

BAĞCILIKTA KLON SELEKSİYONU METOD YAKLAŞIMLARI

Zeki KARA¹

*¹Prof. Dr., Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, KONYA
Geliş tarihi / Received: 11.09.2017, Kabul tarihi / Accepted: 20.06.2018*

ÖZET

Bağcılıkta klon seleksiyonu endüstriyel olarak verim, kalite ve sürdürülebilirlik açısından tüm bağcı ülkelerde ilgi duyulan ve özenle çalışılan, üzüm çeşitleri ve bağcılığın geliştirilmesinin ilk adımlarından birisini oluşturan konulardan birisidir. Bu çalışmada Portekiz, Almanya, Macaristan ve İspanya gibi ülkelerde halen aktif olarak devam eden klon seleksiyon yaklaşımları ile OIV'nin 2017 yılında yayınladığı klon seleksiyonu standart protokolü incelenerek değerlendirilmiştir. Geçmiş birkaç yüzyılı bulan klon seleksiyonu yaklaşımı gelişen süreçte ülkelere göre temel yaklaşım olan belirli virüs hastalıkları başta olmak üzere sanitasyon ve genetik seleksiyon aşamalarından oluşmaktadır. Bunu yanı sıra yetiştirme tekniklerine uygunluk ve ürün kalitesi konularında dinamik bir yaklaşım vardır. Diğer taraftan birçok ülke uzun soluklu ve önemli maliyetleri olan seleksiyon çalışmalarına sektörün paydaşlarını da dahil etmektedir. Böylece çıktılarının sektöre yayılmasının hızlandırması sağlanmaktadır. Seleksiyonda ileri düzeye ulaşıldığında, başka bir ifade ile tüm bağ alanları seçilmiş klonlardan tesis edildiğinde karşılaşılan bir durum ise global iklim değişikliği gibi yeni durumlar için genetik çeşitliliğin kaybıdır. Genetik stokun korunma programları ile seleksiyon programlarının uyumlulaştırılmasına gereksinim duyulmaktadır. Bu kapsamda asma genom yapısında moleküler ıslah için tanımlanan bölgelerin seleksiyon çalışmalarının başlangıcında tanımlanmış kriterler bakımından öne çıkamayan materyalin korunmasına yönelik programların geliştirilmesine katkı sunması beklenmektedir.

CLONAL SELECTION METHOD APPROACHES IN VITICULTURE

ABSTRACT

Clonal selection in Viticulture is one of the first steps in the improvement of grape varieties and viticulture, which are industrially efficient, quality and sustainable in all grapevine producer countries. In this study, clonal selection approaches currently active in Portugal, Germany, Hungary and Spain and OIV's standard protocol for clone selection published in 2017 were evaluated. The approach of several hundred years old clonal selection consists of stages of sanitation and genetic selection, in particular of certain virus diseases, which is the main approach according to countries in the developing process. In addition to this, there is a dynamic approach to the quality of crops and the suitability of cultivation techniques. On the other hand, many countries include industry stakeholders in long-term and costly selection studies. Thus, the output of the output is accelerated. When reaching an advanced level in clearing, that is to say, when all the vineyards are established from selected clones, it is a loss of genetic diversity for new situations such as global climate change. There is a need for harmonization of genetic stock protection programs and selection programs. In this context, it is expected that the regions identified for molecular breeding in suspended genome construction will contribute to the development of programs for preserving material that cannot be distinguished in terms of the criteria defined at the beginning of the selection studies.

GİRİŞ

Klon terimi 1903 yılında Webber tarafından oluşturulmuştur. Etimolojik olarak Yunanca bir kelime olan "klon" dan gelmektedir. Klon kelimesi de klan kelimesinde türemiştir. 1910 yılından beri ıslahta genel olarak kabul edilmiştir [57]. The Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, Paris, France (O.I.V.) klonu kimliği kesin olarak

belirli, fenotipik özellikleri ve sağlık niteliğiyle seçilmiş bir asmanın vegetatif nesli olarak tanımlamaktadır [63]. Bahçe bitkileri klonları bir tek bireyden vegetatif olarak elde edilmekte ve klonal varyasyon sadece bunların mutasyonlarıyla ortaya çıkmaktadır.

Pratikte klon, çeşidin biyotip değişikliği olması durumunda tek bir ana omcanın neslidir [2]. Sartorius [51], Almanya'da klonların özel değerlerini fark eden ilk kişi olmuştur. Klon,

yeni bir mutasyon oluşmadığı sürece sabit kalır. Asma klonlarının stok değeri belirli bir süre için geçerlidir, koşullar yeni bir mutasyona neden olduğunda yeni bir seçim gerekmektedir [6]. Geçen 100 yılda teorik anlamda seçim anlayışı oldukça hızlı gelişmiştir. 1888 yılında Goethe tomurcukları, yeni bir bitkiye dönüşebilen, mutasyona duyarlı ve çoğaltılabilen bitki parçaları olarak tanımlanmıştır [5].

Sağlık ve klonal varyasyon, değişen çevre şartlarına karşı reaksiyon verme ve ıslah için üstün uygulamalar bakımından önemlidir. Sürdürülebilirlik ıslahçıları, benzerliği garanti altına almak ve üzümün tat özelliklerini korumak için orijinal seçime olabildiğince yakın bitki materyali kullanmak istemektedirler. ıslah ve sürdürülebilirlik için mutasyonlar ve onların önemlerinin çok dikkatli bir şekilde analiz edilmesi önem taşımaktadır. Klon seleksiyonu üzüm çeşitlerinin geliştirilmesi için kullanılan bir araçtır. Bu metodoloji çeşitler ve onların temizlik durumu içinde genetik çeşitliliği dikkate alır. Çeşitler içinde genetik çeşitlilik, onların poliklonal orijinleri ve genetik mutasyonun zamanla birikimi ile açıklanabilmektedir [45, 46, 55, 56, 60].

Klon seleksiyonu, üzüm üreticilerine ismine doğru, sağlıklı ve üzüm üretimi için kalite potansiyeli iyi olan asma klonlarının seçimi olup halen dünyanın bütün üzüm üretim bölgelerinde yürütülmektedir. Bu kavram arazide klonların tahmin edilmesi, onların agronomik ve enolojik performanslarının çalışılması, sağlık durumları ve çeşit tanımlanması süreçlerini içermektedir. Sağlıklı ve daha ilgi çekici nitelikteki klonlar mümkün olduğu kadar sürekliliği korumak için seçilir. Seçilmiş klonlar daha sonraki aşamada sertifika işlemleri ve üreticilere dağıtımlarının sağlanması amacıyla, kaliteli üzüm üretme kapasitesini belirlemek için homojen şartlarda dikilirler [30].

Bağcılıkta klon seleksiyonu, hem geleceğin bağ alanlarında mutasyon değişikliklerinin negatif etkilerini elemine etmenin yolunu göstermekte hem de virüs ve ilgili hastalıklarla enfekte olmuş bitkilerin ileri çoğaltılmasını önlemektedir [49]. Bu nedenle klon seleksiyonu genetik ve arilik seleksiyonu olmak üzere iki aşamalı bir süreçtir.

Arilik seleksiyonunda dikim materyalinin üretimi önceden yapılmalıdır. Bağcılıkta negatif toptan seleksiyon, pozitif toptan seleksiyon, tipe göre seleksiyon, teksele seleksiyon gibi çeşitli seleksiyon yöntemleri kullanılmaktadır. En iyi sonuçlar en iyi asmalardan tek tek bireysel seleksiyonla elde edilir [25].

Bu çalışmada farklı ülkelerde bağcılıkta aktif olarak kullanılan klon seleksiyonu metod yaklaşımları incelenerek Türkiye şartlarında konuya ilgi duyanlar için özetlenmiştir.

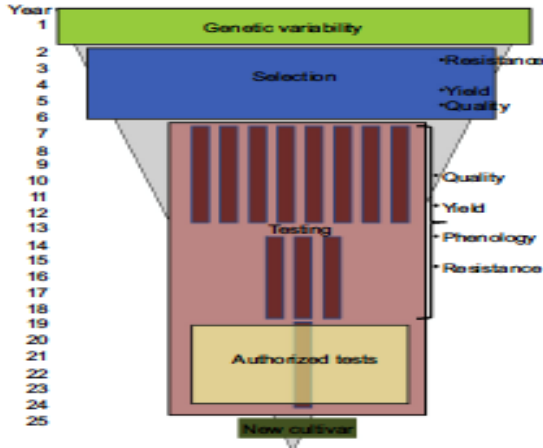
Genetik çeşitlilik

Biyoçeşitlilik çeşidin dünya üzerinde farklı alanlarda yaşama şansı verir. Genetik çeşitlilik üç farklı düzeylerde ölçülebilir. Ekosistem: Çevrenin fiziksel özellikleri ile birlikte bitki ve hayvan topluluklarını kapsar. Türler: Belirli bir bölge veya alandaki türlerinin çeşitliliğidir. Genetik: Aynı türe ait bireyler arasındaki farklılıktır. Bu bir tek popülasyon içindeki bireyler arasındaki genetik varyasyon kadar aynı türün farklı popülasyonları arasındaki farklılığı da içerir. Genetik çeşitliliğin kaynağı; genetik çeşitlilik mayoz ve rekombinasyon sürecinde crossing-over ile gerçekleşir. Asma vegetatif olarak çoğaltıldığından Crossing-over sürecinin yeni klonların ortaya çıkmasında etkisi söz konusu değildir. Mutasyon çevre etkileri (radyasyon gibi stres tetikleyicileri) veya DNA onarım mekanizmasındaki herhangi bir başarısızlıkla ortaya çıkmaktadır. Asma anaç ve üzüm çeşitlerinde klonal çeşitlilik sadece mutasyonla meydana gelmektedir. Mutasyonlar tüm lokus yâda genler gibi kalıtsal bilgiyi (DNA) değiştirirler. Mutasyonların klonlar üzerinde farklı etkileri olabilmektedir. Genomda kodlanmış ve kodlanmamış bölgeler vardır. Eğer mutasyon kodlanmamış bölgede olursa in efektiftir. Kodlanmış bölgede olursa kalite ve miktarı etkileyebilmektedir. Bitkide zamanla mutasyon birikimi olur.

Geleneksel asma ıslah teknikleri

İlk melezlemeden başlayıp yeni çeşidin ıslahına kadar olan tüm prosedür, geleneksel seleksiyon teknikleri uygulandığında yaklaşık 25–30 yıl sürer. Çoğu diğer tarımsal ürünle karşılaştırıldığında, tüm ıslah döngüsü belirgin şekilde daha uzun sürer. Asma, vegetatif olarak çoğaltıldığından, melez kombinasyondan elde

edilen her bir fide, muhtemel bir çeşit adayıdır. Gerçekte, genetik varyasyonu oluşturmak ve tespit edip belirlemek, yalnızca bir vegetasyon süresi içinde fidelerin büyütülmesini gerektirdiğinden çok kısa süreye ihtiyaç duyar. Yandaki ıslah faaliyetleri yalnızca önemli özelliklerin değerlendirilmesine odaklanmıştır.



Şekil 1. Zaman ölçeğinde asmanın ıslahının farklı adımları [10]

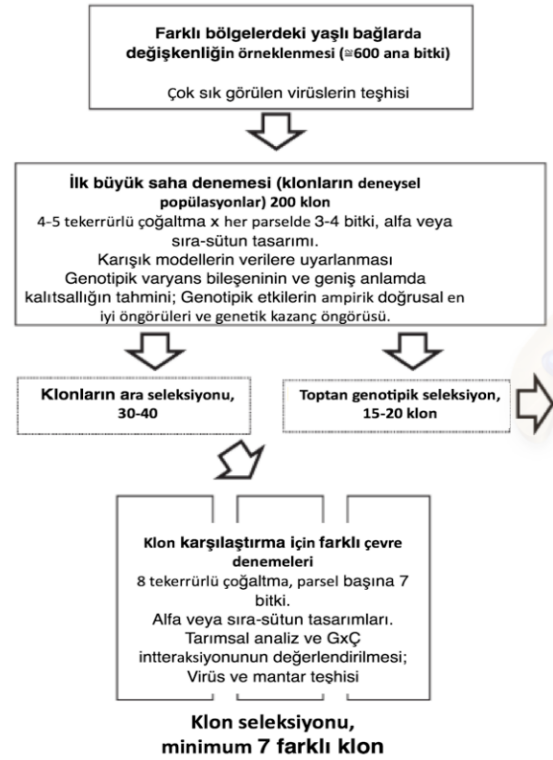
FARKLI ÜLKELERDEKİ KLON SELEKSİYONU YAKLAŞIMLARI

Portekiz'de Asma Klonlarının Toptan Seleksiyonu

Portekiz'de asmada klon seleksiyonunun metodolojisi Şekil 2'de verilmiştir. Bu seleksiyon metodu niceliksel genetik ilkelerine dayanır ve genetik kazanımların tahmin edilmesine izin verir. Üstün bir klon grubu seçildiğinde elde edilen genetik kazanım, seçilen klonların genotipik etkilerinin ampirik en iyi doğrusal öngörülerinin ortalamasıdır.

Klasik modeller uygulandığında, Bu eşitlik ile öngörülen genetik kazanç da tanımlanabilir. Genellikle şeker, asitlik ve antosiyaninler açısından kalitede kazançlar elde edilir, ancak bu, bu özelliklerdeki kazanç çeşit içi çeşitlilik daha düşük olması nedeniyle daha az olur. Toplamda, Portekiz'de toptan seleksiyonla yaklaşık 60 çeşit seçilmiş ve bu seçimler yaygın olarak çoğaltılmakta olup yeni plantasyonlar için kullanılmaktadır. Bu çeşitler arasında araştırmanın kalitesine, çeşidin genetik çeşitliliğine ve seçilen klonların oranına bağlı olarak tahmin edilen genetik

kazançlar %1.6 ila %91.4 arasında değişmektedir [36].



Şekil 2. Portekiz'de asmada klon seleksiyonunun metodolojisi [36]

Almanya'da Klon Seleksiyonu

Bağcılık ekolojisinin kuzey sınırında bulunan Almanya'da, nehir vadilerinde, Ren kolları kollarında (Örneğin Mosel, Main ve Neckar) mutedil bölgelerle ve yalnızca birkaç erken olgunlaşan çeşitle sınırlıdır. Uygun arazi kısıtı nedeniyle bağcılık ekim rotasyonu yapılmadığından toprağa dayalı zararlılar ve hastalıklar sorun oluşturmuş ve hâlâ bir sorundur. Ortaçağ'dan bu yana, manastırlar çoğu bölgede şarap yetiştirme merkezi olarak kurulmuşlar ve materyalin tipe uygun, virüs enfeksiyonlarından arındırılmış ve iyi performans gösteren materyalin seçim çalışmalarını yapmışlardır [3].

Çoğu manastır için şarap üretimi önemli bir gelir kaynağıdır. Bağ işçileri, buradan kendi veya komşu bağlarına seçilmiş kalemleri dağıtarak çevredeki köylerde yüksek verim sağlamışlardır. 1802/1803 tarihli kilise mülklerinin sekülerizasyonu, on dokuzuncu yüzyılın ikinci yarısında yeni zararlıların ve hastalıkların ortaya çıkması, bağcılıkta

azalmaya neden olmuş ve Almanya'daki çeşitli yerlerde modern asma yetiştiriciliği ve araştırmalarının başlangıcını oluşturmuştur. Virüs enfeksiyonlarından kaynaklanan düşük verim, klon seleksiyonu başlatmanın başlıca nedeni olmuştur. Klon seçimi için yapılan ilk faaliyetler, özel ıslahçı Gustav Adolf Froelich'in, verimliliği arttırmak için Silvaner üzerinde klonal seçimi başlattığı 1876'ya kadar uzanmaktadır. Mosel bölgesindeki 1763'ten 1787'ye kadar hektara ortalama verim sadece 3280 L iken 1963–1987'de 10,680 L'ye yükselmiştir [53].

On sekizinci ve on dokuzuncu yüzyılda ıslah süreklilik kazanmış, toptan seleksiyon yaygınlaşmıştır [29]. Froelich [16] tarafından 1886'da tanıtılan tek omca seçimi kavramı ve onun büyük başarısı birçok araştırma istasyonunda [4, 31, 54]; ayrıca özel şarap fabrikalarında [22] klon seleksiyonu faaliyetlerini sağlamıştır [48].

Virüs hastalıkları, özellikle fanleaf, soğuk Alman koşullarında asma performansı üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğu için görsel değerlendirme ve performansa dayalı klon seçimi iyi sonuçlar vermiştir. Bağcılığın azalmasında asıl etken olarak virüsler kabul edildiğinden görsel değerlendirme, 1970'lerden beri klon baş omcaların endekslemesi ve 1980'lerin ortalarında enzime bağlı immünoabsorbent analizi gibi serolojik yöntemlerle tamamlanmıştır. 1990'lı yılların başlarından itibaren tüm Alman klonları virüs testine tabi tutulmuş ve 2013'ten beri tüm ana bloklar Avrupa Birliği mevzuatına (Avrupa Birliği Konseyi 14.02.2002, 23.06.2005 Komisyon Direktifi)'ne göre yönetilmektedir. Bu kombine stratejinin başarılı olduğu kanıtlanmış ve 1950'lerin ortalarında pek çok çeşitten sadece klonal materyal mevcut olup bağlar neredeyse tamamen bunlardan tesis edilmiştir. 1 Ocak 2013'te Bundessortenamt'ta (Federal Çeşit Ofisi), 17 ıslahçının 130 tane çeşide ait 675 klonu tescil edildi. Nitekim "Aktionsgemeinschaft zur Erhaltung von Rebsorten e.V" birkaç klonal ıslahçıdan oluşmakla birlikte, ıslahçıların toplam sayısı çok daha fazladır. Bu 130 çeşidin 66'sı, sadece bir tek klon ile oldukça yeni tescil edilen çeşitlerdir. Kalan 38 çeşitten toplam 609 klon, sırasıyla Riesling, Pinot noir ve Müller-Thurgau gibi çeşitler sırasıyla 117, 74 ve 56 tescilli klona sahiplerdir. Bunlardan belirli bir

kısmı bitki sağlığı hatları olup hiçbir performans farkı göstermezler; bununla birlikte, örneğin, Pinot noir'da, klonlar arasındaki genetik çeşitlilik, moleküler düzeyde [26, 50] ve performans açısından gösterilebilir [43].

Bu durum, üreticilere, dik sürgün büyümesi, daha uzun tane sapı veya daha küçük tanelere bağlı olarak gevşek salkımlar, farklı Botrytis toleransı, titrasyon asitliği, antosiyaninler, tanenler ve lezzet gibi belirli özelliklere sahip geniş bir yelpazede farklı klonlar sunar. Amelografik olarak Pinot noir ile aynı, ancak 2 hafta önce olgunlaşan Pinot précoce noir sinonimi Frühburgunder çeşidi ile farklı olgunlaşma zamanları nedeniyle, Almanya'da Pinot noir'den belirgin olarak farklı kabul edilir ve kendi adını alır [48].

Böyle çok sayıda klon olduğu durumlarda, belirli bir amaç için doğru klonun belirlenmesi zordur. Bu nedenle, bazı ıslahçılar, klon adlarına, Klasik, Süper veya Karizma [22] gibi klonal karakterlerin açıklamaları veya belirli karakterler için özel sayılar kullanırlar. Örneğin, Geisenheim Üniversitesi uzun tane sapından dolayı gevşek salkımlı klon sayılarının başında 1– kullanmışlar; 20 ile başlayan klon sayıları, küçük tanelere sahip çeşitleri belirtmektedir [22, 52].

Geçmişte Riesling'teki genetik değişkenlik küçük kabul edilmiş olmakla birlikte, birçok farklı klon üzerinde yapılan çalışmalar, görünüş ve performanstaki farklılıkların (ör. verim, asitlik, Botrytis toleransı) yanı sıra genetik çeşitlilik [7] ve hatta morfoloji bakımından doğrulanmıştır [50].

Özellikle, Hochschule Geisenheim Üniversitesi eski bağlarda bulunan yeni bitki materyalini toplamakta ve muhafaza etmekte ve Riesling, Pinot noir, Pinot gris ve Pinot blanc aksesyonlarında genetik çeşitliliğin değerlendirilmesini yapmaktadır [52]. Birkaç yıl içinde bu çeşitlerin daha iyi karakterize edilmiş klonları Alman yetiştiricileri tarafından kullanılabilecek duruma gelecektir [48].

Mannini [32]'ye göre klon seleksiyonu, genetik iyileştirme için çok önemli bir araç olarak kabul edilir. Arındırmadan sonra klonların genel performanslarının düzeldiği birçok delille teyit edilmiştir. Genelde bitki vegetatif büyüme gücü her zaman artmakla birlikte diğer bütün parametreler virüslere

bağlı olarak modifiye olur. Sağlıklı omcalar aynı klonun GLRaV-3 ve GLRaV-1 ile bulaşık omcalarından daha yüksek fizyolojik aktivite göstermiştir. Üzüm kalitesi GLRaV-3'ten arındırıldığında herhangi bir verim artışı olmadan geliştirilmiş ve duysal değerlendirmelere göre şarap kalitesi de geliştirilmiştir. GLRaV-1 ortadan kaldırıldığında da verim, kalite parametrelerini olumsuz yönde etkilemeden, yükseltilmiştir. Diğer taraftan, GFLV yapay sanitasyonunun avantajları asma büyüme gücündeki dramatik artış nedeniyle daha tartışmalıdır. Bir çeşit içinde ortaya çıkan genetik değişkenliği korumak için, bir klon seleksiyonundaki sanitasyon yöntemi yaklaşımı sadece esas alınmaz, şiddetle tavsiye edilir. Klonal materyal kullanımının sağladığı avantajlar şu şekilde sıralanmıştır. Dikimlerde karışıklıkların sona erdirilmesi, daha az virüsle bulaşmış bağlar, bağlardan daha yüksek performans, kültürel uygulamalar ve hastalık kontrolünde daha iyi zamanlama, bağda daha yüksek üniformite, bağdaki tüm omcalarda birörnek olgunlaşma, daha yüksek kalite, daha düşük işgücü maliyetleridir (Şekil 3).

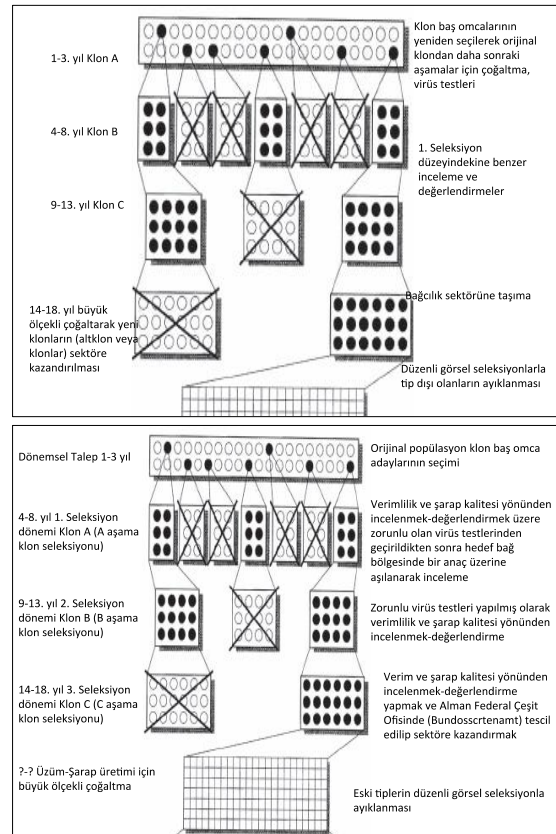
İklim değişikliği ışığında genetik çeşitliliğin korunması

Almanya'da klonal seleksiyon için iklim değişikliği ve genetik çeşitliliğin korunmasında iki önemli zorluk vardır. Birkaç yıl öncesine kadar, iklim değişikliğinin genel varsayımı, Orta Avrupa'da daha sıcak yazlar ve daha yumuşak kışlardır; bu durum, asma gibi Akdeniz bitkileri için harika bir haberdir. 2003 yazı bunun kanıtı olarak alınmaktaydı, ancak uzun soğuk kışlar ve yağışlı Eylül ayları, hava ve iklim varsayımlarının uygun olmadığını, iklimin değişken olacağını ve muhtemelen daha dalgalı hale geleceğini gösteriyor. Klon seleksiyonu en az 20 yıl sürüyor ve tüm tahminlere rağmen iklimin ne olacağı 20 yıl öncesinden bilinmiyor.

Sonuç olarak, birkaç seçeneği incelemek ve farklı klonlar dizileri geliştirmeye çalışmak zorundayız. Salkım çürüklüğüne yüksek bir tolerans, ortalama büyüme gücü, dik sürgün büyümesi, az sayıda koltuk sürgünü, ortalama verim seviyesi ve aroması iyi olan klonlar, bu yüzyılın ortasında iklimin ne olursa olsun yanlış bir yaklaşım olmayacaktır. 30-40 yıllık

zaman için doğru asit seviyesini tahmin etmek zordur.

Gelişmiş klonları seçmek için bir ön şart, genetik çeşitliliğin kullanılmasıdır. Melezleme ıslahı ile bir ıslahçı her zaman iki farklı çeşidi melezleyerek yeni varyasyon yaratabilir, ancak bu klonlar için imkânsızdır. Asmalar büyük oranda heterozigottur; bu nedenle, kendileme ile bir çeşit hiçbir zaman korunamaz ve geleneksel ıslah teknikleriyle bir çeşide tek bir gen katmak da mümkün değildir. Bu, ancak şu anda Almanya ve Kıta Avrupası'nda bir tabu olan gen aktarımı ile başarılabilir. Yeni özelliklere sahip bir klon geliştirmek için tek yol çeşit içinde doğal mutantlar bulmaktır.



Şekil 3. Almanya'da Geisenheim tarafından uygulanmakta olan klon seleksiyonu metodu [44]

Mutasyonlardan kaynaklanan bir bitkinin yeni özellikleri her zaman tesadüfi olarak ortaya çıkar ve öngörülebilir değildir. Bununla birlikte, Pinot noir, Traminer veya Riesling gibi daha eski çeşitlerde, küçük mutasyonlar yüzyıllar boyu birikmiş, vegetatif çoğaltımlarla korunmuş olup bu çeşitlilikler de genetik çeşitliliğe katkıda bulunurlar. Değişiklik ayırt

edici ise o zaman yeni çeşitler ortaya çıkmış olabilir (örneğin, Pinot noir dışındaki Pinot gris veya Pinot blanc tane rengi mutantlarıdır). Bu tür bir genetik materyal, yeni ve daha iyi klonların geliştirilmesi için klon seleksiyonu yapılmasını gerekli kılar. Uygun asmaların nerede bulunacağı sorusu ortaya çıkıyor. Normal bağlar bulunma şansı, özellikle Almanya'da oldukça küçüktür, çünkü 1950'lerin ortalarından beri bağlar neredeyse sadece klonlarla tesis edilmiş olduğundan farklı tipler/örnekler bulma şansı azdır. Daha iyi şans, toptan seleksiyon veya seleksiyon yapılmamış materyalle kurulan eski bağlardır.

Yakın tarihli bir Alman bağ kayıt defteri, klonal dikim materyalinin yaygın kullanımından çok önce, 1950'den önce ~500 ha dikimini listelemektedir. Kamu ve özel Alman klon ıslahçıları benzersiz genotipleri tanımlamak ve korumak için kalan bu bağları kullanıyorlar. Hochschule Geisenheim Üniversitesi şu ana kadar çoğu durumda farklı yerlerden alınsalar da 1000'den fazla Riesling ve 1000'den fazla farklı Pinot tipini germplazm koleksiyonlarına aktarmıştır [48].

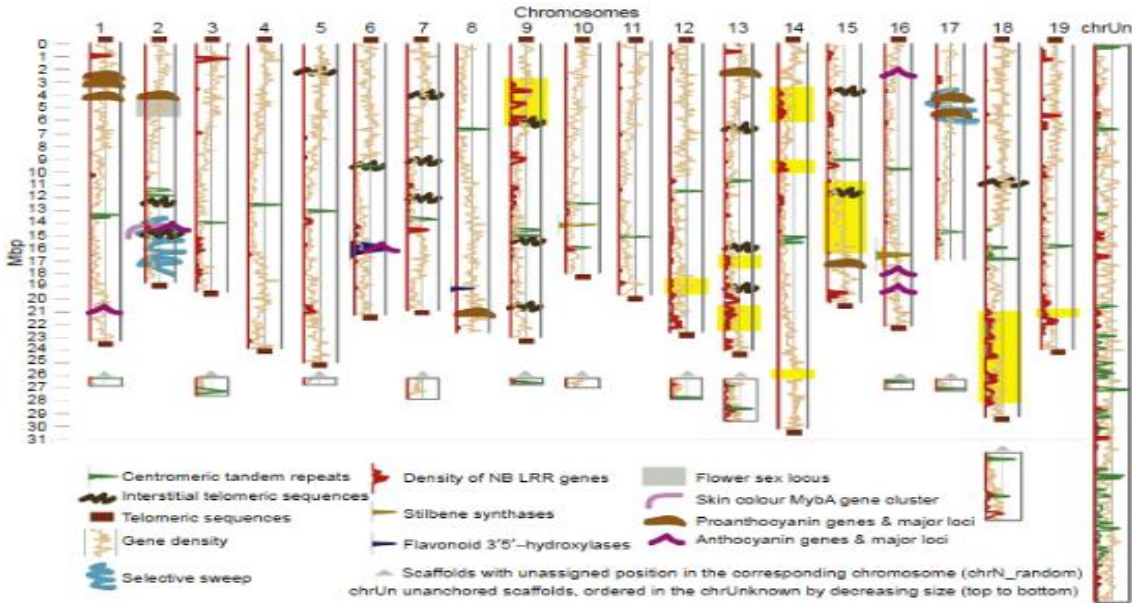
Beklenen gelişmeler

İşaret edildiği gibi, klonal seleksiyonu oldukça basittir: Sadece doğru genotipi bulup onu çoğaltmanız gerekir. Sorun, onu nasıl bulacağınızdır. Mosel Vadisi'nde çakıllı, sık topraklar üzerinde, dik yamaçlarda kendi

kökleri üzerinde, yaşlı bir bağda bulunan bir Riesling asması, Geisenheim ıslah bölümündeki derin kumlu-tınlı bir alanda aşılınmış genç bir Riesling'den kesinlikle farklı görünür. Şimdilik, bu sadece bu yaşlı asmanın çelikleri virüs testi yapılmış, aşılınmış, bir germplazm koleksiyonunda dikilmiş ve diğer aksesyonlar ve standart klonlarla karşılaştırıldığında belirginleşir.

Klonal özelliklerinin fenotiplenmesi zor, güvenilir değil ve zaman alıcıdır. Özelliklerin genetik markırlarla ilişkilendirilmesi bir kısa yol sağlayabilir. Bununla birlikte, bu belirteçler, yeni tanımlanan genotipleri analiz etmek için henüz mevcut değildir. Böyle bir araç sadece ıslah alanlarında daha uygun klon adaylarına odaklanmaya yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda virüsle bulaşık klonlarda ilginç genlerin kullanılması için de kullanılabilir. Şimdiye kadar, fenotipik değerlendirme sistemlerinde virüsle bulaşık asmalar daha fazla değerlendirilemez çünkü virüs ile genotipin etkisi ayırt edilemiyor. Bu nedenle, genellikle atılırlar.

Moleküler genetikteki son gelişmeler ve asma genleri üzerinde artan bilgiler, birkaç yıl içinde kullanıma girmesi beklenen genetik belirteçlere dayalı bir sistem, Almanya'da son kalan klonal olmayan bağlarda değerli klon adaylarının belirlenmesine yardımcı olması mümkün olacaktır [48].



Şekil 4. Asma genomu yapısı ve moleküler ıslah için ilgili bölgeler [9]

Yapısal özelliklerin tahmini, PN40024 referans serisinin 12X genomu dizilimine dayanır. Kromozom uzunluğu milyon baz çiftleriyle (Mbp) gösterilir. Telomerik diziler, Blast tarafından eptameri [TTTAGGG]n kullanarak araştırılmıştır. Terminal telomerik sekanslar kromozomların sonunda kahverengi kutularla gösterilmiş ve ITS'ler kahverengi dalgalı çizgilerle gösterilmiştir. Sentromerik tekrarlamaların yerleri, 107-nt monomer AGTACCGAAAAAGGGTCTGAATCAGTG TGAGTACCGAAAAATGGTAGAATCCG GGCGAGTACCGGAAAAAGGTAGAATC CGTGCGAGTATCGAAAACTGTCCGGG CG kullanılarak Blast tarafından tahmin edildi ve yeşil alanla gösterilmiştir. *Vitis vinifera* kültür çeşitlerinde seçici tarama yapan bölgeler Myles ve ark. [39]'e göre camgöbeği rengiyle gösterilmiştir. 100 kbp'lik bitişik pencerelerde, genlerin yoğunluğu (şeftali renkli alan, V1 gen tahmininin 29.970 genine göre, 100 kbp başına 0–20 gen ölçeği) ve NB–LRR genleri, sahte genler ve homolog gen fragmanları (kırmızı alan, 100 kbp için ölçek 0–20 gen) ile gösterilmiştir. Sarı renkli alanlar, NB–LRR gen kümeleri arasında tanımlanan hastalık ve zararlılara karşı dirençli haplotipli majör lokusları belirtir (kr9 üzerinde DM–Rpv10; kr12 üzerinde PM–Run1/Rpv1; kr13 üzerinde PM–Ren1 ve filoksera–Rdv1; kr14 üzerinde DM–Rpv8, DM–Rpv12, PM–Ren5 ve Xylella fastidiosa–PdR1a kr15 üzerinde PM–Ren3 Agrobacterium–Rcg1; kr18 üzerinde DM–Rpv2, DM–Rpv3, PM–Run2 ve PM–Ren4; kr19'da Xiphinema indeksi–XiR1). Bildirilen proantosiyenin genleri, kr1 üzerinde LAR1, MybC2–L1 ve Trans–like; kr2 üzerinde LDOX; kr8 üzerinde Myb5a; kr13 üzerinde CHI; kr15 üzerinde MybPA1; kr17 üzerinde LAR2 ve COBRA–like [8, 23]. Bildirilen antosiyenin genleri, kr1 üzerinde metilasyon seviyesi ile ilişkili OMT gene kümesi, kr2 üzerinde MybA gen kümesi, kr6 üzerinde F3'5'H gen kümesi, bir cis–eQTL ile ilişkili UFGT geni, asilatlı antosiyanidinlerin taşınması ile bağlantılı antoMATE gen kümesi ve kr16 üzerinde glukozile antosiyanidinlerin taşınması ile bağlantılı ABCC1 ATP'ye bağlanan kaset proteini. Çiçek cinsiyet lokusu, Fechter ve ark. [13]. Flavonoid 3',5'–hidroksilaz ve stilben sintaz gen kümelerinin yerleri sırasıyla Falginella ve ark. [11] ve

Vannozzi ve ark. [61] tarafından belirtilmiştir (Şekil 4), [9].

Macaristan'da Klon Seleksiyonu

Macaristan'da üç seleksiyon yöntemi kullanılmıştır. Toptan, klonal tip ve teksel (klon) seleksiyonlar. Asmalar vegetatif çoğaltılabildiği için, seçilen klonlar vegetatif çoğaltma ile korunabilir. Goethe (1887), tomurcuğu çoğaltmak için uygun en küçük çoğaltılabilir bitki parçası olarak kabul etmiştir. Yüz yıl sonra, 1989 yılında Bouquet, *in vitro*'da bir bitkiye dönüştürülebilir hücrenin somaklon olabileceğini ancak seleksiyonla bir asmanın polimorfizminin kısıtlanabilir ve korunabilir olduğunu bildirmiştir [19].

1. toptan seleksiyonu

İslahçılar bağlarda yıllardır asma stoklarının üretimini incelemektedir. Üretim materyali tümüyle pozitif omcalardan alınır. Bu yöntem yeterince hızlı olup seçimde önemli ilerleme kaydedilebilir. Budapeşte Asma ve Meyve Seleksiyon Merkezi Başkanı Pál Kozma, 1957'de önemli şaraplık üzüm çeşitlerinde toptan seleksiyonu uyguladı. Bunlar ülke genelinde yaygınlaştı. Seçilen asma stoklarının çoğaltma materyalleri, İkinci Beş Yıllık Plan sırasında büyük ölçekli bağ tesislerinde kullanılmıştır [19].

2. klon tipi seleksiyonu

Bu yöntem, asma stoklarının bir veya daha fazla önemli özelliğe (ör. Çiçek tipi) göre gruplanmasını içerir. Bu gruplar daha sonra birlikte çoğaltılırlar. Bu yöntem uygulandığında, seçilmeyen temel stok materyali için ileri seleksiyon esastır. Klon tipi seleksiyonu, toptan seleksiyondan daha etkilidir. Furmint ve Kadarka çeşitleri üzerinde çiçek biyolojisi temelinde bu yöntemle çalışmıştır [19].

3. teksel klon seleksiyonu

Macarlar başarıyla uyguladıkları yöntemi, Almanya'dan uyarlamışlardır. Başlangıçta dört basamaktan oluşan bir yöntem benimsenmiş olmakla birlikte daha sonra adım sayısı üçe indirilmiş olup bireysel seleksiyon hâlâ çok popülerdir. Bağcılık ve Enoloji Araştırma Enstitüsünde, Araştırma İstasyonlarında (Badacsony, Eger, Kecskemét, Pécs, Tarcál) ve

Keszthely'deki Tarım Üniversitesi'nde, genetik ve bitki sağlığı seleksiyonlarıyla paralel olarak kullanılmaktadır. Patojen içermeyen ana stoklarından üretilen patojen içermeyen ana stoklar, seçilmiş klonların çoğaltım materyalinden gelir. Asmanın *Agrobacterium* ve virüs testleri Kecskemét'deki Bağcılık ve Enoloji Araştırma Enstitüsü'nde yürütülür [19].

İspanya'da Klon Seleksiyonu

Klon seleksiyonunun gerekçesi

Şaraplık üzüm çeşitleri için klonal seleksiyon programları geliştirilmesine yönelik çeşitli nedenler olup ıslah programları olmayan fakat ana sebep mevcut şarap koruma figürleriyle ilgilidir. Menşei Korunmalı Tanımlamalar (DOP) ve Korunan Coğrafi İşaretler (IGP), İspanya'da farklı bir kalitenin tanınması için kullanılan sistemleri oluşturmaktadır. İspanya'da üretilen kaliteli şarapların çoğu 90 DOP'dan (Fransız VQPRD'ye eşdeğer) veya 41 IGP'den birinde bulunur.

Her iki koruma şekli de yönetmelikleri içinde belirli bir DOP veya IGP'de yetki verilen çeşitlerin kapsamlı bir listesini içerir. Bu yetkili çeşitlerin herhangi birindeki klonların seçimi, koruma figürü tarafından hemen kabul gören bir bitki materyali oluşturur. Bununla birlikte, yeni ıslah edilen çeşitler için gerekli olan DOP düzenleme kurullarının yanı sıra tüketicilerin kaydetme ve kabul etme yönünde izlemesini gerektiren uzun bir idari yol burada söz konusu değildir.

Asma ağacı bir bitkidir ve istikrarlı ve kaliteli bir bitki olana kadar dikimden itibaren birkaç yıl alır. Bu nedenle, hatalar çok masraflıdır ve üzüm üreticileri birçok açıdan muhafazakârdır; bunlar arasına kullanılan çeşitler ve anaçlar da dahildir. Sorun, üzüm üreticilerine çoğaltılacak ve dağıtılacak sağlıklı bitkiler olmadığı veya en azından sağlığın garantisi olmadığı yönündeydi (ve halen de pek çok çeşit için). Resmi klon sertifikasyon sistemi, bazı yaygın hastalıklar, özellikle de virüsler için böyle teminatlar sunmaktadır [24].

Klon seçimi süreci ve hedefleri

Klon kelimesi, sürgün veya dal anlamına gelen Yunanca klon teriminden kaynaklanır ve 696

tek bir kökenden eşeysiz veya bitkisel çoğaltıma atıfta bulunur. Bağcılıkta, kimliği tartışmasız, fenotipik özellikleri ve sağlık durumu için seçilen bir asmanın vegetatif soyu anlamına gelir. Almanya'da bağcılıkta klon seleksiyonu on dokuzuncu yüzyılda başlamış ve yirminci yüzyılın ikinci yarısında Fransa veya İtalya gibi diğer Avrupa ülkelerinde de devam etmiştir. İspanya'da, 1970'lerde La Rioja ve Katalonya bölgelerinde başlamıştır [24].

Başlangıçta, klon seleksiyonun temel amacı, sağlıklı bitkiler elde etmek ve verimi artırmaktır. Günümüzde, kalite, bazı durumlarda verimi azaltacak şekilde amaca uygun bir hedef olarak düşünülmektedir. Buna ek olarak, renk varyantları veya kaliteyi önemli derecede etkileyen diğer varyant çeşitler, DOCa Rioja'da yakın zamanda tescillenmiş ve kabul edilmiş Tempranillo Blanco gibi yeni çeşitlerin üretilmesine yol açmıştır [35].

Çeşit içi değişkenliğe, noktasal mutasyonlar, büyük kayıplar, hatalı rekombinasyon veya mikro-satellit serilerinde tekrarlanan mikrosatellitlerin sayısındaki farklılaşmaları da içeren herhangi bir hücre bölünmesinde çok düşük bir hızda ortaya çıkan somatik mutasyonlar neden olur [41].

Birçok şaraplık çeşidin yüzyıllar boyu çoğaltıldığı göz önüne alındığında, bu tür nadir mutasyonların birikmesi olasılığı artar. Bu nedenle, günümüzdeki birçok çeşit, çok benzer bitki popülasyonları olarak kabul edilebilir, ancak DNA dizisinin farklı bölgelerinde ve farklı kimerik hallerde mutasyonları taşırlar [59]. Klon seleksiyonu, üzüm üreticileri için yararlı karakteristik özelliklere sahip bu bitkileri seçerek bu çeşitlemeden yararlanmaya çalışır.

Klonları kullanmanın en büyük yararı, belirli bir çeşit içerisindeki belirli bir ortama en iyi adapte olmuş (toprak, iklim) genotipi seçmek ve belirli bir şarap tipi üretmektir. Ayrıca, bir bağ içindeki özdeş genotiplerin aynı davranış ve büyüme evreleri vardır, bu da yönetim ve hasat işlemlerini kolaylaştırır [15].

Öte yandan, genetik çeşitliliğin muhtemel azalması, birkaç klonun kullanılması ile engellenebilir, böylece bağın tekdüzeliği de azaltılır. Klon seleksiyon süreci bağlarda omcaların incelenmesi ile başlar. Normal olarak, mutasyonları taşımak hususunda daha büyük bir olasılığa sahip olduklarında

seleksiyon için 30 yıldan yaşlı bağlar seçilir. Seçilen omcalar üzerinde, klonal ön seleksiyon veya toptan seleksiyon olarak bilinen bir süreçte yerinde en az üç yıl çalışılır. Bu aşamada, tarımsal performans, sıhhi durum ve çeşidin kimliği ayrı ayrı değerlendirilir. Ziraî karakterizasyon, omca başına verim, şeker içeriği ve budama ağırlığı (büyüme gücü) yanı sıra, seleksiyon amacına uygun olarak çok daha fazla (asidite, şeker/asit oranı, fenoloji vb.) konuları içerir.

Sıhhi durum bu safhada genelde, bağların görsel olarak incelenmesi ve enzim bağlı immüno-sorbent analiz (ELISA) yoluyla çeşitli virüslerin varlığı ile değerlendirilir. Bu test birinde pozitif bulunursa genellikle kesin olarak kabul edilir, ancak sonuç negatif olduğunda bir enfeksiyonu dışlamaz. Avrupa Birliği, asma çoğaltma materyali pazarlaması ile ilgili 2005/43/EC sayılı Direktifi her bir üye ülkeden Asma yelpaze yaprak-Grapevine fanleaf virüsü (GFLV), Arabis mosaic virüsü (ArMV) ve Asma Yaprak kıvrıcıklığı-Grapevine leafroll ile ilişkili virüsün (GLRaV-1 ve GLRaV-3) asma fidanlarında bulunmadığını garantiye almasını ister. Çeşit kimliği, ampelografi (morfolojik) tanımlamaları ile kontrol edilebilir, ancak şu anda yaygın olarak mikrosatellitler esas olmak üzere moleküler markörler kullanılarak kontrol edilmektedir.

İlk değerlendirmeden sonra, görünüşte sağlıklı ana bitkiler klon seleksiyonunun amacına göre seçilir. Bu ana (baş) omcalar hem karşılaştırmalı bir parselde hem de bireysel kaplarda çoğaltılır ve izole edilir ve yeni enfeksiyonlardan korunur. Klon karşılaştırma parseline dikilen asmalar tam verime geçtikten itibaren (2 yâda 3 yıl sonra) normalde en az 3 yıl veya daha fazla tüm karakteriyle incelenir. Ayrıca, bu ana bitkilerden alınan materyal, sıhhi statü yönünden değerlendirilmek üzere ulusal referans merkezine gönderilir.

İspanya'da, referans merkezi, immünoassay, DNA tabanlı ve biyolojik indeksleme teknikleri kullanılarak virüs testlerini yürüten Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA)'dır. Teşhisin resmî sonuçlarının alınması 3 yıl alır. Tam karakterizasyon, amaçlara bağlı olarak birçok özellik içerebilir ve şaraplık çeşitler için bir uzmanlar paneli tarafından oenolojik

karakterizasyon ve duyu analizi gerektirir [24].

Yıllarca büyük miktarda veri toplanır ve önemli sonuçlar elde etmek için bu verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi gerekir. Normalde, farklı özelliklere sahip birkaç klon seçilir ve sertifikalandırma için gönderilir. Sertifikasyon sürecinden sorumlu makamlar, klonların kalitelerini incelemeyebilir, ancak yalnızca varyetenin kimliğini ve sağlık durumunu ağırlıklı olarak yukarıda listelenen virüslerin mevcudiyetini, incelememektedirler (Şekil 5).

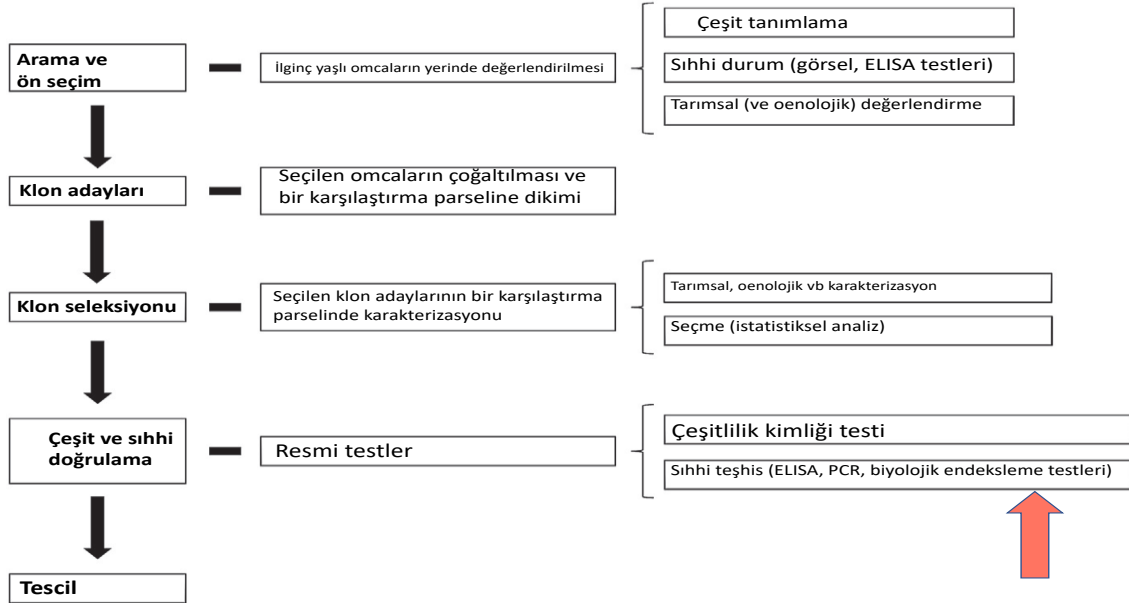
Zorunlu olmasa da IMIDA'da başka virüslerin mevcudiyeti de kontrol edilir: Grapevine leafroll ile ilişkili virüs (GLRaV-2, GLRaV-4 ve GLRaV-6), Rugose Wood kompleksi (RW) ve Grapevine fleck virüsü (GFkV, anaçlar için zorunludur). Sertifikasyon işlemi tamamlandığında, sertifikalı bitkiler yetkili fidanlıklarda satılabilir. Bu bitkiler, ana bitkilerden uygun bir biçimde korunan (izole edilmiş kaplarda) baz materyalden oluşur ve varyetenin kimliği ve resmi listedeki virüsleri taşımadığı garanti edilir. Sertifikalı bitkiler, standartlardan ayırt etmek için mavi bir etiket taşırlar [24].

İspanya'da klon seleksiyonu programları

İspanya'da klon seleksiyonu ağırlıklı olarak bölgesel düzeyde kamu kurumları tarafından gerçekleştirilmiş olmakla birlikte istisnai olarak özel fidanlıklar olan Viveros Provedo ve Agromillora-Vivai Cooperativi Rauscedo (VCR), Şarapçı Bodegas Roda veya daha yakın zamanlarda özel fidanlık Vitis Navarra istasyonlarınca da gerçekleştirilmiştir. İspanya'da ilk klon seleksiyonu programı 1976 yılında La Rioja'nın ana kırmızı şaraplık çeşidi olan Tempranillo'nun klonal seçimi programına başlayan Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico Agroalimentario (CIDA) vasıtasıyla CA La Rioja bölgesel hükümeti tarafından başlatılmıştır [17]. Bu program, 1990 yılında sekiz klonun sertifikalandırılmasını sağlamıştır; bunlardan bazıları İspanya'da en çok yetiştirilenler arasındadır. Aynı zamanda, başka bir kamu enstitüsü INCAVI (Katalonya), klon seleksiyonu programlarını başlatmış ve bu programlarla 60'tan fazla sertifikalı klon elde edilmiştir [24].

1980’lerde, Andalusia (IFAPA Centro Rancho de la Merced), Galicia (EVEGA, MBG-CSIC), Navarre (EVENA), Valencia (UPV) ve Madrid (IMIDRA) gibi diğer CA’lar klon seleksiyonu programlarına başlamış ve bu Castile ve Leon (ITACYL), Bask Bölgesi (EFZ), Aragon (CTA), Extremadura (SIDT) ve Viveros Provedo, Agromillora-VCR ve Bodegas Roda gibi özel şirketler tarafından

1990’lı yıllarda da devam etmiştir. 2000’li yıllarda Asturias CA’ları (SERIDA), Balear Adaları (UIB) ve Castile-La Mancha (IVICAM) ve fidancı Vitis Navarra klon seleksiyonu programlarını başlatmıştır. Buna ek olarak, 1978 ve 1987 yılları arasında IMIDA (Murcia)’da geleneksel ana sofralık üzüm çeşitlerinin klonal ve sıhhi seleksiyonları yapılmıştır.



Şekil 5. İspanya’da klon seleksiyonu süreci planı [24]

Seleksiyon programı geliştiricisi seleksiyona tabi çeşitlerin durumuna bağlı olarak seleksiyon programında değişikliğe gider. CA hükümetlerine mensup kamu kurumları normalde yerel ve küçük ölçekli çeşitlere (bazen yok olma tehlikesiyle karşı karşıyadır) veya bölgesel öneme sahip çeşitlere ancak bazı durumlarda diğer bölgelerle de ilgili olabilen çeşitlere odaklanmıştır. Özel şirketler, yaygın olarak dikilen çeşitlere veya bu çeşitlere belirli bir ticari ilgi ile odaklanmaktadır. Seleksiyon kriterleri, İspanya’da klonal seçim programının geliştirilmesi için sınırlı bir süre içinde geliştirilmiştir. Başlangıçta, seleksiyon amacı, sağlıklı klonları (ana ölçüt) iyi ve tutarlı bir verime sahip olarak elde etmektir. Her iki kriter halen çok önemlidir, ancak diğerleri de önem kazanmıştır.

Hâlihazırda klonal seleksiyonunda çalışan en aktif kuruluşlar ve şirketler arasında yapılan bir ankette seçim kriterlerini tanımlamak için farklı tanımlayıcılar kullanılmıştır. Devam eden seleksiyonlar sırasında muhtemel alkol

(şeker içeriği) ve titrasyon asitliği en genelleştirilmiş ölçütler arasındadır.

Yüksek asitlik düzeyini korumak, sıcak ikliminden dolayı İspanya’nın birçok bölgesinde özel bir sorundur. Kırmızı çeşitler için renk veya beyaz olanlar için aroma gibi diğer kriterler, tipe özgüdür. Tekrarlamak gerekirse, İspanyol ikliminde yüksek bir fenolik içeriği veya birincil aromaları muhafaza etmeyi keşif amaçlanmaktadır. Buna ek olarak, düşük salkım yoğunluğu ve küçük tane boyu, üniform bir olgunlaşma ve sağlıklı, yüksek kaliteli bir hasat elde etmek seçici kriterlerdir. Silkme gibi problemlere sahip çeşitlerde (örneğin, Garnacha Tinta, Merlot) yüksek meyve bağlama gibi çeşitli özel ölçütler de vardır. Ayrıca, Botrytis enfeksiyonuna direnç (aynı zamanda salkım yoğunluğundan etkilenir) bazı klon seleksiyonu programları için kullanılan bir kriterdir.

İspanya’da bazıları tamamlanmış, bazıları da finansman zorlukları nedeniyle iptal edildiğinden halen aktif birkaç klon

seleksiyonu programı vardır. Şu anda, Extremadura ve Valencia'nın daha önce belgelendirilmiş materyaller elde edildiğinden, Andalusya, Aragon, Asturias, Balear Adaları, Bask Bölgesi, Castile ve Leon, Katalonya, Galiçya, La Rioja, Madrid, Murcia ve Navarre'deki kamu kurumları tarafından seleksiyon programları geliştirilmektedir. Şu anda, Kanarya Adaları, Cantabria ya da Castile-La Mancha'da herhangi bir klonal seleksiyon programı geliştirilememektedir. Ayrıca, bazı programlar bazı özel şirketler Agromillora-VCR, Bodegas Roda, Vitis Navarra ve Viveros Provedo tarafından geliştirilmektedir. Halen, klon seleksiyonu altında en az 64 çeşit olup, bunların çoğu (50) sadece bir seleksiyon programına dahil edilmiştir. Diğer taraftan Garnacha (beyaz ve kırmızı), Tempranillo ve Airén üç veya daha fazla seleksiyon programında yer alırken Albariño, Bobal, Cabernet Sauvignon, Godello, Graciano, Merenzao, Merlot, Moscatel de Grano Menudo, Viura ve Xarello iki farklı programla seçilmişlerdir.

Birçok seleksiyon programından amaç, birkaç seçim kriteri için çeşitli değişkenlik gösteren birkaç klon elde etmektir. Bu, üzüm üreticisine, bağ alanına daha iyi uyan tek bir klon veya tamamlayıcı özellikleri olan birkaç klonu seçme imkânı sunar. Bu bağlamda, Bodegas Roda, Tempranillo'da sertifikalı klonlar elde etmeye odaklanmayan, ancak bir çeşit şarap üretmek üzere uyarlanmış bir grup klonu (Familia Roda 107 olarak anılacaktır) bir seleksiyon gerçekleştirmiştir. Verilerine göre, bu klon ailesinin şimdiye kadar 400.000'den fazla asma fidanı dağıtılmıştır [24].

İspanya Castile ve Leon'da geliştirilen klonal seleksiyon programları

Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACYL), İspanya'da halka açık klon seleksiyonu programlarını örnekleyebilecek iki klon seleksiyonu programı geliştirmiştir. İlk program 1990 yılında başlatılmıştır [21] ve bazıları diğer bölgelerde, hatta ulusal düzeyde bile önemli olsa da bölgede yetiştirilen ana çeşitler üzerinde durulmuştur: Albillo Mayor, Albillo Real ve Verdejo (beyaz taneli) ve Garnacha Tinta, Juan García, Mencía, Prieto Picudo ve Tempranillo (siyah taneli).

Bu seseleksiyonların amacı, iyi bir verim, alkol derecesi, asitlik ve kırmızı çeşitlerde

yüksek fenol içeriği (TPI, Total Polyphenol Index) olan klonlar elde etmektir. Birinci aşamada pek çok parsel öngörülmüş ve başlangıçta her çeşitten 41 (9 parselden Albillo Real) ve 340 asma (38 parselden, Tempranillo) arasından seçilmiştir. 3–5 yıldan uzun süre, bu asmalar yerinde incelenmiş, başta hijyenik durum ve ilk agronomik ve oenolojik karakterizasyon tespitleri yapılmıştır.

İkinci aşamada, orijinal parsellerinde daha iyi karakteristik gösteren virüssüz asmalar (klon adayları), Valladolid ilindeki karşılaştırma parseline 1993 yılında çoğaltılarak dikilmiştir. Her bir potansiyel klon için, bireysel mikroviniifikasyonların yapılmasını sağlamak için birkaç omca dikilmiştir. Albillo Mayor'un 15, Albillo Real'in 15, Garnacha Tinta'nın 30, Juan García'nın 38, Mencía'nın 30, Prieto Picudo'nun 37, Tempranillo'nun 90 ve Verdejo'nun 45 olmak üzere klon adaylarının sayıları farklıdır. Böylece sekiz çeşitten toplam 300 klon adayı daha ileri düzeyde değerlendirilmiştir. 4 yıl sonra, bitkiler yeterli statüyü kazandıktan sonra, potansiyel klonların en az 5 yıl boyunca hem agronomik hem de ekolojik olarak karakterleri tespit edilmiştir.

Değerlendirilen özellikler bitkisel gelişim, verim davranışı ve oenolojik ve organoleptik niteliklerdir. Bu özellikler sürgün sayısı, budama ağırlığı, salkım sayısı ve ağırlığı, şiranın analitik kompozisyonu ve şarap tadımı gibi farklı parametreler kullanılarak değerlendirilmiştir. Her bir potansiyel klon, bu çeşitlilik içinde klon adaylarıyla kıyaslanarak değerlendirilir ve nihai değerlendirme üç alanı oransal olarak agronomik %30, oenolojik %35 ve organoleptik %35 düzeyindedir.

Bu nedenle sekiz çeşitten 41 klon, sağlık durumu ve değerlendirilen özelliklerinden dolayı sertifikasyon için uygun görülmüştür [47]. Bu sertifikalı klonlara, Castile ve Leon (CL) kısaltmasıyla başlayan numaralar verilmiştir. Albillo Mayor: CL7, CL17, CL30; Albillo Real: CL35, CL207; Garnacha Tinta: CL52, CL53, CL55, CL288, CL294; Juan García: CL12, CL21, CL52; Mencía: CL51, CL79, CL94; Prieto Picudo: CL9, CL31, CL58, CL110, CL116; Tempranillo: CL16, CL32, CL98, CL117, CL179, CL242, CL261, CL271, CL280, CL292, CL306, CL311, CL326; Verdejo: CL4, CL6, CL21, CL34, CL47, CL77, CL101.

Klon baş omcaları bireysel kaplar içine dikilmiş ve sağlık durumlarını garanti altına almak için bir yedek malzeme olarak ITACYL tesislerinde tutuldu. ITACYL ayrıca üzüm üreticilerine sertifika materyali üreterek satan fidanlıklara çelik sağlamak üzere ana omcalarından bitkiler içeren bir alana sahiptir. 2000 yılında bu klonlar, üzüm üreticileri için sertifikalı bitkiler üretmek için fidanlıklar arasında dağıtılmaya başlanmıştır. ITACYL’de yapılan bu ilk klon seleksiyonu programı bağcılık sektörü üzerinde önemli etkilere sahiptir. Örneğin, Tempranillo’nun CL306 klonu şu anda Kuzey İspanya’da en çok kullanılanlardan biridir. Verdejo’da, halihazırda dikilen asmaların yaklaşık %80’i sertifikalı bir materyal olduğu için, CL101, CL6, CL77 ve CL21 klonlarının baskınlığı olmakla birlikte belirli bir klonun bir üzüm üreticisi tarafından nihai olarak seçilmesi, klon özellikleri ve dikilecek alanın yerel toprak ve iklim koşullarına bağlı olduğu söylenebilir.

2002 yılından beri ITACYL tarafından geliştirilen ikinci klon seleksiyonu programı, Castile ve Leon bölgesinde daha az yetiştirilen çeşitlere odaklanmıştır: Godello, Malvasía Castellana (sinonimi Doña Blanca), Moscatel de Grano Menudo, Puesta en Cruz ve Verdejo Serrano (beyaz taneli); Garnacha Roja ve Verdejo Colorado (kırmızı taneli); Bastardillo Chico (e sinonimi Merenzao), Bruñal, Estaladiña (sinonimi Pan y Carne), Gajo Arroba, Mandón, Negro Sauri (sinonimi Merenzao), Prieto Picudo Oval, Rufete ve Tinto Jeromo (siyah taneli).

Seçilen çeşitlerin bir kısmı yok olma riski altında olması nedeniyle bu proje aynı zamanda klon seleksiyonu ve bir kurtarma programıdır. Puesta en Cruz, Verdejo Serrano, Verdejo Colorado, Estaladiña, Gajo Arroba, Prieto Picudo Oval ve Tinto Jeromo bu durumdadır. Kullanılan metot ilk programa benzer, ancak her çeşit için bulunan bağ ve bitki sayısı çok daha azdır. Bu nedenle, bitkiler için araştırma daha büyük bir gayret gerektirir ancak klon adaylarının seçimi daha kolay olmuştur.

Seçilen klon adaylarının sayısı şöyledir: Godello’da 3, Malvasía Castellana’da 3, Moscatel de Grano Menudo’da 3, Puesta en Cruz’da 6, Verdejo Serrano’da 54’ü; Garnacha Roja’da 18, Verdejo Colorado’da 3, Bastardillo Chico’da 9, Bruñal’da 12,

Estaladiña’da 3, Gajo Arroba’da 9, Mandón’da 9, Zenci Sauri’de 15, Prieto Picudo Oval’de 16, Rufete’de 51 ve Tinto Jeromo’da 9.

Bu klon adayları çoğaltılmış ve orijinal dikim bölgelerine göre farklı yerlerdeki karşılaştırma parsellerine dikilmiştir. Farklı çeşitlerin dikimi aynı yılda yapılmadığından seleksiyon programındaki ilerleme her biri için aynı değildir. Bu nedenle, Rufete, Prieto Picudo Oval ve Negro Sauri, seleksiyon programı en ilerlemiş çeşitler olup klon adaylarının karakterizasyon verileri belirlenmiştir. Bu çeşitlerin ilk sertifikalı klonlarının 2016 yılına yetişmesine çalışılmaktadır. Estaladiña (2013 yılında klon adaları dikilmiştir), Garnacha Roja ve Verdejo Serrano (2012’de dikilmiştir) çeşitlerinden ilk sertifikalı klonların 2020 yılına yetişmesi bekleniyor [24].

Genetik erozyon baskısındaki çeşitlerde seleksiyon

Klon seleksiyonunun genetik erozyona ek olarak bağ alanlarında ve asmalarda tekdüzelik oluşturması yönünden bir dezavantajı vardır. Doğal seleksiyon baskısına (yeni zararlılar, iklim değişiklikleri vb.), iyi bir yanıt sağlayacak şekilde geniş bir aralıkta seçilmiş klonların bulunabilir olması, şarapların kalite ve kompleksliğini artırmak ve çeşitler içindeki genetik değişkenliği korumak için önemlidir. Bu amaç için en iyi yöntem, yaşlı bağlarda ön seleksiyon çalışması yapmaktır. Bağ başına bitki sayısından ziyade bağ sayısı üzerinde daha çok durulmalıdır. Böylece seçilen fenotiplerle yüksek çeşitliliğe ulaşılmaktadır [28].

Asturian bağ alanı İspanya’nın kuzeybatısında çoğunlukla sadece mevcut otokton azınlık çeşitlerden oluşmaktadır. Bu bağ alanı antik dönemden gelmesi, bazı çeşitlerin kimliği konusunda karışıklık, sertifikalı bitki materyali eksikliği ve her bağda çok sayıda çeşitlerin karışık halde bulunması ile karakterize edilmektedir. Bu yöredeki bağcılığın yenilenmesi ve şaraplarının kalitesinin iyileştirilmesi amacıyla, dört kırmızı üzüm çeşidine ait (Albarín tinto, Carrasquín, Verdejo tinto ve Mencía) eski bitkilerden sağlık durumu iyi olanlar ve yeterli verim alınanlar ön seleksiyona tabi tutulmuştur. Agronomik ve enolojik veriler 3 yılda toplanmıştır. Sağlıksız bireyleri çıkarmak

amacıyla muhtemel alkol içeriği ve verimi ortalama değerlerin üstünde olan bitkiler virüs enfeksiyonu yönünden test edilmiştir. Ayrıca seçilen bitkilerin kimliğini doğrulamak için 6 lokus mikrosatelliti analiz edilmiştir. Bu yöredeki çeşitlere ait seçilen 62 klon daha sonraki çalışmalar için homojen şartlara dikilmiştir. Çalışma yapılan bağ alanları yaşına (50 yaşından fazla) ve omcaların genel sağlık durumlarına (fungal hastalıkların iyi kontrolü ve virüs belirtilerinin hiç olmaması) göre seçilmiştir. Her çeşit için, görsel seçime bağlı olarak yeterli ürün verimi ve sağlık durumuna göre çalışmada kullanılacak bitkilerin seçilimi yapılmıştır. 3 yıl boyunca her asma için muhtemel alkol oranı (% , v/v), verim (kg), ve titre edilebilir asit oranı (g/l tartarik asit) hasat zamanında belirlenmiştir. Meyve bağlama problemleri, mantar enfeksiyonları ya da problemleri ile diğer dikkat çekici verilerde kaydedilmiştir [30].

Klon seleksiyonu metotları

Bağıcılıkta toptan, klon tipi ve klonlar arası değerlendirmeye yönelik seleksiyonlar yapılmaktadır. Klon seleksiyonu genetik seleksiyon ve phytosanitary seleksiyon olmak üzere iki kısımdan oluşur. Phytosanitary seleksiyon klon indeksleme, *in vitro*'da kültüre alma, patojenden arındırılmış baz materyal üretimi aşamalarını kapsar. Genetik seleksiyonda klon kalite ve genetik karakterleri doğrulanmış, matematiksel hesaplamaları yapılmış materyali tanımlar. Genetik seleksiyonda mikrobiyolojik yöntemlerle varyantlar, mutantlara ve kimeralara bakılarak teşhis edilmeye çalışılır [58]. Bireysel veya klonal seleksiyonda birkaç defa tekrarlanan vegetatif çoğaltmayla seçilmiş klon baş omcasının klon performans değerini koruma durumuna bakılır. Seleksiyonla sağlanan ilerleme $SH = S_1 - S_0$ (burada SH = Seleksiyonla sağlanan ilerleme; S_0 =seleksiyon yapılmamış popülasyon, S_1 =belirli bir karakter yönünden seçilen klonun performansı) klonun değeri genotipik olarak stabil, yani bu mutasyon olup modifikasyon değildir [36].

Phytosanitary seleksiyon

Bir klonun performansı sağlık koşullarıyla belirlenir [20, 27]. Seleksiyonda ana bitkilerin sağlık durumları haziran ve eylül olmak üzere yılda iki kez değerlendirilmektedir. Bu

seleksiyon enfeksiyonların temizlenmesine dayanmakta ve abiyotik (dolu, don, güneş yanıklığı, beslenme bozuklukları, yüksek kimyasal dozları) veya biyotik (hastalık ve zararlılar) gibi stres etmenlerinin hangilerinin etkili olduğu bilinmelidir. Çevrenin tipik özellikleri ile çeşit hakkında bilgilere sahip olunması önemlidir. Virüs yoğunluğu bölgesel koşullara bağlı olabilir. Örneğin; Hırvatistan'da aynı çeşitte güney bölgesinde kuzey bölgesine göre daha fazla virüs tespit edilmektedir. Hastalıklara eğilimli olması görsel seleksiyonda ıslahçılara yardımcı olabilir. Örneğin Cegléd szépe çeşidi GFLV virüsüne eğilimlidir [27].

Phytosanitary seleksiyonu hastalıklı bitkilerin işaretlenmesiyle başlar. Budama öncesi ve çoğaltma öncesinde işaretlenenler çıkarılır. Sağlıklı klon bitkilerinden çoğaltılan dokuların temizliği ve patojenden arı kaynakların oluşturulması olarak tanımlanabilir. Phytosanitary seleksiyonu görsel seleksiyon olup negatif özellik gösterenler çıkartılabilir. Hastalıklı adayların seçilmesi engellenir ve böylelikle hastalıklara eğilimi daha az olan bitkiler seçilebilir [30].

Klon seleksiyonu ile üzerinden gelinecek problemler

Klon seleksiyonu yapılmadan arındırılmış klonal materyal geniş olarak kullanılmaktadır. Bu seleksiyonu yapılmamış materyal yeni klonların seçimi için bir kaynak oluşturmaktadır. Gelecek nesillerin kullanımına yönelik gen havuzlarının korunması için stratejilere gerek duyulmaktadır.

Klon seleksiyonunun güçlü bir araç olarak kullanıldığı alanlar özetle; virüs enfeksiyonlarıyla savaş, asma performansının artırılması, üreticilerin ve şarap ve diğer endüstrinin günlük ihtiyaçlarına daha uygun yeni ve farklı çoğaltma materyali sağlar. Klon seleksiyonu 15 ila 20 yıl sürer. Örneğin 2020 yılında hangi tip klonlara gereksinim duyacağımız sorusuna yanıt aranır.

Klon seleksiyonu sonucu itibarıyla bağların performansını artırır. Bağcılığın gereksinim duyduğu alanlara daha adapte olabilen yeni çoğaltma materyallerinin geliştirilmesi bu yöntemle sağlanır. Klon seleksiyonu uzun soluklu bir strateji gerektirir. Varyeteler arasındaki genetik varyasyonun korunması

sağlanır. Ticari önemi düşük varyetelerde salkım sıklığı seyreltilmiş yöresel klonların geliştirilmesi mümkün olur.

Omcalar tek tek veya kışlık tomurcuklar ayrı ayrı klon olarak dikilirler. Klonların karakteristik özellikleri tespit edilirken elde edilen üründen yapılan şarapların tadım testleri ile virüs enfeksiyonlarının varlığı da incelenir. En iyi klonu bulmak için 3 çoğaltma adımı (3 generasyon, 12–15 yıl) gerekmektedir. Islah amacıyla ve klon seleksiyonu için belirli bir klonun farklı niteliklerinin bilinmesi esastır. Moleküler markörler klonların ve mutasyonların tanımlanmasında ve farklılığın ortaya çıkarılmasında önemli araçlardır.

Montpellier yakınındaki Fransa Ulusal Tarım Araştırma Enstitüsü, 2000'den fazla çeşit bir koleksiyonda tutulmaktadır. İspanya hükümeti ülkede sahip olduğu 650'den fazla üzüm çeşidini sınıflandırmış diğerleri kalmıştır. Portekiz üzüm çeşitlerinin birkaç yüzünü sınıflandırılmıştır. İtalya, Yunanistan ve Balkanlar'daki çeşit sayısı net olarak bilinmemektedir. Gürcistan'da 500'ün üzerinde çeşitten bahsedilmektedir.

GENRES 081 Projesi (<http://www.genres.de/vitis>) ile önerilen altı loci mikrosatellitlerle (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62, VrZAG79) 63 çeşidin klon tanımlanması yapılmıştır. DNA izolasyonu ve amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri, bir otomatik ABI PRISM 3100 DNA dizisi vasıtasıyla (Applied Biosystems, Foster City, USA) ve Gen-emapper Yazılım v.4.0 (Applied Biosystems) kullanılarak floresan etiketli parçaları ile boyutlandırılmış ve analiz edilmiştir [37].

Klonal farklılığın genetik esasları

Klonal çeşitler tek bir ana omcadan vegetatif yöntemlerle çoğaltılan tüm bireylerdir. Somatik mutasyonların birikimi temel bir farklılık nedeni olabilir. Ayrıca çok klonlu çeşitler birçok birbirine yakın ana omcalardan alınan vegetatif çoğaltma materyalinden üretilmişlerdir. Bu durum genetik bakımından farklılığın tanımlanmasıyla tespit edilebilir.

Klonal farklılıklar için omcanın sağlık durumu en önemli veya tek nedeni midir sorusu ortaya çıkar. Çoğu durumda virüs bulaşık omcanın kötü performans çizelgeleri

aynı veya komşu bağlardaki enfekte olan ve enfekte olmayan omcaların karşılaştırıldığı saha gözlemlerine dayanmaktadır. Buna göre performanstan uzaklaşma, sadece virüs enfeksiyonu ile tetiklenen, ama aynı zamanda bitkilerin genetik farklılıkları ile yaş veya kültürel uygulama farklılıklarından kaynaklanabilir.

Asmalar vegetatif olarak çoğaltılmaktadır. Çok fazla çeşidin (10–30000) çok uzun süredir kültürü yapılmaktadır. Kültürü yapılmakta olan çeşitlerin çoğu gayet yaşlıdır (>2000 yıl?). Yaşlı çeşitler rağbet görmektedirler. Tüketici üzerinde çeşidin adı önemli bir rol oynamaktadır. Sadece virüs taşımayan omcalar yüksek performans gösterebilirler [63, 64]. Kimera ve mutasyonlar genetik farklılığın oluşumunu sağlamakta ve çeşitler üzerinde klon seleksiyonu yapılması fırsatını vermektedir.

Asma çeşitlerinde klon seleksiyonu için oiv standart protokolü

Klon, tek bir asma bitkisinin vegetatif neslidir. Seçim amacıyla bu tek bitki, çeşit kimliği, fenotipik özellikleri ve sıhhi durumu için seçilir. Asma klon seleksiyonunda, türlerin çeşit içindeki genetik değişkenlikleri belirlenir ve kullanılır. Bu genetik değişkenlik çoğunlukla vegetatif çoğaltma ile sabitleşen spontan doğal mutasyonlardan kaynaklanır. Çeşit içinde değişkenliğin artma olasılığı, bağların yaşının artmasıyla artar. Aynı zamanda bağcılık yapılan alanların önemli bir bölümünü oluşturan ve uzun zamandan beri yetiştirildiği bilinen ve yaygın olarak dağıtımı yapılan çeşitler içinde artmaktadır.

Klon seleksiyonu, belirli çeşitlilik içinde "seçim sürecinin hedefleri" ile tanımlanan pozitif olarak modifiye edilmiş özelliklere sahip tek bireyleri belirlemeye gayret eder. Bu özellikler, fenolojik özelliklerin farklı kategorileri (örneğin olgunlaşma süresi), verim ve kalite parametreleri (örneğin aroma profili) veya hastalık hassasiyeti ve direnci için uygulanabilir. Uygun genetik mutasyonların seçimi, sağlıklı (zararlı organizmalardan arındırılmış) klonlar elde etmek için bitki sağlığı testleri ile birlikte yapılmalıdır. Klon seleksiyonu süreci için OIV, protokol önerir (ek 1, ek 2 ve ek 3'te bildirilmiştir) [1].

OIV Klon Seleksiyonu

1. başlangıç materyalinin seçimi-1. adım

Klon seleksiyonu, ilk tesislerinde kullanılan fidanların seçilmiş klon olmadığı bağların veya seçilen ülkede/bölgede seleksiyona başlamadan önce seçilmesi durumunda en etkilidir. Bu bağlarda, çeşit içi varyasyonları daha olasıdır ve klon seleksiyonu programının hedef özelliklerine ilişkin görünüşte üstün bireylerin seçilme ihtimali artar. Ayrıca bunlar diğer önemli bağcılık özellikleri için arzulanan gereksinimleri karşılamalıdır. Buna ek olarak, seçilen bireyler ampelografik ve/veya genetik çalışmalara dayalı olarak ismine doğruluğu bakımından tanımlanmalıdır. Bu ön seleksiyonların ampelografik ve fenolojik özellikleri tanımlanmalıdır. Ayrıca, bulaşıcı ve taşınabilir hastalıklardan etkilenen bireylerin elemine edilmesine özen gösterilmelidir [1].

2. seçilmiş bireylerin vegetatif neslinin gözlenmesi ve korunması-2. adım

Seçilmiş bireyler-çeşitli bölgeler ve/veya yerleşim yerlerinden alınmış-bitki sağlığı denetimini (Şekil 6'ya bakınız) başarılı bir şekilde tamamlayanlar, ayrı olarak çoğaltılır ve tercihen farklı pedoklimatik özelliklere sahip iki ortamda denenmek üzere dikimi gerçekleştirilir. Karşılaştırma amacıyla, bu denemede referans olarak bir veya daha fazla mevcut standart klon bulunmalıdır. Test arazisi homojen toprak ve mikro iklim şartları göstermelidir. Test arazisi toprağı, virüs hastalıkları için taşıyıcılık yapan *Xiphinema* ssp. içermemelidir. Bütün denemede örnekler aynı klon anacı üzerine aşılanmalıdır. Aşılama için kullanılacak anaç, yerel toprak koşullarına adapte edilmelidir, tercihen bu alandaki en sık kullanılan anaçlardan biri kullanılmalıdır.

Her bir klon adayı, en az üç tekerrürlü ve her tekerrürde en az 5 omca olacak şekilde dikilmelidir. Değerlendirme üç ila beş yıllık bir periyotta yapılmalıdır. Şaraplık üzümler, şaraplık çeşitlerin klon adayları için kültürel uygunluğunun değerlendirilmesi başlığı altında belirtilen karakterleri içermelidir. Ek olarak, elde edilecek ürünün tipolojisini daha fazla karakterize etmek için özellikle bölgesel olarak ilgi çeken diğer özellikler eklenebilir. En az üç yıllık dönemde toplanan verilere dayanarak, çalışılan klon seleksiyonu programı çerçevesinde ilgi konusu belirlenmiş hedef

özellikleri de dikkate alarak, klon adaylarının "genel performansı" ile ilgili bir sıralama yapılabilir. Klon seleksiyonunda dikkate alınması gereken özellikler nihai ürünlere (anaç, sofralık üzüm, kuru üzüm, meyve suyu vb.) uygun olmalıdır. Sofralık üzüm kalitesi ile ilgili olarak, OIV-SCRAISIN 371-2008 kararındaki planlar dikkate alınmalıdır [1].

3. adım 2 seçilen bireylerle tam çalışma- adım 3 (opsiyonel)

Bir önceki değerlendirme döngüsünden elde edilen en uygun performans verilerine sahip aday klonlar, daha sonraki gözlemler için çoğaltılacaktır. Bu çoğaltılan materyal sonraki test döngüsünde çalışılacaktır. Bu test döngüsü mümkün olduğunca çeşitli yerlerde, çeşitli anaçlarla (ülkede, yetiştirileceği bölgede en çok kullanılanlarla); mikro-vinifikasyon için yeterli miktarda üzüm almak için klon başına yeterli sayıda bitki ile; araştırma deneme planı klon adayı başına en az üç tekerrürlü olacak şekilde planlanmalıdır. Mümkün olduğunca, bitki genetik varyasyonlarının fenotipik olarak değerlendirilmesini yaparken, ilgili çevresel sapmadan etkili bir şekilde ayıklandığından emin olmak için veri analizine uygun, istatistiksel olarak güvenli deneysel tasarımlar ve modeller kullanılmalıdır. Değerlendirmeler, kalite parametrelerine özel olarak odaklanarak 2. aşamadaki önceki test döngüsü ile aynı özelliklere göre gerçekleştirilecektir (bkz. Ek 2). Vinifikasyon da dahil değerlendirmeler en az iki yıl süreyle yapılmalıdır. Bu test döngüsünde toplanan veriler, araştırılan özelliklere yönelik olarak klon adaylarının değerlendirilmesi için sağlam bir temel sağlar. Ayrıca, farklı ortamlar ve farklı anaç kombinasyonlarından, klon adaylarının ekovaryanları hesaplanabilir. Mümkün olduğunca, seleksiyondan elde edilecek öngörülebilir genetik kazanç tahmini yapılmalıdır.

Seçilmiş bireylerin bitki sağlığı denetimi

Birinci aşamada seçilen bireyler, Çizelge 1'de listelenen virüs hastalıkları açısından test edilmelidir. Bununla birlikte, ulusal mevzuata göre zorunlu testler de yapılmalıdır. Bölgesel veya ulusal önemine bağlı olarak, diğer virüs hastalıkları da ayrıca test edilebilir. Bitki sağlığı testleri için, biyolojik indeksleme, seroloji testi (ELISA) veya moleküler (PCR,

rtPCR, NGS) teknikleri gibi onaylanmış protokoller uygulanabilir. Sadece zararlı hastalıklardan ari olduğu kanıtlanan bireylerin temiz tutulması önerilir. Bununla birlikte, bazı durumlarda, örneğin, başlangıçtaki çeşit popülasyonun çoğunlukla hastalıkla bulaşık olması nedeniyle sağlıklı bireylerin tanımlanmasının zor olduğunda, temizleme protokollerinin uygulanması gerekli olabilir. Bu işlem, termoterapi, ardından sürgün ucu veya meristematik uç kültürü ile yapılabilir. Herhangi bir durumda, bitki sağlığı denetimi ile kurtarılan klonlar, aşama 2’de tarif edilen prosedüre göre kontrol edilmelidir. Bu planın ardından sadece sağlıklı klon adayları ardışık test döngülerine aktarılacaktır.

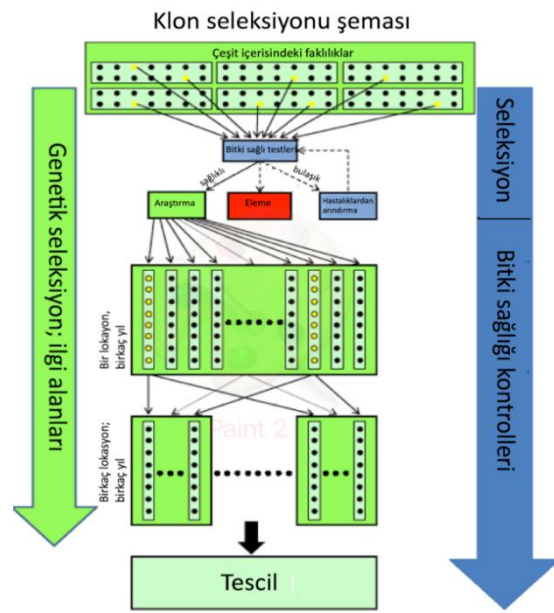
Yeni klonların tescili

Genetik, agronomik ve bitki sağlığı seleksiyonu usullerini başarıyla geçen aday klonlar için yetkili ulusal otoritelere tescil için başvuruda bulunulabilir. Mümkün olduğunca, seleksiyon çalışmaları, genotip ve çevre etkileşimini (GxE) dikkate almalı ve seleksiyondan genetik kazanç üzerindeki etkisini azaltmak için alınan tüm önlemler tam olarak açıklanarak kamunun aydınlatılması sağlanmalıdır. Tescil, çeşit klonunun benzersiz bir isimlendirme veya kodlanmasını gerektirir. Ayrıca tescil, yeni klonun ilgili çeşitten türetildiğini teyit eder.

Yeni klonların korunması

Çizelge 1’de listelenen tüm hastalıklardan (laboratuvar testleri ile teyit edilmiş) ari olduğu kanıtlanan yeni klon bireylerinin (ne

başlangıçtaki çekirdek stok veya ne de çekirdek stoktan üretilen bireyler) tüm virüs hastalıklarının enfeksiyonla bulaşmasına neden olabilecek ve hastalık vektörleri ile teması olmayacak şartlar altında büyütülmesi gerekir. Bunlar virüs vektörlerinden arındırılmış toprakla tercihen serada saksıya dikilerek yetiştirilmelidir. Örneğin yaprak bitleri, kabuklu bitler ve yaprak pireleri gibi potansiyel hastalık vektörleri ile herhangi bir temastan kaçınılmalıdır. Periyodik olarak yapılan bitki sağlığı kontrolü, klonun bitki sağlığı açısından temizliğini doğrulamak için uygulanmalıdır.



Şekil 6. OIV Klon seleksiyonu süreci, bitki sağlığı ve genetik seleksiyon prosedürlerini içerir [1]

Çizelge 1. Klon seleksiyonu sırasında farklı virüs ajanlarını tespit için tanınmış testler

Hastalıklar	Test gerektiren ilişkili etmenler 1	Uygun endeksleme belirtileri indicators 2	Laboratuvar teşhisleri 3
a-Enfeksiyöz dejenerasyon ve çökme	-Grapevine Fanleaf virus, GFLV -Arabis Mosaic Virus, ArMV	Gözle görülür	Seroloji, Moleküler
b-Leafroll hastalığı	Grapevine Leafroll associated Virus, GLRaV 1, 2, 3, 4, 7	Gözle görülür	Seroloji, Moleküler
c-Rugose wood	-Grapevine Virus A, GVA-Grapevine Virus B, GVB	Gözle görülür	Seroloji, Seroloji, Moleküler
d-Diğer asma virüsleri 4, örn.-Diğer Avrupa ve Amerikan Nepo Virüsleri -Grapevine Fleck Virus, GFkV -Asma Rupestris Stem Pitting ile ilişkili Virüs, GRSPaV -Grapevine Corky bark, GCB-Asma Redglobe Virüsü, GRGV -Asma Pinot Gris Virüsü, GPGV-Grapevine Stunt Virus, GSV -Asması damar nekroz kompleksi ile ilişkili ajanlar		Gözle görülür veya latent olarak enfektelidir	Rutin protokoller mümkünse moleküler

1: Teşhis teknikleri mevcut ise, başka enfeksiyöz ajanlar da düşünülmelidir. 2 Uygun göstergeler sadece seçme aşamasında ilgili teknik standartlara göre seçilmelidir (örn. EPPO PM 4/8 (2)). 3 Mümkünse, ileri tanı teknolojisi olarak yeni nesil sıralama (NGS) uygulamasının gelecekteki ikili anlaşmalara istekleri için dikkate alınması gerekir. 4 Diğer asma virüsü testleri (a, b, c noktalarında belirtilmeyen) şu an için gerekli değildir. Ekolojide bulunabilen ve asmada çökmeye neden olabilen bu ve diğer zararlı ve hastalıklar göz önünde bulundurulmalıdır.

Şaraplık çeşitlerin klon adayları için kültürel uygunluğunun değerlendirilmesi

Fenolojik Veriler: Tomurcuk patlama zamanı (Kod OIV 301); bitki tomurcuklarının %50'sinin yeşil uc aşamasında olduğu (Baggiolini ölçeğinin C evresi, BCCH ölçeğinin 7. ve 9. evresi) tarih olarak tanımlanan aşama. Tam çiçeklenme zamanı (Kod OIV 302), çiçeklerin %50'sinin açıldığı (Baggiolini ölçeğinin I. evresi, BCCH ölçeğinin 65. evresi). Tanelerde olgunlaşmanın başlama zamanı (ben düşme, Kod OIV 303), asma üzerindeki salkımlarda tanelerin %50'sine ben düştüğü tarihtir (Baggiolini ölçeğinin M aşamasında, BCCH ölçeğinin 81–85. aşamaları); Fizyolojik olgunluk (=optimum hasat zamanı).

Direnç özelliklerini etkileyen faktörlerin duyarlılık karakteristikleri: *Botrytis cinerea*'ya karşı direnç derecesi (kod OIV 458) yanı sıra, bağcılıkla ilgili fizyolojik hastalıklar da dahil olmak üzere diğer hastalıklar ve zararlılar, salkım yoğunluğu (OIV Kodu 204).

Verim Parametreleri: Tane iriliği, Salkım iriliği, Sürgün başına salkım sayısı, Omca başına verim.

Kalite Parametreleri: Şeker, asit, pH, tane ve meyve suyu tadı (aroma yoğunluğu ve profili), polifenoller, şarap tadı profili (eğer mikroviniifikasyon mümkünse), şarap kalitesinin derecesi (eğer mikroviniifikasyon mümkünse). Belirli bir çeşit için ilk klon seçimi olmadıkça, mikro vinifikasyon arzu edilir [1].

KAYNAKLAR

1. Aurand, J.M., 2017. OIV Process for the Clonal Selection of Vines, 9.
2. Bakonyi, K., 1968. Olasz Rizling Szolofajta Klonszelektalasa es Klonjainak Ertekelse, Keszthely Agrartud Foiskola Kiadv.
3. Bassermann Jordan, F., 1907. Geschichte des Weinbaus unter Besonderer Berücksichtigung der Bayerischen Rheinpfalz. Bd. 1–3, Keller, Frankfurt a. Main.
4. Baur, E., 1933. Der Heutige Stand der Rebenzüchtung in Deutschland, Der Züchter, 5(4):73–77.
5. Becker, H., 1990. A Szőlő Klonszelekciója a Német Szövetségi Köztársaságban és Széhszonlítóva a töBbi Országgal., Szőlőtermesztés és Borászat. 12(1–2):7–10.
6. Becker, P.D.H., 1977. Methods and Results of Clonal Selection in Viticulture, Symposium on Clonal Variation in Apple and Pear 75:111–122.
7. Blaich, R., Konradi, J., Rühl, E. and Forneck, A., 2007. Assessing Genetic Variation among Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.) Clones with AFLP Markers, American Journal of Enology and Viticulture, 58(4):526–529.
8. Carrier, G., Huang, Y.F., Le Cunff, L., Fournier–Level, A., Vialet, S., Souquet, J.M., Cheynier, V., Terrier, N. and This, P., 2013. Selection of Candidate Genes for Grape Proanthocyanidin Pathway by an Integrative Approach, Plant Physiology and Biochemistry, 72:87–95.
9. Di Gaspero, G. and S. Foria, 2015. Molecular Grapevine Breeding Techniques, In: Grapevine Breeding Programs for the Wine Industry, Eds: Elsevier, p:23–37.
10. Eibach, R. and R. Töpfer, 2015. Traditional Grapevine Breeding Techniques, In: Grapevine Breeding Programs for the Wine Industry, Eds: Elsevier, p:3–22.
11. Falginella, L., Castellarin, S. D., Testolin, R., Gambetta, G. A., Morgante, M. and Di Gaspero, G., 2010. Expansion and Subfunctionalisation of Flavonoid 3',5'-hydroxylases in the Grapevine Lineage, BMC Genomics, 11(1):562.
12. Faria, M. A., Beja-Pereira, M., Martins, A., Ferreira, M. A. and Nunes, M. E. S., 2004. Grapevine Clones Discriminated using Stilbene Synthase–Chalcone Synthase Markers, Journal of the Science of Food and Agriculture, 84(10):1186–1192.
13. Fechter, I., Hausmann, L., Daum, M., Sörensen, T. R., Viehöver, P., Weisshaar, B. and Töpfer, R., 2012. Candidate Genes within a 143 kb Region of the Flower Sex Locus in Vitis, Molecular Genetics and Genomics, 287(3):247–259.
14. Forneck, A., J. Konradi and R. Blaich, 2002. A Genetic Variation Analysis of *V. vinifera* cv. Pinot Noir, 8. International Conference on Grape Genetics and Breeding 603:167–170.
15. Forneck, A., A. Benjak and E. Rühl, 2009. Grapevine (*Vitis* ssp.): Example of Clonal Reproduction in Agricultural Important

- Plants, In: Lost Sex, Eds: Springer, p:581–598.
- 16.Froelich, G., 1900. Zur Hybridisation der Reben und der Auswahl der Zuchtreben, Weinbau Weinhandel, 18:230–231.
- 17.García, J. M., Vitón, J. M. G., Renedo, T. V. and Martínez, T. M., 1995. Selección Clonal–Sanitaria de las Viníferas de Rioja: Tempranillos, Graciano, Garnacha Tinta y Mazuelo, Zubía (7):41–52.
- 18.Grenan, S., Bonnet, A. and Boidron, R., 1998. Results and Thoughts on 35 Years of Sanitary Selection in France, 7. International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding 528:713–722.
- 19.Hajdu, E., 2015. Grapevine Breeding in Hungary, In: Grapevine Breeding Programs for the Wine Industry, Eds: Elsevier, p:103–134.
- 20.Hartmair, V., 1973. Phytosanitare Massnahmen in Rahmen der Rebenzucht, Winzer.
- 21.Hernández, C. A., Cano, J. A. R. and Otero, M. d. V. A., 2006. Variedades Autóctonas de Vid en Castilla y León, La Semana Vitivinícola (3123):1942–1947.
- 22.Hofäcker, W., 2004. Die Deutschen Rebkclone. (Oppenheim).
- 23.Huang, Y.–F., Doligez, A., Fournier–Level, A., Le Cunff, L., Bertrand, Y., Canaguier, A., Morel, C., Miralles, V., Veran, F. and Souquet, J.–M., 2012. Dissecting Genetic Architecture of Grape Proanthocyanidin Composition through Quantitative Trait Locus Mapping, BMC Plant Biology, 12(1):30.
- 24.Ibáñez, J., Carreño, J., Yuste, J. and Martínez–Zapater, J., 2015. Grapevine Breeding and Clonal Selection Programmes in Spain, In: Grapevine Breeding Programs for the Wine Industry, Eds: Elsevier, p:183–209.
- 25.Ivanišević, D., Korac, N., Cindric, P., Parpic, I. K., Medic, M. and Bozovic, P., 2011. Some White Wine Varieties Suitable for Organic Production of Grapes, International Symposium Food Safety Production, Proceedings, Bosnia and Herzegovina, 262–264.
- 26.Konradi, J., Forneck, A., Blaich, R., 2003. DNA–Untersuchung Spätburgunder–Frühburgunder. Eine Bande macht den Unterschied. Das deutsche Weinmagazin,, 24:13–15.
- 27.Kontić, J. K., Pejić, I., Maletić, E., Sladonja, B., Poljuha, D., Vokurka, A., Zdunić, G., Preiner, D., Šimon, S. and Ruehl, E., 2006. Virus Diseases Screening in Clonal Selection of Croatian Grapevine Cultivars, 9. International Conference on Grape Genetics and Breeding 827:623–626.
- 28.Lacombe, T., Boursiquot, J. and Audeguin, L., 2004. Prospection, Conservation et Évaluation des Clones de Vigne en France, Bull. OIV, 77:99–809.
- 29.Laufner, R., 1987. 200 Jahre Qualitätsweinbau an Mosel Saar Ruwer. Die Weinbauverordnung des Trierer Kurfürsten Clemens Wenzeslaus 1787. Verkehrsamt der Stadt Trier, Trier.
- 30.Loureiro, M., Moreno–Sanz, P. and Suárez, B., 2011. Clonal Preselection of Grapevine Cultivars of the Appellation “Cangas Quality Wine” (Asturias, Spain), Hort. Sci, 38(2):71–80.
- 31.Ludowici, A., 1924. Die Schule der Rebzucht. Ulmer Verlag, Stuttgart.
- 32.Mannini, F., 1998. Clonal Selection in Grapevine: Interactions between Genetic and Sanitary Strategies to Improve Propagation Material, 7. International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding 528:703–712.
- 33.Marais, J. and Rapp, A., 2017. The Selection of Aroma–Rich Clones of *Vitis vinifera* L. cv. Gewürztraminer and Weissler Riesling by Means of Terpene Analyses, South African Journal of Enology and Viticulture, 12(1):51–56.
- 34.Martín, J., Borrego, J., Cabello, F. and Ortiz, J., 2003. Characterization of Spanish Grapevine Cultivar Diversity using Sequence–Tagged Microsatellite Site Markers, Genome, 46(1):10–18.
- 35.Martínez, J., Vicente, T., Martínez, T., Chávarri, J. and García–Escudero, E., 2006. Una Nueva Variedad Blanca Para la DO Ca, Rioja: el Tempranillo blanco. 19. Congreso Mundial de la Viña y el Vino (OIV). Logroño (La Rioja).
- 36.Martins, A. and Gonçalves, E., 2015. Grapevine Breeding Programmes in Portugal, In: Grapevine Breeding Programs for the Wine Industry, Eds: Elsevier, p:159–182.

37. Moreno-Sanz, P., Suárez, B. and Loureiro, M., 2008. Identification of Synonyms and Homonyms in Grapevine Cultivars (*Vitis vinifera* L.) from Asturias (Spain), The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 83(6):683–688.
38. Mullins, M.G., Bouquet, A. and Williams, L. E., 1992. Biology of the Grapevine, Cambridge University Press, p.
39. Myles, S., Boyko, A.R., Owens, C.L., Brown, P.J., Grassi, F., Aradhya, M.K., Prins, B., Reynolds, A., Chia, J.M. and Ware, D., 2011. Genetic structure and Domestication History of the Grape, Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(9):3530–3535.
40. Olmo, H., 1980. Selecting and Breeding New Grape Varieties, California Agriculture, 34(7):23–24.
41. Pelsy, F., 2010. Molecular and Cellular Mechanisms of Diversity within Grapevine Varieties, Heredity, 104(4):331.
42. Pérez-Hugalde, C., Júdez, L., Litago, J., Yuste, J. and Fuentes-Pila, J., 2004. Statistical Procedure for Clonal Preselection of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo in the Duero Valley, Spain, American Journal of Enology and Viticulture, 55(4):335–345.
43. Porten, M., 2001. Der “Richtige” Spätburgunder Klon., Das Deutsche Weinmagazin, 18(1):38–42.
44. Ries, R., Rühl, E. H. and Schmid, J., 1995. Aims and Achievements of Clonal Selection at Geisenheim, Proceedings of the International Symposium on Clonal Selection: June 20&21, Oregon Convention Centre, Portland, Oregon, USA, 70–73.
45. Rives, M., 1961. Bases Génétiques de la Sélection Clonale Chez la Vigne, Ann. Amélior. Plantes, 11(3):337–348.
46. Rives, M., 1975. Les Origines de la Vigne, Recherche, 53:120–129.
47. Rubio, J. A. and Yuste, J., 2009. Clones Certificados de las Principales Variedades Tradicionales de vid en Castilla y León, ITACyL, p.
48. Ruehl, E., Schmid, J., Eibach, R. and Töpfer, R., 2015. Grapevine Breeding Programmes in Germany, In: Grapevine Breeding Programs for the Wine Industry, Eds: Elsevier, p:77–101.
49. Rühl, E., Konrad, H., Lindner, B. and Bleser, E., 2003. Quality Criteria and Targets for Clonal Selection in Grapevine, 1. International Symposium on Grapevine Growing, Commerce and Research 652:29–33.
50. Rühl, E., H. Konrad and E. Schönhals, 2009. Untersuchung zur Existenz und zum Ausmaß Genetischer Variation Traditioneller Rebsorten im Hinblick auf die Erhaltung genetischer Ressourcen. Erfassung der Physiologischen Kennzahlen der Klone. Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung. Bonn (Forschungsprojekt, 514–33.52/04HS021).
51. Sartorius, O., 1928. Über die Wissenschaftlichen Grundlagen der Reben Selektion in Reinen Beständen, Z für Pflanzenz, 13:79–86.
52. Schmid, J., Manty, F. and Lindner, B., 2009. Geisenheimer Rebsorten und Klone, Geisenheim.
53. Schöffling, H. and Stellmach, G., 1993. Klon Züchtung bei Weinreben in Deutschland: von der Antiken Auslesevermehrung bis zur Systematischen Erhaltungszüchtung, Waldkircher Verlag, p.
54. Seeliger, R., 1983. Der Neue Weinbau. Parey Verlag, Berlin.
55. Sefc, K., Pejić, I., Maletić, E., Thomas, M. and Lefort, F., 2009. Microsatellite Markers for Grapevine: Tools for Cultivar Identification & Pedigree Reconstruction, In: Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology, Eds: Springer, p:565–596.
56. Sefc, K. M., Steinkellner, H., Wagner, H., Glossl, J. and Regner, F., 1997. Application of Microsatellite Markers for Parentage Studies in Grapevine.
57. Stellmach, G., Goheen, A. and Pearson, R., 1988. Other Virus and Viruslike Diseases, Compendium of Grape Diseases, 53–54.
58. Stenkapm, S., Ottaviano, F., Becker, M., Forneck, A. and Blaich, R., 2004. Chimären ein verbreitetes Phänomen im Weinbau. Deutsches Weinbau Jahrbuch 2005., Eugen Ulmer GmbH und Co. Stuttgart, 260:109–115.
59. Torregrosa, L., Fernandez, L., Bouquet, A., Boursiquot, J., Pelsy, F. and Martínez Zapater, J., 2011. Origins and Consequences of Somatic Variation in

- Grapevine, Genetics, Genomics, and Breeding of Grapes, 68–92.
60. Ulanovsky, S., Gogorcena, Y., de Toda, F. M. n. and Ortiz, J., 2002. Use of Molecular Markers in Detection of Synonymies and Homonymies in Grapevines (*Vitis vinifera* L.), *Scientia Horticulturae*, 92(3–4):241–254.
61. Vannozzi, A., Dry, I. B., Fasoli, M., Zenoni, S. and Lucchin, M., 2012. Genome Wide Analysis of the Grapevine Stilbene Synthase Multigenic Family: Genomic Organization and Expression Profiles upon Biotic and Abiotic Stresses, *BMC Plant Biology*, 12(1):130.
62. Walter, B. and G. Martelli, 1996. Clonal Selection of the Vine: Sanitary and Pomological Selection. Influence of Viroses and Quality. 1. Effects of Viroses on the Culture of the Vine and its Products, *Bulletin de l'OIV* (France).
63. Walter, B. and G. Martelli, 1997. Clonal Selection of the Vine: Sanitary and Pomological Selection. Influence of Viroses and Quality. Part 2. Sanitary Selection, Pomological Selection, *Bulletin de l'OIV* (France).
64. Walter, B. and G. Martelli, 1998. Consideration on Grapevine Selection and Certification, *Vitis–Geilweilerhof*, 37:87–90.