

Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV)'ne dayanıklı sivri biber hatlarının geliştirilmesi

İbrahim ÇELİK¹ Ramazan ÖZALP¹ Nejla ÇELİK¹ İlknur POLAT¹ Görkem SÜLÜ¹

¹ Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Antalya

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: ibrahim.celik@tarim.gov.tr

Makale Bilgisi/Article Info
Derim, 2018/35(1): 27-36
doi: 10.16882/derim.2018.325765

Araştırma Makalesi/Research Article
Geliş Tarihi/Received: 03.07.2017
Kabul Tarihi/Accepted: 02.12.2017



Öz

Biber dünyada domates ve karpuzdan sonra en fazla yetiştirilen sebze türüdür. Virüs hastalıkları biber üretimini sınırlandıran en önemli etmenler arasında yer almaktadır. Bu hastalıkların başında domates lekeli solgunluk virüsü (Tomato Spotted Wilt Virüs=TSWV) gelmektedir. Hastalığın kontrolünde en güvenilir yöntem dayanıklı çeşitlerin kullanılmasıdır. Bu çalışmada TSWV'ye dayanıklı yeni sivri biber çeşitlerinin geliştirilebilmesi için ebeveyn olarak kullanılacak hatların ıslahı amaçlanmıştır. Çalışmada TSWV'ye dayanıklı üç adet genotip ile bu hastalığa karşı hassas ve uzun yıllar ticari olarak kullanılan Serademre 8 çeşidi materyal olarak kullanılmıştır. Islah metodu olarak pedigrî yöntemi uygulanmıştır. Hassas ebeveyn ile dayanıklı genitörler arasında yapılan melezlerden geliştirilen üç populasyon beş dönem kendilenmiş ve biyolojik olarak testlenmiştir. Testleme sonucunda dayanıklı olarak belirlenen bireyler bir sonraki generasyona aktarılarak kendilenmeye devam edilmiştir. Dayanıklı bireylerin belirlenmesinde her dönem biyolojik test yapılırken moleküler testler sadece F₁ ve F₅ kademelerindeki bitkilere uygulanmıştır. Biyolojik testlerde mekanik inokülasyon yöntemi, moleküler testlerde ise *Tsw* geni ile bağlantılı CAPS moleküler işaretleyicisi (SCAC₅₆₈) kullanılmıştır. Bu çalışmada sivri biber ıslah çalışmalarında kullanılacak özelliklere sahip TSWV'ye dayanıklı 10 adet hat geliştirilmiştir. Elde edilen TSWV'ye dayanıklı hatların bir kısmı sivri biber ıslah çalışmalarında kullanılması amacıyla özel sektör tohum firmalarına devri yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biber; TSWV; Mekanik inokülasyon; Moleküler işaretleyici; CAPS

Improvement of long type pepper lines resistant to Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)

Abstract

Pepper is widely grown vegetable crops after tomato and watermelon in the world. One of the most important diseases on pepper production is caused by Tomato spotted wilt virus (TSWV). The best way for the control of this disease is to use resistant varieties. This study aimed to improve TSWV resistant lines to use as a parent in long type pepper breeding studies. Three genotypes resistant to TSWV were crossed with the susceptible Serademre 8 used to be commercial. Pedigree method was applied as the breeding method. Three populations were self-pollinated for five generations. The progenies for each of populations were tested against TSWV. Mechanical inoculations were performed in each generation and the selected resistant plants were grown for self-pollination to achieve next generation. Molecular tests were applied to the plants in stages F₁ and F₅. Virulent strain isolated from infected pepper plants was used as a disease material in the mechanical inoculations. CAPS marker (SCAC₅₆₈) linked to the TSWV resistance gene (*Tsw*) was used in the molecular test for verification of mechanical test. In this study, 10 lines resistant to TSWV with good features were developed. Some of the obtained TSWV resistant lines have been transferred to private sector seed companies for use in pepper breeding programs.

Keywords: Pepper; TSWV; Mechanical inoculation; Molecular marker; CAPS

1. Giriş

Biber dünyada 32 324 345 ton (FAO, 2014) üretim miktarına sahip olan, insan beslenmesinde ve ticari sebze piyasasında önemli bir sebzedir. Türkiye 2 457 822 ton (TÜİK, 2016) biber üretim değeri ile Çin ve Meksika'dan sonra 3. sırada yer almaktadır.

Biber üretimini sınırlandıran pek çok hastalık ve zararlı bulunmaktadır. Virüs hastalıkları biberin en önemli hastalıkları içerisinde yer almakta ve önlem alınmadığı takdirde ciddi verim kayıplarına neden olabilmektedir. Biberde kırktan fazla farklı virüsün hastalık yaptığı bildirilmiştir. Bu virüsler içerisinde en önemlileri: Domates lekeli solgunluk virüsü (Tomato

spotted wilt virüs=TSWV), Hıyar mozaik virüsü (Cucumber mosaic virus=CMV), Tütün mozaik virüsü (Tobacco mosaic virus = TMV), Patates Y virüsü (Potato virus Y=PVY) ve Biber beneklenme virüsü (Pepper mottle virüs=PepMoV)'dür (Palloix vd., 1994; Ekbiç vd., 1997). Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV), *Bunyaviridae* familyasına bağlı *Tospovirus* grubuna dahil bir virüstür (Uhrig vd., 1999; Tsompana vd., 2005). TSWV, çok geniş bir konukçu dizisine sahip olup, dikotiledon ve monokotiledon sınıfından 900'den fazla bitki türünde hastalık yapabilmektedir. Kültür bitkilerinden başta domates, tütün, marul, biber, patates, yerfıstığı ve soğanda ekonomik olarak zarar meydana getirmektedir. Ayrıca, konukçu bitkiler arasında pek çok yabancı ot türleri de bulunmakta olup, bu bitkiler kültür bitkilerinin tamamlamasına yardım etmektedir (Arlı-Sökmen vd., 2005). TSWV farklı thrips türleri ile biyolojik olarak taşınır (Wijkamp vd., 1993) ve çiçek thripsinin (*Frankliniella occidentalis*) bu hastalığın taşınmasında en önemli vektör olduğu bildirilmiştir (Antignus vd., 1997).

TSWV ilk olarak, Avusturalya'da ortaya çıkmıştır. Avusturalya'dan sonra hızla yayılarak Amerika ardından Avrupa, Asya ve Afrika kıtalarında bulunan birçok ülkede varlığı belirlenmiştir (Cho vd., 1986). Türkiye'de ilk olarak Tekinel vd. (1969) tarafından marul bitkilerinde rapor edildikten sonra, Azeri (1981) tarafından önce Çanakkale ilinde, sonrasında Balıkesir, Manisa, Uşak ve Samsun illerinde tespit edilmiştir. Yine Turhan ve Korkmaz (2006) tarafından Çanakkale ilinde domateste TSWV'nin varlığı belirlenmiştir. Akdeniz Bölgesine TSWV'nin ilk girişi 1995 yılında olurken (Güldür vd., 1995), 1997 yılında Şanlıurfa ilinde saptanmıştır (Güldür, 1997). Batı Akdeniz Bölgesinde ise virüs Yılmaz (2002) tarafından bildirilmiştir. Küçük (2006) tarafından Adana ve Mersin illerinde domates ve biberlerde (TSWV)'nin tanısı yapılmıştır. Bozdoğan (2009) tarafından Antalya ili Merkez, Serik ve Kumluca ilçelerinde yetiştirilen biberlerin %91.59'unda TSWV ile bulaşık olduğu saptanmıştır.

Türkiye'de TSWV üzerine yapılan çalışmalar daha ziyade survey çalışmaları, hastalığın yaygınlık durumu, tespiti ve mücadele olanakları üzerinde yoğunlaşırken (Değirmenci ve Uzunoğulları, 2007; Bozdoğan, 2009; Çelik

vd., 2012;), bazı araştırmacılar hastalık etmeni patojen üzerinde çalışmalar yürütmüşler ve ülkemizde dayanıklılığı kıran ırkın varlığını rapor etmişlerdir (Deligöz vd., 2014; Fidan, 2016).

Genel anlamda bitki patojeni virüslerin morfolojik yapıları, enfeksiyon öncesi taşınma mekanizmaları, enfeksiyon mekanizmaları, bitki içerisinde çoğalma ve yayılma yollarının kendine has özellikler taşımasından dolayı kimyasal mücadele mümkün değildir. Virüsler ile kimyasal mücadele dolaylı (indirekt) olarak yapılmakta ve virüs hastalığının taşınarak yayılmasına neden olan vektörlerin ortadan kaldırılmasına yönelik programlanmaktadır (Agrios, 2005). Ayrıca vektör üzerinden yapılan mücadele thripslerin ilaca direnç kazanma ve olası çevre kirliliği risklerini taşımaktadır (Sherwood vd., 2009). Sürdürülebilir ve çevre ile uyumlu bir mücadele için hastalık etmenine karşı dayanıklı çeşit geliştirmek en etkili ve en ekonomik yöntem olarak tavsiye edilmektedir (Boiteux, 1995, Moury vd., 1997;).

TSWV'ye dayanıklılık çalışmalarında biberin yabani akrabalarından olan *Capsicum chinense* Jacq. türünden geliştirilen PI152225, PI159236 ve 7204 no'lu genotipler ıslah programlarında dayanıklılık kaynağı olarak kullanılmaktadır. TSWV'nin kalıtımından sorumlu *Tsw* geni üzerinde yapılan çalışmalar *Tsw* geninin *Capsicum chinense* Jacq. hatlarının (PI152225, PI159236 ve 7204) aynı lokusları üzerinde bulunduğunu göstermiştir (Black vd., 1991; Boiteux, 1995; Moury vd., 1997). *Tsw* geni yabani bitkilerde bulunmakta ve TSWV'nin neden olduğu virüs hastalığına dayanıklılık sağlamaktadır. Dayanıklılığı sağlayan dominant özellikteki bu gen, yabani akraba türler ile hassas kültür çeşitleri arasında yapılan melezlemelerle kültür bitkilerine aktarılmaktadır. Bu yolla elde edilmiş olan ve söz konusu dayanıklılık geni taşıyan hibrit çeşitler, hastalıkla mücadelede ticari olarak kullanılmaya başlanmıştır (Langella vd., 2004). Hibrit çeşitlerden istenen genlerin yeni geliştirilecek çeşit adaylarına veya ebeveyn hatlara aktarılması hem daha kolay, hem de zaman açısından daha kısa sürede gerçekleşmektedir. Yapılan melezlerin veya hibrit çeşitlerin açılan generasyonlarında mekanik inokulasyonla testleme ve hastalığa dayanıklılık sağlayan gen ile bağlantılı moleküler işaretleyiciler dayanıklılık geninin varlığını doğrulamada

kullanılmaktadır. Dayanıklı bitkilerde bulunan özelliklere ait allellere bağlı genetik markörlerin belirlenerek ıslahta kullanılmasıyla (markör destekli seleksiyon) yapılan seçim işlemi sıklıkla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, ıslah çalışmalarında hem mekanik hem de moleküler tekniklerin birlikte kullanımı, hastalığa karşı dayanıklılığın tespitinde daha güvenilir bir yoldur (Çelik vd., 2013; Polat vd., 2016).

Son yıllarda geliştirilen moleküler işaretleyiciler ıslahta önemli kolaylıklar sağlamıştır. Biber ıslahında çeşitli patojen dayanıklılıkları ile bağlantılı moleküler işaretleyiciler geliştirilmiş ve dayanıklı hat ve çeşitleri geliştirmek kolaylaşmıştır. Moury vd., (2000) *Capsicum chinense* PI 152225 x *Capsicum frutescens* PI 195301 türler arası melez popülasyonunu kullanarak *Tsw* genine bağlı dört adet RAPD markırı tespit etmişlerdir. Bu markır, moleküler ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere spesifik co-dominant CAPS markırına (SCAC₅₆₈) çevrilmiş olup günümüzde *Tsw* geninin tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Geliştirilen CAPS markırı ülkemizde de biber ıslah programlarında kullanılarak TSWV'ye dayanıklı sivri ve çarliston tipte hibrit biber geliştirilmiştir (Şimşek, 2014; Özkaynak vd., 2014; Polat vd., 2016). Şimşek vd., (2015) SCAC₅₆₈ markırının kullanımıyla TSWV'ye dayanıklı dolmalık biber çeşitleri de elde etmişlerdir. Bu çalışmanın amacı, TSWV'ye dayanıklı örtüaltı yetiştiriciliğine uygun farklı kademelerde verimli ve kaliteli sivri biber hatlarını geliştirmektir. *Tsw* geni taşıyan bitkileri ayırmada mekanik inokulasyon yöntemine göre testlemeler yapılmış, *Tsw* geni ile bağlantılı CAPS moleküler işaretleyiciler kullanılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyal

Araştırma çalışmaları 2010 ile 2014 yılları arasında, Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Sebzeçilik Bölümü seralarında yürütülmüştür. Çalışmada bitkisel materyal olarak üç adet Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV)'ne dayanıklı sivri biber çeşidi ile Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü (BATEM)'ne ait bir adet hassas ve açık tozlanan sivri biber çeşidi Serademre 8 (SD8; P1) kullanılmıştır. Dayanıklı materyaller (P2, P3, P4: parlak yeşil, demre tip, tek ürüne uygun ve orta erkenci) hibrit çeşitlerden

oluşmaktadır. SD8, Demre tipi sivri biber çeşidi olup ülke genelinde açıkta ve örtüaltında uzun yıllardan beri yetiştirilmektedir. Bu çeşitte hastalık dayanımı yoktur. Popülasyon oluşturmak için biber çeşitleri önce melezlenmiş ve daha sonra kendilenerek seleksiyona tabi tutulmuştur. Mekanik inokulasyon çalışmalarında, TSWV ile bulaşık olduğu ELISA testleri ile saptanan biber bitkilerinden alınan taze bitki dokuları kullanılırken, moleküler testlemelerde ise *Tsw* genine bağlı Moury vd. (2000) tarafından geliştirilen co-dominant CAPS markırı (SCAC₅₆₈) mekanik testlemeyi doğrulamada kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

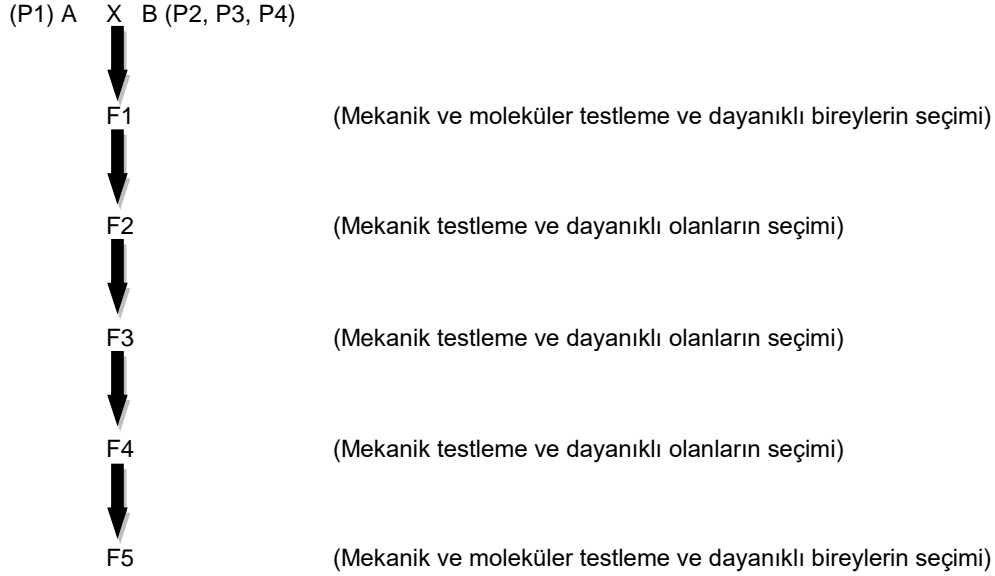
2.2.1. Melezleme çalışmaları

Domates Lekeli Solgunluk Virüsüne dayanıklı sivri biber geliştirme çalışmalarına dayanıklı sivri biber çeşitleri ile hassas SD8 biber çeşidi melezlenerek başlanmıştır. Melezlemeler SD8 çeşidi ana ebeveyn (P₁), hibrit çeşitler baba ebeveyn (P₂, P₃, P₄) olacak şekilde üç kombinasyon (P₁ x P₂, P₁ x P₃ ve P₁ x P₄) yapılmıştır. Çalışmada F₁ ile F₅ arasındaki bitkiler kullanılmıştır (Şekil 1).

2.2.2. Mekanik inokulasyonla testleme çalışmaları

Çalışmada ilk olarak dayanıklılık kaynağı sivri biber çeşitleri ile hassas sivri biber çeşidi SD8 mekanik inokulasyon yapılarak testlenmiştir. Testleme sonrasında dayanıklı bireyler ile hassas bireyler arasında melezlemeler yapılmıştır. Melezlemelerden elde edilen F₁ ile F₅ arasındaki bitkiler biyolojik olarak testlenmiştir.

Biyolojik testlemede mekanik inokulasyon yöntemine göre biber tohumları steril harç ortamına ekilmiş ve ilk gerçek yapraklarının geliştiği dönemde viyollere şaşırtılmıştır. Viyollerde 3-4 yapraklı döneme geldiklerinde biber fideleri 3:1:1 oranında torf, perlit, kum karışımı bulunan saksılara her saksıya ikişer adet fide olacak şekilde şaşırtılmıştır. Mekanik inokulasyon ile testleme çalışmaları Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Sebzeçilik ve Süs Bitkileri Bölümü seralarında yapılmıştır. Dayanıklı ve hassas genotipler arasında yapılan melezleme sonucunda geliştirilen üç popülasyonda Çizelge 1'de verilen sayılarda bitki testlenmiştir.



Şekil 1. Biberde TSWV'ye dayanıklı hat geliştirmede kullanılan testleme aşamaları

Çizelge 1. Farklı generasyonlarda mekanik inokulasyon ile testlenen ve dayanıklı olarak tespit edilen bitki sayıları

	P ₁ x P ₂	P ₁ x P ₃	P ₁ x P ₄	Toplam	TSWV'ye dayanıklılık oranı (%)
Testlenen bitki sayısı	500	15	10	525	
F ₁ Dayanıklı bitki sayısı	245	9	6	260	49.5
Testlenen bitki sayısı	492	45	100	637	
F ₂ Dayanıklı bitki sayısı	406	41	69	516	81.0
Testlenen bitki sayısı	750	200	185	1135	
F ₃ Dayanıklı bitki sayısı	695	165	120	980	86.3
Testlenen bitki sayısı	492	423	100	1035	
F ₄ Dayanıklı bitki sayısı	406	420	85	921	88.9
Testlenen bitki sayısı	421	539	100	1080	
F ₅ Dayanıklı bitki sayısı	399	520	98	1017	94.1

Testleme beş tekerrürlü olarak her tekerrürde 2 bitki olacak şekilde kurulmuştur. Testlemede 10 adet SD8 biber bitkisi hassas kontrol ve 10 adet PI 152225 genotipine ait bitki dayanıklı kontrol olarak kullanılmıştır. Şaşırtma işleminden 1-2 gün sonra fidelere virüs inokulasyonları yapılmıştır. Mekanik inokulasyonda kullanılan TSWV izolatu ilk olarak, Antalya ili örtüaltı biber üretimi yapılan seralarda TSWV simptomundan şüphelenilen biber bitkilerinden toplanarak elde edilmiştir. Simptomlara göre toplanan bu izolatlar laboratuvarında ELISA testine tabi tutulmuş ve TSWV olup olmadığı kontrol edilmiştir. ELISA ile TSWV pozitif bulunan izolatlar hassas biber çeşidi SD8 üzerinde çoğaltılarak mekanik inokulasyon ile testlemede kullanılmıştır. Bu izolatın TSWV'ye dayanıklılığı kıran izolat olup olmadığı üzerinde bir çalışma yürütülmemiştir. Testlemede TSWV'li bitkilerin yaprakları porselen havanda ezilerek içerisine 1:10 oranında pH:7 olan, 0.01 M fosfat buffer

(Na₂HPO₄.2H₂O-NaH₂PO₄.12H₂O) ilave edilerek inokulum hazırlanmıştır. Hazırlanan inokulum fidelerin kotiledon ve ilk gerçek yapraklarına mekanik inokulasyon yöntemine göre bir sünger yardımıyla sürülerek virüs bulaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemden sonra 2-5 dakika içinde yapraklara musluk suyu püskürtülmüştür. İnokulasyondan sonra bitkilerde haftalık olarak gözlem yapılmış ve 2-4 hafta sonrasında bitkilerde gözlenen semptomlara göre hassas ve dayanıklı bitkiler belirlenmiştir (Oğuz vd., 2009; Çelik vd., 2010).

2.2.3. Moleküler testleme çalışmaları

Çalışmanın ilk döneminde ebeveyn olarak kullanılan sivri biber çeşitleri ile standart sivri biber çeşidi SD8 moleküler olarak testlenmiştir. Elde edilen melezlemelerde yalnız F₁ ve F₅ kademelerindeki fidelere mekanik testlemeleri doğrulamak amacıyla moleküler testleme yapılarak dayanıklı bitkiler belirlenmiştir. DNA

izolasyonu, mekanik inokulasyon sonrasında dayanıklı bitkilerin taze genç yaprakları kullanılarak CTAB yöntemine göre yapılmıştır (Doyle ve Doyle, 1990). Primer olarak Moury vd. (2000) tarafından geliştirilen CAPS primeri SCAC₅₆₈ kullanılmıştır. PCR reaksiyon koşulları, Moury vd. (2000) tarafından yapılan çalışmadan bazı değişiklikler yapılarak belirlenmiştir.

PCR reaksiyonları 18 µl hacimde gerçekleşmiştir. Reaksiyonlar 5.0 µl (10 ng DNA) DNA, 2.0 µM 10X PCR buffer, 2.0 µl dNTP (her bir dNTP'nin 200 µM), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 µl Taq (0.5 U Taq DNA polimeraz), 2 µl (0.3 µM her bir primer) ileri ve geri primerler ve 2.5 µl ddH₂O kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR döngü parametreleri 1 döngü 94°C'de 3 dk ve ardından 30 döngü olacak şekilde 94°C'de 30 sn, 52°C'de 30 sn, 72°C'de 1 dk ve son olarak da 1 döngü 72°C'de 10 dk şeklindedir. Termal cykler olarak Biorad DNA-Engine Gradient Cyler (Hercules, CA, ABD) kullanılmıştır. Kesim işlemleri, toplam hacim 32 µl olacak şekilde 8 µl PCR amplifikasyonu, 2 µl buffer ve 2 µl TaqI ve XbaI kullanılarak 37°C'de 16 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri ve kesim ürünleri, % 2'lik yüksek çözünürlüklü agaroz jelde (Amresco SFR, OH, ABD), 115 V'da 1 x TAE tamponu içerisinde 3 saat süreyle yürütülmüş ve UV ışığı altında fotoğraflanmıştır. İşaretleyiciyi teyit etmek için moleküler standart olarak 100 bp'lik DNA ladder kullanılmıştır. PI 152225 dayanıklı kontrol ve SD8 de duyarlı kontrol olarak analizlerde kullanılmıştır.

2.2.4. Islahta seleksiyon kriterleri

Çalışmada mekanik inokulasyon ve moleküler testleme sonucu dayanıklı olan bitkiler seraya dikilerek yetiştirilmiş, F₂ kademesinde bulk yapılmış ve F₃ kademesinden itibaren pedigrî yöntemi (Kalloo, 1988) uygulanarak fenolojik ve morfolojik gözlemlere göre seleksiyon yapılmıştır. Fenolojik ve morfolojik gözlemlerde incelenen özellikler Uluslararası Bitki Gen Kaynakları Enstitüsü (International Plant Genetic Resources Institute= IPGRI), Uluslararası Yeni Çeşitleri Koruma Birliği (International Union for the Protection of New Varieties of Plants= UPOV) ve Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Merkezi Müdürlüğü (TTSM)nce yayınlanmış "Tarımsal Değerleri Ölçme Denemeleri Teknik Talimatı"nda belirtilen kriterler dikkate alınarak Çizelge 2'de verilen özellikler yönünden değerlendirilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

Çalışmanın ilk yılında ebeveyn olarak kullanılan sivri biber tipinde SD8 çeşidi ile TSWV'ye dayanıklı üç biber genotipi melezleme öncesi mekanik inokulasyon yöntemi ile testlenmiş ve sonra bu bitkilerde SCAC₅₆₈ markırı ile moleküler olarak Tsw geninin varlığı kontrol edilmiştir. Hem mekanik hem de moleküler testlemeler sonucunda SD8 homozigot hassas (rr), kontrol genotip PI152225 homozigot dayanıklı (RR) ve dayanıklılık kaynağı olarak kullanılan çeşitlerin heterozigot dayanıklı (Rr) olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 2. Islah aşamasında incelenen bitki ve meyve özellikleri

Bitki özellikleri					
Bitki duruşu	Bitki büyüme gücü	Çiçek sapının duruşu	Gövde uzunluğu	Boğum arası uzunluğu	Virüs dayanıklılığı
Dik	Çok zayıf	Dik	Kısa	Kısa	Dayanıklı
Yarı dik	Zayıf	Sarkık	Orta	Orta	Hassas
Yatık	Orta		Uzun	Uzun	
	Kuvvetli				
	Çok kuvvetli				
Meyve özellikleri					
Bitki başına verim	Olgunluk öncesi renk	Olgunluk rengi	Uzunluk	Çap	Meyvede köruk
Az	Yeşilimsi beyaz	Sarı	Kısa	Küçük	Yok
Orta	Sarımsı	Turuncu	Orta	Orta	Az
Çok	Yeşil	Kırmızı	Uzun	Geniş	Orta
	Mor		Çok uzun	Çok geniş	Çok

Bunun üzerine dayanıklı çeşitlerle hassas çeşit arasında melezlemeler yapılmış ve F₁ tohumları alınmıştır. Elde edilen toplam 525 adet F₁ bitkileri saksılarda yetiştirilerek mekanik inokulasyon yapılmış 265 bitki hassas bulunurken 260 adet bitkinin dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Testlemelerde dayanıklı bitkilerin hassas bitkilere oranının yaklaşık 1:1 olduğu saptanmıştır. Mekanik testleme sonucu tespit edilen dayanıklı bitkilerden gelişme ve büyümesi zayıf olan bitkiler elemine edilerek geriye kalan 210 bitki fide aşamasında SCAC₅₆₈ markırı ile taranmış ve 44 bitki hassas, 166 bitki heterozigot dayanıklı olarak doğrulanmıştır. Çelik vd. (2013), yaptıkları geri melezleme yolu ile yabancı biber genotipi SCM334'den Serademre 8'e PVY dayanıklılığının aktarılması çalışmasında her geri melezleme aşamasında mekanik inokulasyon testlemesi yapmışlar, üç geri melezleme generasyonunda da dayanıklı bitki sayısını yaklaşık %50 olarak tespit etmişler ve sonuçların Mendel açılım kuralına (%50 Rr: %50 rr) uyduğunu bildirmişlerdir. Polat vd. (2016), *Tsw* geninin aktarılması ile ilgili yaptığı çalışmada F₂ aşamasında 247 bitkide mekanik inokulasyon testlemesi yapmışlar ve bu bitkilerin yaklaşık %48'inin dayanıklı olduğunu ve moleküler testelemenin mekanik inokulasyon testlemesini doğruladığını ifade etmişlerdir. Boitex (1995) *Capsicum chinense*'de TSWV'ye dayanıklılık sağlayan genler arasındaki allelik ilişkileri belirlemek amacıyla yaptığı çalışmada dayanıklı ile hassas, dayanıklı ile dayanıklı melezlerin dayanıklı olduğunu ve tek gen dayanıklılığa uyduğunu tespit etmiştir. Moury vd. (1997), TSWV'ye tek gen dayanıklılık kaynağı üç *Capsicum* genotipinin hipersensitif reaksiyonunu belirlemek amacıyla yürüttükleri çalışmalarda F₂ ve daha sonraki açılımların tek gen dominant Mendel açılımına uyduğunu bildirmişlerdir.

F₁ kademesinde dayanıklılıkları belirlenen bitkilerden elde edilen F₂ kademesine ait 637 adet fidenin mekanik inokulasyon testlemesi yapılmış ve 516 adet bitkinin dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Testlenmiş bitkilerin içinde dayanıklı bitkilerin oranı %81 olarak hesaplanmıştır. Dayanıklı bitkiler seraya dikilmiş ve hasat öncesinde Çizelge 1'de verilen gözlemlere göre 118 adet tek bitki seçilmiştir. F₃ kademesinde önceden dayanıklılığı belirlenmiş olan 118 adet tek bitki tohumları kendi kombinasyonları içinde bulk yapılarak ekilmiş ve elde edilen 1135 fidede mekanik inokulasyon

ile testleme yapılmıştır. Testleme sonucunda 980 bitki dayanıklı olarak tespit edilmiş ve seraya dikilmiştir. Bu generasyonda dayanıklı bitkilerin oranı %86.3 olarak bulunmuştur. Serada kendilemeye bırakılan bitkiler hasat olum döneminde yapılan seleksiyon sonucu 69 adet tek bitki seçilmiş ve tohumları alınmıştır. F₄ kademesinde önceden seçilmiş olan dayanıklı 69 tek bitki tohumları her biri ayrı ayrı tek bitki sıraları şeklinde ekilerek her bir sıradan 15 bitki seçilerek toplam 1035 adet bitki mekanik inokulasyonla testlenmiş ve 915 adet bitkinin dayanıklı olduğu belirlenmiştir. Testleme sonucunda dayanıklı olan bitkiler seraya dikilmiş ve kendilenecek seleksiyon kriterlerine uygun 72 adet tek bitki seçilmiştir. Testleme sonucunda dayanıklı bitkilerin oranının yaklaşık %89.0 olduğu görülmüştür. F₅ kademesinde önceden seçilen ve dayanıklı olan tek bitki tohumları sıralara ekilerek her bir tek bitki sırasında 15 bitki olacak şekilde toplam 1080 bitkide testleme yapılmış ve 1017 bitki dayanıklı bulunmuştur. F₅ generasyonunda biyolojik testleme ile dayanıklı bitkilerin oranının %94.1 olduğu tespit edilmiştir. Mekanik testleme sonucu tespit edilen dayanıklı bitkiler SCAC₅₆₈ markırı ile taranarak doğrulaması yapılmıştır. F₅ aşamasında moleküler testlemenin mekanik testlemeyi doğrulama oranı %72.0'dir. Bulunan %28.0'lik farkın markırın geliştirildiği kaynak genotiple çalışmada kullanılan ebeveyndeki dayanıklılık geninin kaynağının farklı olmasından veya testlemenin yapıldığı ortamın iklim koşullarından ileri gelmiş olabileceği düşünülmektedir. Çelik vd. (2013), PVY dayanıklılık çalışmasında mekanik testleme ile moleküler testleme arasında %85.0'lik bir uyum bulmuşlardır. Ortaya çıkan %15.0'lik bu farkın önemli olduğunu ve mekanik inokulasyonla yapılan seleksiyonların mutlaka moleküler testleme ile de doğrulanarak materyal seçiminin yapılması gerektiğini bildirmişlerdir. Ayrıca Moury vd. (1998) biberde ortam sıcaklığının TSWV dayanıklılığı üzerine etkisini belirlemek amacıyla yürüttüğü çalışmada, fide aşamasında yüksek sıcaklığa maruz kalan bitkilerin stabilitesinin azaldığını, bu nedenle iklim durumuna bakmaksızın her şartta *Tsw* geninin markırla doğrulanması gerektiğini ifade etmişlerdir. İklim faktörlerinden sıcaklıkla dayanıklılık arasındaki ilişki bazı araştırmacılar tarafından da çalışılmış ve bitkiler erken büyüme aşamasında uzun süreli ve daha yüksek sıcaklıkta enfekte edildiklerinde sıcaklığa bağlı olarak hastalığa dayanıklılıkta

azalma ve verimde düşme olduğunu tespit etmişlerdir (Roggero vd., 1996; Roggero vd., 2002). Yapılan testlemeler ve seleksiyon sonucunda F₅ kademesine ait 72 hattın 420 bitki seraya dikilmiş ve seleksiyon kriterlerine uygun 55 bitki seçilmiştir. Seçilen bu bitkiler genel kombinasyonu yüksek, meyve ağırlığı 26-28 g meyve uzunluğu 18-22 cm olan sivri biber hattı ile genel kombinasyon yeteneği testine tabi tutulmuş, melez bitkilerin bazı bitki ve meyve özelliklerine göre seçim yaparak 10 adet hat belirlenmiştir (Çizelge 3, Şekil 2). Bu çalışma sonucunda elde edilen 10 hatta ait bitki ve meyve özellikleri Çizelge 3'te verilmiştir. Genel olarak sivri biber hatlarında bitki duruşunun dik ve yarı dik konumda, çiçek sapının sarkık, boğum arasının orta ve kısa uzunlukta, olgunluk öncesi meyvelerin yeşil ve koyu yeşil renkte, meyve büyüklüğünün yeterli, kışa toleransını yüksek ve gelişmemiş (takoz) meyve oranının düşük olduğu, bitki başına verimin orta ve yüksek olduğu izlenmektedir. Verim bakımından öne çıkan ve meyve kalitesi

uygun olan hatların ıslah çalışmalarında ebeveyn olarak kullanılabilir niteliklere sahip olduğu görülmüştür. Bu hatlardan 4 adedi yapılan sözleşmelerle özel sektör tohum firmalarına devredilmiştir.

4. Sonuç

Nüfusun ve dolayısıyla besin ihtiyacının da arttığı bir dünyada, tarımsal üretimi sınırlayan birçok faktör bulunmaktadır. Biberde bitki patojeni virüslerin meydana getirdiği hastalıklar üretimi engelleyen önemli bir faktördür. Türkiye'de bu hastalıkların başında domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV) gelmektedir. Biberde son yıllarda TSWV üzerine yapılan çalışmalar artış göstermiştir. Araştırmalar daha ziyade arazi surveyyeleri ve hastalığın yayılış alanlarını belirleme ile sınırlı kalmıştır. Kimyasal mücadelesi zor ve masraflı olan TSWV'ye karşı dayanıklı çeşit kullanmak en

Çizelge 3. Geliştirilen TSWV dayanıklı sivri biber hatlarının bitki ve meyve özellikleri

Bitki özellikleri						
Hat no	Bitki duruşu	Bitki büyüme gücü	Çiçek sapının duruşu	Gövde uzunluğu	Boğum arası uzunluğu	Virüs dayanıklılığı
10	Yarı dik	Orta	Sarkık	Orta	Orta	Dayanıklı
12	Dik	Orta	Sarkık	Orta	Kısa	Dayanıklı
17	Dik	Orta	Sarkık	Kısa	Kısa	Dayanıklı
20	Dik	Orta	Sarkık	Orta	Kısa	Dayanıklı
22	Yarı dik	Orta	Sarkık	Orta	Orta	Dayanıklı
24	Dik	Orta	Sarkık	Orta	Orta	Dayanıklı
25	Yarı dik	Kuvvetli	Sarkık	Orta	Kısa	Dayanıklı
26	Yarı dik	Orta	Sarkık	Kısa	Kısa	Dayanıklı
27	Dik	Orta	Sarkık	Uzun	Uzun	Dayanıklı
29	Dik	Çok kuvvetli	Sarkık	Orta	Orta	Dayanıklı

Meyve özellikleri						
Hat no	Bitki başına verim	Olgunluk öncesi renk	Olgunluk rengi	Uzunluk	Çap	Meyvede körük
10	Orta	Yeşil	Kırmızı	Orta	Orta	Az
12	Çok	Yeşil	Kırmızı	Orta	Orta	Yok
17	Orta	Yeşil	Kırmızı	Orta	Küçük	Çok
20	Çok	Koyu yeşil	Kırmızı	Orta	Orta	Az
22	Orta	Yeşil	Kırmızı	Uzun	Orta	Orta
24	Çok	Koyu yeşil	Kırmızı	Uzun	Küçük	Orta
25	Çok	Yeşil	Kırmızı	Uzun	Orta	Çok
26	Orta	Koyu yeşil	Kırmızı	Orta	Orta	Çok
27	Çok	Yeşil	Kırmızı	Orta	Küçük	Az
29	Çok	Yeşil	Kırmızı	Uzun	Orta	Orta



12



20



29

Şekil 2. Çalışma sonucunda geliştirilen bazı sivri biber hatları

ekonomik yoldur. Bu çalışma ile TSWV'ye dayanıklı verimli ve kalite bakımından üstün olan sivri biber hatlarını geliştirmek amaçlanmıştır. Çalışma, Tsw geni taşıyan dayanıklı çeşitlerin verici ebeveyn olarak melezlemede yer alması, sonrasında mekanik inokulasyon ve moleküler seleksiyon yöntemlerinin birlikte kullanılmasının TSWV'ye dayanıklılık ıslahı programlarında kolaylıkla uygulanabilir bir yöntem olduğu ve güvenilir sonuçlar verdiğini göstermiştir. Yürütülen bu ıslah programı ile TSWV'ye dayanıklı aynı zamanda verim ve kaliteli sivri biber tipinde hatlar elde edilmiş ve dört hat yapılan kullanım hakkı sözleşmesi ile özel sektör tohum firmalarının hizmetine sunulmuştur.

Kaynakça

- Agrios, G.N. (2005). Plant pathology. Elsevier Academic Press. 922 p.
- Antignus, Y., Lapidot, M., Ganaim, N., Cohen, J., Lachman, O., Pearlsman, M., Raccah, B., & Gera, A. (1997). Biological and molecular characterization of tomato spotted wilt virus in Israel. *Phytoparasitica*, 25(4):319-330.
- Arlı-Sökmen, M., Mennan, H., Sevik, M.A., & Ecevit, O. (2005). Occurrence of viruses in field-grown pepper crops and some of their reservoir weed hosts in Samsun, Turkey. *Phytoparasitica*, 33(4):347-358.
- Azeri, T. (1981). Preliminary report of tomato spotted wilt virus and its epidemiy on tobacco in the Çanakkale region of Türkiye. *Journal of Turkish Phytopathology*, 10(2-3):79-87.
- Black, L.L., Hobbs, H.A., & Gatti, J.M.Jr. (1991). Tomato spotted wilt virus resistance in *Capsicum chinese* PI 152225 and 159236. *Plant Disease*, 75(8), pp:863.
- Bozdoğan, V. (2009). Antalya ilinde domates, biber ve marul yetiştirilen alanlarda Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (*Tomato Spotted Wilt Virus*, TSWV)'nün saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Boiteux, L.S. (1995). Allelic relationships between genes for resistance to tomato spotted wilt tospovirus in *Capsicum chinese*. *Theoretical and Applied Genetics*, 90(1):146-149.
- Çelik, N., Özalp, R., & Çelik, İ. (2010). Bazı biber hat ve çeşitlerinin Tobacco Mosaic Tobamovirus (TMV)'e dayanıklılığının mekanik inokulasyon ve ELISA testleri ile belirlenmesi. *Derim*, 27(2):1-9.
- Çelik, N., Özalp, R., & Göçmen, M. (2012). Antalya ilinde örtüaltı biber yetiştiriciliğinde Patates Y virüsü (PVY) patotiplerinin belirlenmesi ve bazı biber çeşitlerinin PVY'ye karşı reaksiyonları *Bitki Koruma Bülteni*, 52(3):235-246.
- Çelik, İ., Özalp, R., Çelik, N., Polat, İ., Sülü, G., & Ünlü, A. (2013). Patates Y virüsü (*Potato Virus Y =PVY*)'ne dayanıklı sivri biber hatlarının geliştirilmesi. *Derim*, 30(2):42-53.
- Cho, J.J., Mau, R.F.L., German, T.L., Hortmann, R.W., Yudin, L.S., Gonsalves, D., & Provvidenti, R. (1989). A multi disciplinary approach to management of Tomato Spotted Wilt Virus in Hawaii. *Plant Disease*, 73:375-383.
- Değirmenci, K., & Uzunoğulları, N. (2007). Marmara Bölgesinde domates yetiştiricilik alanlarında sorun olan virüslerin belirlenmesi, *Bitki Koruma Bülteni*, 47(1-4):72-77.
- Deligoz, I., Sarı, S., & Arlı Sökmen, M., 2014. First report of resistance breaking strain of Tomato

- Spotted Wilt Virus (Tospovirus; Bunyaviridae) on resistant sweet pepper cultivars in Turkey. *New Disease Reports*, 30:26.
- Doyle, J.J., & Doyle J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13-15.
- Ekbiç E., Abak K., & Yılmaz, M.A. (1997). A new PVY Pathotype on pepper along Mediterranean coastal area of Turkey. *Proceedings 10th Congress Mediterranean Phytopathology*, pp:187-189.
- Fao. (2014). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, Erişim tarihi:15 Aralık 2016.
- Fidan H. (2016). Antalya'da örtü altı domates ve biber alanlarında dayanıklılık kıran Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) izolatların genetik kıyaslanması. *VI. Türkiye Bitki Koruma Kongresi*, s:560-560.
- Güldür, M.E. (1997). Şanlıurfa ili için yeni bir virüs: Domates lekeli solgunluk virüsü (Tomato Spotted Wilt Virus). *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 1(3):71-76.
- Güldür, M.E., Marchoux, G., Yurtmen, M., & Yılmaz, M.A. (1995). Mersin ve çevresinde yetiştirilen domateslerde zararlı yeni bir virüs: Tomato Spotted Wilt Virus. *VII: Türkiye Fitopatoloji Kongresi*, s:303-305.
- Kaloo, G., (1988). Breeding Methods in Vegetable Crops (chapter 3). In: *Vegetable Breeding*. Vol. 1:75-104, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Küçük, B., (2006). Adana ve Mersin illerinde domates lekeli solgunluk virüsü (Tomato Spotted Wilt Virus, TSWV)'nin değişik yöntemlerle saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Langella, R., Ercolano, M.R., Monti, L.M., Frusciante, L., & Barone, A. (2004). Molecular marker assisted transfer of resistance to TSWV in tomato elite lines. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79(5):806-810.
- Moury, B., Palloix, A., Selassie, K.G., & Marchoux, G. (1997). Hypersensitive resistance to tomato spotted wilt virus in three *Capsicum chinense* accessions is controlled by a single gene and is overcome by virulent strains. *Euphytica*, 94(1):45-52.
- Moury B, Selassie K.G, Marchoux G, Daubeze A.M, & Palloix A. (1998). High temperature effects on hypersensitive resistance to Tomato Spotted Wilt Tospovirus (TSWV) in pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *European Journal of Plant Pathology*, 104(5):489-98
- Moury, B., Pflieger, S., Blattes, A., Lefebvre, V., Palloix, A. (2000). A CAPS marker to assist selection of Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) resistance in pepper. *Genome*, 43(1):137-142.
- Oğuz, A., Ellialtıoğlu, Ş., Çelik, N., & Zengin, S. (2009). Bazı domates hatlarının domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV -Tomato Spotted Wilt Virus)'ne karşı reaksiyonlarının mekanik inokulasyon yöntemi ile belirlenmesi. *Derim*, 26(1):40-50.
- Özkaynak, E., Devran, Z., Kahveci, E., Doğanlar, S., Başköylü, B., Doğan, F., İşleyen, M., Yüksel A., & Yüksel, M. (2014). Pyramiding multiple genes for resistance to PVY, TSWV and PMMoV in pepper using molecular markers. *European Journal of Horticultural Science*, 79(4):233-239.
- Palloix, A., Abak K., Gognalons P., Daubeze A. M., Guldur M., Memouchi G., & Gebre - Selaissie K. (1994). Virus diseases infecting pepper crops in Turkey. *Proceedings of 9th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union*, s:469-472.
- Polat, I., Celik, I., Celik, N., & Ozalp, R. (2016). Biological and molecular determination for resistance to Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) in F2 population of Long-Type Pepper (*Capsicum annum* L.). *Acta Horticulturae*, 26(1):115-120.
- Roggero P, Lisa V, Nervo G, & Pennazio S. (1996). Continuous high temperature can break the hypersensitivity of *Capsicum* "PI 152225" to Tomato Spotted Wilt Tospovirus (TSWV). *Phytopathologia Mediterranea*, 35(2):117-20.
- Roggero P, Masenga V, & Tavella L. (2002). Field isolates of Tomato spotted wilt virus overcoming resistance in pepper and their spread to other hosts in Italy. *Plant Disease*, 86:950-54.
- Sherwood, J. L., German, T. L., Moyer, J. W., & Ullman, D. E. (2009). Tomato spotted wilt. The Plant Health Instructor DOI: 101094. PHI-I-2003-0613-02 Updated.
- Şimşek, D., Pınar, H., & Mutlu, N. (2015). Moleküler ıslah yöntemleri kullanılarak tospovirüs ve tobamovirüslere dayanıklı yeni dolmalık biber (*Capsicum annum* L.) hat ve çeşitlerinin geliştirilmesi. *Alatırım*, 14(1):1-8.
- Şimşek, D., (2014). Moleküler ıslah yöntemleri kullanılarak tospovirus ve tobamovirüslere dayanıklı çarlı biber (*Capsicum annum* L.) hat ve çeşitlerinin geliştirilmesi. *Selçuk Tarım Bilimleri Dergisi* 1(1):1-5.
- Tekinel, N., Dolar, M.S., Sağsöz, S., & Salcan, Y. (1969). Mersin bölgesinde ekonomik bakımdan önemli bazı sebzelerin virüsleri üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 9(1):7-49.
- Tsompana M., Abad J., Purugganan M., & Moyer J.W., (2005). The molecular population genetics of the Tomato spotted wilt virus (TSWV) genome. *Molecular Ecology*, 14(1):53-66.
- TUİK, (2016). Türkiye İstatistik Kurumu, <http://www.tuik.gov.tr.http://rapory.tuik.gov.tr/16-03-2017-13:51:1213638012337011429810280936.html>? Erişim tarihi:15 Mart 2017.
- Turhan, P., & Korkmaz, S. (2006). Çanakkale ilinde Domates Lekeli Solgunluk Virüsünün serolojik ve biyolojik yöntemlerle saptanması. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 12(2):130-136.
- Uhrig, J.F., Soellick, T.R., Minke, C.J., Philipp, C., Kellman, J.W., & Schreier, J.W. (1999). Homotypic interaction and multimerization of nucleocapsid protein of Tomato potted Wilt Tospovirus: Identification and characterization of

two interacting domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(1):55-60.
Wijkamp, I., & Peters, D. (1993). Determination of the median latent period of two tospoviruses in

Frankliniella occidentalis, using a novel leaf disk assay. *Phytopathology*, 83(9):986-991.
Yılmaz, S. (2002). Batı Akdeniz Bölgesi'nde yeni bir bitki virüs hastalığı. *Derim*, 19(2):55-60.