

**BAZI BİBER HAT VE ÇEŞİTLERİNİN  
Tobacco mosaic tobamovirus (TMV)'E DAYANIKLILIĞININ  
MEKANİK İNOKULASYON VE ELISA TESTLERİ İLE BELİRLENMESİ**

Nejla ÇELİK<sup>1\*</sup> Ramazan ÖZALP<sup>1</sup> İbrahim ÇELİK<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Antalya

**Özet**

Örtüaltı biber (*Capsicum annuum* L.) yetiştiriciliğinde önemli verim kayıpları ve kalite bozulmalarına neden olan virüs hastalıklarının başında *Tobacco mosaic tobamovirus* (TMV) gelmektedir. Ülkemizde ve dünyada virüs hastalıkları ile kimyasal mücadelenin olmaması, üreticilerin dayanıklı çeşit kullanmalarını gerektirmektedir. Bu çalışma, 2005-2009 yılları arasında "Türkiye F1 Hibrit Sebze Çeşitlerinin Geliştirilmesi ve Tohumluk Üretiminde Kamu-Özel Sektör İşbirliği Projesi" kapsamında yürütülmüştür. Çalışmada, sonbahar ve ilkbahar dönemlerinde, Enstitü gen havuzunda bulunan 156 adet biber hattı ile 36 adet özel sektöre ait çeşit, TMV etmenine karşı testlenmiştir. Saksılara ikişer adet dikilen biber fideleri 2-4 yapraklı döneme gelince hazırlanan virüs inokulumu bitkilerin yapraklarına mekanik inokulasyon yöntemine göre inokule edilmiştir. Bitkiler haftalık olarak gözlenmiş ve oluşan belirtiler kaydedilmiştir. İnokulasyondan 4-6 hafta sonra gözlem sonuçları semptomatolojik olarak ve laboratuvarında ELISA testi ile değerlendirilmiştir. Çalışmalar sonucunda, Enstitüye ait 15 adet hat ile özel sektöre ait 2 adet çeşit dayanıklı olarak belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Biber, *Capsicum annuum*, *Tobacco mosaic tobamovirus*, TMV, Dayanıklılık,

**DETERMINATION OF SOME PEPPER LINES AND VARIETIES  
RESISTANT TO *Tobacco mosaic tobamovirus* (TMV) WITH  
INOCULATION AND ELISA TESTS**

**Abstract**

The virus *Tobacco mosaic tobamovirus* (TMV) disease causes major losses in yield and quality in pepper cultivation. No chemical control of the virus disease forces growers to use resistant varieties in the world. This study was carried out in the frame of "Improvement of Turkey F<sub>1</sub> Hybrid Vegetable Variety and Public-Private Sector Collaboration in Seed Production Project" between 2005 and 2009. 156

\* Sorumlu yazar:neclacelik32@hotmail.com

Pepper lines in gene pool of Institute and 36 varieties of private sector were screened against TMV resistance in greenhouse in autumn and spring seasons. Plants sown two plants per pot were infected with pathogen by mechanical inoculation at 2-4 true leaf period. The symptoms were weekly observed and recorded. Observations were evaluated at 4-6 weeks after inoculation by symptomatologic and ELISA. As a result of this study, 15 lines of Institute and 2 varieties of private sector were determined resistant.

**Keywords:** Pepper, *Capsicum annuum*, *Tobacco mosaic tobamovirus*, TMV, Resistance,

## 1. GİRİŞ

Biber (*Capsicum annuum* L.) bitkisi *Solanaceae* familyasının *Capsicum* cinsine dahil olup; iklim isteği yönünden ılık ve sıcak iklim sebzesidir (Wien, 1997). Gerek Dünyada ve gerekse Türkiye’de sevilerek tüketilen, içerdiği vitamin ve mineral maddelerce insan beslenmesi ve sağlığına olumlu katkısı olan ve üzerinde ıslah çalışmalarının en fazla yoğunlaştığı sebze türlerinden biridir. Türkiye 1.796.177 ton biber üretimi ile Dünyada Çin ve Meksika’dan sonra 3. sırada yer almaktadır (Anonim, 2009). Yetiştiriciliği yapılan bitkilerin doğrudan toprak üstü organlarında zararlılara yol açan hastalıkların başında viral hastalıklar gelmektedir. Biberde zararlı olan 42 adet virüsün biberde yaptığı yıllık zarar oranının % 42-% 80 dolayında olduğu tahmin edilmektedir. Bu virüsler arasında Hıyar Mozaik Virüsü (CMV), Patates Y Virüsü (PVY), Biber Çizgili Damar Virüsü (PVBV), Tütün Mozaik Virüsü (TMV) en önemli virüslerdir (Palloix, 1994; Ekbiç vd., 1997).

Bilindiği üzere bitki virüs hastalıkları ile mücadele, hastalık görüldükten sonra mümkün olmamakta ve ciddi ürün kayıpları yanı sıra kalite kayıplarına da yol açmaktadır. Ayrıca viral hastalıklar çok kolay yollardan yayılmaları nedeniyle, özellikle sonbahar döneminde yapılan üretimlerde önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Yıldız vd., 1990). Virüs hastalıklarının kontrolünde doğrudan kimyasal mücadele olmadığından, hastalığın yayılmasını önlemek için Koruyucu Önlemler önem kazanmaktadır. Virüs hastalıklarının kontrolünde erken tanı ve teşhis, virüs kaynağının yok edilmesi, etkili vektör ve yabancı ot mücadelesi, sayılabilecek temel koruyucu önlemlerdir (Demir, 2005). Sayılan bu virüslerin pek çoğu afitler tarafından bulaştırılırken, bazıları ise nematod, thrips, yaprak kurtları, beyazsinekler ve funguslar tarafından; bazı virüsler ise mahiyeti tam olarak bilinmeyen toprak içindeki vektörler tarafından bulaştırılmaktadır (Green vd., 1991). Bu nedenle

virüs hastalıkları ile mücadelede, hastalık etmeninin çok iyi tanınması, gerek hastalığın bitkiye bulaşmadan önce gerekse ilk hastalık belirtileri görüldükten sonra alınacak önlemler daha önemli olmaktadır (Zitter vd., 1984).

Örtüaltı alanlarda virüs hastalıklarından korunmak, diğer bir ifadeyle hastalık çıkışını önlemek amacıyla başlangıç olarak hastalıklara dayanıklı olduğu bilinen çeşitler tercih edilmeli ve oldukça sağlıklı görünen bitkilerden tohum alınmalı veya sertifikalı tohum kullanılmalıdır. Tohumla taşınmayan virüs hastalıklarında bile hasta bitkilerden alınan tohumların çimlenme güçlerinin düşük olduğu saptanmıştır. Bu nedenle virüs hastalıkları ile mücadelede en basit ve etkili yöntem dayanıklı çeşit kullanmaktır (Fletcher, 1989). Bu çalışmada; "Türkiye F1 Hibrit Sebze Çeşitlerinin Geliştirilmesi ve Tohumluk Üretiminde Kamu-Özel Sektör İşbirliği Projesi" kapsamında, Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü (BATEM) biber ıslah hatlarının ve bazı özel sektör firma çeşitlerinin *Tobacco mosaic tobamovirus* (TMV)'e karşı mekanik inokulasyon yöntemi ile testlenmesi ve bu yöntemin kullanılabilirliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

## **2. MATERYAL VE YÖNTEM**

### **2.1. Materyal**

Testlemelerde BATEM biber gen havuzunda bulunan ıslah hatları ile özel sektöre ait çeşitlere ait biber fideleri, dayanıklı ve hassas olduğu bilinen biber çeşitlerine ait fideler, Ege Üniversitesi'nden temin edilen TMV izolatu, pH:7 olan 0.01 M Fosfat buffer, 6 numara saksı (180 x 165 mm) ve 3:1:1 oranında torf, perlit ve kum karışımı içeren steril harç ortamı, TMV antiserum kiti kullanılmıştır.

### **2.2. Yöntem**

#### *2.2.1. Mekanik inokulasyon*

BATEM biber gen havuzunda bulunan 156 adet ıslah hattı ve özel sektöre ait 36 çeşit olmak üzere toplam 192 genotip mekanik inokulasyon yöntemi ile testlenmiştir. Testlenecek biber hat ve çeşitlerine ait tohumlar torfla doldurulmuş plastik kaplara ekilmiş ve fideler ilk gerçek yapraklarını oluşturdukları dönemde viyollere şaşırtılmıştır. Viyollerde 3-4 yapraklı

döneme gelen fideler, içerisinde 3:1:1 oranında torf, perlit ve kum karışımı bulunan saksılara her saksıya ikişer bitki olacak şekilde şaşırtılmıştır. Her muamele için 12 bitki ve 2 bitki de kontrol olmak üzere toplam 14 bitki kullanılmıştır. Testlemede kontrol olarak, dayanıklı ve hassas olduğu bilinen çeşitlerden 10 bitki dayanıklı kontrol ve 10 bitki de hassas kontrol olarak ve her hattan 2 bitki de inokule edilmeden negatif kontrol olarak bulundurulmuştur.

Şaşırtma işleminden 1-2 gün sonra fideler klasik testleme yöntemlerinden "Mekanik İnokulasyon Yöntemi"ne göre virüs ile inokule edilmiştir. Bu amaçla Ege Üniversitesinden temin edilip çoğaltılmış olan TMV inokulumu 1:5 oranında, pH:7 olan 0.01 M Fosfat buffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Antignus vd., 1997) ile ezilerek içerisinde karborandum tozu ve  $\text{SiO}_2$  karıştırılmış (Şekil 1a) ve bir sünger yardımıyla test bitkilerinin kotiledon ve ilk gerçek yapraklarına sürülerek (Şekil 1b) virüsün bitkiye bulaşması sağlanmıştır (Mandal vd., 2001). Bu işlemden sonra 2-5 dakika içinde yapraklara su püskürtülmüş ve inokulum fazlası uzaklaştırılmıştır (Şekil 1c). İnokulasyon işlemi bir hafta sonra bitkilerin üst yapraklarında tekrarlanmıştır. İnokulasyonlar sonrasında bitkiler her hafta kontrol edilerek gelişen belirtiler gözlenmiş ve kaydedilmiştir (Matthews, 1991). Ayrıca bitkiler üzerinde oluşabilecek hastalık ve zararlılar kontrol edilerek uygun kimyasal ilaçlarla mücadelesi yapılmıştır.



Şekil 1. Hazırlanan inokulum (a), biber yapraklarına TMV inokulasyonu (b), yapraklara su püskürtme (c).

### 2.2.2. DAS-ELISA testi

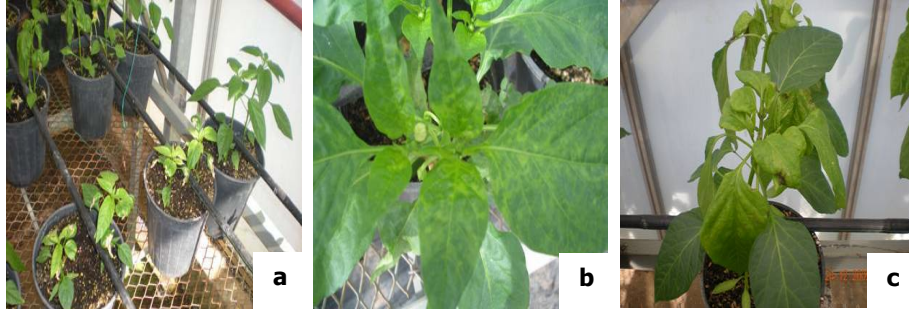
Bitkilerde yapılan gözlemler sırasında alınan taze yaprak örnekleri, TMV antiserum kiti ile firma tarafından önerilen test prosedürüne göre DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immune Sorbent Assay) tekniği ile testlenmiştir (Clark ve Adams, 1977). Testlemeler sırasında TMV

antiserum kitine ait pozitif ve negatif kontroller kullanılmış ve örnekler 405 nm dalga boyundaki spektrofotometrede okunmuştur.

### **3. BULGULAR VE TARTIŞMA**

#### **3.1. Mekanik İnokulasyon**

Mekanik inokulasyon sonrasında bitkiler her hafta kontrol edilerek gelişen belirtiler gözlenmiş ve kaydedilmiştir. İnokulasyon tarihinden 2-4 hafta sonra bitkilerin yapraklarında sararma ve bazı bitkilerde kuruma, yapraklarda mozaik lekeleri ve bitkilerde bodurlaşma şeklinde belirtiler gözlenmiştir (Şekil 2 a,b,c). Çalışmada mekanik inokulasyon yöntemi ve DAS-ELISA tekniği ile 2004-2009 yılları arasında BATEM ve özel sektöre ait toplam 192 adet biber hat/çeşit testlenmiş olup, testleme sonuçları Çizelge 1'de verilmiştir.



Şekil 2. İnokulasyondan 10 gün sonra bitkilerdeki belirtiler (a), yapraklarda sararma (b), mozaik (c)

Testleme çalışmaları sonucunda Enstitü'ye ait toplam 156 adet hattın 15 adedi TMV'ne dayanıklı bulunurken 141 adedi duyarlı bulunmuştur. Özel sektör çeşitlerinden ise 36 adet çeşitten 2 adedi dayanıklı bulunurken 34 adedi duyarlı olarak tespit edilmiştir.

Testlemeler sonucu duyarlı bulunan hatların, DAS-ELISA ile yapılan analizlerde de pozitif reaksiyon verdiği tespit edilmiştir. Enstitüye ait dayanıklı bulunan ıslah hatları yürütülmekte olan ıslah programlarında değerlendirmeye alınmıştır.

Çizelge 1. 2004-2009 yılları arasında biberde TMV testleme ve sonuçları

Kurum Adı	Testleme Zamanı (yıl)	Testlenen Çeşit/Hat Sayısı (adet)	Dayanıklı Sayısı (adet)	Duyarlı Sayısı (adet)
BATEM	2004	20	0	20
BATEM	2005	14	0	14
BATEM	2006	26	0	26
BATEM	2007	40	4	36
BATEM	2008	25	0	25
BATEM	2009	31	11	20
Özel Sektör	2005	5	0	5
Özel Sektör	2006	17	1	16
Özel Sektör	2007	13	0	13
Özel Sektör	2008	1	1	0
	TOPLAM	192	17	175

Yapılan çalışmada mekanik olarak inokule edilen bitkilerde gelişen belirtilerle DAS-ELISA sonuçları karşılaştırılmış, dayanıklı ve duyarlı bitkiler belirlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. TMV duyarlı ve dayanıklı bitkiler

### 3.2. DAS-ELISA Testi

Mekanik inokulasyondan 4 hafta sonra biber bitkilerinden alınan taze yaprak örnekleri DAS-ELISA tekniği ile testlenmiştir. Testlemeler sırasında TMV antiserum kitine ait pozitif ve negatif kontroller kullanılmıştır. ELISA ile testlenen bazı örnekler ile pozitif ve negatif kontrollere ait absorban değerleri Çizelge 2’de verilmiştir.

Çizelge 2. DAS-ELISA analizi yapılan bazı örneklerin absorbens değerleri

Örnekler	Absorbans Değeri	Sonuç
VT1	0.431	Pozitif
VT2	0.593	Pozitif
VT3	0.672	Pozitif
VT4	0.103	Negatif
VT5	0.566	Pozitif
VT6	0.439	Pozitif
VT7	0.259	Pozitif
VT8	0.510	Pozitif
VT9	0.099	Negatif
VT10	0.315	Pozitif
TMV Negatif kontrol	0.096	Negatif
TMV Pozitif kontrol	0.928	Pozitif

ELISA testleri sonucunda, sağlıklı kontrol (negatif kontrol) için 405 nm dalga boyunda spektrofotometrede elde edilen absorbens değerinin en az 2 katı ve daha fazla absorbens değeri veren örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Davis, 1986; Sammons vd., 1989; Al-Shanwan vd., 1995).

#### 4. SONUÇ

Kültür bitkilerinde virüs hastalıkları ile mücadelenin, hastalık bitkiye giriş yaptıktan sonra mümkün olmaması üreticileri dayanıklı çeşit kullanmaya sevk etmektedir. Virüs hastalıklarına karşı dayanıklılık çalışmalarının yeni bir konu olması ve bu konunun klasik test yöntemlerinden olan "Mekanik İnokulasyon Yöntemi" ile ele alınmış olması bitkilerdeki hastalıklara dayanıklılığın önemini bir kez daha vurgulamıştır.

TMV dayanıklılık testine tabi tutulan biber çeşitlerinde mekanik inokulasyonlardan sonra haftalık olarak bitkilerde gözlemler yapılmıştır. İnokulasyondan yaklaşık 4 hafta sonra gözlem sonuçları değerlendirilmiş, hassas ve dayanıklı hatlar belirlenmiştir. Gözlemler sırasında hassas olarak nitelendirilen biber hatlarında inokulasyondan sonra yeni gelişen yapraklarda mozaik belirtileri gözlenmiştir. Dayanıklı olarak nitelendirilen biber hatlarında ise bitkilerin inokulasyonundan sonra gelişen üst aksamında herhangi bir belirtiyeye rastlanmamıştır.

Biber bitkileri yapılan gözlemlerden sonra DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiş ve belirti gözlenen ve gözlenmeyen hatlara ait örnekler laboratuvarında analiz edilmiştir. Analiz sonucunda, yapraklarında TMV belirtileri görülen ve hassas olarak nitelendirilen hatlara ait bitkilerden alınan örnekler pozitif reaksiyon verirken, herhangi bir belirti göstermeyip dayanıklı olduğu kanaatine varılan hatlara ait bitkilerden alınan örnekler ise negatif reaksiyon vermiştir.

Bu çalışma ile mekanik inokulasyonlar sonrası yapılan gözlemlerde elde edilen sonuçların doğruluğu serolojik olarak DAS-ELISA testi ile de kanıtlanmıştır. Ayrıca Enstitü'de biber ıslahı konusunda yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen materyallerin yine Enstitü'de yapılan mekanik inokulasyon çalışmaları ile Tütün mozaik virüsü açısından başarılı bir şekilde testlenebileceği ortaya konulmuştur. Biber ıslahında çalışan katılımcı özel firmaların da Tütün mozaik virüsü ile ilgili talep etmiş oldukları dayanıklılık testlemeleri imkanlar dahilinde yerine getirilmiştir.

Sonuç olarak; bu çalışma ülkemizde kamu ve özel sektör tohumculuk sektörünün, genetik materyalde hastalık ve zararlılara dayanıklılık testlemelerinin seri hale dönüştürülmesinde bir ön çalışma niteliğinde olup, özellikle uygulamaya çok büyük katkı sağlamıştır. Ayrıca bitkilerdeki mevcut dayanıklılığın ortaya konulmasında mekanik inokulasyon ve ELISA çalışmalarına ilaveten TMV'ye karşı dayanıklılık sağlayan L3 geninin bitkideki varlığının moleküler yöntemlerle de ortaya konulması gerekmektedir. Bu çalışma ile bitkilerin virüs hastalıklarına karşı reaksiyonlarının ortaya konulmasında kullanılan yöntemlerden biri olan mekanik inokulasyon yönteminin, güvenilir sonuçlar vermesi yanında kolay uygulanabilir bir yöntem olduğu ortaya konulmuştur. Bu nedenlerle ıslah çalışmaları sonucu elde edilen materyallerin gözden geçirilmesinde böyle bir metodun kullanılması ihtiyaç haline gelmiştir.

#### **Kaynaklar**

- Al-Shanwan, I.M., Abdalla, O.A., Al-Saleh, M.A. 1995. Response Greenhouse-Grown Cucumber Cultivars to An Isolate of Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV). *Plant Disease*, 79:898-901.
- Anonim, 2009. Food And Agriculture Organization of The United Nations. <http://faostad.fao.org/site/567/default.aspx> Erişim Tarihi:04.04.2010.
- Antignus, Y., Lapidot, M., Ganaim, N., Cohen, J. Lachman, O., Perlsman, M., Raacah, B., Gera, A. 1997. Biological and Molecular Characterization of Tomato Spotted Wilt Virus in Israel. *Phytoparasitica*, 25:319-330.



- Clark M.F., Adams, A.N. 1977. Characteristics of The Microplate Method of Enzyme Linked Immunesorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *Journal of General Virology*, 34:475-483.
- Davis, R.F. 1986. Partial Characterization of Zucchini Yellow Mosaic Virus Isolated from Squash in Turkey. *Plant Disease*, 70: 735-738.
- Demir, M. 2005. Kahramanmaraş'ta Yetiştirilen Kırmızı Biberlerde Yaprakbiti İle Taşınan Virüslerin Saptanması. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 28 s.
- Ekbic, E., Abak, K., Yılmaz, M.A. 1997. A New PVY Pathotype on Pepper Along Mediterranean Coastal Area of Turkey. Proc.10<sup>th</sup> Cong, Medit. Phytopath. Union, Montpellier, 1-5 June 1997. 187-189.
- Fletcher, J.T. 1989. Diseases of Greenhouse Plants, British Library Cataloguing in Publication Data, Singapore, 351 s.
- Green, S. K. and Kim, J. S.1991. Characteristics and Control of Viruses Infecting Peppers: A Literature Review. Asian Vegetable Research and Development Centre - Technical Bulletin No. 18, 60 pp.
- Mandal, B., Papru, H.R., Culbreteath, A.K. 2001. Factor Affecting Mechanical Transmission of Tomato Spotted Wilt Virus to Peanut (*Arachis hypogaea*). *Plant Disease*, 85(12):1259-1263.
- Matthews, R.E.F. 1991. Plant Virology, 3<sup>rd</sup> edit., Acad. Press, New York, 897 pp.
- Palloix, A., Abak, K., Gognalons, P., Daubeze, A. M., Guldur, M., Memouchi, G., Gebre-Selaissie, K. 1994. Virus Diseases Infecting Pepper Crops in Turkey. In: Proceedings of 9<sup>th</sup> Congress of the Mediterranean Phytopathological Union, Kuşadası, Aydın, 1994, 469-472.
- Sammons, B., Barnet, O.W., Davis, R.F., Mizuki, M.K. 1989. A Survey of Viruses Infecting Yellow Summer Squash in South Carolina. *Plant Disease*, 73: 401-404.
- Wien, H.C. 1997. Peppers. The Physiology of Vegetable Crops. UK at The University Press, Cambridge.
- Yıldız, M., Erkan, S., Delen, N. 1990. Sera Sebze Yetiştiriciliğinin Hastalıklar Açısından Durumu. Türkiye 5. Seracılık Sempozyumu, İzmir, s.155-164.
- Zitter, T.A. Florini,D. 1984. Virus Diseases of Pepper. Vegetable MD Online, Vegetable Crops, Fact Sheet Page: 736.00, Cornell University, New York State.