

## MAS Yöntemiyle Domates Lekeli Solgunluk Virüsü'ne Dayanıklı Domates Hatlarının Geliştirilmesi

Ayşe KAHRAMAN<sup>1\*</sup>, Hülya İLBİ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dr., Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Sebzeçilik Şubesi, Menemen/İzmir; ORCID:0009-0004-1556-9061

<sup>2</sup>Prof. Dr., Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Bornova/İzmir; ORCID: 0000-0002-7691-7996

### ÖZ

Domates, Solanaceae familyasına ait dünyada ve ülkemizde yetiştiriciliği en fazla yapılan sebze türüdür. Domates yetiştiriciliğini olumsuz yönde etkileyen birçok hastalık etmeni ve zararlı bulunmaktadır. Domates lekeli solgunluk virüsü (Tomato spotted wilt virüs, TSWV), bazı ülkelerde karantina kapsamında bulunan, Thrips tabaci ve batı çiçek tripsi (*Frankliniella occidentalis*) tarafından taşınan tehlikeli bitki virüslerinden biridir. Bu amaçla, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü domates gen havuzunda yer alan sofralık ve sanayilik tüketime uygun domates hattı hassas M68 ile Tomato Genetic Resource Center (TGRC)'den temin edilen Domates lekeli solgunluk virüsüne dayanıklı LA3667 ile melezleme yapılarak oluşturulan popülasyonda MAS yöntemi kullanılarak homozigot dayanıklı nitelikli hatların moleküler olarak seleksiyonu yapılmıştır. Bu amaçla F<sub>2</sub> ıslah kademesinde monogenik (1:2:1) açılımına göre 150 F<sub>2</sub> bireyinde 35 homozigot dayanıklı, 74 heterozigot dayanıklı ve 41 hassas birey elde edilmiştir. Dayanıklı olarak belirlenen homozigot dayanıklı hatlar, F<sub>4</sub> kademesine kadar kendilenmiş, F<sub>4</sub> kademesinde tekrar moleküler olarak testlenmiş, Sw-5 lokusu bakımından homozigot dayanıklı 3 hat ve 2 hassas domates ıslah hattı mekanik inokülasyon yoluyla biyolojik testlemeye alınmış ve dayanıklılık sonuçlarının, moleküler ve biyolojik olarak birbiriyle uyumlu olduğu görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Domates, TSWV, dayanıklılık, moleküler markör

### Development of Tomato Lines Resistant to Tomato Spotted Wilt Virus Using the MAS Method

#### ABSTRACT

Tomato, belonging to the Solanaceae family, is the most cultivated vegetable species in the world and in Türkiye. There are many disease factors and pests that negatively affect tomato cultivation. Tomato spotted wilt virus (TSWV) is one of the dangerous plant viruses carried by Thrips tabaci and western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*), which is under quarantine in some countries. For this purpose, homozygous resistant tomato lines were obtained by using the MAS method in the population created by crossing the susceptible M68 tomato line suitable for table and processing consumption in the tomato gene pool of the Aegean Agricultural Research Institute with the Tomato spotted wilt virus resistant LA3667 line obtained from Tomato Genetic Resource Center (TGRC). Molecular selection of the lines was made. For this purpose, in the F<sub>2</sub> breeding stage, 35 homozygous resistant, 74 heterozygous resistant and 41 susceptible individuals were obtained from 150 F<sub>2</sub> individuals according to the monogenic (1:2:1) expansion. Homozygous resistant lines determined as resistant were selfed to the F<sub>4</sub> stage, tested molecularly again at the F<sub>4</sub> stage, 3 resistant lines homozygous for the Sw-5 locus and 2 susceptible tomato breeding lines were subjected to biological testing by mechanical inoculation. At the end of the study, molecular test and biological test were found concordantly.

**Keywords:** Tomato, TSWV, resistance, molecular marker

### GİRİŞ

1915 yılında ilk defa Brittlebank tarafından Avustralya'da tespit edilen TSWV [3, 27], insan ve hayvanlarda patojen virüs türlerini de içeren Bunyaviridae familyasına ait Tosopovirus cinsinde yer alan 15 virüs türünden birisidir [21]. Dünya'da en fazla zarar oluşturduğu bitki türleri arasında domates, biber, marul, tütün, yer fıstığı ve bazı süs bitkileri yer almaktadır. TSWV, Türkiye'de ilk olarak [36], tarafından marul bitkilerinde, ardından domateste [37, 8, 9, 3, 13, 40, 14, 1, 38, 12, 22, 39], tütünde [3],

biberde [41, 2, 39], patlıcanda [16], kabakta [39] ve bazı yabancı otlarda da [2, 22] tespit edilmiştir. TSWV, domates yetiştiriciliğinde ve diğer önemli kültür bitkilerinde en tehlikeli 10 virüs türünden birisi olmakla birlikte Dünya'da hemen hemen her yerde sorun oluşturmaktadır [12]. TSWV, Akdeniz ve Avrupa Bitki Koruma Organizasyonu (EPPO) ve ülkemizde de karantina usullerince iç ve dış karantinaya tabi virüsler arasında yer almaktadır [35]. EPPO A2 karantina listesinde, Türkiye Bitki Karantinası Yönetmeliği'nde ise; "Türkiye de sınırlı olarak bulunan ve ithale mâni teşkil eden karantinaya

\*Sorumlu yazar / Corresponding author: ayse.kahraman@tarimorman.gov.tr

tabi zararlı organizmalar” listesinde yer almaktadır [17]. Virüs mekanik yolla ve 9 trips türü ile taşınmaktadır. Bu türler arasında, soğan tripsi (*Thrips tabaci* Lindeman) ve batı çiçek tripsi (*Frankliniella occidentalis* Pergande) en yaygın olanlarıdır [20]. TSWV, domates bitkisini ciddi oranda etkilemekte ve önemli derecede ürün kayıplarına neden olabilmektedir. TSWV ile bulaşık bitkilerde bodurlaşma, yapraklarda kloroz, meyvelerde klorotik ve nekrotik halka şeklinde lekeler meydana gelmektedir [12].

Günümüzde bitki virüs hastalıklarının kimyasal mücadelesi bulunmamaktadır. Bu nedenle virüs kaynaklı hastalıklara karşı en etkin ekonomik ve çevreci yöntem hastalıklara karşı dayanıklı çeşit kullanılmasıdır [15]. Domateste TSWV dayanıklılığı ile ilişkili genler ilk olarak Finley [11] tarafından 5 farklı dayanıklılık geni (Sw1a, Sw1b, sw2, sw3, sw4) olarak tanımlanmıştır. Bu genler izolat spesifik olup, ayrıca dayanıklılık mekanizmasının farklı Tospovirüsler tarafından kırılabilirdiği bildirilmiştir [23, 26]. Dominant kalıtım gösteren Sw-5 geni ise ilk olarak Güney Afrika kaynaklı “Stevens” domates çeşidinde tanımlanmıştır [30]. *S.peruvianum*’dan geliştirilen *S.lycopersicum* “UPV-32” hattında tanımlanan dayanıklılık geni Sw-6’nın trips inokülasyonuna kısmi dayanıklılık ve virüs izolatlarına Sw-5’ten daha az dayanıklılık gösterdiği belirlenmiştir [24, 25]. Son olarak, Sw-7 tanımlanmıştır ve *S.chilense* kaynaklı LA 1938’den, *Solanum lycopersicum*’a aktarılmıştır [5, 31, 23, 26]. Domateste şimdiye kadar geniş spektrumlu Tospovirus dayanıklılığı ile ilgili en iyi direnç seviyeleri Sw-5 geninde bildirilmiştir ve bu gen çifti tek ve ko-dominant dayanıklı ve hassas hatlar arasında polimorfizm göstermiştir [7].

DNA markörleri 1980’lerden itibaren pek çok alanda olduğu gibi domates dayanıklılık ıslahında seleksiyonu kolaylaştırması ve yeni çeşitlerin geliştirilmesinde önemli bir araç olmuştur. Hastalık dayanıklılık genlerini tanımlamaya yönelik markörler, ıslah programlarında seleksiyonda (MAS) kullanılmaktadır. Böylece, birden fazla dayanıklılık genini aynı genotip üzerinde piramitlemek mümkün olabilmektedir [9]. Ülkemizde domateste markörlere dayalı seleksiyon üzerine çalışmalar bulunmaktadır. Oğuz [21], Türkiye kaynaklı domates genetik kaynaklarının ve bazı yabancı genotiplerin etmene karşı dayanımlarını morfolojik ve moleküler olarak araştırmışlardır. Kontrol olarak TSWV dayanıklılık geni, Sw-5 genini taşıyan LA 3667, Formula F<sub>1</sub> ve *S.peruvianum* genotipleri dayanıklı kontrol olarak kullanılmışlardır. Araştırma sonunda tüm yerel genotiplerin etmene karşı hassas olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada; moleküler markör yardımcı seleksiyon (MAS) ıslahı kullanılarak domates yetiştiriciliğini olumsuz yönde etkileyen verim ve kalite kayıplarına neden olan TSWV karşı dayanıklılık kazandırılmış domates ıslah hatlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Çalışmada Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilmiş olan, TSWV’ye hassas M68 hattı ile dayanıklılık aktarmak amacıyla TGRC (Tomato Genetic Resource Center)’den temin edilen TSWV’ye dayanıklılık sağlayan Sw-5 genini içeren LA 3667 sofralık hatları kullanılmıştır. M68: Bitki ve meyve özellikleri bakımından öne çıkan, sanayi ve sofralık özelliği iyi, 150-200 g ağırlıkta, orta erkenci, yuvarlak meyveli bir hatır. Hastalıklara dayanıklılık yönünden hassas olduğu belirlenmiştir.

LA 3667: TGRC’den temin edilmiştir. Monogenik olarak Sw-5 geni içeren, yüksek yuvarlak meyve şeklinde, geçici, sofralık bir ıslah hattıdır.

### Metot

#### Popülasyon oluşturma

Domates lekeli solgunluk virüsüne dayanıklılık geni (Sw-5) içeren hatların oluşturulmasına yönelik popülasyon oluşturulmuştur. Oluşturulan popülasyon “popülasyon 1” olarak adlandırılmıştır. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsünün hastalıklara dayanıklılık bakımından duyarlı M68 no.lu ıslah hattı ile TGRC’den temin edilen Sw-5 geni bakımından homozigot dayanıklı LA 3667 ıslah hattının ile melezlenmesi ile oluşturulmuştur. Tohum ekimleri hazır torf kullanılarak 228’lik polistiren fide viyollerine yapılmıştır. Fide dikimleri 140×50 cm aralıkla Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü deneme alanına yapılmıştır. Domates lekeli solgunluk virüsüne dayanıklı (LA 3667) ve hassas (M68) ebeveynler melezlenmiştir. Melezlemeler 20 Mayıs-10 Haziran tarihleri arasında çiçeklenmelerin yoğun olduğu dönemde gerçekleştirilmiştir. Kademe ilerletmek amacıyla melez meyvelerden elde edilen tohumlar 06 Ağustos 2012’de ekilmiş ve 07 Eylül 2012’de 10 adet F<sub>1</sub> fidesi seraya dikilmiştir. 10 adet F<sub>1</sub> bitkisinden alınan yaprak örneklerinden yapılan markör analizi [7] sonunda heterozigot dayanıklı (Rr) oldukları belirlenmiştir. Bu F<sub>1</sub> bitkileri kendilenmeleri izole koşullarda yetiştirilerek sağlanmıştır. Her bir F<sub>1</sub> bitkisinden (01.02.2013) 10 adet meyve alınarak F<sub>2</sub> tohumları çıkarılmıştır. F<sub>1</sub> bitkilerinden elde edilen tohumların 200 tanesi F<sub>2</sub> ıslah kademesi için viyollere ekilmiştir (11.03.2013). Tohum çıkışı gerçekleşen 190 adet fidenin 140×50

cm aralıklarla Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü deneme alanına dikimi yapılmıştır. F<sub>2</sub> popülasyonunda yer alan 190 bitkinin kendilemesi yapılarak tohumu alınabilen 150 bitkisinden taze yaprak örnekleri alınarak Dianase vd. [7] göre markör analizi yapılmıştır. TSWV bakımından homozigot dayanıklı (RR/Sw-5) olduğu belirlenen 35 F<sub>2</sub> bireyinin meyvelerinden alınan tohumlar her birinden beşer bitki olacak şekilde ekilmiştir.

Yetiştirilen F<sub>3</sub> bireylerinin fideleri 2013 Sonbahar döneminde seraya dikilmiştir. F<sub>3</sub> bireylerinde kendilemeler yapılmış ve olgunlaşan kendilenmiş meyvelerin hasatı 13.02.2014 tarihinde yapılarak, tohumları alınmıştır. F<sub>3</sub> bireylerinde bitki habitüsü, çiçeklenme durumu ve meyve şekli yönünden gözlemler yapılmış ve bitki habitüsü güçlü, çiçeklenme durumu iyi ve yuvarlak meyve şekilli 30 adet kendilemesi yapılan homozigot F<sub>3</sub> bireyinin seçimi yapılmıştır. F<sub>3</sub> popülasyonundan seçilen 30 F<sub>4</sub> bireyin her birinden 20 bitki olacak şekilde 4 Mart 2015 tarihinde ekilmiştir. Fide döneminde yapılan markör analizi ile homozigot dayanıklı Sw-5(RR) 10'ar adet F<sub>4</sub> kademesindeki 3 hat Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde biyolojik testlemeye alınmıştır.

#### *Moleküler analizler*

Popülasyon 1'de M68, LA 3667, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> ve F<sub>4</sub> bitkilerine ait yaprak örnekleri sıvı azotla muamele edildikten sonra Doyle&Doyle yöntemine göre DNA izolasyonu yapılmıştır.

Dianase (2010), S-w-5-2 primer dizilimine, (Forward: 5'-AATTAGGTTCTTGAAGCCCATCT-3' ve Reverse: 5'-TTCCGCATCAGCCAATAGTGT-3') göre moleküler testleme gerçekleştirilmiştir.

•*Kullanılan PCR reaksiyonu için hazırlanan karışım:* 10X buffer:1 µl, dNTP: 0,7 µL (2,5 mM), MgCl<sub>2</sub>: 0,6 µL (50 mM), Primer Forward: 0,5 µL (100 ng), Primer Reverse: 0,5 µL (100 ng), Taq Polimerase: 0,1 µL (0,5 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen) Kullanılan DNA miktarı: 2 µL ve kullanılan su miktarı 4,5 µL şeklindedir. DNA Amplifikasyonu için Kullanılan Protokol Sw-5 lokusunu tanımlamaya yönelik DNA amplifikasyonu sağlamak için kullanılan PCR tabanlı çoğaltım programı: 94°C'de 2 dakika ilk denatürasyon basamağı, 94°C'de 30 saniye (denatürasyon), 50°C'de 1 dakika (annealing), 72°C'de 30 saniye (elongasyon) 29 döngü (denatürasyon, annealing ve elongasyon) tekrar edilmiştir. Son olarak 72°C'de 5 dakika ve ∞ zamanda 4°C'de inkübasyon şeklinde uygulanmıştır. Çalışmada %2'lik agarose jel kullanılmıştır.

#### *Biyolojik testleme*

Çalışmada moleküler olarak dayanıklı ve hassas olarak belirlenen 5 domates ıslah hattında F<sub>4</sub> kademesinde mekanik inokülasyon yapılmıştır. Mekanik inokülasyon 14 Nisan 2015 ile 15 Mayıs 2015 tarihleri arasında BATEM (Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü) Antalya'da gerçekleştirilmiştir. TSWV inokulum kaynağı olarak BATEM Bitki Koruma Bölümü viroloji laboratuvarlarındaki hastalıklı bitki örnekleri kullanılmıştır. 14 Nisan 2015 tarihinde ilk gerçek yaprakları oluşan TSWV dayanıklılığı moleküler olarak belirlenmiş F<sub>4</sub> kademesindeki 3 dayanıklı hat (Sw-5/RR) ve 2 hassas hat (Sw-5/rr) BATEM'de biyolojik olarak testlemeye alınmıştır. Testleme yapılan her bir hattan 10 bitki, hassas kontrol ETAE hassas hattı M68, Sw-5 lokusu içeren dayanıklı olduğu bilinen LA 3667 ve BATEM kodlu hassas kontrol olarak 10'ar bitki kullanılmış ve her bir saksıya 2 şer adet gelecek şekilde şaşırtılmıştır.

TSWV ile bulaşık olduğu belirlenmiş domates bitkilerinden elde edilen inokulum steril porselen bir havan içerisinde iyice ezilmiş. İçerisine 1:5 oranında 0,01 M fosfat tampon ilave edilmiştir. İnokülasyonda kullanılan fosfat tampon; 1 lt 0.01 M için, 1 lt suya 5.253 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (MA=136.09), 10.93 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (MA=177.99) eklenerek, pH=7.0 olacak şekilde hazırlanmıştır. Solüsyonun içerisine %1 oranında Na<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> ve %0.1 oranında Merchптоethanol eklenmiş ve +4°C'de saklanmıştır. İnokülasyonda kullanılan inokulum kaynağı, 100 g hastalıklı bitki örneğine 200 µl fosfat tampon eklenerek hazırlanmıştır. Bitki örnekleri porselen havanlara konmuş ve bitki özsuğu tampona geçecek şekilde iyice ezilmiştir. Bitki artıkları süzülerek çözüldüden çıkarılmış ve çözelti içerisine hastalık etmeninin girişini sağlayabilmek için yaprak dokusunu zedelemek amacıyla carborandum tozu serpilmiştir. Bu hazırlık işlemleri ve inokülasyon işlemleri sırasında inokulum kaynağının buz içerisinde tutulmasına dikkat edilmiştir. Şaşırtma işleminden 1 gün sonra hazırlanan bu inokulumla fidelerin kotiledon ve ilk gerçek yapraklarına sünger yardımıyla sürülerek inokülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde 3-4 dakika sonra bitkilerin yapraklarına sprey ile su püskürtülerek yapraklar üzerindeki inokulum fazlalıkları yıkanmıştır.

## **BULGULAR VE TARTIŞMA**

### *Moleküler Analizlere Ait Bulgular*

Bu çalışmada Marköre Dayalı Seleksiyon yöntemi kullanılarak tüm dünyada büyük ekonomik kayıplara neden olan Domates lekeli solgunluk virüsüne

dayanıklılık sağlayan Sw-5 geninin nitelikli bir domates ıslah hattına aktarılması amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak melezleme (kombinasyon ıslah) yöntemi kullanılarak popülasyon geliştirilmiştir. Seleksiyon aşamalarında dayanıklı bireyleri seçmek amacıyla markör yardımcı seleksiyondan yararlanılmıştır. Çalışmanın F<sub>2</sub> ıslah kademesinde marköre dayalı seleksiyon yöntemi (MAS) ile homozigot dayanıklı bitkiler seçilerek tek bitki seleksiyonu yapılmış ve kendileme işlemi yapılarak bir sonraki ıslah kademesine ulaşılmıştır. MAS yöntemi ile belirlenen hassas ve heterozigot dayanıklı bireyler popülasyondan elimine edilmiştir. Bugüne kadar TSWV'ne karşı dayanıklılık sağlayan 8 gen (Sw1a, Sw1b, sw2, sw3, sw4, Sw-5, Sw-6 ve Sw-7) tanımlanmıştır [11, 23, 26]. Domates lekeli solgunluk virüsüne dayanıklılık sağlayan genler arasında, Sw-5 geninin Tosporvirüsüne karşı güvenilir ve etkili dayanıklılık sağladığı ve domates ıslah programlarında seleksiyonda Sw-5 geni ile yakın ilişkide olan SCAR markörü ve SNP markörlerinin kullanıldığı belirtilmektedir [29, 7, 28, 19].

Domates lekeli solgunluk virüsüne karşı dayanıklılık sağlamak için oluşturulan Popülasyon 1'de F<sub>1</sub> ve F<sub>2</sub> bitkilerinde 10 adet F<sub>1</sub> bitkisinde ve F<sub>2</sub> popülasyonunda 150 bitkide markör analizi gerçekleştirilmiştir. F<sub>1</sub> bireyleri ve kontrol olarak kullanılan hassas ebeveyn M68, dayanıklı ebeveyn LA 3667 ve F<sub>1</sub> bireylerine ait moleküler analiz görüntüleri Şekil 1'de verilmiştir. Testlemeye alınan F<sub>1</sub> bireyleri de Sw-5 geni bakımından heterozigot dayanıklı bulunmuştur. Şekil 2'de ise F<sub>2</sub> popülasyonunda testleme yapılan bireylere ait moleküler analiz görüntüleri yer almaktadır. Çizelge 1'de ise analiz yapılan bireylerde elde edilen sonuçlar toplu olarak yer almaktadır.



\*(s: 510 bp, M68 hassas; R:574 bp, LA3667; H: 510 bp ve 574 bp F<sub>1</sub> (M68×LA3667) bitkileri

Şekil 1. F<sub>1</sub> bitkilerinden elde edilen bant görüntüleri

TSWV'ne dayanıklı hat geliştirmek amacıyla oluşturulan Popülasyon 1'in F<sub>2</sub> kademesindeki 150 birey Sw-5 geni bakımından moleküler testlemeye

alınmıştır. Moleküler testlemede Sw-5 geni bakımından homozigot dayanıklı bireyler 574 bp'de bant oluştururken, hassas F<sub>2</sub> bireyleri 510 bp'de, heterozigot dayanıklı 574 bp ve 510 bp'de bant oluşturmuşlardır. Dianase vd. [7], homozigot dayanıklı Stevens çeşidinin 574 bp büyüklüğünde bant oluşturduğunu, MoneyMaker ile küçük meyve şekline sahip domates çeşitlerinin ise 464 bp'de bant oluşturduğunu belirtmektedir. Dayanıklılık kaynağı olarak kullanılan Sw-5 genini içeren hat LA 3667, Stevens çeşidinden geliştirilmiş bir ıslah hattı olması dolayısıyla Domates lekeli solgunluk virüsüne dayanıklı bireyler sadece 574 bp'de bant oluşturmuşlardır. Çalışmada 464 bp'de bant gözlenmemiştir.



\*91-94-95 ve 96 kodlu örnekler kontrol olarak ebeveynlerden ve F<sub>1</sub> bitkilerinden seçilmiştir ve kontrol amaçlı 2 kez tekrarlanmıştır.

Şekil 2. Popülasyon 1'de F<sub>2</sub> kademesinde bireylerden (1-24 arası) elde edilen bant görüntüleri

Çizelge1. Popülasyon 1'de F<sub>2</sub> kademesinde analiz sonunda bireylerin dayanıklılık durumları

M68×LA3667 (Sw-s) F <sub>2</sub> - Popülasyonu (150 Bitki)	
Homozigot Dayanıklı (RR)	35
Heterozigot Dayanıklı (Rr)	74
Hassas (rr)	41
F <sub>2</sub> (M68×LA3667) 1:2:1 RR: Rr: rr (Sw-5) 150	

Shi vd. [28], Sw-5 ile ilişkili SNP moleküler markörleriyle yaptıkları çalışmada, Stevens çeşidi kaynaklı LA 3667 aksesyonunun, Tosporvirüsüne etkili dayanıklılık gösterdiğini belirtmiştir. Bu çalışmada da dayanıklılık kaynağı olarak kullanılan ve Enstitüde saf hat haline getirilen LA 3667 hattı hem SCAR hem de SNP markörü ile yapılan analizlerde Sw-5 genini içerdiği teyit edilmiştir. Ayrıca, Popülasyon 1'in F<sub>2</sub> bitkilerinde Sw-5 geni bakımından yapılan moleküler analiz sonucu açılımın 1:2:1 (Sw-5+/Sw-5+)/(Sw-5+Sw-5-)/(Sw-5-/Sw-5-) olduğu belirlenmiştir. Popülasyon 1'de kullanılan LA 3667 hattının dayanıklılık sağlayan Sw-5 genini dominant olarak taşıdığı ve dayanıklılığın tek dominant genle kontrol edildiği [30, 18] teyit edilmiştir.

F<sub>2</sub> popülasyonunda yapılan testlemede dayanıklılığın tek gen kalıtım hipotezi Ki-kare ( $\chi^2$ ) testi ile belirlenmiştir. Çizelge 2'de Popülasyon 1'in F<sub>2</sub> kademesindeki moleküler markör sonucu belirlenen birey sayıları ve Ki-kare testi verilmiştir.



Çizelge 2. Popülasyon 1 için, F<sub>2</sub> açılımında moleküler markör sonuçlarına göre Ki-kare ( $\chi^2$ ) testi

F <sub>2</sub> Açılımı Ki-kare ( $\chi^2$ )			
Genotip	Gözlenen	Beklenen	Ki-kare ( $\chi^2$ )
RR (Sw-5+/Sw-5+) Homozigot dayanıklı	35	37.5	0,16
Rr (Sw-5+/Sw-5-) Heterozigot dayanıklı	74	75	0,01
rr (Sw-5-/Sw-5-) Hassas	41	37.5	0,32
Toplam	150	150	$\chi^2=0,49$

Sd:2  $\chi^2=(0,05)= 5,991$

F<sub>2</sub> açılımında genotiplerin  $\frac{1}{4}$  RR,  $\frac{1}{2}$  Rr ve  $\frac{1}{4}$  rr şeklinde genotipik açılım göstermesi gerekmektedir. F<sub>2</sub> açılımında 150 bitkide yapılan testleme sonucunda 35 birey homozigot dayanıklı, 74 birey heterozigot dayanıklı ve 41 birey hassas olarak gözlenmiştir. F<sub>2</sub> açılımında yapılan Ki-kare ( $\chi^2$ ) testi ile monohibrit açılımın beklenen değerleri ile uyumlu olduğu bulunmuştur. TSWV'ne dayanıklılığın tek gen kontrolünde olduğu (0,05) istatistiki önem seviyesinde görülmüştür. Popülasyon 1'de dayanıklılık çalışmalarına homozigot dayanıklı bireylerle devam edilmiş ve bu bireylerde kendilemeler yapılarak, F<sub>3</sub> ve F<sub>4</sub> ıslah kademelerine geçilmiştir.

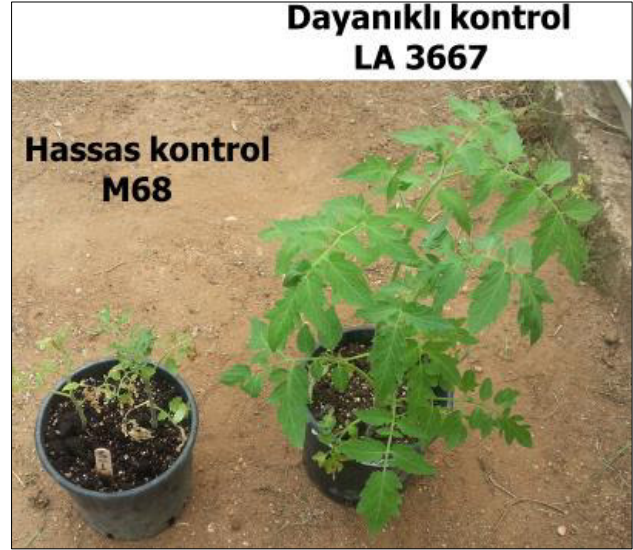


Şekil 3. Testlemeye alınan hassas ve dayanıklı bitkilerde meydana gelen belirtiler. Dayanıklı ve hassas hatlara ait bitkilerde inokülasyon sonrası TSWV belirtileri a) testlenen bitkilerin genel görüntüsü b) hassas ve dayanıklı kontrol c) hassas bitkilerde görülen belirtiler d) hassas bitkilerde kahverengileşme

### **Biyolojik Testlemeye Ait Bulgular**

TSWV testlemesinde kullanılan dayanıklı kontrole (LA3667) ait bitkilerde hiçbir hastalık belirtisi görülmediği, hassas kontrole (M68) ait tüm bitkilerde hastalık belirtileri görülmüştür. Moleküler olarak dayanıklı olarak belirlenen 3 hatta ait bitkilerin

tamamında hastalık belirtisi görülmemiş, hassas hatların bitkilerinde ise hastalık belirtileri görülmüştür. Testlenen bireylerde moleküler testleme sonuçları ile biyolojik testleme sonuçları uyumlu olarak belirlenmiştir.



Şekil 4. Popülasyon geliştirmede kullanılan ve biyolojik testlemede kullanılan hatlar

Fidan ve Sarı [10] Domateste Tomato spotted wilt virüs'üne karşı dayanıklılığı kıran izolatının fenotipik karakterizasyonu tanımlamak için yaptıkları çalışmada 2016-2019 yılları arasında Antalya ili ve ilçelerinde domates yetiştiriciliği yapılan seralarda Sw-5 geni barındıran çeşitler üzerinde TSWV'a ait belirtilerin geliştiği gözlemlenmiştir. Bu izolatların PCR çalışmaları ile bitkilerin Sw-5 geni içerdiği ve RT-PCR (Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu) çalışmaları ile de belirtilerin TSWV'a ait olduğu doğrulandıktan sonra izolatın ismi TSWVAntRB olarak belirlenmiştir. Yapılan gözlemler sonucunda TSWVAntRB izolatının farklı belirtilere sahip olduğu tespit edildiği belirtilmiştir. Yapılan çalışma sonunda elde edilen veriler neticesinde Sw-5 dayanımını kıran izolat olarak isimlendirilen bu TSWVAntRB izolatının eski izolata nazaran daha agresif tavırlar sergilediği ve ürünler üzerinde çok şiddetli belirtiler meydana getirerek pazar değerini düşürdüğü belirtilmiştir.

### **SONUÇ**

Çalışmanın sonucunda dayanıklı ileri ıslah hatları geliştirilmiştir. Domates lekeli solgunluk virüsüne dayanıklı F<sub>4</sub> kademesinde 30 ileri ıslah hattı, geliştirilmiştir. Bu hatlar ileride yapılacak moleküler ve biyolojik testleme çalışmalarında referans olarak

kullanılabilecekleri gibi çeşit geliştirme çalışmalarında ebeveyn hat olarak kullanılabileceklerdir. Domates ıslah programlarında, hastalık ve zararlılara yönelik dayanıklılık genlerinin belirlenmesinde geliştirilen moleküler markörlerin katkıları ve seleksiyonda ıslahçılara kazandırdığı zaman ve emek oldukça önemlidir. Ancak hastalık etmenlerinin ve zararlıların dinamik canlılar olması nedeniyle geliştirilen ıslah materyallerinin biyolojik olarak testlenmesi, yapılan çalışmaların etkinliğinin teyit edilmesi açısından faydalı olacaktır.

### KAYNAKLAR

1. Arli-Sökmen, M., Şevik, M.A. 2006. Viruses infecting field-grown tomatoes in Samsun province Turkey. Archives of Phytopathology and Plant Protection 39(4):283-288.
2. Arli-Sökmen, M., Mennan, H., Şevik, 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.
3. Azeri, T. 1994. Detection of tomato spotted wilt virus in tobacco and tomato cultivars by enzyme linked immunosorbent assay. J. Turkish Phytopath 23(1):37-46.
4. Brittlebank, C.C. 1919. Tomato diseases. J. Agric. Victoria 27:213-235.
5. Canady, M.A., Stevens, M.R., Barineau, M.S., Scott, J.W. 2001. Tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in tomato derived from *Lycopersicon chilense* Dun. LA 1938. Euphytica, 117:19-25.
6. Collard, B.C.Y., Jahufer., M.Z.Z., Brouwer, J.B., Pang, E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica (2005) 142:169-196.
7. Dianese, È.C., Fonseca, M.E.N., Goldbach, R., Kormelink, R., Inoue-Nagata, A.K., Resende, R.O., Boiteux, L.S. 2010. Development of a locus-specific, co-dominant SCAR marker for assisted-selection of the Sw-5 (tospovirus resistance) gene cluster in a wide range of tomato accessions. Mol Breeding 25:133-142.
8. Fidan, Ü. 1993. Recent records on virus diseases of vegetables in greenhouses. J. Turk. Phytopathology 22(1):45-45.
9. Fidan, Ü. 1995. Virus disease of vegetables in Greenhouses in İzmir and Muğla. J. Turk. Phytopathology 24(1):7-14.
10. Fidan, H. ve Sarı, N. 2019. Domateste tomato spotted wilt virüsüne karşı dayanıklılığı kıran izolatının fenotipik karakterizasyonu. Mediterranean Agricultural Sciences 32(3):307-314, doi:10.29136/mediterranean.596401.
11. Finlay, K.W. 1953. Inheritance of spotted wilt virus resistance in tomato. Australian Journal of Biological Sciences, 6:153-163.
12. German, T.L., Ullman, D.E., Moyer, J.W. 1992. Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny and vector relationships. Annual Review of Phytopathology 30(1):315-348.
13. Güldür, M.E., Marchoux, G., Yılmaz, M.A. 1995. A new virus destructive on tomatoes growing in Mersin and its provinces: tomato spotted wilt virus (TSWV). In 7. Congress of Phytopathology in Turkey, Adana (Turkey), 26-29 Sep 1995. Cukurova University Faculty of Agriculture.
14. Güldür, M.E. 1997. Şanlıurfa ili için yeni bir virüs: domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV). Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 1(3):71-76.
15. Hull, R., Davies, J.W., 1992. Approaches to non-conventional control of plant virus diseases. Critical reviews of Plant Science 11:17-33.
16. Kamberoğlu, M.A., Çalışkan, A.F., Alan, B., 2009. First report of tomato spotted wilt virus on eggplant in Turkey. Journal of Plant Pathology 91:231-231.
17. Kılıç, H., Isparta L., Yardımcı N., Doğan K., 2017. Isparta ve Burdur illeri üretim alanlarında yetiştirilen domateslerde domates lekeli solgunluk virüsünün tanılanması. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 8(1):34-39.
18. 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.
19. Lee, H.J., Kim, B., Bae, C., Kang, W.H., Kang, B.C., Yeam, I., Oh, C.S. 2015. Development of a single-nucleotide polymorphism marker for the Sw-5b gene conferring disease resistance to tomato spotted wilt virus in tomato. Korean Society for Horticultural Science 33:730-736.
20. Mau, R.F.L., Martin, J.L. 2002. *Frankliniella occidentalis* Pergande. www.extentohawaii.edu/kbase/crop/type/foccid.html.
21. Oğuz, A. 2010. Bazı yerel domates genotiplerinde farklı yöntemler kullanarak, domates lekeli solgunluk virüsü (tomato spotted wilt virüsü=TSWV)'ne dayanıklılığın ve genetik varyasyonun araştırılması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, 166s.
22. Özdemir, S., Erilmez, S., Kaçan, K. 2009. Detection of Tomato spotted wilt virus (TSWV) on tomato crops and some weeds in Denizli

- province of Turkey. Acta Hort. (ISHS) 808:171-174.
23. Price, D.L., Memmott, F.D., Scott, J.W., Olson, S.M., Stevens, M.R. 2007. Identification of molecular markers linked to a new Tomato spotted wilt virus resistance source in tomato. Tomato Genetics Coop Rep, 57p.
24. Roselló, S., Díez, M.J., Nuez, F. 1998. Genetics of tomato spotted wilt virus resistance coming from *Lycopersicon peruvianum*. European Journal of Plant Pathology 104(5):499-509.
25. Roselló, S., Ricarte, B., José Díez, M., Nuez, F. 2001. Resistance to Tomato spotted wilt virus introgressed from *Lycopersicon peruvianum* in line UPV 1 may be allelic to Sw-5 and can be used to enhance the resistance of hybrids cultivars. Euphytica 119(3):357-367.
26. Saidi, M., Warade, S.D. 2008. Tomato breeding for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV): an overview of conventional and molecular approaches. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 44:83-92.
27. Samuel, G., Bald, J.G., and Pittman, H.A. 1930. Investigations of "spotted wilt" of tomatoes. Commonw. Austr. Counc. Sci. Ind. Res. Bull. 44:64.
28. Shi, A., Vierling, R., Grazzini, R., Chen, P., Caton H., Panthee D. 2011. Identification of molecular markers for Sw-5 gene of tomato spotted wilt virus resistance. Am. J. Biotechnol. Mol. Sci., 1(1):8-16.
29. Stevens, M.R., Scott, S.J., Gergerich, R.C. 1991. Inheritance of resistance to tomato spotted wilt virus in a *Lycopersicon esculentum* cultivar. HortScience 26(6):781.
30. Stevens, M.R., Scott, S.J., Gergerich, R.C. 1992. Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. Euphytica 59:9-17.
31. Stevens, M.R., Scott, J.W., Cho, J.J., Geary, B.D., Memmott, F.D. 2006. A new dominantly inherited source of TSWV resistance in tomato derived from *L.chilense*, which resists isolates that overcome Sw-5. HortScience 41:91.
32. Şevik, M.A., Arlı-Sökmen, M. 2012. Estimation of the effect of tomato spotted wilt virus (TSWV) infection on some yield components of tomato. Phytoparasitica 40(1):87-93.
33. Şevik, M.A. 2007. Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV)'nün Samsun ilinde domates üretim alanlarındaki yayılış durumunun ve bazı karakteristik özelliklerinin belirlenmesi. Doktora Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, s:128.
34. Şevik, M.A. 2011. Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV)'nün tarımsal ürünlerde meydana getirdiği ekonomik kayıplar. Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 15(1):35-42.
35. Şin, B. 2015. Amasya, Samsun ve Tokat illerinde domates yetiştirilen alanlarda enfeksiyon oluşturan domates lekeli solgunluk virüsü (tomato spotted wilt virus, TSWV) izolatlarının karakterizasyonu. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, Samsun.
36. 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):37-49.
37. Tekinel, N., 1973. Adana, Antalya, Hatay ve İçel illerinde domates virüs hastalıklarının yayılış alanlarının ve oranlarının tespiti üzerinde araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni 13:(3):107-141.
38. Turhan, P., Korkmaz, S. 2006. Çanakkale ilinde domates lekeli solgunluk virüsünün serolojik ve biyolojik yöntemlerle saptanması. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi 12(2):130-136.
39. Yardımcı, N., Çulal-Kılıç H. 2009. Tomato spotted wilt virus in vegetable growing areas in the west mediterranean region of Turkey. African Journal of Biotechnology 8(18):4539-4541.
40. Yılmaz, M.A., Baloğlu S., Özaslan M., Güldür M.E. 1995. GAP bölgesinde kültür bitkilerinde belirlenen virüsler. GAP Bölgesi Bitki Koruma Sorunları ve Çözüm Önerileri Sempozyumu, Şanlıurfa, s:241-250.
41. Yürtmen M., Güldür ME., Yılmaz MA. 1999. Tomato spotted wilt virus on peppers in İçel province of Turkey. Petria, Giornale di Patologia Delle Piante 9(3):243-344.