

**BAZI DOMATES HATLARININ DOMATES LEKELİ SOLGUNLUK  
VİRÜSÜ (TSWV=TOMATO SPOTTED WILT VİRUS)'NE KARŞI  
REAKSİYONLARININ MEKANİK İNOKULASYON YÖNTEMİ İLE  
BELİRLENMESİ**

Asu OĞUZ<sup>1</sup> Şebnem ELLİALTIOĞLU<sup>2</sup> Nejla ÇELİK<sup>1</sup>  
Aylin KABAŞ<sup>1</sup> Sinan ZENGİN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü-ANTALYA  
<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü-ANKARA

**ÖZET**

Son yıllarda dünyada ve ülkemizde domates yetiştirilen alanlarda sıkça görülen domates lekeli solgunluk virüsü (Tomato Spotted Wilt Virus= *TSWV*), %42.1 ile %95.5 arasında ürün kayıplarına neden olabilmektedir. Hastalık etmeni virüs ile mücadelede en etkin yöntem genetik dayanıklılıktır. Bu hastalığa karşı dayanıklılık, *Solanum peruvianum* türünden elde edilmiş dominant tek bir gen olan *Sw-5* geni ile ifade edilmektedir. Bu çalışmada, ıslah çalışmalarında pratik olarak kullanılacak mekanik inokulasyon yöntemi ile hastalığa dayanıklılıkları farklı beş farklı domates genotipi testlenmiştir. Çamköy-Antalya yöresinden elde edilen *TSWV* izolatu (*TSWV-15*) ile yapılan mekanik inokulasyon çalışmaları sonucunda hassas ve dayanıklı bireyler tespit edilmiştir. Testlemelerde dayanıklı materyal olarak, *Sw-5* geni ihtiva ettiği bilinen LA 3667 çeşidi kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan diğer materyaller Çeşit-1 (dayanıklı ticari çeşit; FORMULA F1), Çeşit -2 (hassas ticari çeşit; BATEM ÖZÇELİK F1), Hat-1(BATEM-114) ve Hat-2 (BATEM-115)' dir. Virüsün mekanik inokulasyonu sonucunda Çeşit-1 ve LA 3667, *TSWV-15* izolatına karşı dayanıklı bulunmuş; Çeşit-2, Hat-1 ve Hat-2'nin ise hassas olduğu tespit edilmiştir. Antalya yöresinden izole edilen virüs izolatına karşı *Sw-5* genini bulunduran domates çeşitlerinin dayanıklılık gösterdiği; geliştirilecek dayanıklı çeşitlerde gen kaynağı olarak *Sw-5* genini bulunduran çeşitlerin kullanılacağı anlaşılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *TSWV*, *Sw-5*, dayanıklılık, virüs, mekanik inokulasyon, genotip

## **DETERMINING SOME OF THE TOMATO LINES REACTION AGAINST TSWV (TOMATO SPOTTED WILT VIRUS) BY THE MECHANICAL INOCULATION METHOD**

### **ABSTRACT**

In the tomato raising fields of Turkiye and in all around the world, *TSWV* - which is seen widely, caused the 42.1% to 95.5% of the product loss, recently. The most effective fight against the disease agent virus is the genetical resistance. The resistance to this disease is managed by the dominant *Sw-5* gene, which is obtained from *Solanum peruvianum*. In this study, five tomato genotypes have different characteristics against virus disease were examined by the mechanical inoculation method-which can be used in breeding programms practically. Sensitive and resistant individuals were determined at the end of the mechanical inoculation studies by using the *TSWV* isolate (*TSWV-15*) which was obtained from Çamköy-Antalya region. In the testing period, as a resistant material, LA 3667-which contained *Sw-5* gene was used. The other materials those were used in the study were, Çeşit-1 (resistant commercial variety; FORMULA F1), Çeşit-2 (a commercial variety; BATEM ÖZÇELİK F1 ), Hat-1 (BATEM-114 ) and Hat-2 (BATEM-115) (BATEM lines- the reaction against the disease are not determined). As a result of the testing study, Çeşit-1 and LA 3667 were assigned to be resistant to the *TSWV-15* isolate. But, Çeşit-2, Hat-1 and Hat-2 were determined to be sensitive. This study is considered to be qualified enough to use for the future improvement programs for the resistance to the disease agent virus.

**Keywords:** *TSWV*, *Sw-5*, disease resistance, virus, mechanic inoculation, genotype

### **1.GİRİŞ**

*Solanaceae* familyasında yer alan domates, dünyada ve ülkemizde üretim alanı ve miktarı bakımından ilk sırada yer alan sebze türüdür. Tüm dünyada toplam 4.6 milyon hektar alanda 126 milyon ton domates üretilmektedir. Ülkemiz, 270.000 ha alanda yaklaşık 10 milyon ton üretim ile Çin ve ABD' den sonra 3. sırada yer almaktadır (FAO, 2009).

Domates üretiminde hastalık ve zararlılar en önemli sorunlar arasında yer almaktadırlar. Yaklaşık olarak 40 adet virüs hastalığı domates bitkisinde üretim kayıplarına yol açmaktadır. Bunlar içerisinde domates lekeli solgunluk virüsü (*TSWV*) en tahripkar 10 virüs içerisinde yer almaktadır.

*TSWV* ilk olarak, 1915 yılında Avustralya' da ortaya çıktıktan sonra, hızla yayılarak Amerika, Avrupa, Asya, Afrika kıtalarında bulunan birçok ülkede belirlenmiştir (Cho vd., 1986). Günümüzde Dünya üzerinde farklı

kıtalarındaki 90'dan fazla ülkede çok sayıda kültür bitkisi, süs bitkisi ve yabancı ot türünde *TSWV*'nin enfeksiyon oluşturduğu tespit edilmiştir. Hastalık etmeni virüsün 36 familyadan 160 farkı türde hastalık yapabildiği bilinmektedir (Rosello vd., 2007).

Ülkemizde bu virüs ilk olarak Tekinel vd. (1969) tarafından Mersin ili ve çevresinde tespit edilmiştir. Daha sonra sırasıyla Çanakkale (1981), İzmir-Manisa (1994), Akdeniz Bölgesi (1995), Şanlıurfa (1997) ve Samsun (1998-1999)'da farklı bitki türlerinde (domates, biber, kavun, marul, cam güzeli, patlıcan vb.) gözlenmiştir (Turan ve Korkmaz 2006).

*TSWV*, dokuz farklı trips türünü (*Thrips tabaci*, *Frenkliniella occidentalis* başta olmak üzere) vektör olarak kullanmaktadır. 70'den fazla familya ve bunlara ait 550 farklı bitki türünü konukçu olarak kullanabilen bu vektörler sayesinde hastalık çok kolay epidemiy oluşturabilmektedir.

*TSWV*, ekonomik öneminden dolayı Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde 'European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO)' A1 karantina listesinde yer almaktadır (Anonymous, 2007). Ülkemizde ise hem iç hem de dış karantinaya tabi olan virüs etmenleri arasında bulunmaktadır (Yılmaz, 2002).

Hastalık etmeni virüsün bitkinin enfekte olduğu döneme göre %42.1 ile %95.5 oranında zarara yol açtığı ortaya konmuştur (Şevik, 2007). *TSWV* belirtilerinin ortaya çıkışı ve farklı şiddetlerde olması, enfeksiyonun gerçekleştiği bitkinin yaşına bağlıdır (Chaisuekul vd., 2003). Bitki, genç dönemde virüsle enfekte olduğunda gelişme geriliği, küçükleme ve üst yapraklarda geriye doğru ölümler gerçekleşmektedir (Resim 1). Meyve tutumu olmadığı gibi, yaprak damarları arasında kahverengi lekeler ve hastalığın ilerleyen dönemlerinde yapraklarda kurumalar görülebilmekte ve bitki ölüme gitmektedir. Daha gelişmiş dönemlerde enfekte olan bitkilerde ise yapraklarda ve meyvelerde hastalığın tipik belirtisi olan iç içe geçmiş sarıdan kahverengine dönen nekrotik halkalar ortaya çıkmakta ve meyvenin pazar değeri düşmektedir (Roselló vd., 1996) (Resim 2 ve Resim 3).



Resim 1. Genç bitki döneminde, TSWV'nin yapraklardaki belirtileri

Hastalığa karşı kimyasal mücadelede, tripslerin ortadan kaldırılması önem kazanmakta ise de, tripslerin zaman içinde bağışıklılık geliştirebilme özelliklerinden dolayı başarılı olunamamaktadır. Bu nedenle en etkili mücadele yönteminin, hastalık etmenine karşı genetik dayanıklılık olduğu kabul edilmektedir.



Resim 2. Gelişmiş bitki döneminde TSWV'nin bitkideki ve meyvelerdeki belirtileri

TSWV'ye karşı *Sw-5* geni dayanıklılık kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bu gen domatesin yabani akrabalarından *Solanum peruvianum*'da bulunmuş ve ticari bir çeşit olan Stevens (LA3667)'a aktarılmıştır (Spasova vd., 2001; Barone, 2004; Garland vd., 2005). Daha önce bu genle ilgili yapılan çalışmalarda hastalık etmeni virüsün mekanik inokulasyonu yoluyla hastalığa karşı dayanıklılığın tespiti gerçekleştirilmiştir (Spasova vd.,2001).

Dünyada ve Türkiye'de ekonomik açıdan önemli kayıplara neden olan bu virüs etmenine karşı dayanıklılık çalışmaları güncel ıslah konuları arasında yer almaktadır. Virüs etmenine karşı bilinen en güvenilir dayanıklılık kaynağı, tek ve dominant bir gen olan *Sw-5* dayanıklılık genidir. *Solanum peruvianum* kökenli bu gen, günümüzde TSWV'ye dayanıklı olarak gösterilen ticari çeşitlerin temel dayanağını oluşturmaktadır. Ancak bilindiği gibi herhangi bir hastalık etmeninin izolatları arasında agresivite farklılıkları olabilmekte, bazı

durumlarda dayanıklılık özelliği kendini gösteremeyebilmektedir. Domateste bu virüse dayanıklı çeşit ıslahı amacıyla yapılacak çalışmalarda Sw-5 geninin kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla Antalya yöresindeki hastalıklı bitkilerden elde edilen izolata karşı; dayanıklı ve hassas çeşitlerle, ıslah materyallerine ait iki hat testlemelere tabi tutulmuştur. Ayrıca bu uygulama ile, mekanik inokulasyon yönteminin de uygulanabilirliği ve etkinliğinin çalışma koşullarımızda ortaya konması amaçlanmıştır.

## **2. MATERYAL VE YÖNTEM**

### **2.1. Materyal**

Bitkisel materyal olarak, mekanik inokulasyon testlemelerinde dayanıklı çeşit kapsamında, TGRC (Tomato Genetic Research Center)'den temin edilen LA 3667 ile ticari bir çeşit (Çeşit-1; FORMULA F1) kullanılmıştır. Hassas olarak yine ticari bir çeşit (Çeşit-2; BATEM ÖZÇELİK F1) ve Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü-Sebzecilik Bölümü'nde geliştirilen iki adet ıslah hattı (Hat-1; BATEM-114 ve Hat-2; BATEM-115) kullanılmıştır.

Hastalık etmeni virüsün inokulum kaynağı ise Çamköy-Antalya'da domates yetiştirilen bir sera alanından temin edilmiştir.

### **2.2. Yöntem**

#### *2.2.1. DAS-ELISA Testi*

Çamköy-Antalya'da domates üretimi yapılan seradan alınan hastalıklı bitki örneğinin serolojik analizleri Agdia firmasından temin edilen TSWV antiserum kiti protokolüne göre DAS-ELISA metodu kullanılarak yapılmıştır (Wang vd.,1980). Analizlerin gerçekleştirilmesi aşamasında antiserum kitine ait pozitif ve negatif kontroller kullanılmış ve izole edilen TSWV15'in de aralarına ilave edildiği örneklerle ait okumalar 60 dakikalık inkübasyon süresi sonucunda spektrofotometrede 405 nm dalga boyunda yapılmıştır.

#### *2.2.2. Mekanik İnokulasyon*

İnokulasyon işlemi, fidelerin ilk gerçek yapraklarının çıktığı aşamada ve yaklaşık olarak 15 cm boyuna ulaştıklarında gerçekleştirilmiştir. İçerisine karborandum ve silisyum oksit eklenmiş 2 ml %0.01 M'lık fosfat tampon çözeltisine 1g inokulum eklenerek mekanik inokulasyon için karışım

hazırlanmıştır. Bu karışım, bitkilerin ilk gerçek yapraklarının el ile aşındırılması suretiyle bulaştırılmıştır. Virüs inokulasyon çalışmaları ortam sıcaklığının 22-24°C ve oransal nemin %60-70 olduğu testleme seralarında yapılmıştır (Garland vd., 2005).

### 3.BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 3.1. DAS-ELISA Testi

İnokulasyon yapıldıktan sonra alınan bitki örneklerinde ve antiserum kitinde yer alan pozitif ve negatif kontrollere ait örneklerde yapılan okumalara ait absorbens değerleri Tablo 1' de verilmiştir.

**Çizelge 1.** DAS –ELISA analizi yapılan örneklerin absorbens değerleri

Örnekler	Absorbans Değeri
Negatif kontrol	0,074
Pozitif kontrol	0,509
<i>TSWV15</i>	0,774

Bu çalışmada yapılan ELISA testinde negatif kontrol değerinin 3 katı olan tüm değerler pozitif olarak kabul edilmiş ve 0,222 üzerindeki ölçüm değerleri pozitif olarak değerlendirilmiştir. Nitekim hastalık etmeni virüse karşı dayanıklılık geninin kalıtımıyla ilgili çalışmalar sırasında F2 kademesindeki bitkilerin oluşturduğu populasyonda yapılan ELISA ölçümlerinde de 0,23 üzerindeki absorbens değerleri pozitif olarak kabul edilmiş, bunun altındaki değerler negatif olarak kabul edilmiştir (Stevens vd.,1992).

ELISA analizi sonuçlarında Çamköy-Antalya'dan temin edilen izolatin hastalık şiddeti negatif kontrolün 10 katından fazla (0,774) tespit edilmiş ve buna göre *TSWV15* olarak adlandırılan yöresel izolatin agresivitesinin yüksek olduğu anlaşılmıştır.

#### 3.2.Mekanik İnokulasyon

Mekanik inokulasyon tarihinden 20 gün sonra, domates bitkilerinde hastalık belirtileri ile ilgili gözlem ve incelemeler yapılmıştır. Testleme sonucunda Çeşit-1 ve LA 3667 dayanıklı; Çeşit-2, Hat-1 ve Hat-2 ise hassas olarak gözlenmiştir (Resim 3). Dayanıklı bitkilerde herhangi bir hastalık belirtisine rastlanmaz iken; hassas bitkilerin yaprak damarlarının arasında

kahverengileşmeler ve benek şeklinde belirtiler gözlenmiştir (Resim 4). Testleme sonuçlandığında bitkiler yeniden ELISA testine tabi tutulmuştur. ELISA testi sonuçları, görsel olarak ortaya çıkan bulgularla tam olarak bir uyuşma sergilemiş; belirti gösterenler pozitif sonuç verirken dayanıklı bulunan Çeşit-1 ve LA 3667 bitkilerinde negatif sonuç elde edilmiştir.

Hastalık etmeni virüse karşı dayanıklılık geni olan *Sw-5*'in tespiti çalışmalarında Garland vd. (2005) tarafından yapılan mekanik inokulasyon testlemelerinde, farklı ıslah kademelerindeki bitkilerde taramalar (screening) yapılmıştır. Bu çalışmada da hastalık belirtisi olarak yapraklarda kahverengileşme ve benek şeklindeki lekeler dikkate alınmış olup, dayanıklı kontrol olarak kullanılan LA 3667 çeşidinde hiçbir belirti ortaya çıkmadığı halde, *Sw-5* genini içermeyen tüm genotiplerde hastalık belirtilerine rastlanmıştır.



**Resim 3.** Yapılan mekanik inokulasyonun sonuçları; **a)**Çeşit-1(dayanıklı ticari çeşit), **b)**LA 3667 (dayanıklı materyal) **c)**Çeşit-2 (hassas ticari çeşit), **d)**Hat-1(hassas hat) **e)** Hat-2(hassas hat)





**Resim 4.** İnokulasyon yapılmış bitkilerdeki hastalık belirtileri

#### **4. SONUÇ**

Ülkemizde *TSWV* ile ilgili yapılan çalışmalar son yıllara kadar yalnızca arazi surveyleri ve hastalığın yayılış alanlarını belirlemeyle sınırlı kalmıştır. *TSWV*, önceleri ülkemiz için yeni ve çok da dikkati çekmeyen bir virüs olarak algılanırken, özellikle son birkaç yıldan bu yana domates yetiştirilen örtüaltı ve hatta açık alanlarda yaygınlaşması, verim ve kaliteyi neredeyse tamamen yok etmesi nedeniyle üreticilerin ve tohum şirketlerinin ilgi odağı haline gelmiştir. Genetik dayanıklılık haricinde kesin bir mücadelesi olmayan diğer virüs hastalıklarında olduğu gibi dayanıklı çeşit kullanımı *TSWV* için de başvurulacak en güvenli yoldur. Bu virüse karşı dayanıklılık çalışmaları ise ülkemiz için tamamen yeni bir konudur. Geleneksel ıslah yöntemlerinin yanı sıra, moleküler yardımcı seleksiyonun kullanımı, hastalığa karşı dayanıklılık geninin varlığının tespiti için hem pratik hem de daha kısa zaman alması bakımından inokulasyon yöntemine göre çok avantajlıdır. Ancak hastalığa dayanıklı olduğu düşünülen bitkinin hastalık etmeni virüs ile testlenmesi ıslah çalışmalarında mutlaka gerçekleştirilmesi gereken bir adımdır. Doğru sonuç veren ve kolay uygulanabilir inokulasyon yönteminin ortaya konması, moleküler yöntemlerle yürütülen çalışmaların paralelinde bulunması

gereklidir. Bu çalışmada kullanılan mekanik inokulasyon yönteminin, *TSWV*ye dayanıklılık ıslahı programlarında kolaylıkla uygulanabilir olduğu ve güvenilir sonuçlar verdiği gösterilmiştir. Ayrıca Antalya'dan izole edilen *TSWV* izolatının yüksek agresiviteye sahip bir izolat olduğu da ortaya konmuş, *Sw-5* geninin varlığı halinde agresivite yüksek de olsa dayanım özelliğinin kendini gösterdiği belirlenmiştir.

### **Teşekkür**

İnokulasyon çalışmasının optimizasyonunda bizden yardımını esirgemeyen Sn. Yrd. Doç. Dr. Muharrem Kamberoğlu' na ve Sayın Filiz Çalışkan'a, ayrıca izolat temininde bize yardımcı olan Sayın Volkan Bozdoğan'a teşekkürlerimizi sunarız.

### **Kaynaklar**

- Anonim, 2007. Zirai Mücadele Teknik Talimatı, Domates Lekeli Solgunluk Virüsü, s:1-2.
- Barone, A.,2004. Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogen in tomato. Marker Assisted Selection: A Fast Track To Increase genetic Gain in Plant and Animal Breeding. Session 1: MAS in Plant, pp: 29-35.
- Chaisuekul, C., Riley, D. G., Rappu, H. R., 2003. Transmission of Tomato spotted wilt virus to tomato plants of different ages. J. Entomol. Sci., 38(1):127-136.
- Cho, J.J., Mau, R.F.L., German, T.L., Hortmann, R.W., Yudin, L.S., Gonsalves, D., Provvidenti, R. 1989. A multidiciplinar approach to management of tomato spotted wilt virus in Hawaii. Plant Disease 73: 375-383.
- FAO, 2009. Tarımsal Üretim Verileri. (<http://apps.fao.org>).
- Garland, S., Sharman, M., Persley, D., McGrath, D., 2005. The development of an improved PCR-based marker system for *Sw-5*, an important *TSWV* resistance gene of tomato. Australian J. Agric. Research, 56: 285-289.
- Roselló, S.,Diéz, M. J., Nuez, F., 1996. Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. I. The tomato spotted wilt virus- a review. Sci. Hort., 67:117-150.
- Spasova, M. I., Prins, T. W., Folkertsma, R.T., Klein-Lankhorst, R. M., Hile, J., Goldbach, R.W., Prins, M., 2001. The tomato gene *Sw-5* is a member of coiled coil, nucleotide binding, leucine rich repeat class of

- plant resistance genes and confers resistance to *TSWV* in tobacco. *Molecular Breeding*, 7: 151-161.
- Şevik, M. A., 2007. Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV)'nün Samsun İlinde Domates Üretim Alanlarındaki Yayılış Durumunun ve Bazı Karakteristik Özelliklerinin Belirlenmesi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü (yayımlanmamış Doktora Tezi), Samsun, 117s.
- Tekinel, N., Dolar, M.S., Sağsöz, S., Salcan, Y., 1969. Mersin bölgesinde ekonomik bakımdan önemli bazı sebzelerin virüsleri üzerinde araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, 9: 37-49.
- Turhan, P., Korkmaz, S. 2006. Çanakkale ilinde Domates Lekeli Solgunluk Virüsünün serolojik ve biyolojik yöntemlerle saptanması. *Ankara Üniv. Ziraat Fak. Tarım Bilimleri Der.* 12 (2): 130-136.
- Wang, M., Gonsalves, D., 1990. ELISA detection of various tomato spotted wilt virus isolates using specific antisera to structural proteins of the virus. *Plant Disease* 74: 154-158.
- Yılmaz, S., 2002. Batı Akdeniz Bölgesi' nde yeni bir bitki virüs hastalığı. *Derim Dergisi*. 19 (2): 55-60.