small interfering Ribonucleic Acid

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4. 1. Seval F1 ve Tueza F1 bitkilerinde MetMi1.2F/MetMi1.2R primer seti ile elde edilen amplifikasyon eğrileri	21
Şekil 4. 2. Seval F1 ve Tueza F1 bitkilerinde Mi1.2F/Mi1.2R primer seti ile elde edilen amplifikasyon eğrileri.....	22
Şekil 4. 3. Seval F1 ve Tueza F1 bitkilerinde Mmi1.2F/Mmi1.2R primer seti ile elde edilen amplifikasyon eğrileri	23
Şekil 4. 4. Seval F1 ve Tueza F1 bitkilerinde Fj-M1.2F/Fj-M1.2R primer seti ile elde edilen amplifikasyon eğrileri.....	24
Şekil 4. 5. Seval F1 ve Tueza F1 bitkilerinde Mi-1.2PP F/Mi-1.2PP R primer seti ile elde edilen amplifikasyon eğrileri	25
Şekil 4. 6. Seval F1 ve Tueza F1 bitkilerinde Mi-1.2JEB F/Mi-1.2JEB R primer seti ile elde edilen amplifikasyon eğrileri	28
Şekil 4. 7. Seval F1 ve Tueza F1 bitkilerinde Ls_GAPDH-F/Ls_GAPDH-R primer seti ile elde edilen amplifikasyon eğrileri.....	29

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan <i>M. incognita</i> izolatları ve orijinleri	13
Çizelge 3.2. <i>Mi-1.2</i> gen ifade değişiminin belirlenmesi için yapılan denemenin planı.....	14
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primerler ile problemlerin dizilimleri, fragment uzunlukları ve referansları	15
Çizelge 3.4. SYBR Green I ile yapılan qPCR reaksiyonu bileşenleri ve miktarları	16
Çizelge 3.5. qPCR analiz programı.....	16
Çizelge 3.6. Prob ile yapılan qPCR reaksiyonu bileşenleri ve miktarları.....	17
Çizelge 3.7. qPCR analiz programı	17
Çizelge 4.1. RNA örneklerinin nanodrop ile farklı dalga boylarında ölçüm değerleri.....	19
Çizelge 4.2. Seval F1 ve Tueza F1 bitkilerinde MetMi1.2F/MetMi1.2R primer seti ile elde edilen C_T değerleri	20
Çizelge 4.3. Seval F1 ve Tueza F1 bitkilerinde Mi1.2F/Mi1.2R primer seti ile elde edilen C_T değerleri.....	22
Çizelge 4.4. Seval F1 ve Tueza F1 bitkilerinde Mmi1.2F/Mmi1.2R primer seti ile elde edilen C_T değerleri.....	23
Çizelge 4.5. Seval F1 ve Tueza F1 bitkilerinde Fj-M1.2F/Fj-M1.2R primer seti ile elde edilen C_T değerleri.....	24
Çizelge 4. 6. Seval F1 ve Tueza F1 bitkilerinde Mi-1.2PP F/Mi-1.2PP R primer seti ile elde edilen C_T değerleri	25
Çizelge 4. 7. Seval F1 ve Tueza F1 bitkilerinde Mi-1.2JEB F/Mi-1.2JEB R primer seti ile elde edilen C_T değerleri.....	26
Çizelge 4. 8. Seval F1 ve Tueza F1 bitkilerinde Ls_GAPDH-F/Ls_GAPDH-R primer seti ile elde edilen C_T değerleri.....	27
Çizelge 4. 9. <i>Meloidogyne incognita</i> 'nın G7 ve V6 izolatları ile inokle edilen domates bitkilerinden elde edilen RNA'ların Mi1.2F/Mi1.2R primerlerin SYBR Green I boyası ile qPCR'da edilen ortalama C_T , ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ ve değişim katsayısı değerleri.....	29

Çizelge 4. 10. <i>Meloidogyne incognita</i> 'nın G7 ve V6 izolatları ile inokle edilen domates bitkilerinden elde edilen RNA'ların Fj-M1.2F/Fj-M1.2R primerlerin SYBR Green I boyası ile qPCR'da elde edilen ortalama C_T , ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ve değişim katsayısı değerleri	30
Çizelge 4. 11. <i>Meloidogyne incognita</i> 'nın G7 ve V6 izolatları ile inokle edilen domates bitkilerinden elde edilen RNA'ların Mi1.2-F/Mi1.2-R primerleri ve UPL prob ile qPCR'da elde edilen ortalama C_T , ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ve değişim katsayısı değerleri.....	31
Çizelge 4. 12. <i>Meloidogyne incognita</i> 'nın G7 ve V6 izolatları ile inokle edilen domates bitkilerinden elde edilen RNA'ların Ls_Mi1.2-F/Ls_Mi1.2-R primerleri ve Ls_Mi1.2-P probu ile qPCR'da elde edilen ortalama C_T , ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ve değişim katsayısı değerleri	32

1. GİRİŞ

Domates, Solanaceae familyasına ait olan ekonomik açıdan önemli sebzelerdendir. Orta ve Güney Amerika kökenli tek yıllık bir bitki olan domatesin muhtemel atasının yabani çeri domatesi olduğu (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) belirtilmiştir (Jenkins 1948; Akkurt vd. 2013). 16. yüzyılda Avrupa Akdeniz ülkelerinde yaygınlaşmasının ardından 20. yüzyıla gelindiğinde dünyanın birçok yerinde ekimi yapılmaktadır (Yazgan ve Fidan 1996). FAO 2017 verilerine göre dünyada 117 milyon ton domates üretimi gerçekleştirilmektedir. Çin, toplam dünya domates üretiminin %31’lik kısmını karşılamaktadır. Türkiye, %7,2’lik üretim ile dünyada 4. sıradadır. Domates taze olarak veya gıda sanayisinde soyulmuş, doğranmış, dondurulmuş, konserve, salça, ketçap, turşu gibi çeşitli şekillerde kullanılmaktadır (Causse vd. 2016).

Domates yetiştiriciliğinde verimi etkileyen önemli hastalık etmenleri ve zararlılar bulunmaktadır. Kök-ur nematodları en önemli zararlı grubunu oluşturarak dünya domates üretiminde % 42-54’lik verim kaybına sebep olmaktadır (Netscher ve Sikora 1990). Dünyada kök-ur nematodlarının 98 türü tanımlanmıştır (Jones vd. 2013). *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* tropik bölgelerde, *M. hapla*, *M. chitwoodi* ve *M. fallax* ise ılıman iklim bölgelerinde yaygın türler olduğu rapor edilmiştir (Netscher ve Sikora 1990; Eisenback ve Triantaphyllou 1991; Adam vd. 2007).

Kök-ur nematodları ikinci larva döneminde (J₂) yumurtadan çıkarak bitki köklerine giriş yapmaktadır. Bitki köküne giriş yaptıktan sonra hücreler arasında hareket ederek iletim demetlerine ulaşır ve kendilerini sabitler. Nematod, iletim demeti çevresinden seçilmiş hücrelerden beslenmeye başlar. Bu hücreler nematod tarafından çok çekirdekli hücrelere dönüştürülür. Bu hücreler ‘dev hücre’ olarak adlandırılır ve nematodun gelişimi boyunca beslenme bölgesi olarak kullanılır (Williamson 1998; Perry vd. 2009). Köklerde beslenmeleri sonucu ur oluşumuna sebep olurlar. Uurlar, bitkinin topraktan su ve besin alımını engellediği için bitkinin sararmasına, solmasına ve yoğun enfeksiyondan ölmesine neden olur. Ayrıca köklerdeki yaralar toprak kökenli patojenlerin bitkiye girişine imkân sağlar (Williamson ve Hussey 1996; Jones vd. 2013).

Kök-ur nematodlarının neden olduğu zararları azaltmak için kültürel, biyolojik, fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Kültürel yöntemlerden olan konukçu dayanıklılığı, kök-ur nematodlarına karşı en etkili ve çevre dostu yöntem olarak bilinmektedir (Devran ve Söğüt 2014). Dayanıklı çeşitler, uygulama kolaylığı sağlayarak özel alet ve ekipman gerektirmeden çevre dostu bir çözüm sunmaktadır (Lopez-Perez vd. 2006; Cortada vd. 2009; Verdejo-Lucas vd. 2009).

Domateste kök-ur nematodlarına karşı dayanıklılık dominant olan *Mi-1.2* geni tarafından sağlanmaktadır. Domatesin yabani türü olan *Solanum peruvianum*'da (PI128657) bulunmuş ve kültür formu domatese embriyo kurtarma tekniği ile aktarılmıştır (Smith 1944). Kök-ur nematodlarının en yaygın üç türü olan *M. incognita*, *M. javanica* ve *M. arenaria*'ya karşı dayanıklılık sağlamaktadır. *Mi-1.2* geninin altı adet homoloğu olduğu (*Mi-1.1*, *Mi-1.3*, *Mi-1.4*, *Mi-1.5*, *Mi-1.6* ve *Mi-1.7*) ve dayanıklılığın *Mi-1.2* geni tarafından sağlandığı rapor edilmiştir (Milligan vd. 1998). Kök-ur nematodlarına karşı koruma sağlayan *Mi-1.2* geni, yüksek toprak sıcaklığında (> 28°C) kırılmakta (Dropkin 1969; Milligan vd. 1998; Özalp ve Devran 2018) ve virüent kök-ur nematod popülasyonları tarafından aşılabilmektedir (Devran ve Söğüt 2010; Verdejo-Lucas vd. 2013). Dünyanın farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda virüent kök-ur nematod popülasyonları bulunmuştur (Roberts 1995; Ornat vd. 2001; Tzortzakakis vd. 2005; Iberkleid vd. 2014). Türkiye'de Batı Akdeniz Bölgesi'nde yürütülen çalışmada 7 adet *M. incognita* ve 6 adet *M. javanica* popülasyonunun *Mi-1* virüent olduğu belirlenmiştir (Devran ve Söğüt 2010). Virüent popülasyonların yaygınlaşması nedeniyle bunlarla mücadele konusunda çalışmalar yürütülmüştür (Çatalkaya ve Devran 2019). Virüent ve avirüent *M. incognita* izolatlarının *Mi-1.2* geni taşıyan dayanıklı bitkide oluşturacakları tepkilerin real time ile belirlenmesi konusunda sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır (Seiml-Buchinger vd. 2019).

Real-Time PCR (qPCR), gen ifade analizleri için yaygın olarak kullanılan hassas ve spesifik bir metottur (Bustin 2002; Jensen 2012). Ayrıca qPCR yöntemi diğer yöntemlere kıyasla, zaman kazandıran, uygun maliyetli ve yaygın kullanılan bir yöntemdir (Udvardi vd. 2008). qPCR, *Mi-1.2* geninin ifade değişiminin belirlenmesinde kullanılmıştır. Seiml-Buchinger vd. (2019) domates bitkisinde *M. incognita* etkileşimi, nematod üreme kapasitesi ve jasmonoic asitin etkisini araştırılmışlar ve stressiz ortamda

dayanıklı ve hassas bitkilerde *Mi-1.2* geni ifade düzeyinin önemli bir fark göstermediği ve dayanıklılığın sadece *Mi-1.2* genine bağlı olmadığı, dayanıklılık üzerinde inokülasyonu yapılan nematod yoğunluğunun da büyük etkisi olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, *M. incognita*'nın avirüent izolatu (G7) ile virüent izolatu'nun (V6) kontrollü koşullar altında *Mi-1.2* geni taşıyan dayanıklı domates bitkisinde inokülasyon yapıldıktan belirli süreler sonra bu genin ifadesindeki değişiminin qRT-PCR ile belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. KAYNAK TARAMASI

2.1.Domatesin Orijini ve Önemi

Domates, Solanaceae familyasının *Lycopersicon* cinsine aittir ve anavatanı Peru'dur (Rick 1973; Taylor 1986; Gebremariamd 2015). Amerika kıtasının dışında domates ilk olarak 1544 yılında İtalya'da tespit edilmiştir (Razdan 2006). 16. yüzyılda Güney Avrupa'da sebze olarak tüketilmeye başlanmıştır (Peralta 2007).

FAO 2016 dünya sebze üretimi istatistiklerine göre, 1,1 milyar ton olan yaş sebze üretiminin %13'lük payı ile domates, dünya genelinde en çok üretilen sebze türüdür. Çin, dünya domates üretiminin 56,4 milyon tonluk üretimi ile %31'lik kısmını karşılayarak birinci sırada yer almaktadır. Çin'i, 18,4 milyon ton ile Hindistan, 13,03 milyon ton ile ABD, 12,6 milyon tonluk üretimi ile ise Türkiye takip etmektedir (FAO 2018).

Domates insan beslenmesinde önemli bir yere sahip olup, folik asit, vitamin C ve potasyum besin içerikleri bulunmaktadır (Beecher 1998). Domates sofralık veya gıda endüstrisinde dondurulmuş, konserve, salça, ketçap, turşu olmak üzere farklı şekillerde tüketilmektedir.

2.2. Kök-ur Nematodları

Kök-ur nematodları, 'elma şeklindeki dişi' anlamına gelen *Meloidogyne* cinsine aittir (Perry 2009). Yüksek adaptasyon özelliğine sahip obligat bitki parazitleri içerisinde önemli bir polifag grubu oluştururlar. Bitki parazit nematodları arasında ekonomik açıdan en önemli grup olan kök-ur nematodları dünyanın geneline yayılmış olup, tek yıllık ve çok yıllık olmak üzere 2000'den fazla bitkiye zarar verirler (Bleve-Zacheo 2007).

Kök-ur nematodları yaşam döngüsü boyunca morfolojik değişikliklere uğrar. Yumurtadan ikinci dönem larva olarak çıkan kök-ur nematodu larvaları, konukçu bitkinin kök ucunu arayarak buradan bitkiye giriş yapar. Kök dokusu içinde uygun beslenme yerini bulana kadar dolaşır ve uygun beslenme yerini bulduklarında

kendilerini sabitler ve beslenmeye devam ederler, dişi birey yumurta bıraktıktan sonra ölürler. Erkek bireyler ise kökü terk ederek toprağa geçerler (Wyss 1992).

Kök-ur nematodlarının bitkide beslenmesi sonucu dev hücreler oluşur (Williamson 1998). Oluşturdukları urlar ile iletim demetlerine zarar vererek konukçu bitkinin topraktan su ve besin alımını engellerler. Yoğun enfeksiyon sonucunda bitki ölebilir. Ayrıca sitiletleri ile bitki köklerinde açtıkları yaralardan toprak kökenli patojenlerin bitkiye girişine yardımcı olurlar (Siddiqui vd. 2014).

Meloidogyne türlerinin yaşam döngülerini toprak sıcaklığı, toprak yapısı, toprak nemi ve konukçu bitkiye bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Toprak sıcaklığı 26-27°C’de hayat döngüsünü 28 günde tamamlamaktadırlar (Bleve-Zacheo vd. 2007).

2.2.1. Yaygınlıkları

Kök-ur nematodları, sabit endoparazit beslenme özelliğine sahip nematod gruplarının en önemlisidir. Konukçularının iletim demetlerinde beslenmeleri sonucu ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Dünyada 98 adet kök-ur nematod türü tanımlanmıştır (Jones vd. 2013). *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* tropik bölgelerde, *M. hapla*, *M. chitwoodi* ve *M. fallax* ise ılıman iklim bölgelerinde yaygın türler olarak rapor edilmiştir (Netscher ve Sikora 1990; Eisenback ve Triantaphyllou 1991; Adam vd. 2007).

Türkiye’de kök-ur nematodlarının yaygınlıkları üzerine yürütülen çalışmalarda; *M. hapla* (Diker 1959), *M. incognita* (Yüksel 1966), *M. javanica* (Ertürk ve Özkut 1973), *M. thamesi* (Ertürk ve Özkut 1973), *M. arenaria* (Yüksel 1974), *M. artellaria* (Di Vito vd. 1994) ve *M. chitwoodi* (Özarslandan vd. 2009) belirlenmiştir. Son yıllarda Türkiye’de yeni bir kök-ur nematod türü belirlenmiştir. Önceki çalışmalarda *M. ethiopica* (Aydınlı vd. 2013) olarak adlandırılan kök-ur nematod türü, daha sonra *M. luci* olarak tanımlanmıştır (Geriç Stare vd. 2017).

Türkiye’nin farklı bölgelerinde yapılan surveylerde türlerin yaygınlıkları konusunda bilgiler edinilmiştir. Pehlivan ve Kaşkavalı (1992), Balıkesir, Bursa Çanakkale, İzmir ve Manisa illerinde sanayi domatesi üretim alanlarında yaptıkları surveylerde *M. incognita* ve *M. javanica*’nın bulunduğunu bildirmiştir. Başka bir

çalışmada Kaşkavalı ve Öncüer (1999), Aydın ili yazlık sebze üretim alanlarında *M. incognita*, *M. javanica* ve *M. hapla*'nın varlığını rapor etmişlerdir. Adana, Hatay, İçel ve Antalya illeri sebze üretim alanlarında *M. javanica*, *M. incognita* ve *M. hapla* tespit edilmiştir (Söğüt ve Elekçioğlu 2000). Mennan ve Ecevit (2001), Bafra ve Çarşamba ovaları sebze üretim alanlarında *M. incognita*'nın bulunduğunu bildirmiştir. Batı Akdeniz Bölgesi'nde örtü altında sebze üretim alanlarında *M. incognita*, *M. javanica* ve *M. arenaria* tespit edilmiştir (Devran ve Söğüt 2009). Devran vd. (2009) Niğde ili patates üretim alanlarında *M. chitwoodi*'nin bulunduğunu bildirmiştir. Tokat iline bağlı Niksar ve Erbağa ilçelerindeki sebze üretim alanlarında *M. incognita* bulunduğu rapor edilmiştir (Akyazı ve Ecevit 2011). Aydın (2014), Orta Karadeniz Bölgesi'nde *M. arenaria*, *M. ethiopica*, *M. javanica* ve *M. incognita*'nın bulunduğu bildirilmiştir. Uysal vd. (2017), Türkiye Göller Bölgesi'nde *M. incognita*, *M. hapla*, *M. javanica* ve *M. arenaria* bulunduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmalar *M. incognita*'nın Türkiye'de en yaygın kök-ur nematod türü olduğunu göstermektedir.

2.2.2. Virulent kök-ur nematodları

Dayanıklı bitkilerde, hassas bitkilerde olduğu gibi yaşam döngülerini tamamlayabilen popülasyonlar virulent; hassas bitkide yaşam döngüsünü tamamlayıp, dayanıklı bitkide gelişme ve üreme yeteneği gösteremeyen popülasyonlar 'avirulent' olarak ifade edilmektedir (Roberts 2002). Kök-ur nematodları, hassas konukçularında beslenme gerçekleştirerek köklerde ur oluşumuna sebep olmaktadır (Eisenback ve Triantaphyllou 1991). Dayanıklı bitkiler, nematod üremesini en az düzeyde tutar ya da tamamen engeller (Cook ve Evans 1987). *Mi-1* virulent popülasyonlar, doğada kendiliğinden olabileceği gibi, avirulent popülasyonların *Mi-1* geni taşıyan domates çeşitlerine sürekli maruz bırakılması sonucunda da oluştuğu belirlenmiştir (Jarquin-Barberena vd. 1991; Castagnone-Sereno vd. 1993; Roberts 1995). *Mi-1* virulent popülasyonlar, Amerika (Kaloshian vd. 1996), Tunus (Eddaoudi vd. 1997), İspanya (Ornat vd. 2001), Fransa (Jacquet vd. 2005), Türkiye (Devran ve Söğüt 2010) ve İsrail (Iberkleid vd. 2014)'de rapor edilmiştir.

Jarquin-Barberena vd. (1991), *M. incognita*'ya ait dört farklı izolat üzerinde yaptıkları çalışmada bir tanesinin *Mi-1* genine karşı doğal virulent olduğunu tespit etmişlerdir. Bu *Mi-1* virulent popülasyonunu hem hassas hem de dayanıklı domates

çeşitlerinde çoğaltmaları sonucu (9 döl sonra) virülensliklerinde azalma olmadığını tespit etmiştir. Ayrıca, avirulent bir *M. incognita* popülasyonun, *Mi-1* genine sahip domates bitkisi üzerindeki yapay seleksiyonu sonucunda virulent olduğunu rapor etmişlerdir.

Castagnone-Sereno vd. (1993), doğal virulentlik gösteren *M. incognita* popülasyonu ile selektif çoğaltma sonucu virulentlik kazandırılan bir diğer *M. incognita* popülasyonlarını, 18 döl boyunca dayanıklı ve hassas domates çeşitleri üzerinde çoğaltmışlardır. Elde ettikleri yumurta kümesi sayılarına göre doğal ve selektif virulent popülasyonlarının üremelerinde küçük değişiklikler olmasına rağmen, popülasyonlardan hiçbirinin *Mi-1* virulent özelliklerini kaybetmediklerini bildirmişlerdir.

Roberts (1995), daha önce domates yetiştiriciliğinin yapılmadığı bir arazide, *Mi* geni taşıyan domates çeşitlerinde enfeksiyona neden olan doğal virulent kök-ur nematod popülasyonları olduğunu belirlemişlerdir.

Kaloshian vd. (1996) Domateslerde dayanıklılığı kıran nematod türleri ile ilgili yapmış oldukları çalışmada, 2 farklı araziden alınan *M. incognita* popülasyonlarının *Mi* geni taşıyan domates bitkilerini enfekte ettiklerini tespit etmişlerdir.

Ornat vd. (2001), 14 adet kök-ur nematodu popülasyonun, hassas ve dayanıklı domates çeşitleri üzerindeki gelişimini takip etmişlerdir. Bu popülasyonlardan yalnız *M. javanica* türüne ait bir popülasyonunun hassas domatesler yanında dayanıklı domateslerde de geliştiğini bu nedenle virulent olduğunu bildirmişlerdir.

Tzortzakakis vd. (2005), 9 kök-ur nematod popülasyonunun virülensliğini saksı denemeleri ile araştırmışlar ve *M. incognita*'ya ait bir, *M. javanica*'ya ait beş popülasyonun dayanıklı domates çeşitleri üzerinde gelişim gösterdiğini ve Yunanistan'da ilk kez virulent *M. incognita* popülasyonunun tespit edildiğini belirtmişlerdir.

Jacquet vd. (2005), heterozigot dayanıklı bitkilerin, homozigot dayanıklı bitkilere göre virulent *M. incognita*'nın çoğalmasını engellemede daha etkin olduğunu bildirmişlerdir. Bu durumu, *Mi-1* genin doz etkisine bağlı olduğunu ve nematod

üremesinde özellikle heterozigot domates bitkilerinde genetik arka planın önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Cortada vd. (2009), sera koşullarındaki saksı denemelerinde *Mi-1* geni taşıyan 4 domates anacının, *M. incognita*, *M. javanica* ve *M. arenaria* türlerine ait yedi farklı kök-ur nematod popülasyonuna karşı tepkilerinde, bir tane domates anacının tüm kök-ur nematodu popülasyonlarının çoğalmasını baskıladığını, bir tanesinin de orta düzeyde dayanıklılık gösterdiğini geriye kalan iki anacın ise yeterli koruma sağlamadığını belirtmişlerdir.

Devran ve Söğüt (2010), Batı Akdeniz Bölgesi'nden topladıkları 95 kök-ur nematod izolatını kontrollü iklim ortamında hassas ve dayanıklı domates çeşitleri üzerindeki gelişimini araştırmışlar ve *M. incognita*'ya ait 7 ve *M. javanica*'ya ait 6 popülasyonun *Mi-1* geni taşıyan çeşit üzerinde çoğaldığını ve bunların virü lent popülasyonlar olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışma Türkiye'de virü lent kök-ur nematodlarının tespiti üzerine yapılan ilk araştırmadır.

Verdejo-Lucas vd. (2012), 29 adet *Meloidogyne* spp. popülasyonunun dayanıklı ve hassas domates çeşitlerinde üreme oranlarını karşılaştırmışlar ve bu popülasyonların % 48'inin *Mi-1* genine karşı virü lent olduğunu bulmuşlardır.

Iberkleid vd. (2014), doğal seleksiyon sonucunda *Mi-1* genini kıran virü lent kök-ur nematod popülasyonlarının, 3 döl süresince hassas ve dayanıklı bitkilerde ayrı ayrı çoğaltarak bu popülasyonların dayanıklı ve hassas domateslerdeki enfeksiyon özelliklerini incelemişlerdir. Popülasyonların, hem hassas hem de dayanıklı domateslerde enfeksiyon oluşturdıkları ve *Mi-1* genini kırabilme yeteneğini kaybetmediklerini belirtmişlerdir. Avirü lent popülasyonların bitki köklerindeki yumurta paketi sayıları hassas çeşitlerde yüksek, heterozigot dayanıklı çeşitte az, homozigot dayanıklı çeşitlerde ise neredeyse hiç yumurta paketi olmadığını belirtmişlerdir. Virü lent kök-ur nematod popülasyonlarının ise hassas, heterozigot, homozigot dayanıklı domates çeşitlerinin hepsinin köklerinde yumurta paketi sayılarının yüksek olduğunu ve bitkide başarılı bir şekilde ürediklerini tespit etmişlerdir.

Çataalkaya ve Devran (2019), 2015-2016 yıllarında yaptıkları çalışmada, solarizasyon ile diğer metodların beraber uygulanmasını nematod ile daha iyi mücadele sağladığı ve seralarda yetiştirilen homozigot ve heterozigot dayanıklı domates bitkilerin *Mi-1* virulent popülasyonların karşı performanslarında değişiklik olmadığını belirtmişlerdir.

2.2.3. Mücadele yöntemleri

Dünya genelinde nematodların neden olduğu yıllık 100 milyar Euro'dan fazla kaybın büyük bir kısmına *Meloidogyne* türleri sebep olmaktadır (Bird ve Kaloshian, 2003). Bu kayıpları, en aza indirmek için farklı mücadele yöntemleri kullanılmaktadır. Solarizasyon, toprağın şeffaf plastik naylon ile kapatılarak güneşten gelen ısı ve radyasyon ışınları aracılığıyla toprak sıcaklığının artırılarak toprak kökenli patojenlerin, yabancı otların ve nematodların kontrol edilmesidir (Katan 1981). Solarizasyon üzerine ilk çalışma İsrail'de yapılmıştır (Katan 1981). Solarizasyon kök-ur nematod popülasyonu sayısını önemli ölçüde düşürmektedir (Ostrec ve Grubisic 2003). Toprak kökenli patojenlerle mücadele için toprak solarizasyonu tek başına kullanıldığı gibi farklı yöntemlerle beraber de kullanılmaktadır (Katan vd. 1996). Nematodları kontrol altına almak için farklı kimyasallar solarizasyonla birlikte kombinasyon yapılarak kullanılabilir.

Biyolojik mücadele, son yıllarda kimyasal uygulamaların yerine kullanılmak istenen bir mücadele yöntemidir. Kimyasalların, toprakları ve su kaynaklarını kirletmesi, insan sağlığına zarar vermesi nedeniyle biyolojik mücadele yöntemleri ön plana çıkmaktadır. Biyolojik mücadele, kimyasalların aksine kalıntı sorunu oluşturmamaktadır. Özellikle bakteri ve funguslar orijinli biyolojik ajanlar, nematodlara karşı kullanılmaktadır (Keren-Zur vd. 2000; Walia vd. 2000; Anastasiadis 2008). Bununla birlikte biyolojik preparatlar, değişik özellikleri nedeniyle henüz istenilen uygulama düzeyine ulaşamamıştır.

Kimyasallar, nematodlarla mücadelede yaygın şekilde kullanılmaktadır ve genel olarak yüksek moleküllü toprak fumigantları, karbamatlı ya da organik fosforlu bileşiklerdir (Bakker 1993; Whitehead 1997). Ağır metal içerikli bu ilaçlar zamanla toprağın kirlenmesine, taban suyuna geçerek çevre ve insan sağlığına zarar

vermektedirler. Bu nedenle, günümüzde birçok nematisitin kullanımı sınırlandırılmış ve bazıları ise yasaklanmıştır (Devran ve Söğüt 2010; Wesemael vd. 2011). Bu sebeple kök-ur nematodlarına karşı alternatif mücadele stratejilerinin uygulanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Dayanıklı çeşit kullanımı kök-ur nematodlarını kontrol etmek için en ekonomik ve çevre dostu yöntem olarak bilinmektedir (Ho vd. 1992; Devran ve Söğüt 2010; Landi vd. 2018). Sebzelerden özellikle domateste kök-ur nematodlarına karşı dayanıklı çeşitler ticari olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Domateste, kök-ur nematodların dayanıklılık 1940'lı yıllarda *S. peruvianum* (PI128657)'da bulunmuş (Bailly 1941) ve embriyo kurtarma tekniği ile *S. esculentum*'a aktarılmıştır (Smith 1944). *Mi-1* geni günümüzde en iyi karakterize edilmiş kök-ur nematodlarına dayanıklılık sağlayan gen olup, karşılaştırmalı çalışmalarda kullanılmak üzere iyi bir veri oluşturmaktadır. Domates genomunun 6. kromozomunun kısa kolunda 650 kb'lik bölgede bulunan ve 7 homolog genleri (*Mi-1.1*, *Mi-1.2*, *Mi-1.3* ve *Mi-1.4*, *Mi-1.5*, *Mi-1.6* ve *Mi-1.7* bulunmaktadır (Kaloshian vd. 1998). Yapılan çalışmalar sonucunda, dayanıklılığın *Mi-1.2* tarafından sağlandığı gösterilmiştir (Milligan vd. 1998). Bu dayanıklılık gen motifi, CC-NBS-LRR'dır (Milligan vd. 1998; Hwang ve Williamson 2003). *Mi-1* geni, *M. incognita*, *M. javanica* ve *M. arenaria* türlerine karşı dayanıklılık sağlamaktadır (Williamson 1998). *Mi-1.2* geni *Meloidogyne* türlerine karşı sağladığı dayanıklılığa ek olarak, patates afidinin [*Macrosiphum euphorbiae* (Thomas)] belirli biyotiplerine (Rossi vd. 1998) ve pamuk beyazsineğinin [*Bemisia tabaci* (Gennadius)] B ve Q biyotiplerine (Nombela vd. 2003) dayanıklılık sağladığı tespit edilmiştir. *Mi-1.2*, bu üç farklı organizmaya dayanıklılık gösteren ilk bitki geni olarak saptanmıştır (Maleita vd. 2011). *Mi-1.2* geninin sağladığı dayanıklılığı olumsuz etkileyen faktörler; yüksek toprak sıcaklığında kırılması (Dropkin 1969; Sorribas vd. 2005; Özalp ve Devran 2018) ve virulent kök-ur nematodlarının gelişmesidir (Kaloshian vd. 1996; Devran ve Söğüt 2010). Bazı virulent popülasyonlar hem doğal olarak hem de sürekli olarak dayanıklı bitki yetiştirilmesi ile de ortaya çıkabilirler (Jarquin Barberena vd. 1991; Roberts 1995; Omat vd. 2001; Castagnone-Sereno 2002). Laboratuvar ortamında yapılan çalışmalarda *M. incognita*'nın avirulent bir popülasyonunun sürekli dayanıklı bitki üzerinde yetiştirilmesiyle virulent popülasyon elde edilmiştir (Jarquin-Barberena vd. 1991; Xu vd. 2001). Verdejo-Lucas vd. (2009), yapmış oldukları çalışmada, sürekli dayanıklı çeşide maruz bırakılan avirulent

popülasyonların virulent özelliği kazandığı, sürekli olarak duyarlı bitkiye maruz bırakılan virulent popülasyonların ise avirulent hale geldiklerini, virulensliklerini kaybettiklerini rapor etmişlerdir.

2.3. Real-Time PCR

Real time PCR günümüzde gerçek zamanlı nükleik asit miktarını belirlemek adına yaygın olarak kullanılan moleküler bir metottur. Tek bir tüp içerisinde anlık bulunan ürün miktarı çeşitli floresan boya veya probalar kullanılarak ölçülen ışınım miktarı ile belirlenmektedir (Rebrikov ve Trofimov 2006). Çift zincirli DNA (dsDNA) 'nın amplifikasyonunu ölçmede SYBR Green I floresan boyası yaygın olarak kullanılır. Oluşan çift zincirli DNA sarmalının arasına girerek ışınım yapar ve eşzamanlı olarak amplifikasyon miktarının monitörden gözlemlenebilmesine olanak sağlar. Ürün miktarı arttıkça floresan ışınım miktarı artar. Bu boya, sadece özgül bölgelere bağlanmayarak çeşitli istenmeyen dsDNA parçaları ve primer dimeri oluşumunda da ışınım verebilmektedir. Bu sebepten dolayı, spesifik bağlanmayı artırmak adına farklı mekanizmalara sahip probalar kullanılabilmektedir. TaqMan, hairpin ve hibridizasyon prob yöntemleri yaygın kullanılan prob dizaynları arasındadır (Dorak 2007).

Real Time PCR, tanımlama ve gen ifade çalışmalarında yaygın şekilde kullanılmaktadır. Genlerin biyotik ve abiyotik stres koşullarına karşı ifade düzeyleri değişebilmektedir. Real Time PCR tekniği; protein seviyesini belirleme, transkripsiyon düzeyinin analizi, inoküle edilen ve edilmeyen bitkilerde gen ifade düzeyi farklılıklarını, hücre farklılaşma ve gelişim sırasında gen ifade düzeyi değişimini, kimyasal maddeye maruz kalındığında ifade düzeyi değişimi, küçük RNA interferaz (siRNA) etkinliğinin belirlenmesi, protein kodlamayan RNA gen ifadesinin nicel analizi gibi çalışmalarda kullanılmaktadır (Schmittgen ve Livak 2008). Real time PCR çalışmalarında eşik döngü değeri (C_T) floresan ışınım miktarının gözlemlenebilmesi adına gereken eşik değerini geçtiği döngü sayısı olarak ifade edilir. C_T 'nin nümerik değeri reaksiyondaki ampikon miktarı ile ters orantılıdır (Schmittgen ve Livak 2008).

2.3.1. *Mi-1.2* geninin ifadesi

Mi-1.2 geninin kök-ur nematodlarına tepkilerinin moleküler olarak anlaşılması üzerine değişik çalışmalar yürütülmüştür. Aynı zamanda *Mi-1.2* geninin sağladığı dayanıklılığın oluşmasında rol alan değişik yolaklar incelenmiştir. Fujimoto vd. (2011) kök-ur nematodlarının enfeksiyonunun bastırılmasında, bitki köklerinde hangi genlerin pozitif rol oynadığını araştırmışlardır.

Pallipparambil vd. (2014) domates bitkilerinin epidermis, mezofil ve floem bölgelerinden aldıkları örneklerde yaptıkları *Mi-1.2* transkript analizleri sonucunda *Mi* geni kaynaklı dayanıklılığın floem iletim sisteminin dış kısmında aktif olduğunu bulmuşlardır.

Shukla vd. (2018), *M. incognita* ile inoküle edilmiş dayanıklı ve duyarlı bitkilerde gen aktivasyonu ve burada hangi yolakların rol aldığını araştırmışlardır.

Zhou vd. (2018) domates bitkisinde R-genleri kaynaklı nematod dayanımının reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumuna etkisi üzerine yaptıkları çalışmada, *M. incognita* ile enfekte edilmiş *Mi-1.2* dayanıklılık geni içeren domates örneklerinin köklerinde yüksek oranda ROS birikimi gerçekleşirken, duyarlı ve susturulmuş *Mi-1.2* geni taşıyan dayanıklı genotiplerde bu oranın nadiren artış gösterdiğini belirtmişlerdir.

Seiml-Buchinger vd. (2019), qRT-PCR ile dayanıklı ve duyarlı bitkilerde stres olmayan koşullarda gen ifadesini benzer bulmuşlardır. Nematoda maruz bırakıldıklarında dayanıklı bitkilerde gen ekspresyonu artarken duyarlı bitkilerde bir tepki gözlenmemiş ve nematod üremesi gerçekleşmiştir. Jasmonik asit ile muamele edilen bitkilerin köklerinde *M. incognita* üremesinin bastırıldığını rapor etmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Domates bitkileri

Bitkisel materyal olarak *Mi-1.2* geni taşıyan Seval F₁ ve *Mi-1.2* geni taşımayan hassas Tueza F₁ domates çeşitleri kullanılmıştır. Domates çeşitlerine ait fideler, Multi Tohum Tar. San. Tic. A.Ş. (Antalya) tarafından temin edilmiştir.

3.1.2. *Meloidogyne incognita* izolatları

Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Nematoloji grubunun önceki çalışmalarında tanımlanan ve laboratuvar kültür koleksiyonunda bulunan *Meloidogyne incognita*'ya ait avirüent G7 ve virüent V6 izolatları kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan *M. incognita* izolatları ve orijinleri

Popülasyon Adı	Orijini	Konukçu Bitki	Referans
G7	Gazipaşa	Domates	Devran ve Söğüt (2009)
V6	Kepez	Domates	Laboratuvar kültürü ¹

¹ Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Nematoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonu

3.2. Metot

3.2.1. *Meloidogyne incognita* izolatlarının çoğaltılması

Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Nematoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan *M. incognita*'ya ait G7 ve V6 izolatları çoğaltılmıştır. Avirüent G7 izolatu için hassas Tueza F₁, virüent V6 izolatu için ise dayanıklı Seval F₁ domates fideleri kullanılmıştır. Domates fideleri otoklav edilmiş kumlu-tınlı toprak karışımı içeren 250 mL'lik saksılara şaşırtılmıştır. İzolatlara ait yumurta paketlerinden elde edilen ikinci dönem larvalar, 3-4 gerçek yapraklı domates fidelerinin kök boğazı yakınında açılan 2 cm derinliğindeki deliklere inoküle edilmiştir. Bitkiler, 25°C±1 ve %65±5 nem koşullarına sahip iklim kabinde 16:8 saat fotoperiyot (aydınlık: karanlık) koşullarında yetiştirilmiştir. İnokulasyondan 8 hafta sonra bitkiler sökülüş ve bitki kökleri musluk suyu altında dikkatlice yıkandıktan sonra üzerlerindeki yumurta kümeleri toplanmış ve çalışmada kullanılabilecek kadar 4°C'ye

ayarlanmış buzdolabında tutulmuştur.

3.2.2. Bitkilerin *Meloidogyne incognita* izolatları ile inokülasyonu

Seval F₁ çeşidine ait domates fideleri, otaklav edilmiş kumlu-tınlı toprak karışımı içeren 250 ml'lik saksılara şaşırtılmıştır. Bitkiler 4. gerçek yapraklı döneme geldiğinde her birine 1000 adet ikinci dönem larva bulaştırılmıştır (Çizelge 3.2). İnokülasyon yapılan bitkiler, 25±1 sıcaklık, %60±5 nem ve 16:8 fotoperiyota sahip iklim kabinlerinde tutulmuştur. Deneme üç tekerrürlü olarak yapılmıştır.

Çizelge 3.2. *Mi-1.2* gen ifade değişiminin belirlenmesi için yapılan denemenin planı

İzolatu Kdu	İzolatu Özelliği	Domates Çeşidi	RNA İzolasyonu Yapılan Bitki (Adet)	İzolasyon Zamanı (Saat)
G7	Avirü lent	Seval F ₁	3	48
			3	96
			3	192
V6	Virü lent	Seval F ₁	3	48
			3	96
			3	192
Kontrol	-	Seval F ₁	3	48
			3	96
			3	192

- : İnokülasyon yapılmadı (Kontrol bitkileri)

3.2.3. Bitki köklerinden RNA izolasyonu

Bitkiler, nematod inokülasyonundan 48, 96 ve 192 saat sonra sökül m ü ş ve kökleri dikkatli bir şekilde yıkanarak topraktan temizlenmiştir. Bu köklerin her birinden RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) kullanarak belirtilen protokole göre RNA izolasyonu yapılmıştır.

3.2.3.1. RNA miktarlarının belirlenmesi

RNA izolasyonu yapılan örneklerin konsantrasyonları NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers (Thermo Scientific™) cihazı kullanılarak ölçülmü ş t ü r. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbanslarının ölçü l m e s i y l e belirlenmiştir.

3.2.3.2. RNA'ların cDNA'ya çevrilmesi

Bitki köklerinden izole edilen RNA örnekleri, EvoScript Universal cDNA Master Kit (Roche) kiti kullanılarak cDNA'ya çevrilmiştir. PCR reaksiyonu; 7 µL RNA (100 ng), 4 µL Reaction Buffer (vial 2) ve 7 µL destile su olmak üzere toplam 18 µL'den oluşmuştur. Bu reaksiyon karışımı örnek sayısı kadar hazırlanmış ve her bir tüpe 18 µL dağıtılmıştır. Daha sonra buz üzerinde 10 dakika bekletilmiş ve buzdan alınan örneklerin her biri üzerine 2 µL enzim eklenmiş ve 42 °C'de 15 dk, 85°C'de 5 dk, 65°C'de 15 dk ve 4°C'de ∞ olacak şekilde Veriti 96-Well (Applied Biosystems) cihazında PCR yapılmıştır.

3.2.4. Real-Time PCR çalışmaları

Meloidogyne incognita'nın avirulent ve virulent izolatlarının *Mi-1.2* geni taşıyan Seval F₁ bitkisine inokülasyondan belirli süre sonra *Mi1.2*'nin bitki köklerindeki gen ifadesindeki değişiklikleri belirlemek için real time PCR yapılmıştır. Bunun için önceki çalışmalarda geliştirilen primerler ile bu çalışma kapsamında dizayn edilen primer ve probler kullanılmıştır (Çizelge 3.3). Yeni dizayn edilen primer ve probler için *Mi-1.2* geni mRNA dizilimleri Geneious (Biomatters Ltd.) programı kullanılarak yapılmıştır. Referans gen olarak GAPDH tercih edilmiştir (Çizelge 3.3).

Çalışmada SYBR Green I ile çalışılacak olan primerler öncelikle dayanıklı Seval F₁ ve duyarlı Tueza F₁ bitkilerinde qPCR yapılarak C_T değerleri incelenmiştir. En iyi C_T ayırımı veren primerler bir sonraki çalışmalar için seçilmiştir. Problar ise doğrudan uygulama örneklerinde kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan primerler ile problerin dizilimleri, fragment uzunlukları ve referansları

Primer/Probe Adı	Primer/Probe Dizisi (5-3)	PCR Ürünü (bp)	Referans
MetMi1.2F MetMi1.2R	CTTGCGTCTACTGACTCTTTCC CTAAGAGGAATCTCATCACAGG	331	Bu çalışma
Mi1.2F Mi1.2R	ATCATTCAACTACAAGAGCATATGTT AGTGTTCCAACATGAGCCA	167	Bu çalışma
Mmi1.2F Mmi1.2R	GGACCTGGAACCCTCTTTAA TAAGAATTCGGACACAAGTTAAAT	95	Bu çalışma
Fj-M1.2F Fj-M1.2R	CCCGAAATTGGATTGCCTAA ACGGCCGATTTGTCACAAC	101	Fujimoto vd. (2011)
Mi-1.2PP F Mi-1.2PP R	CTTGCGTCTAGCGACTCTTTCC CTAAGAGGAATCTCATCACAGG	248	Zhou vd., (2018)

Çizelge 3.3.'ün devamı

Primer/Probe Adı	Primer/Probe Dizisi (5-3)	PCR Ürünü (bp)	Referans
Mi-1.2JEB F Mi-1.2JEB R	GCAAACAACATCATTGGTGT ACATCATCATCCAAAAGTGA	248	Palliparambil vd. (2015)
Ls_GAPDH-F Ls_GAPDH-R Ls_GAPDH -P	AGGATTGGAGAGGTGGAAGA AACAGTTGGGACTCGGAAAG 6Fam-TATTCCTAGCAGTACTGGAGCAGCCA- BBQ	134	Bu çalışma
Ls_Mi1.2-F Ls_Mi1.2-R Ls_Mi1.2-P	CTTGCGTCTACTGACTCTTTCC GGTGAATCTCCTCAAGCTTAC 6Fam-AGTGGGAGGTTGGAGAGGAATCCT- Tamra	105	Bu çalışma
Mi1.2-F Mi1.2-R UPL 89	GTTGGTGAGTCAAGAACTGGA TGCCAGATATCTTTATACAATCCTT GGATGCTG	82	Bu çalışma

SYBR Green I kullanılarak yapılan qPCR reaksiyonu aşağıdaki karışımlardan oluşmuştur (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. SYBR Green I ile yapılan qPCR reaksiyonu bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Miktar
Su, PCR-grade	3,4 µL
Forward Primer-F (10 µM)	0,8 µL
Reverse Primer- R (10 µM)	0,8 µL
Enzim Karışımı (2x) (Roche)	10 µL
DNA	5 µL
Toplam	20 µL

Hazırlanan karışım her bir örnek üzerine 15 µL dağıtılmıştır. Hazırlanan plateler, 2000 rpm'de 60 saniye santrifüj edildikten sonra LightCycler® 480 II (Roche) cihazına yerleştirilmiş ve qPCR reaksiyonu aşağıdaki program kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. qPCR analiz programı

Program	Denaturasyon	Amplifikasyon	Cooling
Parametre			
Analiz modu	yok	Kuantifikasyon modu	Erime Eğrisi modu
Döngü	1	40	1
Hedef [°C]	95	95	58
Süre [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:10	00:00:10
Acquisition Mode	yok	yok	single

Prob kullanılarak yapılan qPCR reaksiyonları aşağıdaki karışımlardan oluşmuştur (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. Prob ile yapılan qPCR reaksiyonu bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Miktar
Su, PCR-grade*	5 µL
Forward Primer-F (10 µM)	0,8 µL
Reverse Primer- R (10 µM)	0,8 µL
Probe	0,4 µL
Enzim Karışımı (2x) (Roche)	10 µL
DNA	3 µL
Toplam	20 µL

Hazırlanan karışım her bir örnek üzerine 15 µL dağıtılmıştır. Hazırlanan plateler, 2000 rpm’de 60 saniye santrifüj edildikten sonra LightCycler® 480 II (Roche) cihazına yerleştirilmiştir ve qPCR reaksiyonu aşağıdaki program kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. qPCR analiz programı

Program	Denaturasyon	Amplifikasyon	Cooling
Parametre			
Analiz modu	yok	Kuantifikasyon modu	Yok
Döngü	1	45	1
Hedef [°C]	95	95	60
Süre [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:10	00:00:30
Ramp.Rate [°C/s]	20	20	20
Acquisition Mode	Yok	yok	tek

3.2.5. Sonuçların analizi

Her bir bitkinin kökünden elde edilen RNA’lar, NanoDrop™ 2000/2000c cihazında *Mi.1.2* geni taşıyan domates bitkilerinin *Meloidogyne incognita*’nın avirülent ve virülent izolatlarına inokülasyondan belirli süre sonra oluşan tepkiler arasındaki farklılıklar $\Delta\Delta C_T$ değerleri hesaplanarak incelenmiştir (Livak ve Schmittgen 2001; Livak ve Schmittgen 2008). Çalışmada kullanılan formüller aşağıda belirtilmiştir.

$$\Delta C_T = (C_{T, \text{hedef gen}} - C_{T, \text{referans gen}})$$

$$\Delta\Delta C_T = (\Delta C_{T, \text{hedef gen}} - \Delta C_{T, \text{referans gen}})_{T_x} - (\Delta C_{T, \text{hedef gen}} - \Delta C_{T, \text{referans gen}})_{T_0}$$

$$T_x = \text{inokülasyondan izolasyona kadar geçen süre (saat)}$$

$$T_0 = \text{inokülasyon yapılmamış örnek}$$

$$2^{-\Delta\Delta C_T} \text{ değeri,} \quad \begin{aligned} &\geq 1 \text{ ise; Değişim katsayısı} = 2^{-\Delta\Delta C_T} \\ &< 1 \text{ ise; Değişim katsayısı} = -\frac{1}{2^{-\Delta\Delta C_T}} \end{aligned}$$

4. BULGULAR

4.1. *Meloidogyne incognita* İzolatlarının Çoğaltılması ve İnokülasyonu

Avirü lent (G7) ve virü lent (V6) *M. incognita* izolatlarına ait J₂'ler domates bitkilerinde çoğaltılmış ve elde edilen nematodlar ışık mikroskobu altında sayılmıştır. Testlenen Tueza F₁ ve Seval F₁ ait domates fidelerinin her birine 1000'er adet J₂ inokülasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu için inokülasyon yapılan bitkilerden belirli süreler sonunda kök örnekleri alınmıştır.

4.2. Bitki RNA Miktarlarının Belirlenmesi

Her bir bitkinin kökünden elde edilen RNA'lar, NanoDrop™ 2000/2000c cihazında ölçümleri yapılarak RNA miktarları tespit edilmiştir. İzolasyon sonucu elde edilen RNA miktarlarının gen ifade değişimi çalışmaları için yeterli olduğu belirlenmiştir. Daha sonra örneklerin gen ifade değişimi çalışmalarında RNA miktarlarından kaynaklanabilecek farklılığı ortadan kaldırmak için örneklerin RNA miktarları sabitlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. RNA örneklerinin nanodrop ile farklı dalga boylarında ölçüm değerleri

Örnek No	Örnek Adı	Nükleik Asit Konsantrasyonu	Birim	260/280	260/230	Faktör
1	AS21	300,2	ng/μL	2,12	2,24	40
2	AS22	150,8	ng/μL	2,07	1,93	40
3	AS23	70,6	ng/μL	2,11	1,85	40
4	AS41	215,2	ng/μL	2,13	2,11	40
5	AS42	145,9	ng/μL	2,11	2,19	40
6	AS43	298,6	ng/μL	2,09	1,96	40
7	AS81	126,1	ng/μL	2,12	1,36	40
8	AS82	62,8	ng/μL	2,09	1,80	40
9	AS83	79,7	ng/μL	2,13	2,03	40
10	VS21	138,4	ng/μL	2,13	1,06	40
11	VS22	111,8	ng/μL	2,12	2,13	40
12	VS23	140,2	ng/μL	2,12	2,04	40
13	VS41	132,9	ng/μL	2,13	2,10	40
14	VS42	156,4	ng/μL	2,14	1,93	40
15	VS43	109,5	ng/μL	2,11	2,02	40
16	VS81	115,0	ng/μL	2,13	1,38	40
17	VS82	238,0	ng/μL	2,11	2,17	40
18	VS83	96,8	ng/μL	2,10	1,99	40
19	SK21	160,0	ng/μL	2,14	1,92	40
20	SK22	170,5	ng/μL	2,11	1,36	40
21	SK23	144,6	ng/μL	2,12	1,77	40
22	SK41	105,8	ng/μL	2,12	2,00	40
23	SK42	208,5	ng/μL	2,12	2,26	40
24	SK43	297,8	ng/μL	2,11	2,17	40
25	SK81	203,3	ng/μL	2,11	2,2	40
26	SK82	88,9	ng/μL	2,10	1,82	40
27	SK83	167,6	ng/μL	2,10	2,08	40
28	TK21	185,8	ng/μL	2,12	2,20	40
29	TK22	153,9	ng/μL	2,14	1,94	40
30	TK23	107,4	ng/μL	2,13	2,20	40
31	TK41	136,3	ng/μL	2,12	2,31	40
32	TK42	198,5	ng/μL	2,08	2,07	40
33	TK43	106,2	ng/μL	2,12	2,03	40
34	TK81	100,4	ng/μL	2,10	2,04	40
35	TK82	109,3	ng/μL	2,13	2,19	40
36	TK83	106,1	ng/μL	2,12	1,43	40
37	Seval F ₁	212,9	ng/μL	2,11	2,17	40
38	Tueza F ₁	197,7	ng/μL	2,10	2,04	40

AS : Avirulent *M. incognita* izolatının Seval F₁'e inokülasyonu , VS : Virulent *M. incognita* izolatının Seval, F₁'e inokülasyonu

SK : Seval F₁ Kontrol, TK : Tueza F₁ Kontrol

4.3. cDNA'ların Elde Edilmesi

İzole edilen RNA örnekleri EvoScript Universal cDNA Master Kiti kullanılarak Real Time PCR ile tüm örnekler sorunsuz bir şekilde cDNA'ya çevrilmiştir.

4.4. Real-Time PCR Çalışmaları

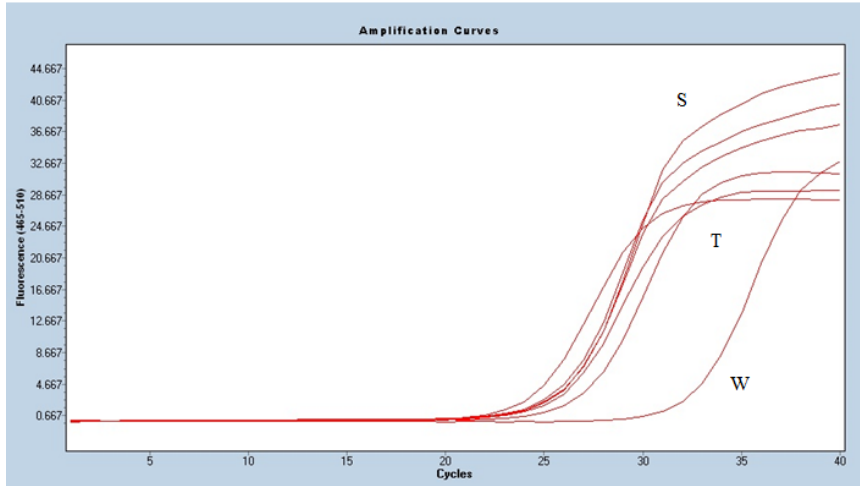
4.4.1. SYBR Green I boyası ile Real Time PCR

Mi.1.2 geninin ifade değişimini belirlemek için 6 adet primer seti (MetMi1.2F/MetMi1.2R, Mi1.2F/Mi1.2R, Mmi1.2F/Mmi1.2R, Fj-M1.2F/Fj-M1.2R, Mi-1.2PP F/Mi-1.2PP R, Mi-1.2JEB F/Mi-1.2JEB R) ve 1 adet referans gen GAPDH (Ls_GAPDH-F/Ls_GAPDH-R) kullanılmıştır. Bu primerlerin performanslarını belirlemek için öncelikle 3 adet dayanıklı (Seval F₁) ve 3 adet duyarlı (Tueza F₁) bitkilerden izole edilen RNA'lar, SYBR Green I boyası kullanılarak Real Time PCR yapılmıştır. Örneklerin amplifikasyon eğrileri ve C_T değerleri belirlenmiştir.

MetMi1.2F/MetMi1.2R primer seti kullanılarak yapılan real time PCR çalışması sonucunda, Seval F₁ için ortalama C_T değeri 26,07, Tueza F₁ için ortalama C_T değeri 25,57 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). C_T değerleri arasında çok net bir fark gözlemlenmemiş ve elde edilen amplifikasyon eğrileri birbirlerine oldukça yakın bulunmuştur (Şekil 4.1). Bu primer seti diğer çalışmalarda kullanmak üzere seçilmemiştir.

Çizelge 4.2. Seval F₁ ve Tueza F₁ bitkilerinde MetMi1.2F/MetMi1.2R primer seti ile elde edilen C_T değerleri

Örnek No	Örnek Adı	C _T Değeri	C _T Ortalama Değeri
1	Seval F ₁	25.75	26.07
2	Seval F ₁	26.11	
3	Seval F ₁	25.71	
4	Tueza F ₁	25.74	25.57
5	Tueza F ₁	24.14	
6	Tueza F ₁	26.84	
7	Su	32.15	



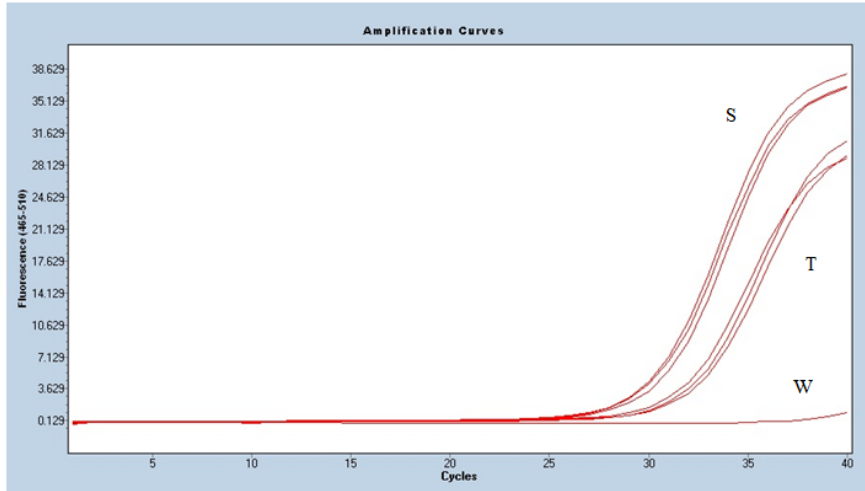
T : Tueza F₁ , S : Seval F₁ , W : Su

Şekil 4.1. Seval F₁ ve Tueza F₁ bitkilerinde MetMi1.2F/MetMi1.2R primer seti ile elde edilen amplifikasyon eğrileri

Mi1.2F/Mi1.2R primer çifti ile SYBR Green I boyası kullanılarak yapılan Real-Time PCR çalışmasında dayanıklı (Seval F_1) ve duyarlı (Tueza F_1) bitkilerde C_T değerleri yaklaşık 25 döngüden sonra ışıma vermeye başlamıştır. Seval F_1 'in ortalama C_T değeri 31,91 ve Tueza F_1 'in ortalama C_T değeri 30,33 belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Dayanıklı ve duyarlı örnekler arasında çoğalma eğrileri birbirlerinden farklılık göstermiştir (Şekil 4.2). Bu primer çifti çalışmalarda örneklerin analizlerinde kullanılmak üzere seçilmiştir.

Çizelge 4.3. Seval F_1 ve Tueza F_1 bitkilerinde Mi1.2F/Mi1.2R primer seti ile elde edilen C_T değerleri

Örnek No	Örnek Adı	C_T Değeri	C_T Ortalama Değeri
1	Seval F_1	30.61	30.33
2	Seval F_1	30.13	
3	Seval F_1	30.26	
4	Tueza F_1	32.14	31.91
5	Tueza F_1	31.59	
6	Tueza F_1	32.00	
7	Su	35.00	



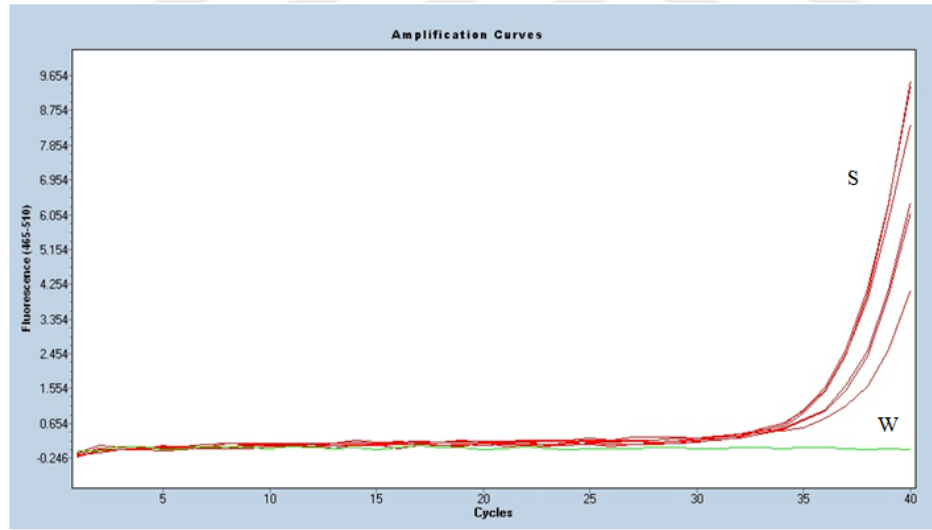
T : Tueza F_1 , S : Seval F_1 , W : Su

Şekil 4.2. Seval F_1 ve Tueza F_1 bitkilerinde Mi1.2F/Mi1.2R primer seti ile elde edilen amplifikasyon eğrileri

Mmi1.2F/Mmi1.2R primer setinin SYBR Green I boyası kullanılan real time PCR uygulaması sonucunda Seval F₁ ortalama C_T değeri 35,00, Tueza F₁ ortalama C_T değeri 35,00 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.4). Dayanıklı ve duyarlı örneklerin amplifikasyon eğrileri birbirlerine çok yakın belirlenmiştir (Şekil 4.3). C_T değerleri aynı olduğu için bu primer seti çalışmalarda kullanmak üzere seçilmemiştir.

Çizelge 4.4. Seval F₁ ve Tueza F₁ bitkilerinde Mmi1.2F/Mmi1.2R primer seti ile elde edilen C_T değerleri

Örnek No	Örnek Adı	C _T Değeri	C _T Ortalama Değeri
1	Seval F ₁	35.00	35.00
2	Seval F ₁	35.00	
3	Seval F ₁	35.00	
4	Tueza F ₁	35.00	35.00
5	Tueza F ₁	35.00	
6	Tueza F ₁	35.00	
7	Su	0	



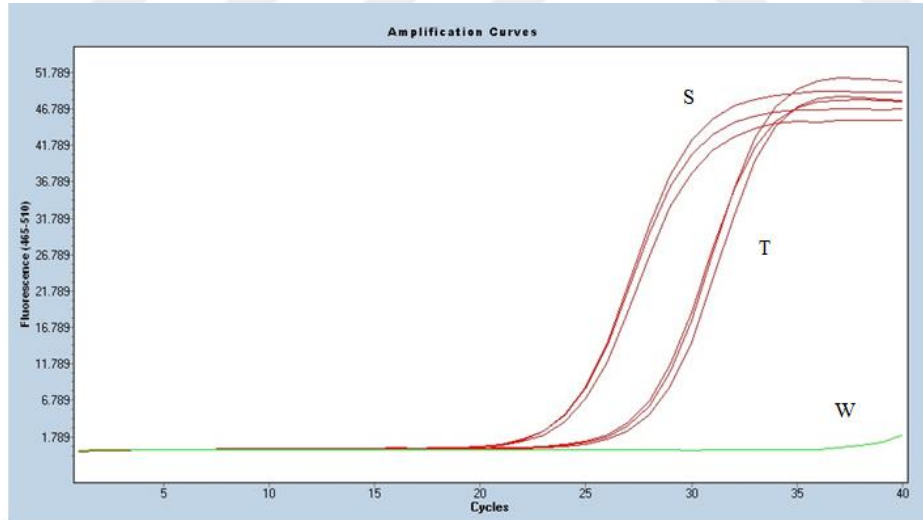
T : Tueza F₁ , S : Seval F₁ , W : Su

Şekil 4.3. Seval F₁ ve Tueza F₁ bitkilerinde Mmi1.2F/Mmi1.2R primer seti ile elde edilen amplifikasyon eğrileri

Fj-M1.2F/Fj-M1.2R primer çifti ile SYBR Green I boyası kullanılarak yapılan Real-Time PCR çalışması sonucunda Seval F₁ bitkilerinin ortalama C_T değeri 24,00, Tueza F₁ bitkilerinin ortalama C_T değeri 27,73 bulunmuştur (Çizelge 4.5). Seval F₁ bitkileri, Tueza F₁ bitkilerinden daha önce ışıma göstermiştir. Dayanıklı ve duyarlı bitkilerde amplifikasyon eğrileri birbirlerinden iyi bir şekilde ayrılmıştır (Şekil 4.4). Bu nedenle bu primer çifti diğer çalışmalarda kullanmak üzere seçilmiştir.

Çizelge 4.5. Seval F₁ ve Tueza F₁ bitkilerinde Fj-M1.2F/Fj-M1.2R primer seti ile elde edilen C_T değerleri

Örnek No	Örnek Adı	C _T Değeri	C _T Ortalama Değeri
1	Seval F ₁	24.15	24.00
2	Seval F ₁	23.95	
3	Seval F ₁	23.90	
4	Tueza F ₁	27.48	27.73
5	Tueza F ₁	27.99	
6	Tueza F ₁	27.72	
7	Su	0	



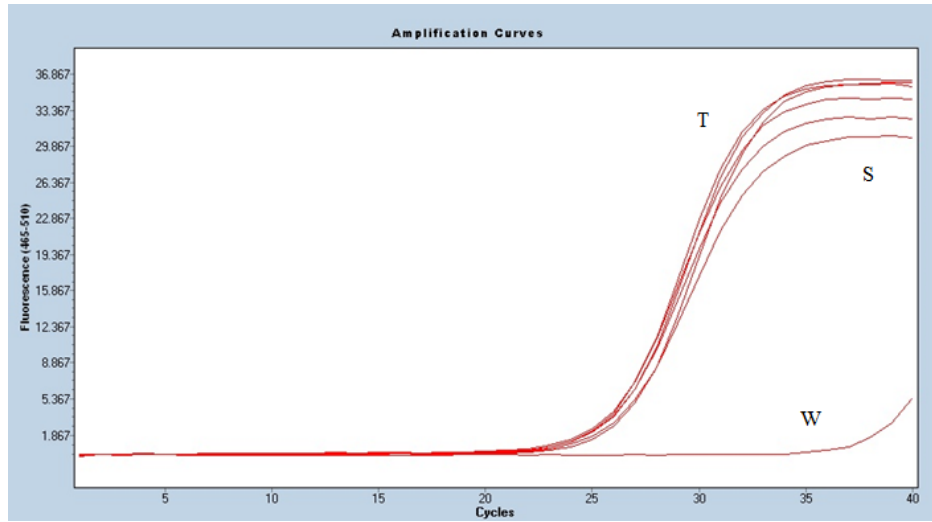
T : Tueza F₁ , S : Seval F₁ , W : Su

Şekil 4.4. Seval F₁ ve Tueza F₁ bitkilerinde Fj-M1.2F/Fj-M1.2R primer seti ile elde edilen amplifikasyon eğrileri

Duyarlı ve dayanıklı örneklerin SYBR Green I boyası kullanılarak Mi-1.2PP F/Mi-1.2PP R primer çifti ile yapılan real time çalışmasında Tueza F₁ bitkilerinin ortalama C_T değeri 25,94, Seval F₁ bitkilerinin ortalama C_T değeri 26,16 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). Dayanıklı ve duyarlı örneklerin amplifikasyon eğrileri birbirlerinden ayrılmamıştır (Şekil 4.5). C_T değerleri ve amplifikasyon eğrileri arasında belirgin bir fark bulunmadığı için bu primer çifti diğer çalışmalarda kullanmak üzere seçilmemiştir.

Çizelge 4.6. Seval F₁ ve Tueza F₁ bitkilerinde Mi-1.2PP F/Mi-1.2PP R primer seti ile elde edilen C_T değerleri

Örnek No	Örnek Adı	C _T Değeri	C _T Ortalama Değeri
1	Seval F ₁	25.87	25.95
2	Seval F ₁	26.13	
3	Seval F ₁	25.84	
4	Tueza F ₁	26.09	26.16
5	Tueza F ₁	25.88	
6	Tueza F ₁	26.51	
7	Su	35.00	



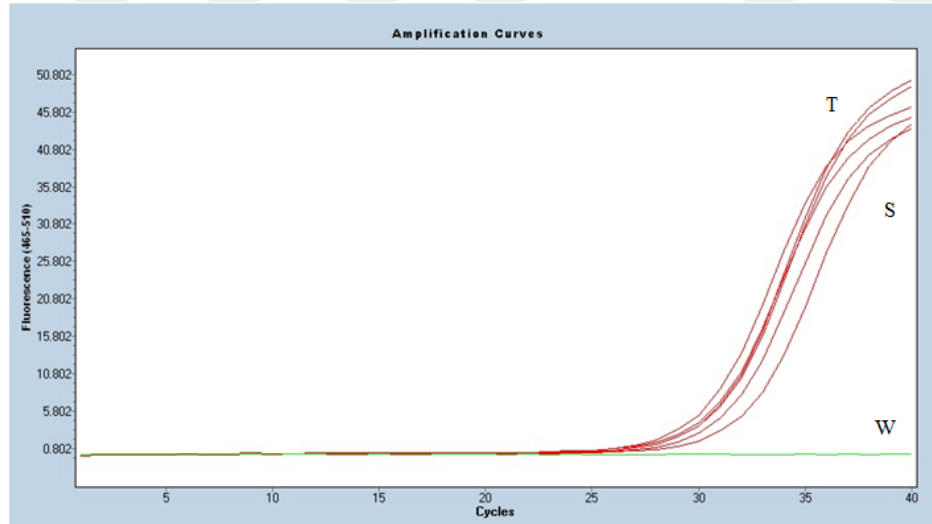
T : Tueza F₁ , S : Seval F₁ , W : Su

Şekil 4.5. Seval F₁ ve Tueza F₁ bitkilerinde Mi-1.2PP F/Mi-1.2PP R primer seti ile elde edilen amplifikasyon eğrileri

Mi-1.2JEB F/Mi-1.2JEB R primer seti kullanılarak yapılan real time PCR çalışmasında Seval F₁ bitkilerinin ortalama C_T değeri 30,54, Tueza F₁ bitkilerinin ortalama C_T değeri 31,19 belirlenmiştir (Şekil 4.7). Seval F₁ ve Tueza F₁ arasında amplifikasyon eğrileri birbirlerinden ayırım göstermemiştir (Şekil 4.6). C_T değerleri ve amplifikasyon eğrileri arasındaki fark belirgin olmadığı için bu primer çifti diğer çalışmalarda kullanmak üzere seçilmemiştir.

Çizelge 4.7. Seval F₁ ve Tueza F₁ bitkilerinde Mi-1.2JEB F/Mi-1.2JEB R primer seti ile elde edilen C_T değerleri

Örnek No	Örnek Adı	C _T Değeri	C _T Ortalama Değeri
1	Seval F ₁	31.06	30.55
2	Seval F ₁	30.06	
3	Seval F ₁	30.52	
4	Tueza F ₁	30.83	31.19
5	Tueza F ₁	31.98	
6	Tueza F ₁	30.76	
7	Su	0	



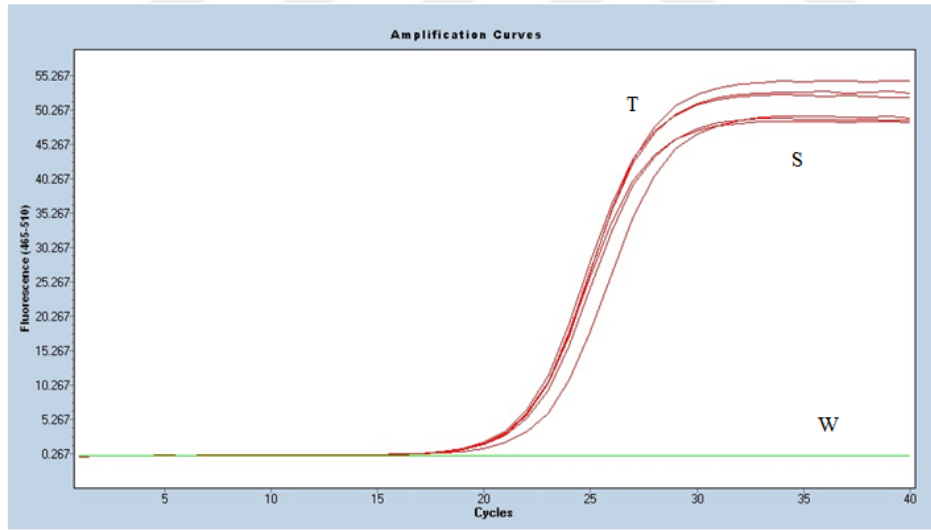
T : Tueza F₁ , S : Seval F₁ , W : Su

Şekil 4.6. Seval F₁ ve Tueza F₁ bitkilerinde Mi-1.2JEB F/Mi-1.2JEB R primer seti ile elde edilen amplifikasyon eğrileri

Real Time PCR çalışmasında kontrol primer olarak Ls_GAPDH-F/Ls_GAPDH-R primer seti kullanılmıştır. Bu primer seti beklediği gibi dayanıklı ve duyarlı örneklerde beklenen C_T değerlerini (Çizelge 4.8) ve amplifikasyon eğrisini (Şekil 4.7) vermiştir. Bu primer seti tüm real time PCR çalışmalarında referans primer olarak kullanılmıştır.

Çizelge 4.8. Seval F_1 ve Tueza F_1 bitkilerinde Ls_GAPDH-F/Ls_GAPDH-R primer seti ile elde edilen C_T değerleri

Örnek No	Örnek Adı	C_T Değeri	C_T Ortalama Değeri
1	Seval F_1	21.79	21.98
2	Seval F_1	22.57	
3	Seval F_1	21.57	
4	Tueza F_1	21.56	21.68
5	Tueza F_1	21.70	
6	Tueza F_1	21.79	
7	Su	0	



T : Tueza F_1 , S : Seval F_1 , W : Su

Şekil 4.7. Seval F_1 ve Tueza F_1 bitkilerinde Ls_GAPDH-F/Ls_GAPDH-R primer seti ile elde edilen amplifikasyon eğrileri

Mi-1.2 geninin avirulent ve virulent *M. incognita* popülasyonlarına karşı gen ifade değişimini belirlemek için 6 primer seti (MetMi1.2F/MetMi1.2R, Mi1.2F/Mi1.2R, Mmi1.2F/Mmi1.2R, Fj-M1.2F/Fj-M1.2R, Mi-1.2PP F/Mi-1.2PP R ve Mi-1.2JEB F/Mi-

1.2JEB R) SYBR Green I boyası kullanılarak real time PCR yapılmıştır. Çalışma sonucunda 2 primer seti (Mi1.2F/Mi1.2R ve Fj-M1.2F/Fj-M1.2R) dayanıklı ve duyarlı bitkiler arasında farklı C_T değerleri verdiği ve birbirlerinden belirgin şekilde ayrıldığı için ana deneme örneklerinin analizinde kullanmak üzere seçilmiştir.

Mi-1.2 geninin ifadesini belirlemek için SYBR Green I ile test edilmiş 6 primer çifti arasından seçilen 2 primer seti (Mi1.2F/Mi1.2R ve Fj-M1.2F/Fj-M1.2R) çalışma için kurulan deneme örneklerinin analizinde kullanılmıştır. *Ls_GAPDH-F/Ls_GAPDH-R* primer setleri ise referans gen olarak kullanılmıştır.

Çalışmada, dayanıklı domates fideleri 3 biyolojik tekerrür olacak şekilde *M. incognita*'nın avirüent G7 ve virüent V6 izolatları ile inoküle edilmiştir. İnokulasyondan 48 saat, 96 saat ve 192 saat sonra bitki köklerinden RNA izolasyonu yapılarak elde edilen cDNA'lar Mi1.2F/Mi1.2R primer seti, SYBR Green I boyası kullanılarak qPCR analizleri yapılmış ve ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ve değişim katsayısı (fold change) değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.9).

M. incognita'nın avirüent G7 izolatı, Seval F₁ bitkisinde inokülasyondan 48 saat sonra $\Delta C_T=7,96$, $\Delta\Delta C_T=-0,95$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=1,93$ ve değişim katsayısı=1,93 olarak, 96 saat sonra $\Delta C_T=8,16$, $\Delta\Delta C_T=-0,23$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=1,17$ ve değişim katsayısı=1,17 ve 192 saat sonra ise $\Delta C_T=9,03$, $\Delta\Delta C_T=2,13$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=0,23$ ve değişim katsayısı=-4,38 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.9). *M. incognita*'nın virüent V6 izolatı ise, Seval F₁ bitkisinde inokülasyondan 48 saat sonra $\Delta C_T=9,71$, $\Delta\Delta C_T=0,80$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=0,58$ ve değişim katsayısı=-1,74 olarak, 96 saat sonra $\Delta C_T=7,81$, $\Delta\Delta C_T=-0,59$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=1,50$ ve değişim katsayısı=1,50 ve 192 saat sonra ise $\Delta C_T=8,05$, $\Delta\Delta C_T=1,15$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=0,45$ ve değişim katsayısı=-2,22 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.9).

Mi1.2F/Mi1.2R primerleri ile yapılan real time PCR analizlerinde; nematodların *Mi-1.2* geni üzerine etkisi incelendiğinde, inokülasyondan 48 saat sonra *M. incognita*'nın avirüent G7 izolatı bitkide; 1,93 kat artışa neden olurken *M. incognita*'nın virüent V6 izolatı 1,74 kat azalışa; 96 saat sonra avirüent G7 izolatı 1,17 artışa virüent V6 izolatı ise 1,5 kat artışa; 192 saat sonra avirüent G7 izolatı 4,38 kat azalışa ve virüent V6 izolatı ise 2,22 kat azalışa neden olmuştur (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. *Meloidogyne incognita*'nın G7 ve V6 izolatları ile inokle edilen domates bitkilerinden elde edilen RNA'ların Mi1.2F/Mi1.2R primerlerin SYBR Green I boyası ile qPCR'da edilen ortalama C_T , ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ve değişim katsayısı değerleri

Nematod İzolati	Süre (Saat)	Primer Adı	Referans Primer Adı	Ortalama C_T Hedef Gen	Ortalama C_T Referans Gen	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$	Değişim katsayısı
Avirüilent G7	48	M1.2F-R	GAPDH	33,52	25,56	7,96	-0,95	1,93	1,93
Virüilent V6		M1.2F-R	GAPDH	31,18	21,47	9,71	0,80	0,58	-1,74
-		M1.2F-R	GAPDH	31,31	22,40	8,91			
Avirüilent G7	96	M1.2F-R	GAPDH	32,71	24,54	8,16	-0,23	1,17	1,17
Virüilent V6		M1.2F-R	GAPDH	31,42	23,61	7,81	-0,59	1,50	1,50
-		M1.2F-R	GAPDH	33,87	25,48	8,39			
Avirüilent G7	192	M1.2F-R	GAPDH	31,38	22,35	9,03	2,13	0,23	-4,38
Virüilent V6		M1.2F-R	GAPDH	32,45	24,40	8,05	1,15	0,45	-2,22
-		M1.2F-R	GAPDH	33,18	26,28	6,90			

Aynı örneklere ait RNA'lar ikinci bir primer seti olan Fj-M1.2F/Fj-M1.2R ile SYBR Green I boyası kullanılarak real time PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucu ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ve değişim katsayısı (fold change) değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.10). *M. incognita*'nın avirüilent G7 izolatının Seval F₁ bitkisine inokülasyonundan 48 saat sonra $\Delta C_T=3,44$, $\Delta\Delta C_T=1,23$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=0,43$ ve değişim katsayısı=-2,35 olarak, 96 saat sonra $\Delta C_T=2,75$, $\Delta\Delta C_T=-0,47$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=1,38$ ve değişim katsayısı=1,38 ve 192 saat sonra ise $\Delta C_T=2,67$, $\Delta\Delta C_T=0,09$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=0,94$ ve değişim katsayısı=-1,06 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.10). *M. incognita*'nın virüilent V6 izolatının Seval F₁ bitkisine inokülasyonundan 48 saat sonra $\Delta C_T=2,86$, $\Delta\Delta C_T=0,65$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=0,64$ ve değişim katsayısı=-1,57 olarak, 96 saat sonra $\Delta C_T=2,35$, $\Delta\Delta C_T=-0,87$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=1,83$ ve değişim katsayısı=1,83 ve 192 saat sonra ise $\Delta C_T=2,51$, $\Delta\Delta C_T=-0,08$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=1,06$ ve değişim katsayısı=1,06 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.10).

Fj-M1.2F/Fj-M1.2 primerleri ile yapılan real time PCR analizlerinde; nematodların *Mi-1.2* geni üzerine etkisi incelendiğinde, inokülasyondan 48 saat sonra *M. incognita*'nın avirüilent G7 izolatı domates bitkilerinde; 2,35 kat azalışa neden olurken *M. incognita*'nın virüilent V6 izolatı 1,57 kat azalışa; 96 saat sonra avirüilent G7 izolatı 1,38 kat artışa virüilent V6 izolatı ise 1,83 kat artışa; 192 saat sonra avirüilent G7 izolatı 1,06 kat azalışa ve virüilent V6 izolatı ise 1,06 kat artışa neden olmuştur (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. *Meloidogyne incognita*'nın G7 ve V6 izolatları ile inokle edilen domates bitkilerinden elde edilen RNA'ların Fj-M1.2F/Fj-M1.2R primerlerin SYBR Green I boyası ile qPCR'da elde edilen ortalama C_T , ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ve değişim katsayısı değerleri

Nematod İzolatı	Süre (Saat)	Primer Adı	Referans Primer Adı	Ortalama C_T Hedef Gen	Ortalama C_T Referans Gen	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$	Değişim katsayısı
Avirülene G7	48	M1.2F-R	GAPDH	29,00	25,56	3,44	1,23	0,43	-2,35
Virülene V6		M1.2F-R	GAPDH	24,33	21,47	2,86	0,65	0,64	-1,57
-		M1.2F-R	GAPDH	24,61	22,40	2,21			
Avirülene G7	96	M1.2F-R	GAPDH	27,29	24,54	2,75	-0,47	1,38	1,38
Virülene V6		M1.2F-R	GAPDH	25,96	23,61	2,35	-0,87	1,83	1,83
-		M1.2F-R	GAPDH	28,70	25,48	3,22			
Avirülene G7	192	M1.2F-R	GAPDH	25,02	22,35	2,67	0,09	0,94	-1,06
Virülene V6		M1.2F-R	GAPDH	26,90	24,40	2,51	-0,08	1,06	1,06
-		M1.2F-R	GAPDH	28,87	26,28	2,59			

4.4.2. TaqMan Prob ile Real Time PCR

Mi-1.2 geninin ifadesini belirlemek için 2 adet primer/prob seti (Mi1.2-F/Mi1.2-R ve UPL 89; Ls_Mi1.2-F, Ls_Mi1.2-R ve Ls_Mi1.2-P) ve 1 adet referans gen GAPDH (Ls_GAPDH-F, Ls_GAPDH-R ve Ls_GAPDH-R) kullanılarak qPCR yapılmıştır.

Çalışmada, dayanıklı domates fideleri 3 biyolojik tekerrür olacak şekilde *M. incognita*'nın avirülene G7 ve virülene V6 izolatları ile inoküle edilmiştir. İnokulasyondan 48 saat, 96 saat ve 192 saat sonra bitki köklerinden RNA izolasyonu yapılarak elde edilen cDNA'lar Mi1.2-F/Mi1.2-R primer seti UPL prob kullanılarak qPCR analizleri yapılmış ve ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ve değişim katsayısı (fold change) değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.11). *M. incognita*'nın G7 izolatının Seval F₁ bitkisine inokulasyonundan 48 saat sonra $\Delta C_T=1,72$, $\Delta\Delta C_T=0,16$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=0,90$ ve değişim katsayısı=-1,11 olarak, 96 saat sonra $\Delta C_T=1,09$, $\Delta\Delta C_T=-0,07$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=1,05$ ve değişim katsayısı=1,05 ve 192 saat sonra ise $\Delta C_T=2,41$, $\Delta\Delta C_T=1,32$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=0,40$ ve değişim katsayısı=-2,50 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.11). *M. incognita*'nın V6 izolatının Seval F₁ bitkisine inokulasyonundan 48 saat sonra $\Delta C_T=2,45$, $\Delta\Delta C_T=0,89$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=0,54$ ve değişim katsayısı=-1,85 olarak, 96 saat sonra $\Delta C_T=1,68$, $\Delta\Delta C_T=0,52$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=0,70$ ve değişim katsayısı=-1,43 ve 192 saat sonra ise $\Delta C_T=1,05$, $\Delta\Delta C_T=-0,04$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=1,03$ ve değişim katsayısı=1,03 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.11).

Mi1.2-F/Mi1.2-R primerleri ile yapılan real time PCR analizlerinde; nematodların *Mi-1.2* geni üzerine etkisi incelendiğinde, inokülasyondan 48 saat sonra *M. incognita*'nın avirüent G7 izolatu ile enfekte edilen bitkide; 1,11 kat azalışa ve *M. incognita*'nın virüent V6 izolatu 1,85 kat azalışa; 96 saat sonra avirüent G7 izolatu ile enfekte edilen 1,05 kat artışa virüent V6 izolatu ise 1,43 kat azalışa; 192 saat sonra avirüent G7 izolatu 2,50 kat azalışa ve virüent V6 izolatu ise 1,03 kat artışa neden olmuştur (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. *Meloidogyne incognita*'nın G7 ve V6 izolatları ile inokle edilen domates bitkilerinden elde edilen RNA'ların Mi1.2-F/Mi1.2-R primerleri ve UPL prob ile qPCR'da elde edilen ortalama C_T , ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ ve değişim katsayısı değerleri

Nematod İzolatu	Süre (Saat)	Primer Adı	Referans Primer Adı	Ortalama C_T Hedef Gen	Ortalama C_T Referans Gen	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$	Değişim katsayısı
Avirüent G7	48	M1.2F-R	GAPDH	29,36	27,64	1,72	0,16	0,90	-1,11
Virüent V6		M1.2F-R	GAPDH	26,49	24,04	2,45	0,89	0,54	-1,85
-		M1.2F-R	GAPDH	26,67	25,11	1,56			
Avirüent G7	96	M1.2F-R	GAPDH	27,84	26,75	1,09	-0,07	1,05	1,05
Virüent V6		M1.2F-R	GAPDH	27,49	25,81	1,68	0,52	0,70	-1,43
-		M1.2F-R	GAPDH	28,72	27,56	1,16			
Avirüent G7	192	M1.2F-R	GAPDH	27,02	24,61	2,41	1,32	0,40	-2,50
Virüent V6		M1.2F-R	GAPDH	27,70	26,64	1,05	-0,04	1,03	1,03
-		M1.2F-R	GAPDH	29,53	28,44	1,09			

Aynı örneklere ait RNA'lar ikinci bir primer seti olan Ls_Mi1.2-F/Ls_Mi1.2-R Ls_Mi1.2-P probu ile real time PCR yapılmıştır. Analiz sonucu ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ve değişim katsayısı (fold change) değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.12). *M. incognita*'nın avirüent G7 izolatının Seval F₁ bitkisine inokülasyonundan 48 saat sonra $\Delta C_T=1,68$, $\Delta\Delta C_T=1,47$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=0,36$ ve değişim katsayısı=-2,77 olarak, 96 saat sonra $\Delta C_T=1,27$, $\Delta\Delta C_T=-0,40$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=1,32$ ve değişim katsayısı=1,32 ve 192 saat sonra ise $\Delta C_T=1,05$, $\Delta\Delta C_T=-0,04$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=1,03$ ve değişim katsayısı=1,03 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.12). *M. incognita*'nın virüent V6 izolatının Seval F₁ bitkisine inokülasyonundan 48 saat sonra $\Delta C_T=1,19$, $\Delta\Delta C_T=0,98$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=0,51$ ve değişim katsayısı=-1,97 olarak, 96 saat sonra $\Delta C_T=1,13$, $\Delta\Delta C_T=-0,54$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=1,45$ ve değişim katsayısı=1,45 ve 192 saat sonra ise $\Delta C_T=0,69$, $\Delta\Delta C_T=-0,41$, $2^{-\Delta\Delta C_T}=1,32$ ve değişim katsayısı=1,32 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.12).

Ls_Mi1.2-F/Ls_Mi1.2-R primerleri ile yapılan real time PCR analizlerinde; nematodların *Mi-1.2* geni üzerine etkisi incelendiğinde, inokülasyondan 48 saat sonra *M. incognita*'nın avirüent G7 izolatu bitkide; 2,77 kat azalışa *M. incognita*'nın virüent V6 izolatu 1,97 kat azalışa; 96 saat sonra avirüent G7 izolatu 1,32 kat artışa virüent V6 izolatu ise 1,45 kat artışa; 192 saat sonra avirüent G7 izolatu 1,03 kat artışa ve virüent V6 izolatu ise 1,32 kat artışa neden olmuştur (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. *Meloidogyne incognita*'nın G7 ve V6 izolatları ile inokle edilen domates bitkilerinden elde edilen RNA'ların Ls_Mi1.2-F/Ls_Mi1.2-R primerleri ve Ls_Mi1.2-P probu ile qPCR'da elde edilen ortalama C_T , ΔC_T , $\Delta\Delta C_T$, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ve değişim katsayısı değerleri

Nematod İzolatu	Süre (Saat)	Primer Adı	Referans Primer Adı	Ortalama C_T Hedef Gen	Ortalama C_T Referans Gen	ΔC_T	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$	Değişim katsayısı
Avirüent G7	48	M1.2F-R	GAPDH	29,32	27,64	1,68	1,47	0,36	-2,77
Virüent V6		M1.2F-R	GAPDH	25,23	24,04	1,19	0,98	0,51	-1,97
-		M1.2F-R	GAPDH	25,32	25,11	0,21			
Avirüent G7	96	M1.2F-R	GAPDH	28,02	26,75	1,27	-0,40	1,32	1,32
Virüent V6		M1.2F-R	GAPDH	26,94	25,81	1,13	-0,54	1,45	1,45
-		M1.2F-R	GAPDH	29,23	27,56	1,67			
Avirüent G7	192	M1.2F-R	GAPDH	25,66	24,61	1,05	-0,04	1,03	1,03
Virüent V6		M1.2F-R	GAPDH	27,33	26,64	0,69	-0,41	1,32	1,32
-		M1.2F-R	GAPDH	29,53	28,44	1,09			

5. TARTIŞMA

Domates dünyada en çok üretilen sebze türü olup insan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir. Birçok hastalık ve zararlılar domates üretimini etkileyerek önemli derecede verim ve ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Kök-ur nematodları bu zararlılardan en önemlileri arasındadır. Bu zararlılarla mücadele için değişik yöntemler kullanılmakta olup dayanıklı çeşitler en önemli mücadele yöntemlerinden birisidir. Domateste kök-ur nematodlarına karşı dayanıklılık *Mi-1.2* geni tarafından kontrol edilmektedir (Milligan vd. 1998). Bu gen en yaygın üç kök-ur nematod türüne (*M. arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*) karşı dayanıklılık sağlamaktadır (Roberts and Thomason 1989; Milligan vd. 1998). Fakat *Mi-1.2* genini aşan virulent popülasyonlar bitkisel üretim alanlarında bulunmuştur (Jarquin-Barberena vd. 1991; Castagnone-Sereno vd. 1993; Roberts 1995; Huang vd. 2004; Devran ve Söğüt 2010).

Bu çalışmada, virulent ve avirulent *M. incognita* izolatları ile inokülasyondan farklı süreler sonra (48, 96 ve 192 saat) *Mi-1.2* geni taşıyan domates bitkilerinden izole edilen RNA'lar kullanılarak genin izolatlara karşı ifade değişim düzeyi araştırılmıştır. Bunun için en temel çalışma olarak RNA izolasyonunun başarılı bir şekilde yapılması ve örneklerde DNA kalıntılarının olmaması hedeflenmiştir. Örneklerden RNA izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirilmiş ve aynı zamanda izolasyon aşmasında örnekler DNase enzimi ile muamele edilerek DNA'lar uzaklaştırılmıştır. Bu çalışmalar sonucu örneklerde DNA'nın bulunmadığı PCR yapılarak da doğrulanmıştır. Elde edilen RNA'ların diğer araştırmalar ve gen ifadesi çalışmaları için uygun olduğu teyit edilmiştir.

Gen ifadesi çalışmalarında hedef gen ile referans gen birlikte analiz edilmektedir. Domateste referans gen olarak Actin ve GAPDH yaygın şekilde kullanılmaktadır (Guan vd. 2016; Zhou vd. 2018). Bu çalışmada GAPDH referans gen olarak tercih edilmiştir. Böylece qPCR çalışmalarında *Mi-1.2* genine özgü primerler ile GAPDH genine özgü primerler birlikte analiz edilmişlerdir. Hedef gene özgü primerler ile referans gene özgü primerler analiz yapılan tüm örneklerde başarılı şekilde çalışmış ve beklenen C_T değerini üretmişlerdir.

Gen ifadesi çalışmalarında boya ve probler kullanılmaktadır. Bu çalışmada, *Mi-1.2* geninin ifade değişim analizi için hem SYBR Green I hem de prob kullanılmıştır. SYBR Green I boyasının maliyetinin düşük olması ve primer dizaynının kolaylığından dolayı çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışma kapsamında SYBR Green I boyası ile altı primer seti (MetMi1.2F/MetMi1.2R, Mi1.2F/Mi1.2R, Mmi1.2F/Mmi1.2R, Fj-M1.2F/Fj-M1.2R, Mi-1.2PP F/Mi-1.2PP R ve Mi-1.2JEB F/Mi-1.2JEB R) kullanılmış ve bunlardan üç tanesi önceki yayınlardan geri kalan üç tanesi ise bu çalışma kapsamında dizayn edilmiştir. Primerlerin, *Mi-1.2* geni taşıyan ve taşımayan bitkilerdeki ön analizi sonucu C_T değerleri ve amplifikasyon eğrileri dikkate alınarak aralarından iki primer seti (Mi1.2F/Mi1.2R ve Fj-M1.2F/Fj-M1.2R) örneklerin analizi için seçilmiştir. Yayınlarından seçilen Mi-1.2PP F/Mi-1.2PP R (Zhou vd. 2018) ve Mi-1.2JEB F/Mi-1.2JEB R primer çiftleri (Paripparambil vd. 2015) ve dizayn edilen primerler (MetMi1.2F/MetMi1.2R ve Mmi1.2F/Mmi1.2R), örnekler arasında belirgin farklılık göstermemiştir. Bu durum primerlerin dizaynlarından, kullanılan bitkilerin genetik özelliklerinden, *Mi-1.2* geninin homologlarına bağlanabilmesinden veya genlerin ifade düzey farklılıklarından kaynaklanmış olabilir. Ayrıca SYBR Green I boyasının PCR aşamasında çift zincir oluşturan istenmeyen DNA moleküllerine bağlanması sonucu ışıma yaparak istenmeyen amplifikasyona neden olmuş olabilir. Buna karşın, Fujimoto vd. (2011) tarafından geliştirilen Fj-M1.2F/Fj-M1.2R primer çifti ile bu çalışma kapsamında dizayn edilen Mi1.2F/Mi1.2R primer çifti örnekler arasında C_T değerleri ve amplifikasyon eğrileri açısından beklenen ayırımı gösterdiği için çalışmada kullanmak üzere seçilmişlerdir. Mi1.2F/Mi1.2R ve Fj-M1.2F/Fj-M1.2R primer setleri, SYBR Green I kullanılarak örneklerin qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda *M. incognita*'nın virulent ve avirulent izolatlarının *Mi-1.2* geni taşıyan domates bitkilerine inokülasyondan 96 saat sonra alınan örneklerinde her iki primer setleri ile artış görülürken, 48 ve 192 saat sonra alınan örneklerin sonuçlarının birbirlerinden farklı olduğu görülmüştür. Avirulent izolatın inokülasyonundan 48 saat sonra aynı örneklerin Mi1.2F/Mi1.2R ile yapılan gen ifadesi analizinde 1,9 kat artış gözlenirken, Fj-M1.2F/Fj-M1.2R ile 2,35 kat azalış görülmüştür. Buna karşın, inokülasyondan 192 saat sonra yapılan analizlerde ise virulent izolat Mi1.2F/Mi1.2R 2,22 kat azalışa neden olurken, Fj-M1.2F/Fj-M1.2R ise 1.06 kat artışa neden olmuştur. Fujimoto vd (2011), Fj-M1.2F/Fj-M1.2R primer setinin dayanıklı ve

duyarlı bitkilerin avirüent ve virüent *M. incognita* izolatları ile inokülasyonu ve metil jasmonate (meJA) ile teşvik edilmeleri sonucu kök ur nematod enfeksiyonu ile gen ifade ilişkisinin belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Bu çalışmada, adı geçen pirmer çifti, örneklerde *Mi-1.2* gen ifadesinin belirlenmesinde de kullanılmış ve sonuç üretmiştir.

TaqMan problar, SYBR Green I boyalarına göre maliyetleri yüksektir. Fakat daha spesifik olmalarından dolayı gen ifadesi çalışmalarında tercih edilmektedir. Bu çalışmada, *Mi-1.2* gen bölgesine göre *Ls_Mi1.2-P* ve UPL 89 olmak üzere iki ayrı TaqMan prob kullanılmıştır. *Ls_Mi1.2-P* probu bu çalışma kapsamında geliştirilmiştir. UPL 89 ise firmanın (Roche) ürünü olarak sipariş edilmiştir. Literatür bilgisine göre *Mi-1.2* gen ifadesi genellikle SYBR Green I boyaları kullanılarak yapılmıştır (Fujimoto vd. 2011; Parippambal vd. 2015; Zhou vd. 2018). Buna karşın prob sistemleri analizlerde kullanılmamıştır. Bu çalışmada probların kullanılması *Mi-1.2* geninin ifade çalışmalarına farklı bir bakış açısı getirmiştir. Nematod inokülasyonundan 48 saat sonra alınan örneklerde her iki prob setinde azalış görülürken, 96 ve 192 saat sonra alınan örneklerin sonuçlarında farklılıklar tespit edilmiştir. Virüent izolat inokülasyonundan 96 saat sonra aynı örneklerin UPL 89 ile yapılan gen ifade değişim analizinde 1,43 kat azalış olurken *Ls_Mi1.2-P* ile 1,45 kat artış; inokülasyondan 192 saat sonra yapılan analizde avirüent izolat UPL 89 prob ile 2,50 kat azalışa neden olurken, *Ls_Mi1.2-P* ile 1,03 kat artışa neden olmuştur. Bu farklılıkların *Mi-1* lokusunun özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Milligan vd. (1998), *Mi-1.2* genini klonlaması üzerine yürüttükleri çalışmada aynı bölgede *Mi-1.1* ve *Mi-1.2* genleri ile bir yalancı gen (pseudogene) olduğu ve dayanıklılığın yalnızca *Mi-1.2* geni tarafından sağladığını bildirmişlerdir. Seah vd. (2007) *Mi-1* gen bölgesinde *Mi-1.2* geninin farklı homologlarının bulunduğunu ve bu homologların dayanıklı ile duyarlı bitkilere göre farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Dayanıklı bitkide *Mi-1.1*, *Mi-1.2*, *Mi-1.3*, *Mi-1.4*, *Mi-1.5*, *Mi-1.6* ve *Mi-1.7* olmak üzere 7 homolog genin, duyarlı bitkide ise *Mi-1A*, *Mi-1B*, *Mi-1C*, *Mi-1D*, *Mi-1E*, *Mi-1F* ve *Mi-1G* olarak adlandırılan 7 homolog genin bulunduğu bildirilmiştir. Bu genlerden *Mi-1.3* ve *Mi-1.5*, *Mi-1A* ve *Mi-1D*'nin yalancı gen olduğu, *Mi-1.6* ve *Mi-1.7*'nin ise tam ORF içermediği ve yalancı genler hariç homolog genlerin sekans düzeyinde %92,9-%96,7 oranında benzerlik gösterdiği belirtilmiştir. Bu çalışmada, NCBI'da bulunan *Mi-1* lokusundaki bütün genlerin mRNA

dizileri düzenlenip *Mi-1.2* geni ile birlikte Geneious programında alignment edilmiş primerler ve probalar geliştirilmiştir. Primerlerin geliştirilmesinde önceki çalışmalardaki temel yaklaşım olan *Mi-1.2* ile *Mi-1.1* genlerinin karşılaştırılması yapılmıştır. Bu çalışma için dizayn edilen primerlerin (*Mi1.2F/Mi1.2R*, *Ls_Mi1.2-F/Ls_Mi1.2-R* ve *Mi1.2-F/Mi1.2-R*) forward ve reverse dizilerinin *Mi-1.1* geninin ilgili bölgesinden bazı farklılıkları bulunmaktadır. Fujimota vd. (2011) tarafından geliştirilen *Fj-M1.2F/Fj-M1.2R* primerleri de *Mi-1.1* gen dizilerinden farklı bazlara sahiptirler. Ayrıca UPL 89 probunun dizilimi de *Mi-1.1* geninin ilgili bölgesinden farklıdır. Böylece geliştirilen primerlerin ve UPL 89 probunun *Mi1.2* genine özgü olduğu söylenebilir. Önceki çalışmalarda (Fujimota vd. 2011; Paripparambil vd. 2015; Zhou vd. 2018), *Mi-1.2* genine özgü primer geliştirmede *Mi-1.1* ile *Mi-1.2* mRNA dizileri karşılaştırılarak dizayn edilmiştir. Bizim yaklaşımımız bu çalışmalarla paralellik göstermiştir. Çalışmada genetik materyal olarak *Mi-1.2* geni taşıyan dayanıklı Seval F₁ domates çeşidi kullanılmıştır. Bu nedenle bu 4 primer çifti ile probaların dizilimleri, Seah vd. (2007) tarafından dayanıklı bitkilerde bulunduğu belirtilen diğer homolog genlerle (*Mi-1.3*, *Mi-1.4*, *Mi-1.5*, *Mi-1.6* ve *Mi-1.7*) olan benzerliği incelenmiştir. Bunun için NCBI’da bulunan tüm homolog genler (*Mi-1.1*, *Mi-1.3*, *Mi-1.4*, *Mi-1.5*, *Mi-1.6* ve *Mi-1.7*) *Mi-1.2* geni ile alignment edilmiştir. *Mi1.2F* primerlerinin dizilimleri diğer homolog genlerin ilgili bölgelerinden SNP, deletion (silinme) ve insertion (ekleme) farklılıkları olduğu, *Mi1.2R* primeri ise *Mi-1.4*, *Mi-1.5* ve *Mi-1.7* dizilimleri ile aynı olduğu görülmüştür. PCR işleminin temel mantığı gereği *Mi1.2F* primeri diğer genlerin ilgili bölgesine bağlanamayacağı için yalnızca *Mi-1.2* gen bölgesinin çoğaltılabileceği öngörülmüştür. *Mi1.2-F* primeri, diğer homolog genlerin ilgili bölgelerinden 3 baz farklılık göstermiştir. *Mi1.2-R* primeri ise *Mi-1.4*, *Mi-1.5* ve *Mi-1.7* dizilimleri ile aynıdır. Ayrıca bu primerlerle kullanılan UPL 89 probunun *Mi-1.4*, *Mi-1.5* ve *Mi-1.7* ile de tam eşleştiği görülmektedir. Bu primer setinin yukarıda açıklanan temel yaklaşıma göre yalnızca *Mi-1.2* gen bölgesini çoğaltmış olduğu düşünülmektedir. *Fj-M1.2F* primeri, *Mi-1.4*, *Mi-1.5* ve *Mi-1.7* dizilimleri ile aynı fakat *Fj-M1.2R* dizilimleri farklıdır. Bu primer çiftinin yalnızca *Mi-1.2* genine özgü PCR ürünü verebileceği öngörülmektedir. *Ls_Mi1.2-F* ve *Ls_Mi1.2-R* primerinin *Mi-1.4*, *Mi-1.5* ve *Mi-1.7* homolog genlerinden yalnızca bir baz farklı olduğu belirlenmiştir. Bu primer çiftinin *Mi-1.2* geni yanında, Seval F₁’de *Mi-1.4*, *Mi-1.5* ve *Mi-1.7* homologları bulunması

durumunda bunların ilgili bölgelerini de çoğaltabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada, dayanıklı Seval F₁ çeşidi kullanılmış olsa da bu çeşidin ilgili *Mi-1* bölgesinde Seah vd. (2007) tarafından duyarlı bitkide bulunan *Mi-1A*, *Mi-1B*, *Mi-1C*, *Mi-1D*, *Mi-1E*, *Mi-1F* ve *Mi-1G* homologlardan hangisi veya hangilerini taşıyıp taşımadığı bilinmemektedir. Örneklerin analizinde kullanılan primerlerin homolog gen bölgelerine benzerlikleri Geneious programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Mi1.2F primerinin diğer homolog genler ile karşılaştırıldığında 2 veya daha fazla baz farkı ve silinme (deletion) bölgesi olduğu görülmüştür. Mi1.2R primeri ise *Mi-1G* hariç diğerlerinden baz farklılığı bulunmaktadır. Fj-Mi1.2F primerlerinin, *Mi-1A* ve *Mi-1B* homologları hariç diğerleri ile uyumlu olduğu, Fj-Mi1.2R primerinin ise tüm homolog dizilerden baz farkının bulunduğu tespit edilmiştir. Mi1.2-F primeri diğer homologlardan 2 veya daha fazla baz farkı olduğu görülmüştür. Mi1.2-R primeri ise *Mi-1A*, *Mi-1E* ve *Mi-1F* dizilerinden farklı olarak diğer homolog dizilimleri ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. UPL 89 probu, *Mi-1G* hariç diğerlerinden farklıdır. Ls_Mi1.2-F primeri tüm homolog dizilerinden farklı, Ls_Mi1.2-R ise *Mi-1F* ve *Mi-1C* hariç diğer homologlar ile tam eşleşmediği tespit edilmiştir. *Mi-1.2* geni yanında homolog genlerinin de ifadesinin olabileceği bildirilmiştir (Seah vd. 2007). Bu çalışmada, Seval F₁ çeşidinde *Mi-1.2* yanında hangi homolog genlerin olduğu ve bunların ifadesinin *Mi-1.2* geninin ifadesi ölçümüne ne düzeyde etki ettiği tam olarak belirlenememiştir. Bu konunun tam olarak anlaşılması için Seval F₁ materyalinin aynı koşullarda nematodlara maruz bırakılarak RNA izolasyonu yapılması ve bu örnekler kullanılarak RNAseq analizlerinin yapılması gerekmektedir. Böylece ilgili gen bölgesinin sekans bilgisine göre yalnızca *Mi-1.2* genine özgü primer geliştirilmesi ve daha güvenilir sonuca ulaşılmasına imkân verebileceği düşünülmektedir.

Gen ifade değişim analizi çalışmalarında mRNA'nın kullanılıyor olması birçok parametrenin sonuçlar üzerinde etkili olabileceğini göstermektedir. Özellikle biyolojik test çalışmalarında bu durum çok önemlidir. Kök ur nematodları ile yapılan bitki testlemelerinde değişik faktörler sonuçlar üzerinde önemli olmaktadır. Nematod izolatinın virülensliği, inokülasyonda kullanılan nematod sayısı, toprak sıcaklığı ve fidenin dönemi gibi farklı parametrelerin biyolojik testin performansını etkilediği belirtilmiştir (Mıstanoğlu vd. 2016). Bir diğer çalışmada ise dayanıklı ve duyarlı domates bitkilerinin *M. incognita*'nın ırk 2 ile inokülasyon yoğunluğuna göre farklılık

gösterdiği belirlenmiştir (Özalp vd. 2018). Bu çalışmada, örnekler arasında oluşan farklılıklara inokülasyon yoğunluğunun da biyolojik tekerrürler üzerinde değişikliğe sebep olmuş olabileceği düşünülmektedir. Biyotik ve abiyotik faktörlerin *Mi-1.2* gen ifade analizi üzerine farklı sonuçlar verdiği rapor edilmiştir. Fujimota vd. (2011), metil jasmonate (meJA)'ın değişik konsantrasyonlarda bitki üst aksamında uygulanmasında 0,5 mM ve daha yüksek konsantrasyonunun bitkide kök-ur nematodlarının enfeksiyonu azalttığı ve bu etkinin yaklaşık bir hafta sürdüğü belirtilmiştir. Guan vd. (2016) *Mi-1* geni taşıyan domates bitkisinin *M. incognita*'nın virü lent ve avirü lent izolatları ile inokülasyonu sonrası RNAseq analizi ile 308 diferansiyel olarak ifade edilen genler differentially expressed genes (DEGs) tanımlamışlar ve bunlar içerisinde seçilen 23 DEGs qRT-PCR ile doğrulamışlardır. Bir diğer çalışmada Seiml-Buchinger vd. (2019) qRT-PCR analizi sonucu, stres olmayan koşullarda dayanıklı ve duyarlı bitkilerde *Mi-1.2*, *PR1* ve *PR6* genlerinin ifade düzeylerinin benzer olduğunu fakat nematod enfeksiyonu süresince dayanıklı bitkilerde *Mi1.2*, *PR1* ve *PR6* genlerinin daha fazla çalıştığı, duyarlı bitkilerde ise gen ifadesinde herhangi bir tepki olmadığını belirtmişlerdir. Bu çalışmalar, *Mi-1.2* geninin ifadesinin farklı biyotik ve abiyotik faktörlere ve inokülasyon sonrası zamana göre değişkenlik gösterebildiği belirlenmiştir.

5. SONUÇLAR

Domates dünyada ve Türkiye’de yetiştiriciliği yapılan en önemli sebzelerden biridir. Kök-ur nematodları, domates üretiminde önemli kayıplara sebep olmaktadır. *Mi-1.2* geni, domateste kayıplar neden olan *M. arenaria*, *M. incognita* ve *M. javanica*’ya karşı dayanıklılık sağlamaktadır (Roberts ve Thomason 1989; Milligan vd. 1998). Fakat virü lent popülasyonlar, *Mi-1.2* genini kırmaktadırlar (Castagnone-Sereno vd. 1993). Bu çalışmada, *Mi-1.2* geni taşıyan domates bitkilerinin virü lent ve avirü lent *M. incognita* izolatları ile inokülasyonundan farklı süreler sonra (48, 96 ve 192 saat) *Mi-1.2* geninin ifade düzeyi ifade düzeyi araştırılmıştır.

Bu çalışmada, *Mi-1.2* geni taşıyan dayanıklı domates bitkisinin virü lent ve avirü lent *M. incognita* popülasyonlarının enfeksiyonuna karşı *Mi-1.2* gen ifade değişimleri Real-Time PCR tekniği kullanılarak analiz edilmiştir. Bitki başına 1000 adet *M. incognita* J₂ aşamasında kök-ur nematodu olacak şekilde sayılarak dayanıklı Seval F1 inokülasyonu gerçekleştirilmiştir. İnokülasyon sonrası zamana göre 3 biyolojik tekerrür yapılan bitkiler ile 48 saat, 96 saat ve 192 saat sonra RNA izolasyonu yapılmıştır. Domates bitkisi üzerinde kök-ur nematodu enfeksiyonu sonrasında zamana bağlı *Mi-1.2* gen ifade değişimini gözlemlemek amacıyla SYBR Green I ve probler ile qPCR yapılmıştır.

Mi.1.2 geninin ifadesi için bu gene özgü primerler ile referans gen olarak GAPDH kullanılmıştır. Çalışmada öncelikle SYBR Green I boyası ile altı primer seti (MetMi1.2F/MetMi1.2R, Mi1.2F/Mi1.2R, Mmi1.2F/Mmi1.2R, Fj-M1.2F/Fj-M1.2R, Mi-1.2PP F/Mi-1.2PP R ve Mi-1.2JEB F/Mi-1.2JEB R) kullanılmıştır. Primerlerin, dayanıklı ve duyarlı bitkilerdeki ön analiz sonucu C_T değerleri ve amplifikasyon eğrileri dikkate alınarak aralarından iki primer seti (Mi1.2F/Mi1.2R ve Fj-M1.2F/Fj-M1.2R) örneklerin analizi için seçilmiştir. Mi-1.2PP F/Mi-1.2PP R primer çiftleri (Zhou vd. 2018) ve Mi-1.2JEB F/Mi-1.2JEB R primer çiftleri (Paripparambil vd. 2015) ve dizayn edilen primerler (MetMi1.2F/MetMi1.2R ve Mmi1.2F/Mmi1.2R) dayanıklı ve duyarlı örnekler arasında beklenen farklılığı göstermemiştir.

Mi.1.2F/Mi1.2R primerleri ile SYBR Green I boyası kullanılarak yapılan real time PCR analizlerinde; nematod inokülasyondan 48 saat sonra *M. incognita*'nın avirü lent G7 izolatu bitkide; 1,93 kat artışa neden olurken *M. incognita*'nın virü lent V6 izolatu 1,74 kat azalışa; 96 saat sonra avirü lent G7 izolatu 1,17 artışa virü lent V6 izolatu ise 1,50 kat artışa; 192 saat sonra avirü lent G7 izolatu 4,38 kat azalışa ve virü lent V6 izolatu ise 2,2 2kat azalışa neden olmuştur. Fj-M1.2F/Fj-M1.2 primerleri SYBR Green I boyası ile yapılan real time PCR analizlerinde; nematod inokülasyondan 48 saat sonra *M. incognita*'nın avirü lent G7 izolatu domates bitkilerinde 2,35 kat azalışa neden olurken *M. incognita*'nın virü lent V6 izolatu 1,57 kat azalışa; 96 saat sonra avirü lent G7 izolatu 1,38 artışa virü lent V6 izolatu ise 1,83 kat artışa; 192 saat sonra avirü lent G7 izolatu 1,06 kat azalışa ve virü lent V6 izolatu ise 1,06 kat artışa neden olmuştur. Mi1.2F/Mi1.2R ve Fj-M1.2F/Fj-M1.2R primerinin qPCR sonuçları karşılaştırıldığında inokülasyondan 96 saat sonra bitkiden alınan örneklerde her iki primer setleri ile artış görü lürken, 48 ve 192 saat sonra alınan örneklerin sonuçlarının birbirlerinden farklı oldu ğu görü lmü ştür. Avirü lent izolatu inokülasyondan 48 saat sonra aynı örneklerin Mi1.2F/Mi1.2R ile yapılan gen ifadesi analizinde 1,93 kat artış gözlenirken, Fj-M1.2F/Fj-M1.2R ile 2,35 kat azalış görü lmü ştür. Buna karşı n inokülasyondan 192 saat sonra yapılan analizde ise virü lent izolat Mi1.2F/Mi1.2R 2,22 kat azalışa neden olurken, Mi1.2F/Mi1.2R ise 1,06 kat artışa neden olmuştur.

Bugüne kadar literatürde domates bitkisi üzerinde *M. incognita* enfeksiyonuna karşı *Mi-1.2* gen ifade değ işimi çalış malarında kullanılmak üzere yapılan prob dizayn çalış masına rastlanılmamıştır. Bu çalış ma yapılan ilk çalış ma olma özelliğini taşımaktadır. Bu kapsamda *Mi-1.2* genine özgü dizayn edilmiş Ls_Mi1.2-P ve UPL 89 problemleri qRT-PCR çalış malarında kullanılmış tır. Mi1.2-F/Mi1.2-R primerleri ile UPL 89 probu ile birlikte real time PCR yapı ldığında, nematod inokülasyonundan 48 saat sonra *M. incognita*'nın avirü lent G7 izolatu bitkilerde; 1,11 kat azalışa ve *M. incognita*'nın virü lent V6 izolatu 1,85 kat azalışa; 96 saat sonra avirü lent G7 izolatu 1,05 kat artışa virü lent V6 izolatu ise 1,43 kat azalışa; 192 saat sonra avirü lent G7 izolatu 2,50 kat azalışa ve virü lent V6 izolatu ise 1,03 kat artışa neden olmuştur. Ls_Mi1.2-F, Ls/Mi1.2-R primerleri Ls_Mi1.2-P ile yapılan real time PCR analizlerinde; nematod inokülasyonundan 48 saat sonra *M. incognita*'nın avirü lent G7 izolatu bitkilerde 2,77 kat azalışa *M. incognita*'nın virü lent V6 izolatu 1,97 kat azalışa; 96 saat sonra avirü lent G7

izolatı 1,32 kat artışa virü lent V6 izolatı ise 1,45 kat artışa; 192 saat sonra avirü lent G7 izolatı 1,03 kat artışa ve virü lent V6 izolatı ise 1,32 kat artışa neden olmuştur. Mi1.2-F/Mi1.2-R ve Ls_Mi1.2-F, Ls/Mi1.2-R primerlerinin prob lar kullanılarak qRT-PCR sonuç ları karşı laştırıldığında nematod inokü lasyondan 48 saat sonra alınan ö rneklerde her iki prob setinde azalış görü lürken, 96 ve 192 saat sonra alınan ö rneklerin sonuç larında farklıklar tespit edilmiştir. Virü lent izolatın inokü lasyondan 96 saat sonra aynı ö rneklerin UPL 89 ile yapılan gen ifadesi analizinde 1,43 kat azalış olurken Ls_Mi1.2-P ile 1,45 kat artış; inokü lasyondan 192 saat sonra yapılan analizde ise avirü lent izolat UPL 89 prob ile 2,5 kat azalışa neden olurken, Ls_Mi1.2-P ile 1,32 kat artışa neden olmuştur.

Mi-1.2 geni klonlanmış ve aynı bölgede *Mi-1.1* ve *Mi-1.2* genleri ile bir yalancı gen (pseudogene) olduğunu ve dayanıklılığın yalnızca *Mi-1.2* geni tarafından sağladığını bildirmişlerdir (Milligan vd. 1998). Bu nedenle *Mi-1.2* geni ile ilgili primerlerin geliştirilmesinde önceki çalışmalarda kullanılan *Mi-1.1* ile *Mi-1.2* genlerinin karşı laştırılması yapılmıştır. Bu çalışmada dizayn edilen primerler içinde öncelikle bu durum dikkate alınmış ve primerlerin (Mi1.2F/Mi1.2R, Ls_Mi1.2-F/Ls_Mi1.2-R ve Mi1.2-F/Mi1.2-R) ve UPL 89 probunun *Mi-1.2* genine özgü olduğu görü lmüştür.

Mi-1 gen bölgesinde, *Mi-1.2* genin farklı homologlarının (dayanıklı bitkide; *Mi-1.1*, *Mi-1.2*, *Mi-1.3*, *Mi-1.4*, *Mi-1.5*, *Mi-1.6* ve *Mi-1.7*) ve (duyarlı bitkide; *Mi-1A*, *Mi-1B*, *Mi-1C*, *Mi-1D*, *Mi-1E*, *Mi-1F* ve *Mi-1G*) olarak *Mi-1* gen bölgesinde *Mi-1.2* genin farklı homologlarının bulunduğ u bildirilmiştir (Seah vd 2007). Bu çalışmada geliştirilen ve önceki çalışmalardan seçilen primerlerin diğ er homolog genlerle ilişkisi ayrı ayrı araştırılmış tır. Buna karşı n farklı *Mi-1.2* gen homologlarının ifade düzeyleri arasındaki ilişkiyi konu alan detaylı bir çalışma bulunmamaktadır. Dolayısıyla, *Mi-1.2* homologlarının stressiz veya enfeksiyona uğ ramış koş ullarda önemli bir gen ifadesi gösterip göstermediğ i ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır. Buradan hareketle, açık veri tabanları üzerinden *Mi-1.2* genine özel dizayn edilmiş primerler, zaten çok yüksek oranlarda sekans dizilimi aynı olan homolog genlere bağ landığ ı takdirde bu bölgeleri de çoğ altarak *Mi-1.2* gen ifade ölç ümünde önemli oranda sapmalara sebep olabilecektir. Ayrıca kö k ur nematodları ile yapılan bitki testlemelerinde, nematod izolatının virü lensliğ i, inokü lasyonda kullanılan nematod sayısı, toprak sıcaklığ ı ve fidenin yaşı

gibi farklı parametreler genin çalışmasını etkileyebileceği için bunların etkisini azaltmak için testlemede kullanılacak bitki sayıları artırılabilir.

Kullanılan materyale göre gen dizilimlerinde çeşitli değişiklikler olması beklenen bir durumdur. Bu sebeple veri tabanına yüklenmiş gen dizilimleri üzerinden dizayn edilen primerler kullanılmış, homolog genler ile net bir ayırım yapabildiği belirlense dahi kullanılan materyalin gen diziliminde çeşitli farklılıklar olabileceğinden dolayı beklenen ayırımın yapılamayabileceği de düşünülmektedir.

Mi-1.2 geninin çok yüksek oranda benzerliği olan çok sayıda homolog geni bulunması sebebiyle bu gene özgü yapılacak primer dizayn çalışmalarını zorlaştırmaktadır. Gen ifadesi çalışmalarında kesin bir kanıya varmak için testlenecek bitkisel materyalin ilgili gen bölgesinin sekansının bilinmesi ve primerlerin buna göre dizayn edilerek homolog genlerin olası etkisi ortadan kaldırılabilecektir. Bunun için bitkisel materyalin RNAseq analizinin yapılması daha güvenileri sonuçlara ulaşmaya imkân verebilecektir.

7. KAYNAKLAR

- 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.
- Akkurt, H. D., Kaşkavalcı, G. and Peçen, A. 2013. Investigations on the effects of solarization and synergic use of some other treatments against root-knot nematodes (*Meloidogyne spp.*) in organic tomato growing. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 37(1): 81-92.
- Akyazı, F. ve O. Ecevit. 2011. Tokat İli sebze alanlarındaki kök-ur nematod (*Meloidogyne spp.*)'larının yayılışları ve tür tespiti. *Anadolu Tarım Bilim Dergisi*. 26(1):1-9.
- Anastasiadis, I. A., Giannakou, I. O., Prophetou-Athanasiadou, D. A. and Gowen, S. R. 2008. The combined effect of the application of a biocontrol agent *Paecilomyces lilacinus*, with various practices for the control of root-knot nematodes. *Crop Protection*, 27: 352-361.
- 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 Seralarında Kök-ur Nematodu (*Meloidogyne spp.*) Populasyonları Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi, OMÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı.
- Bailey, D. M. 1941. The seedling test method for root-knot-nematode resistance. In: *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*. 38: 573-575.
- Bakker, J., 1993. Current state of nematocides. In: Zadoks J.C. (Ed.), *Modern crop protection: Developments and perspectives*. Wageningen Agric. Univ. Press. pp. 21-26.
- Beecher, G. R. 1998. Nutrient content of tomatoes and tomato products. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 218(2): 98-100.
- Bird, D. M. and Kaloshian, I. 2003. Are roots special? Nematodes have their say. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62(2): 115-123.
- 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*, 1(1): 1-16.
- Bustin, S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology*, 29: 23-39
- Castagnone-Sereno, P. 2002. Genetic variability of nematodes: a threat to the durability of plant resistance genes. *Euphytica*, 124: 193-199.

- 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(8): 803-805.
- Catalkaya, M., and Devran, Z. 2019. Integrated management of *Mi-1* virulent *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949 (Tylenchida: *Meloidogynidae*) in greenhouse tomatoes. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 43(2): 157-169.
- Causse, M., Giovannoni, J., Bouzayen, M. and Zouine, M. 2016. The Tomato Genome. In: Compendium of Plant Genomes, Springer, pp. 259
- Cook, R. and K. Evans, 1987. Resistance and Tolerance. In: Kerry, B.R. and Brown, R.H. (Eds.), Principles and Practice of Nematode Control in Crop. Academic Press, Australia, pp. 179-220.
- Cortada, L., Sorribas, F.J., Ornat, C., Andres, M.F., and Verdejo-Lucas, S. 2009. Response of tomato rootstocks carrying the *Mi*-resistance gene to populations of *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* and *M. Javanica*. *European Journal of Plant Pathology*, 124: 337-343.
- Cortada, C., Vidal, L., Pastor, R., Santiago, N., and Canals, A. 2009. Determination of organochlorine pesticides in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 649(2): 218-221.
- 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. and Söğüt, M. A. 2014. Response of heat-stable tomato genotypes to *Mi-1* virulent root-knot nematode populations. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 38(3): 229-238.
- Devran, Z. and Söğüt, M.A. 2009. Distribution and identification of root-knot nematodes from Turkey. *Journal of Nematology*, 41:128-133.
- Devran, Z., Mutlu, N., Özarslandan, A., Elekcioglu, İ.H., 2009. Identification and genetic diversity of *Meloidogyne chitwoodi* in potato production areas of Turkey. *Nematropica*, 39: 75-83.
- Di Vito, M., Greco, N., Ores, G., Saxena, M. C., Singh, K. B., and Kusmenoglu, I. 1994. Plant parasitic nematodes of legumes in Turkey.
- Diker, T. 1959. Nebat Parazit Nematodları. Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş. Neşriyatı, No: 70, Ankara, 98 s.
- Dorak, M. T. (Ed.). 2007. Real-time PCR. Taylor & Francis.
- Dropkin, V. 1969. The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: reversal by temperature. *Phytopathology*, 59: 1632-1637.
- Eddaoudi, M., Ammati, M., and Rammah, A. 1997. Identification of the resistance breaking populations of *Meloidogyne* on tomatoes in Morocco and their effect on new sources of resistance. *Fundamental and Applied Nematology*, 20(3): 285-290

- Eisenback, J. D., and Triantaphyllou, H. H. 1991. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species and races. *Manual of agricultural nematology*, 1: 191-274.
- Ertürk, H., and Özkut, S. 1973. Ege Bölgesi şartlarında kök-ur nematodlarına (*Meloidogyne* spp.) dayanıklı asma anacı araştırması. IV. Bilim Kongresi Bildiriler, 1-7.
- FAO, 2016. Production. Retrieved from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> [Erişim tarihi: 12.01.2020].
- FAO, 2017. Production. Retrieved from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> [Erişim tarihi: 12.01.2020].
- FAO, 2018. Production. Retrieved from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> [Erişim tarihi: 12.01.2020].
- Fujimoto, T., Tomitaka, Y., Abe, H., Tsuda, S., Futai, K., and Mizukubo, T. 2011. Expression profile of jasmonic acid-induced genes and the induced resistance against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato plants (*Solanum lycopersicum*) after foliar treatment with methyl jasmonate. *Journal of plant physiology*, 168(10): 1084-1097.
- Gebremariam, G. 2015. Tuta absoluta: a global looming challenge in tomato production, review paper. *J Biol Agric Healthc*, 5(14): 57-62.
- Gerič Stare, B., Strajnar, P., Susič, N., Urek, G., and Širca, S. 2017. Reported populations of *Meloidogyne ethiopica* in Europe identified as *Meloidogyne luci*. *Plant disease*, 101(9): 1627-1632.
- Gheysen, G. and Jones, J.T. 2006. Molecular aspects of plant–nematode interactions. In: Perry, R.N. and Moens, M. (Eds.), *Plant Nematology*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 234–254.
- Guan, T., Shen, J., Fa, Y., Su, Y., Wang, X., and Li, H. 2017. Resistance-breaking population of *Meloidogyne incognita* utilizes plant peroxidase to scavenge reactive oxygen species, thereby promoting parasitism on tomato carrying *Mi-1* gene. *Biochemical and biophysical research communications*, 482(1): 1-7.
- 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(6): 971-982.
- Huang, G., Dong, R., Maier, T., Allen, R., Davis, E. L., Baum, T. J., and Hussey, R. S. 2004. Use of solid-phase subtractive hybridization for the identification of parasitism gene candidates from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Molecular plant pathology*, 5(3): 217-222.
- Hwang, C. F., and Williamson, V. M. 2003. Leucine-rich repeat-mediated intramolecular interactions in nematode recognition and cell death signaling by the tomato resistance protein *Mi*. *The Plant Journal*, 34(5): 585-593.

- 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. *Phytopathology*, 104(5): 484-496.
- Iberkleid, I., Vieira, P., de Almeida Engler, J., Firester, K., Spiegel, Y., and Horowitz, S. B. 2013. Fatty acid-and retinol-binding protein, Mj-FAR-1 induces tomato host susceptibility to root-knot nematodes. *PloS one*, 8(5).
- Jacquet, M., Bongiovanni, M., Martinez, M., Verschave, P., Wajnberg, E., and Castagnone-Sereno, P. 2005. Variation in resistance to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in tomato genotypes bearing the *Mi* gene. *Plant Pathology*, 54(2):
- Jarquín-Barberena, H., Dalmasso, A., Guiran, G. D., and Cardin, M. C. 1991. Acquired virulence in the plant parasitic nematode *Meloidogyne incognita*: 1. Biological analysis of the phenomenon. *Revue de Nématologie*.
- Jenkins, J. A. 1948. The origin of the cultivated tomato. *Economic Botany*, 2(4): 379-392.
- Jensen, E. C. 2012. Real-Time reverse transcription polymerase chain reaction to measure mRNA: Use, limitations, and presentation of results. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 295(1): 1-3.
- Jones J.T., Haegeman A., Danchin E.G.J., Gaur H.S., Helder J., Jones M.G.K., Kikuchi T., Manzanilla López R., Palomares-Rius J.E., Wesemael W.M.L. and Perry R.N. 2013. Top 10 plantparasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 14: 946– 961.
- Kaloshian, I., Williamson, V., Miyao, G., Lawn, D., and Westerdahl, B. 1996. “Resistance-breaking” nematodes identified in California tomatoes. *California Agriculture*, 50(6): 18-19.
- Kaloshian, I., Yaghoobi, J., Liharska, T., Hontelez, J., Hanson, D., Hogan, P., Jesse, T., Wijbrandi, J., Simons, G., Vos, P., Zabel, P., and Williamson, V.M. 1998. Genetic and physical localization of the root-knot nematode resistance locus *Mi* in tomato. *Molecular & General Genetics*, 257: 376-385.
- Kaşkavalcı, G., and Öncüer, C. 1999. Investigations on the distribution and economic importance of *Meloidogyne Goeldi*, 1887 (Tylenchida: *Meloidogynidae*) species found in the major areas of hot elimata vegetables in Aydın province. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 23(2). 93-99.
- Katan J. 1996. Principles and practice of managing soil borne plant pathogens. In: Hall R. (Ed.), Soil solarisation. APS Press., pp. 250-278.
- Katan J., Greenberger A., Alon H. and Grinstein A. 1976. Solar heating by polyethylene mulching for the control of diseases caused by soil- borne pathogens. *Phytopathology*, 66: 683-688.
- Katan, J. 1981. Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pests. *Annual Review of Phytopathology*, 19(1): 211-236.

- Keren-Zur, M., Antonov, J., Bercovitz, A., Feldman, K., Husid, A., Kenan, G., Markov, N. and Rebhun, M. 2000. *Bacillus facil* formulations for the safe control of root-knot nematodes. Retrieved from <http://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20003031309> [Son erişim tarihi: 10 Şubat 2019].
- Landi, S. d'Errico, G., Roversi, P. F., and d'Errico F. P. 2018. Management of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato with different combinations of nematicides and a resistant rootstock: preliminary data. *J Zoology*, 101; 47-52.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*, 25(4): 402-408.
- Lopez-Perez, J. A., Strange, M. L., Kaloshian, I. and Ploeg, A. T. 2006. Differential response of *Mi* gene resistant tomato rootstocks to root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*). *Crop Protection*, 25: 382-388.
- Maleita, C.M., Vieira Dos Santos M.C., Curtis, R.H.C., Powers, S.J., and Abrantes, I.M. de O. 2011. Effect of the *Mi* gene on reproduction of *Meloidogyne hispanica* on tomato genotypes. *Nematology*, 13(8): 939-949.
- Mennan, S. ve O. Ecevit. 2001. Bafra ve Çarşamba Ovaları'ndaki bazı *Meloidogyne incognita* (Nemata; Heteroderidae) popülasyonlarının ırk tespiti. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 25(1): 33- 39.
- Milligan, S. B., Bodeau, J., Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Zabel, P., and Williamson, V. M. 1998. The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *The Plant Cell*, 10(8): 1307-1319.
- 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. *The Turkish Journal of Entomology*, 40(4): 377-383.
- Netscher, C., and Sikora, R. A. 1990. Nematode parasites of vegetables. In: Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture, CABI, pp. 237-283.
- Nombela, G., Williamson, V. M., and Muñiz, M. 2003. The root-knot nematode resistance gene *Mi-1.2* of tomato is responsible for resistance against the whitefly *Bemisia tabaci*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(7): 645-649.
- 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(3): 271-276.
- Oštrec, L., and Grubišič, D. 2003. Effects of soil solarization on nematodes in Croatia. *Journal of pest science*, 76(5): 139-144.
- Özalp, T., and 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.

- Özalp, T., Mistanoğlu, and İ., Devran, Z. 2018. 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.
- Özarslandan, A., Z. Devran, N. Mutlu and İ.H. Elekcioglu, 2009. First report of Columbia Root-Knot nematode (*Meloidogyne chitwoodi*) in potato in Turkey. *Plant Disease*, 93(3):316.
- Pallipparambil, G. R., Sayler, R. J., Shapiro, J. P., Thomas, J. M., Kring, T. J., and Goggin, F. L. 2014. *Mi-1.2*, an R gene for aphid resistance in tomato, has direct negative effects on a zoophytophagous biocontrol agent, *Orius insidiosus*. *Journal of experimental botany*, 66(2): 549-557.
- Pehlivan, E. ve G. Kaşkavalcı. 1992. Sanayi domatesi üretim alanlarında Kök-ur nematodları (*Meloidogyne spp.*)'nın yayılışı ve bulaşıklılık oranı üzerinde araştırmalar, *SANDOM Çalışma Raporu*, 6: 61-68.
- Peralta, I. E., and Spooner, D. M. 2007. History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae). *Genetic improvement of solanaceous crops*, 2: 1-27.
- Perry, R. N., Moens, M., and Starr, J. L. 2009. Root-knot nematodes. CABI.
- Razdan, M. K. 2006. Genetic improvement of solanaceous crops volume 2: tomato. CRC Press.
- Rebrikov, D. V., and Trofimov, D. Y. 2006. Real-time PCR: a review of approaches to data analysis. *Applied biochemistry and microbiology*, 42(5): 455-463.
- Rick, C. M. 1973. Potential genetic resources in tomato species: clues from observations in native habitats. In: *Genes, enzymes, and populations*, Springer, Boston, MA., pp. 255-269.
- Roberts, P. A., and Thomason, I. J. 1989. Review of variability in four *Meloidogyne spp.* measured by reproduction on several hosts including *Lycopersicon*. *Agricultural Zoology Reviews*.
- 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.
- 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(17): 9750-9754.
- Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3(6): 1101.

- Seah, S., Williamson, V. M., Garcia, B. E., Mejia, L., Salus, M. S., Martin, C. T., and Maxwell, D. P. 2007. Evaluation of a co-dominant SCAR marker for detection of the *Mi-1* locus for resistance to root-knot nematode in tomato germplasm. *Tomato Genetic Cooperative Report*, 57: 37-40.
- Seiml-Buchinger, V. V., Zinovieva, S. V., Udalova, Z. V., and Matveeva, E. M. 2019. Jasmonic acid modulates *Meloidogyne incognita*-tomato plant interactions. *Nematology*, 21(2): 171-180.
- Shukla, N., Yadav, R., Kaur, P., Rasmussen, S., Goel, S., Agarwal, M., Jagannath, A., Gupta, R. and Kumar, A. 2018. Transcriptome analysis of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*)-infected tomato (*Solanum lycopersicum*) roots reveals complex gene expression profiles and metabolic networks of both host and nematode during susceptible and resistance responses. *Molecular plant pathology*, 19(3): 615-633.
- Siddique S., Matera C., Radakovic Z.S., Shamim Hasan M., Gutbrod P., Rozanska E., Sobczak M., Torres M.A. and Grundler F.M.W. 2014. Parasitic worms stimulate host NADPH oxidases to produce reactive oxygen species that limit plant cell death and promote infection. *Sci. Signal.* 7(320): 1–9.
- Smith, P. G. 1944. Embryo culture of a tomato species hybrid. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 44, pp. 413-416.
- Sorribas, F. J., Ornat, C., Verdejo-Lucas, S., Galeano, M., and Valero, J. 2005. Effectiveness and profitability of the *Mi*-resistant tomatoes to control root-knot nematodes. *European Journal of Plant Pathology*, 111(1): 29-38.
- Söğüt, M.A. ve İ.H. Elekçioğlu. 2000. Akdeniz Bölgesi'nde sebze alanlarında bulunan *Meloidogyne Goeldi*, 1892 (Nemata: Heteroderidae) türlerinin ırklarının belirlenmesi. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 24(1): 33–40.
- Taylor, J. B. 1986. Biosystematic of the Tomato. In: Atherton, J.G. and Rudich, J. (Eds.), *The tomato crop: A scientific basis for improvement*, Chapman and Hall, London, pp. 1-34
- Tzortzakakis, E. A., Adam, M. A., 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(1): 101-105.
- Udvardi, M.K., Czechowski, T. and Scheible, W.R. 2008. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell*, 20: 1736–1737.
- Uysal, G., Söğüt, M. A., and Elekçioğlu, İ. H. 2017. Identification and distribution of root-knot nematode species (*Meloidogyne spp.*) in vegetable growing areas of Lakes Region in Turkey. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 41(1): 105-122.
- Verdejo-Lucas, S., Blanco, M., Cortada, L., and Sorribas, F.J. 2013. Resistance of tomato rootstocks to *Meloidogyne arenaria* and *Meloidogyne javanica* under intermittent elevated soil temperatures above 28 °C. *Crop Protection*, 46: 57- 62.

- Verdejo-Lucas, S., Cortada, L., Sorribas, F. J., and Ornat, C. 2009. Selection of virulent populations of *Meloidogyne javanica* by repeated cultivation of *Mi* resistance gene tomato rootstocks under field conditions. *Plant Pathology*, 58(5): 990-998.
- Verdejo-Lucas, S., Talavera, M., and Andrés, M. F. 2012. Virulence response to the *Mi.1* gene of *Meloidogyne* populations from tomato in greenhouses. *Crop Protection*, 39: 97-105.
- Walia, R. K., Sharma, S. B. and Vats, R. 2000. Bacterial Antagonists of Phytonematodes, 173-186. In: Upadhyay, R. R., Mukerji, K. G. and Chamola, B.P. (Eds.), Biocontrol Potential, and Its Exploitation in Sustainable Agriculture: Crop Diseases, Weeds and, Nematodes, Vol. I. Kluwer Academy Plenum, New York, pp. 294
- Walia, R. K., Sharma, S. B., & Vats, R. (2000). Bacterial antagonists of phytonematodes. In Biocontrol potential and its exploitation in sustainable agriculture (pp. 173-186). Springer, Boston, MA.
- Wesemael, W. M. L., Viaene, N. and Moens, M. 2011. Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Europe. *Nematology*, 13 (1): 3-16.
- Whitehead, A.G., 1997. Plant-parasitic nematodes: their importance and control. In: Plant nematode control. CAB Int., Wallingford, UK, pp. 1-12
- Williamson, V. M. 1998. Root-knot nematode resistance genes in tomato and their potential for future use. *Annual review of phytopathology*, 36(1): 277-293.
- Williamson, V. M., and Hussey, R. S. 1996. Nematode pathogenesis and resistance in plants. *The Plant Cell*, 8(10): 1735.
- Wyss, U., F.M.W. Grundler and A. Munch. 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., and 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(4): 377-382.
- Yazgan, A., ve Fidan, S. 1996. Tokat koşullarına uygun Kiraz domates (*Lycopersicon esculentum* Mill. var. *cerasiforme*) çeşitlerinin belirlenmesi. *GAP*, 1: 7-10.
- Yüksel, H.Ş. 1966. Karadeniz Bölgesi'nde tesadüf edilen *Meloidogyne incognita* varyasyonu hakkında. *Bitki Koruma Bülteni*, 6: 35-38.
- Yüksel, H.Ş. 1974. Kök-ur Nematodlarının (*Meloidogyne* spp.) Türkiye' deki durumu ve bunların popülasyon problemi üzerinde düşünceler. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 5(1): 83-105.
- Zhou, J., Xu, X. C., Cao, J. J., Yin, L. L., Xia, X. J., Shi, K., Zhou, Y. H. and Yu, J. Q. 2018. Heat Shock Factor HsfA1a Is Essential for R Gene-Mediated Nematode Resistance and Triggers H2O2 Production1. *Plant physiology*, 176(3): 2456-2471.

ÖZGEÇMİŞ

Nur ÜLGER

nur2mlt@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2018-2020	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Bölümü, Antalya
Lisans 2012-2017	Yeditepe Üniversitesi Mimarlık ve Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, İstanbul