

Yemelik Baklagil Tohumlarıyla Taşınan Bazı Virüslerin Tespiti, Biyolojik ve Moleküler Karakterizasyonu[&]

Mehmet Zeki KIZMAZ^{1*}, Mustafa GÜMÜŞ²

¹Dicle Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Diyarbakır

²Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, İzmir

*Sorumlu Yazar: mehmet.kizmaz@dicle.edu.tr

Geliş Tarihi: 06.04.2021 Düzeltme Geliş Tarihi: 24.05.2021 Kabul Tarihi: 01.07.2021

Öz

Bu çalışma, 2017 yılında Türkiye'nin farklı illerindeki üreticilerden ve firmalardan temin edilen bakla, bezelye, mercimek ve nohut tohum örneklerinde Alfalfa mosaic alfamovirus (AMV), Bean yellow mosaic potyvirus (BYMV), Cucumber mosaic cucumovirus (CMV) ve Pea seed-borne mosaic potyvirus (PSbMV) virüslerinin bulunma durumunun belirlenmesi ve tespit edilen virüslerin biyolojik ve moleküler karakterizasyonunun yapılması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Tohum örneklerinde virüslerin saptanmasında, DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri kullanılmıştır. Tespit edilen virüsler mekanik inokulasyonla test bitkilerine taşınarak biyolojik karakterizasyonu yapılmıştır. Daha sonra RT-PCR yöntemiyle çoğaltılan virüslerin CP (kılıf protein) gen bölgelerinin dizi analizleri yapılarak, MEGA programı vasıtasıyla dünya izolatlarıyla karşılaştırılmalı olarak filogenetik analizi gerçekleştirilmiştir. Toplamda 30 adet bakla, 25 adet bezelye, 50 adet mercimek ve 100 adet nohut tohum örneği testlenmiştir. Test sonuçlarına göre, bakla tohum örneklerinde CMV (%3.33) ve PSbMV (%3.33), mercimek tohum örneklerinde BYMV (% 2.00) ve CMV (% 2.00) ve nohut tohum örneklerinde AMV (% 1.00), BYMV (% 2.00), CMV (% 1.00) ve PSbMV (% 3.00) virüslerine rastlanırken, bezelye tohumlarında herhangi bir virüse rastlanmamıştır. Ayrıca, mercimekte BYMV+CMV, baklada CMV+PSbMV ve nohutta AMV+BYMV+PSbMV çoklu enfeksiyonları tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen filogenetik analize göre, en yüksek nükleotid benzerliği AMV (nohut) izolatu ile Rusya izolatu (97.73), BYMV (nohut) izolatu ile Amerika izolatu (% 98.51), CMV (nohut) izolatu ile Polonya izolatu (% 98.54), PSbMV (nohut) izolatu ile Çin ve Almanya izolatları (% 98.98), BYMV (mercimek) izolatu ile Hindistan izolatu (% 94.47) ve PSbMV (bakla) izolatu ile Yunanistan izolatu (% 99.45) arasında tespit edilmiştir. Bizim literatür bilgilerimize göre, baklada PSbMV, Nohutta BYMV, CMV ve PSbMV virüsleri ülkemizde ilk kez belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Baklagiller, tohum, bitki virüsleri, karakterizasyon.

Detection, Biological and Molecular Characterization of Some Viruses Transmitted By Seeds of Edible Leguminous

Abstract

This study was carried out to determine the presence of Alfalfa mosaic alfamovirus (AMV), Bean yellow mosaic potyvirus (BYMV), Cucumber mosaic cucumovirus (CMV), and Pea seed-borne mosaic potyvirus (PSbMV) in broad bean, pea, lentil, and chickpea seed samples obtained from producers and companies from different provinces of Turkey in 2017 and to perform biological and molecular characterization of the detected viruses. DAS-ELISA and RT-PCR methods were used to detect viruses in seed samples. The detected viruses were transported to test plants by mechanical inoculation and their biological characterization was made. Afterward, the sequence analysis of the CP gene (coat protein) regions of the viruses amplified by RT-PCR method was performed, and the phylogenetic analysis of the identified sequences and the same isolates registered in the GenBank was performed using the MEGA program. A total of 30 broad beans, 25 peas, 50 lentils and 100 chickpea seed samples were tested. According to detection test results, CMV (3.33%) and

PSbMV (3.33%) in broad bean, BYMV (2.00%) and CMV (2.00%) in lentil and AMV (1.00%), BYMV (2.00%), CMV (1.00%) in chickpea and PSbMV (3.00%) were found, but the viruses could not be detected in pea seed samples. Besides, multiple infections were detected by BYMV+CMV in lentil, CMV+PSbMV in pod, and AMV+BYMV+PSbMV in chickpea. According to the phylogenetic analysis, AMV (chickpea) isolate and Russia isolate (97.73%), BYMV (chickpea) isolate and American isolate (98.51%), CMV (chickpea) isolate and Polish isolate (98.54%), PSbMV (chickpea) isolate and China and Germany isolates (98.98%), BYMV (lentil) isolate and Indian isolate (94.47%), PSbMV (broad bean) isolate and Greece isolate (99.45%) were found to be highly similar. According to our literature information, PSbMV in broad bean, BYMV, CMV, and PSbMV have been identified first time in Turkey.

Key words: Leguminous, seed, plant viruses, characterization.

Giriş

Yaklaşık 500 cins ve 12 bin tür otsu, çalı ve ağaç formunda bitki bulunduran *Leguminosae* (*Fabaceae*) familyası *Papilionatae*, *Caesalpinoideae* ve *Mimosoideae* alt familyalarına ayrılmaktadır (Edwardson ve Christie, 2018). Yemelik baklagiller olarak adlandırılan bakla (*Vicia faba*), bezelye (*Pisum sativum*), mercimek (*Lens culinaris*), nohut (*Cicer arietinum*) bitkileri *Papilionatae* alt familyası içinde yer alan ve dünya çapında yetiştiriciliği yapılan en önemli baklagil türleridir (Lewis ve ark., 2005). Baklagil bitkileri insan ve hayvan beslenmesinde kullanılan bitkiler arasında hububatlardan sonra ikinci sırada bulunmaktadır. Besin değeri olarak hububat tohumlarından 2-3 kat daha fazla protein içermeleri nedeniyle insan beslenmesinde önemli yer tutmakta ve çiftlik hayvanları için kaliteli yem kaynağı olarak kullanılmaktadırlar. Yeşil gübre olarak kullanılmalarının yanısıra, *Rhizobium* bakterileriyle ortak yaşam kurmaları sayesinde bitkilerin azot ihtiyacının karşılanması ve toprağın azot içeriğinin artırılmasında katkı sağlamaktadırlar. Azotlu gübrelerin üretimi ve kullanımından kaynaklı çevre sorunlarının azaltılmasına da yardımcı olurlar. (Edwardson ve Christie, 2018).

Virüs hastalıkları tropik ve subtropik bölgelerde yemelik baklagil üretimini sınırlayan başlıca biyotik faktörlerden biri olup, kültürü yapılan baklagillerde hastalık meydana getiren farklı cinslere ait yaklaşık 150 virüs olduğu belirlenmiştir (Loebenstein ve Thottappilly, 2003; Rao ve ark., 2008; Sastry ve Zitter, 2014; ICTV, 2020). Alfalfa mosaic alfamovirus (AMV), Bean yellow mosaic potyvirus (BYMV), Cucumber mosaic cucumovirus (CMV) ve Pea seed-borne mosaic potyvirus (PSbMV) gibi tohum kaynaklı virüsler dünya çapında yayılım göstermekte ve çeşitli baklagillerde hastalık meydana getirmektedir (Albrechtsen, 2006; Sastry, 2013). Dünyada kültür bitkilerinin yaklaşık % 90'ının tohum aracılığıyla yetiştirilmesi nedeniyle, tohumla taşınan bitki

tohum oluşumunun engellenmesine, tohumun çimlenme yeteneğinin azalmasına veya kaybolmasına, tohumlarda renk ve şekil bozukluklarına ve bunlara bağlı olarak ürün miktarı ve kalitesinde azalmaya neden olmaktadır. Ayrıca virüslere karşı mücadelede yapılan harcamalar ve oluşan maliyetler dolaylı olarak zarar vermektedir. Enfekteli tohumların primer enfeksiyon kaynağı olması, bu tohumlardan oluşan bitkilerin sekonder inokulum kaynağı oluşturması, tohum vasıtasıyla virüslerin dünya geneline yayılması ve virüslerin yıldan yıla taşınarak devamlılık kazanmasına neden olduğu için tohum enfeksiyonları virüs ekolojisi ve epidemiyolojisi yönünden büyük öneme sahiptir (Erkan, 1998; Albrechtsen, 2006; Sastry, 2013).

Tohum kökenli virüs hastalıklarının baklagil bitkilerinin gelişimi ve verimi üzerine etkisi, bitki tür ve çeşidi, virüsün ırkı, enfeksiyon zamanı, mevsim, lokasyon ve iklim faktörlerine bağlı olarak değişmektedir (Jones ve Barbetti, 2012). Farklı araştırmacılar tarafından yapılan tarla denemelerinde, AMV'nin baklada % 45, mercimekte % 81-87 ve nohutta % 98 (Latham ve ark., 2004); BYMV'nin baklada % 45 (Al-khalaf ve ark., 2010) ve mercimekte % 96 (Kumari ve ark., 1994); CMV'nin fasulyede % 5-75 (Morales, 2003; Schwartz ve ark., 2005), mercimekte % 80-90 (Latham ve ark., 2004) ve nohutta % 80 (Jones ve ark., 2008); PSbMV'nin baklada % 40.5 (Makkouk ve ark., 1993), bezelyede % 25 (Coutts ve ark., 2009) ve mercimekte % 96 (Coutts ve ark., 2008) verim kaybına neden olduğu bildirilmiştir.

Ülkemizde temel besin kaynağı olan baklagillerde sorun olan virüslere yönelik yapılan çeşitli araştırmalar bulunmaktadır (Yeken ve ark., 2018). Bu çalışmada, dünyada ve ülkemizde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan bakla, bezelye, mercimek ve nohut bitkilerinde tohumla taşınan AMV, BYMV, CMV ve PSbMV virüslerinin ülkemizdeki bulunma durumu belirlenmiştir. Elde edilen izolatlar mekanik inokulasyonla test bitkilerine taşınarak biyolojik karakterizasyonu ve CP gen bölgesine dayalı moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

virüsleri büyük problem oluşturmaktadır (Erkan, 1998). Bitkilerde hastalık meydana getirerek;

Materyal ve Metot

Tohum örneklerinin toplanması

Çalışmanın ana materyalini çiftçi ve firmalardan toplanan tohum örnekleri oluşturmuştur. ISTA (2017) örnekleme listesindeki 20.000 kg ve üzeri miktarlardaki lot büyüklüğünde alınacak örnek sayısı kriteri dikkate alınarak, bakla, bezelye, mercimek ve nohut bitkilerinin ülke bazındaki tohum üretim miktarları üzerinden hesaplama yapılmış ve elde edilen sonuçlar 1/50 oranında azaltılarak toplanılan minimum örnek sayıları belirlenmiştir (Çizelge 1).

DAS-ELISA testi

Toplanan tohum örnekleri öncelikle çimlendirilip gerçek yaprakları oluştuktan sonra bitkiler DAS-ELISA yöntemi ile AMV, BYMV, CMV ve PSbMV virüsleri için testlenmiştir. DAS-ELISA testi Clark ve Adams (1977) ve kitin temin edildiği BIOREBA (Reinach, Switzerland) firmasının önerileri dikkate alınarak uygulanmıştır.

Mekanik inokulasyon çalışmaları

DAS-ELISA sonucunda virüsle enfekteli olduğu tespit edilen örneklerden elde edilen virüs izolatları *Chenopodium quinoa*, *Vicia faba*, *Datura stramonium* ve *Nicotiana rustica* bitkilerine mekanik inokulasyonla taşınarak biyolojik karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. AMV, BYMV, CMV ve PSbMV ile bulaşık nohut tohum örnekleri 1:3 (w/v) oranında fosfat tamponu (0.1 M, pH 7.2) eklenerek porselen havanlar içinde ekstrakte edilmiştir. Ekstrakte edilen bitki özleri tülbenkten geçirilerek seçilen test bitkilerine mekanik olarak taşınmıştır (Xu ve Nie, 2006).

Total nükleik asit (TNA) izolasyonu ve RT-PCR çalışmaları

TNA izolasyonu her örnek için çimlendirilen tohumlardan alınan yaklaşık 1 g yeşil aksam kullanılarak Foissac ve ark. (2001) tarafından bildirilen yöntem temel alınarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen TNA'lar diğer sonraki çalışmalarda kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

TNA izolasyonu yapılmış olan örneklerden cDNA sentezi için RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kiti (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır. Bu yöntemde göre; eppendorf

tüplerin içerisine 4-5 µl (0.1 ng -5 µg) TNA, 1 µl reverse primer konulup saf su ile 12 µl'ye tamamlanmıştır. Tüpler 70 °C'de 5 dk inkubasyon uygulandıktan sonra, içlerine sırasıyla 4 µl 5X reaction buffer, 1 µl Ribolock RNase inhibitör (20 U/µl), 2 µl 10 mM dNTP mix ve 1 µl RevertAid M-MuLV RT (200 U/µl) eklenmiştir. Daha sonra tüplere 42 °C'de 60 dk ve 70 °C'de 5 dk inkubasyon uygulanarak cDNA sentez aşaması tamamlanmıştır.

cDNA sentezi gerçekleştirilen örnekler Thermo Fisher Scientific firmasının PCR için önerdiği miktarlar dikkate alınarak 50 µl reaksiyon hacminde çoğaltılmıştır. Steril PCR tüplerine 25 µl PCR master mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, ABD), 2 µl forward primer, 2 µl reverse primer, 8 µl cDNA ve 13 µl nuclease free su eklenmiştir. Tüpler PCR cihazına yerleştirildi ve daha önceki çalışmalardan rapor edilen sıcaklık döngüleri kullanıldı (Çizelge 2).

Örneklerin yükleneceği jel, 100 ml 1X TAE tamponu içine 1.5 g agaroz konulup mikrodalga fırında 3-5 dakika tutularak hazırlanmıştır. 10 µl örneğe 2 µl EZ-Vision nükleik asit boyama maddesi eklenerek jelle yükleme yapılmıştır. Ayrıca, RT-PCR ürünlerinin boyutlarını tanımlamak için jelle 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, ABD) yüklenmiştir. Elektroforez koşumu, 90 V'da 60 dk süreyle ve 1X TAE çözeltisi içerisinde uygulanmıştır. Daha sonra jel UV transilimünatör vasıtasıyla görüntülenerek değerlendirme yapılmıştır.

DNA dizi analizi ve bioenformatik çalışmalar

RT-PCR çalışmaları sonucunda çoğaltılan virüs hedef bölgeleri hizmet alımı yoluyla (Triogen Biyoteknoloji, İstanbul) dizi analizleri gerçekleştirilmiştir. Firmadan gelen virüs izolatlarının forward ve reverse kromotogram dosyaları MEGA-X programı kullanılarak hizalama yapıp konsensüs diziler elde edilmiştir. Elde edilen konsensüs dizileri NCBI veri tabanında bulunan referans izolatlarla karşılaştırmalı olarak filogenetik analiz gerçekleştirilip, neighbor-joining yöntemine göre filogenetik ağaçlar elde edilmiştir. Karşılaştırılması yapılan referans diziler hizalama yapılarak nükleotit ve aminoasit dizilerinin benzerlik oranları belirlenmiştir. Yerel izolatlara ait konsensüs diziler, NCBI veri tabanına kaydedilerek bioenformatik çalışmalar sonlandırılmıştır.

Çizelge 1. Türkiye'de araştırma konusu bitkilerin tohum üretim miktarları ve toplanan örnek sayıları.

Bitki adı	Üretilen tohum miktarı (ton)*	Tescilli çeşit sayısı**	Toplanan örnek sayısı
Bakla	704	3	~ 30
Bezelye	469	30	~ 20
Mercimek	1140	21	~50
Nohut	2300	21	~ 100

* Kaynak: GTHB, 2016

** Kaynak: GTHB, 2017

Çizelge 2. Moleküler çalışmalarda kullanılan primerler ve PCR Döngüleri.

Primer Adı	Primer Dizileri ve Kaynak	Hedef Bölge (bp)	PCR Döngüsü
AMV CP forward AMV CP reverse	5'-TGCGAATAGATGCCGGTTCTC-3' 5'-CATACCTTGACCTTAATCCAC-3' (Pourrahim ve Farzadfar, 2016)	880	1 x (95°C 12 .) 35x(95°C 45sn / 47°C 1dk / 72°C 1dk) 1x(72°C 10dk.)
BYMV CP forward BYMV CP reverse	5'-GTTCGATTCAATCCGAACAAG-3' 5'-GGAGGTGAAACCTCACTAATAC-3' (Al-Khalaf ve ark., 2008)	907	1 x (94°C 5 dk.) 35 x (94°C 1 dk / 50°C 1 dk / 72°C 2dk) 1 x (72°C 5dk)
CMV CP forward CMV CP reverse	5'-ATGGACAAATCTGAATCAAC-3' 5'-TCAAACCTGGGAGCACCC-3' (Kavyashri ve ark., 2016)	700	1x (94°C 3 dk.) 35x (94°C 1 dk/ 53°C 1 dk. / 72°C 2 dk) 1x (72°C 10 dk.)
PSbMV CP forward PSbMV CP reverse	GAAAGAGGAGGAGGACAGAAAG GGCTCTCATTCCGAGAAGATT (Giakountis ve ark., 2015)	833	1x(95°C 5dk.) 45x (95°C 20 sn./ 60°C 30 sn./ 72°C 30sn- 1dk) 1x(72°C 10 dk.)

Bulgular ve Tartışma

DAS-ELISA sonuçları

Çiftçilerden ve firmalardan toplanan 30 adet bakla, 25 adet bezelye, 50 adet mercimek ve 100 adet nohut tohum örneği AMV, BYMV, CMV ve PSbMV virüslerinin varlığını belirlemek için DAS-ELISA yöntemiyle testlenmiştir. DAS-ELISA sonucuna göre; 1 bakla, 1 mercimek ve 5 nohut tohum örneğinin virüsle enfekteli olduğu belirlenmiştir. Bezelye tohum örneklerinde ise virüse rastlanmamıştır (Çizelge 3). Daha önce yapılan çalışmalarda, AMV, BYMV, CMV ve PSbMV'nin bakla, bezelye, mercimek ve nohut bitkilerinde enfeksiyon oluşturduğu ve farklı oranlarda tohumla taşındığı farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Musil, 1966; Kaiser ve ark.,

1968; El-Attar ve ark., 1971a, 1971b; Kaiser ve Danesh, 1971; Eldin ve ark., 1981; Kaiser, 1981; Lundsgaard, 1981; Hampton, 1982; Mills ve Ahmed, 1984; Bos ve ark., 1988; Ouizbouben ve Fortass, 1997). Ülkemizde daha önce yapılmış çalışmalarda ise bakla bitkisinde BYMV, bezelye bitkisinde BYMV ve PSbMV, mercimek bitkisinde AMV, BYMV ve PSbMV ve nohut bitkisinde AMV virüslerinin varlığı bildirilmiştir (Fidan, 1988; Makkouk ve ark., 1993; Erdiller ve ark., 1997). Çalışmamızda ülkemiz için bakla bitkisinde PSbMV ve nohut bitkisinde BYMV, CMV ve PSbMV virüslerinin varlığı ilk kez tespit edilmiştir.

Çizelge 3. DAS-ELISA yöntemiyle enfekteli bulunan tohum örnek sayısı ve oranı.

Bitki Adı	Testlenen Örnek Sayısı	AMV		BYMV		CMV		PSbMV	
		a	b	a	b	a	b	a	b
Bakla	30	-	0.00	-	0.00	1	3.33	1	3.33
Bezelye	25	-	0.00	-	0.00	-	0.00	-	0.00
Mercimek	50	-	0.00	1	2.00	1	2.00	-	0.00
Nohut	100	1	1.00	2	2.00	1	1.00	3	3.00

a: Enfekteli tohum örnek sayısı, b: Enfekteli tohum örnek oranı (%).

Testlenen tohum örneklerinin bazıları tek virüsle enfekteliyken, bazı tohum örneklerinin birden fazla virüsle enfekteli olduğu belirlenmiştir. Bir bakla örneğinde CMV+PSbMV, bir mercimek örneğinde BYMV+CMV, bir nohut örneğinde CMV, bir nohut örneğinde BYMV, 2 nohut örneğinde

PSbMV ve bir nohut örneğinde AMV+BYMV+PSbMV virüsleri belirlenmiştir (Çizelge 4). Daha önce birden fazla virüsün aynı tohum örneğinde bulunabileceği bildirilmiştir (Jones ve Coutts, 1996).

Çizelge 4. Tohum örneklerinde bulunan enfeksiyon tipleri.

Enfeksiyon Tipi	Testlenen Tohum Türü			
	Bakla	Bezelye	Mercimek	Nohut
BYMV	-	-	-	1
CMV	-	-	-	1
PSbMV	-	-	-	2
BYMV+CMV	-	-	1	-
CMV+PSbMV	1	-	-	-
AMV+BYMV+PSbMV	-	-	-	1

Biyolojik karakterizasyon sonuçları

AMV, BYMV, PSbMV ve CMV ile bulaşık olduğu bilinen nohut tohum ekstraktları *C. quinoa*, *V. faba*, *D. stramonium*, *N. rustica* indikatör

bitkilerine inokule edilmiştir. Virüsler tarafından indüklenen belirtiler ve test bitkilerine gerçekleştirilen DAS-ELISA testi sonuçları aşağıdaki çizelgede özetlenmiştir (Çizelge 5).

Çizelge 5. Biyolojik karakterizasyon çalışmalarında oluşan belirtiler ve DAS-ELISA sonuçları.

Virüs Adı	İndikatör Bitki Adı	Virüsün meydana getirdiği belirtiler									DAS-ELISA sonucu
		B	KL		NL		K	YŞB	M	BÖ	
			L	S	L	S					
AMV	<i>C. quinoa</i>	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+
	<i>V. faba</i>	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
	<i>D. stramonium</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
	<i>N. rustica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
BYMV	<i>C. quinoa</i>	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
	<i>V. faba</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
	<i>D. stramonium</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
	<i>N. rustica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CMV	<i>C. quinoa</i>	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
	<i>V. faba</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
	<i>D. stramonium</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	<i>N. rustica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PSbMV	<i>C. quinoa</i>	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
	<i>V. faba</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
	<i>D. stramonium</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
	<i>N. rustica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

B: Bodurlaşma, S: Sistemik, L: Lokal, KL: Klorotik leke, NL: Nekrotik leke, K: Kloroz, YŞB: Yaprakta şekil bozukluğu, M: Mozaik, BÖ: Bitki ölümü

Biyolojik karakterizasyon konusunda daha önce yapılmış çalışmalar ve çalışmamızdan elde edilen sonuçlar göstermiştir ki mekanik inokulasyon yapılan test bitkilerinde görülen belirtiler, virüsün türü/ırkı, virüsün izole edildiği bitki ve bölge, kullanılan test bitkisinin türü ve çeşidine bağlı olarak çok yüksek çeşitlilik

göstermektedir (Erdiller ve ark., 1997; Fidan ve Yorgancı, 1990; Kararah ve ark. 2014; Kim ve ark., 2011; Sertkaya ve ark., 2017; Yardımcı ve ark., 2007, Xu ve Nie, 2006).

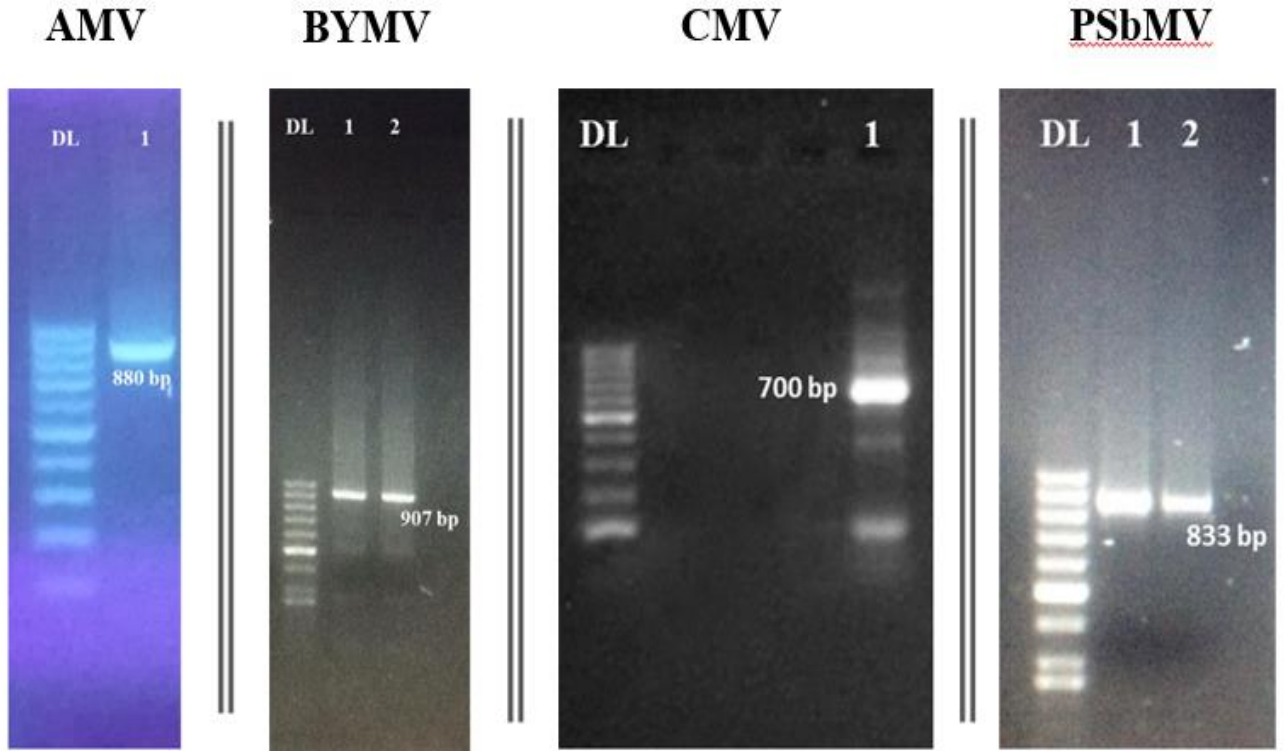
Biyolojik indeksleme yöntemiyle virüslerin belirtilere dayalı teşhisi tek başına yeterli olmayıp, daha hassas ikinci bir yöntemle teyit edilmeye ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda belirti

göstermeyen test bitkilerinde latent enfeksiyon olup olmadığı veya belirti gösteren test bitkilerinde enfeksiyonun araştırma konusu virüsten kaynaklı olduğunu teyit etmek amacıyla, test bitkilerinden örnekler alınarak DAS-ELISA yöntemiyle testlenmiştir. DAS-ELISA sonuçlarına göre BYMV ve CMV inokule edilen *N. rustica* bitkileri dışında tüm test bitkileri pozitif çıkmıştır. Ayrıca AMV ve PSbMV ile inokule edilen *N. rustica* bitkilerinde belirti oluşmamasına rağmen test sonucu pozitif çıkmıştır (Çizelge 5). Kelaniyangoda ve Madhubashini (2010) test sonucu negatif çıkan örneklerle ilgili olarak bitki tarafından salgılanan bazı engelleyicilerin virüs partikülüne bağlandığı ve bunların mekanizmasının

bilinmediğini ve bazı test bitkilerinin latent enfeksiyon geçirebileceğini bildirmişlerdir.

RT-PCR sonuçları

DAS-ELISA testleri sonucunda absorbens değerleri negatifin 2 katı olan tohum örnekleri ve absorbens değeri negatifin üzerinde olan virüsle bulaşık olduğundan şüphelenilen tohum örnekleri RT-PCR yöntemiyle testlenmiştir. Testlenen örneklerden birinde AMV (nohut), ikisinde BYMV (mercimek ve nohut), birinde CMV (nohut) ve ikisinde PSbMV (nohut ve bakla) virüslerinin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 1).

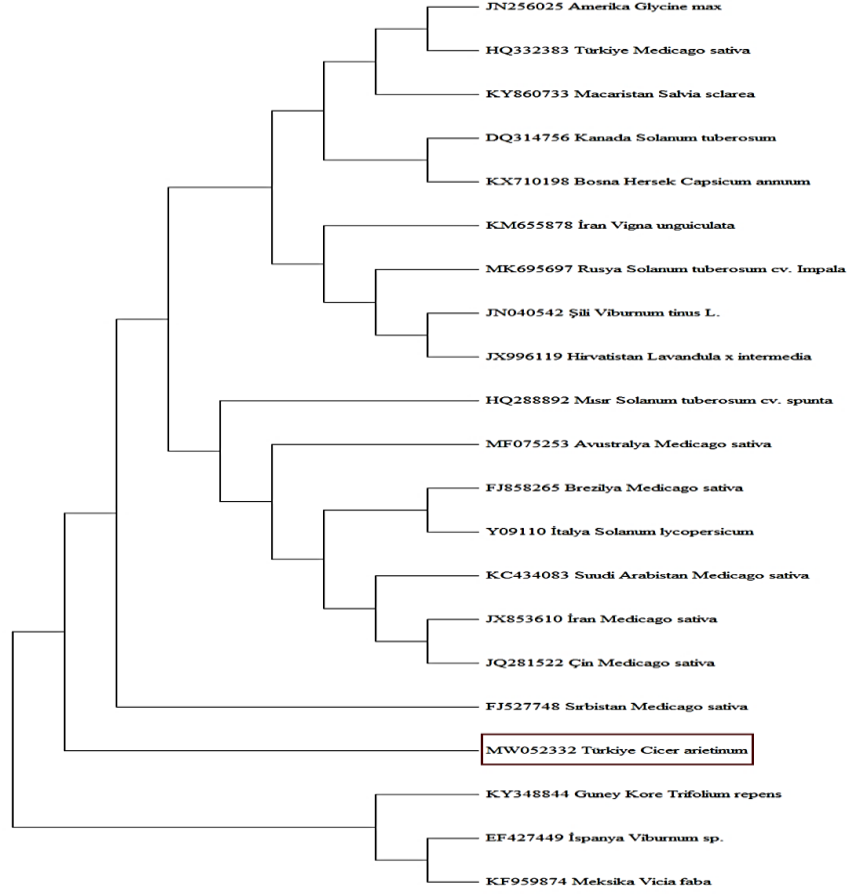


Şekil 1. PCR ürünlerinin UV görüntüsü.

Filogenetik analiz sonuçları

RT-PCR yöntemiyle çoğaltılan AMV nohut izolatu, BYMV nohut izolatu, CMV nohut izolatu, PSbMV nohut izolatu, BYMV mercimek izolatu ve PSbMV bakla izolatının hedef bölgelerinin dizi analizi yapılarak, Türkiye ve dünyadaki izolatlarla karşılaştırmalı olarak filogenetik analizi gerçekleştirilmiş, nükleotit ve aminoasit benzerlikleri belirlenmiştir.

Nohut AMV izolatının amplifiye edilen 666 bp uzunluğundaki CP nükleotit dizisinin (MW052332) filogenetik analizine göre, bizim izolatımız filogenetik olarak Sırbistan izolatu (FJ527748) ile yakın ilişki göstermiştir (Şekil 2). Yanı sıra bizim izolatımızın nükleotit ve amino asit dizisi benzerlik oranları sırasıyla % 93.25-97.73 ve %73.27-96.00 arasında değişkenlik göstermiştir (Çizelge 6).



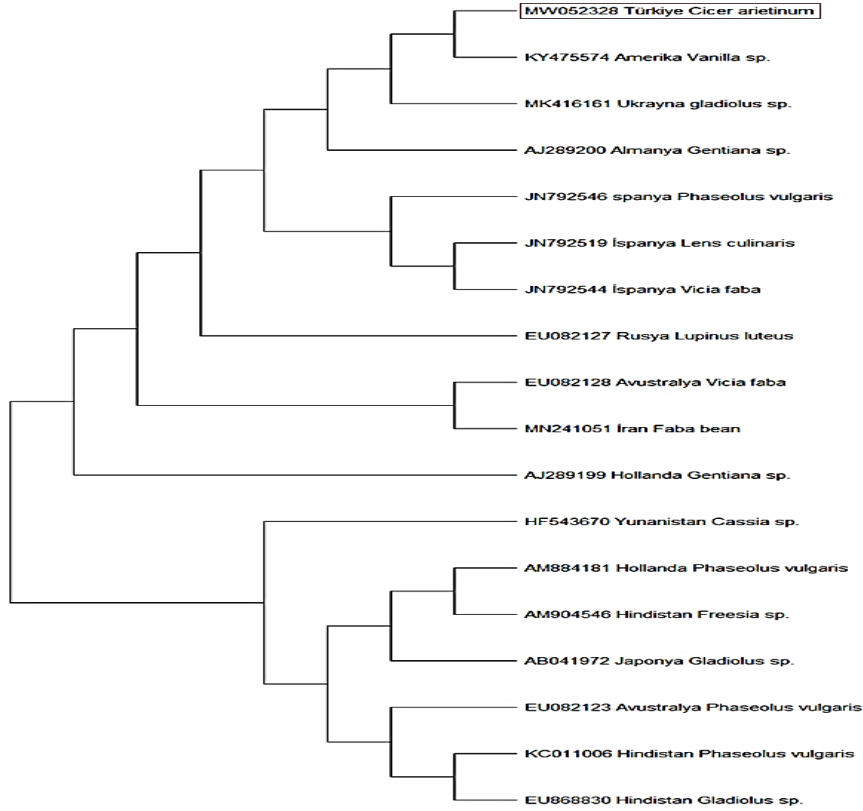
Şekil 2. AMV nohut izolatının klf protein gen bölgesine dayanarak oluşturulan filogenetik analizini gösteren dendrogram.

Çizelge 6. AMV nohut izolatı ile NCBI veri tabanında farklı konukçulardan alınan izolatların nükleotit ve aminoasit dizilerinin benzerlik oranları.

Erişim Numarası	Ülke	Konukçu	Nükleotit Benzerliği (%)	Aminoasit Benzerliği (%)
KM655878	İran	<i>Vigna unguiculata</i>	97.57	83.49
FJ527748	Sırbistan	<i>Medicago sativa</i>	97.14	82.57
KX710198	Bosna Hersek	<i>Capsicum annuum</i>	97.64	86.27
Y09110	İtalya	<i>Solanum lycopersicum</i>	96.51	82.81
JN040542	Şili	<i>Viburnum tinus L.</i>	97.48	85.29
JX996119	Hırvatistan	<i>Lavandula x intermedia</i>	97.32	85.78
MK695697	Rusya	<i>Solanum tuberosum cv. Impala</i>	97.73	96.00
DQ314756	Kanada	<i>Solanum tuberosum</i>	97.00	82.35
MF075253	Avustralya	<i>Medicago sativa</i>	96.70	82.81
HQ288892	Mısır	<i>Solanum tuberosum cv. Spunta</i>	96.70	81.90
FJ858265	Brezilya	<i>Medicago sativa</i>	96.56	82.81
JN256025	Amerika	<i>Glycine max</i>	96.55	82.81
JQ281522	Çin	<i>Medicago sativa</i>	95.68	82.81
JX853610	İran	<i>Medicago sativa</i>	95.66	82.81
KY348844	Güney Kore	<i>Trifolium repens</i>	93.25	79.19
EF427449	İspanya	<i>Viburnum sp.</i>	94.22	84.31
KC434083	Suudi Arabistan	<i>Medicago sativa</i>	95.69	95.51
KY860733	Macaristan	<i>Salvia sclarea</i>	97.14	84.44
KF959874	Meksika	<i>Vicia faba</i>	94.68	85.71
HQ332383	Türkiye	<i>Medicago sativa</i>	96.14	73.27

Nohut BYMV izolatının amplifiye edilen 750 bp uzunluğundaki CP nükleotit dizisinin (MW052328) filogenetik analizine göre, bizim izolatımız filogenetik olarak Amerikan izolatı (KY475574) ile yakın ilişki göstermiştir (Şekil 3).

Yanı sıra bizim izolatımızın nükleotit ve amino asit dizisi benzerlik oranları sırasıyla % 85.95-98.51 ve % 81.12-100.00 arasında değişkenlik göstermiştir (Çizelge 7).



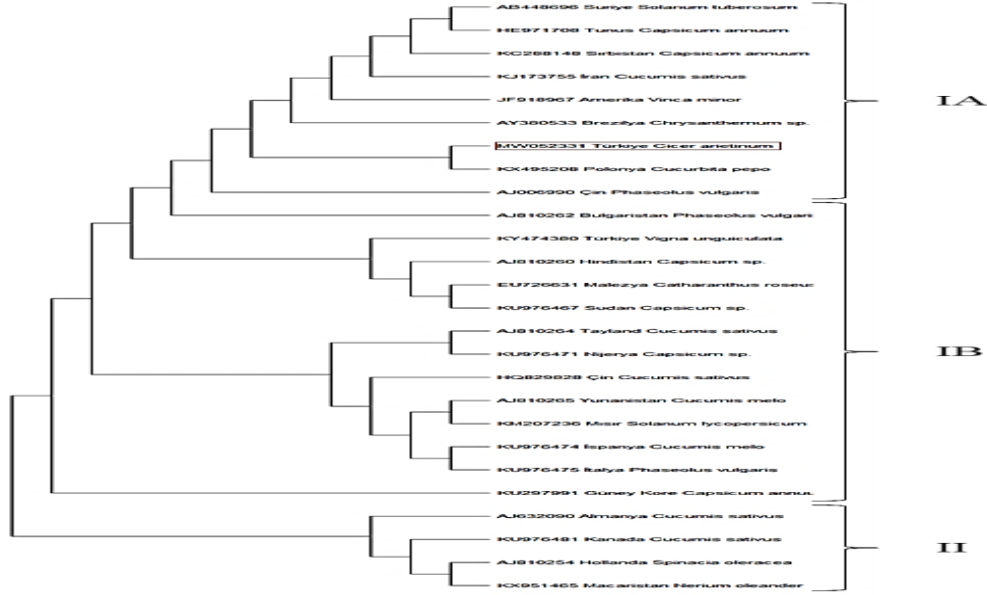
Şekil 3. BYMV nohut izolatının kılıf gen bölgesine dayanarak oluşturulan filogenetik analizini gösteren dendrogram

Çizelge 7. BYMV nohut izolatı ile NCBI veri tabanında farklı konukçulardan alınan izolatların nükleotit ve aminoasit dizilerinin benzerlik oranları.

Erişim Numarası	Ülke	Konukçu	Nükleotit Benzerliği (%)	Aminoasit Benzerliği (%)
EU082127	Rusya	<i>Lupinus luteus</i>	91.11	95.98
MK416161	Ukrayna	<i>Gladiolus sp.</i>	98.09	99.48
KY475574	Amerika	<i>Vanilla sp.</i>	98.51	99.44
AB041972	Japonya	<i>Gladiolus sp.</i>	87.86	92.77
AJ289200	Almanya	<i>Gentiana sp.</i>	98.08	98.66
EU082128	Avustralya	<i>Vicia faba</i>	87.47	95.98
KC011006	Hindistan	<i>Phaseolus vulgaris</i>	86.57	93.17
JN792544	İspanya	<i>Vicia faba</i>	96.52	100.00
JN792546	İspanya	<i>Phaseolus vulgaris</i>	96.52	99.28
AM884181	Hollanda	<i>Phaseolus vulgaris</i>	86.91	92.77
JN792519	İspanya	<i>Lens culinaris</i>	96.11	100.00
EU868830	Hindistan	<i>Gladiolus sp.</i>	86.54	81.12
EU082123	Avustralya	<i>Phaseolus vulgaris</i>	86.38	93.57
AM904546	Hindistan	<i>Freesia sp.</i>	85.97	91.16
AJ289199	Hollanda	<i>Gentiana sp.</i>	92.28	97.96
MN241051	İran	<i>Vicia faba</i>	85.95	96.38
HF543670	Yunanistan	<i>Cassia sp.</i>	88.66	98.53

Nohut CMV izolatının amplifiye edilen 633 bp uzunluğundaki CP nükleotit dizisinin (MW052331) filogenetik analizine göre, bizim izolatımız filogenetik olarak IA alt grubu içinde yer alan Polonya izolatı (KX495206) ile yakın ilişki

göstermiştir (Şekil 4). Yanı sıra bizim izolatımızın nükleotit ve amino asit dizisi benzerlik oranları sırasıyla % 78.05-98.54 ve % 83.60-99.39 arasında değişkenlik göstermiştir (Çizelge 8).



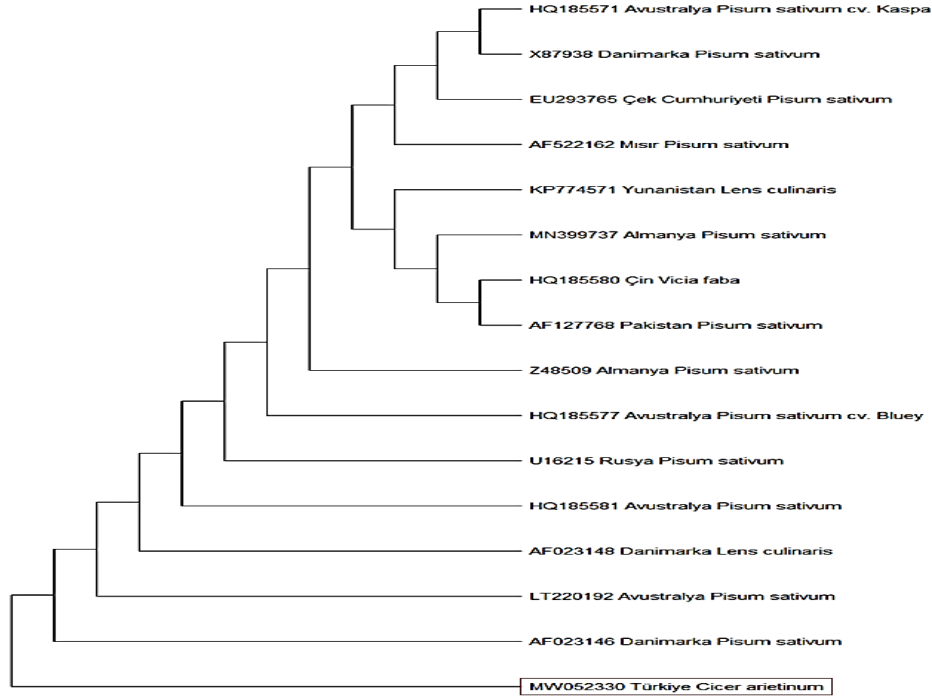
Şekil 4. CMV nohut izolatının kılıf gen bölgesine dayanarak oluşturulan filogenetik analizini gösteren dendrogram.

Çizelge 8. CMV nohut izolatı ile NCBI veri tabanında farklı konukçulardan alınan izolatların nükleotit ve aminoasit dizilerinin benzerlik oranları.

Erişim Numarası	Ülke	Konukçu	Nükleotit Benzerliği (%)	Aminoasit Benzerliği (%)
KX495206	Polonya	<i>Cucurbita pepo</i>	98.54	98.42
KJ173755	İran	<i>Cucumis sativus</i>	98.06	98.42
AY380533	Brezilya	<i>Chrysanthemum</i> sp.	97.90	97.89
AB448696	Suriye	<i>Solanum tuberosum</i>	97.90	98.42
KC288148	Sırbistan	<i>Capsicum annuum</i>	97.74	98.42
KM207236	Mısır	<i>Solanum lycopersicum</i>	97.26	97.37
JF918967	Amerika	<i>Vinca minor</i>	96.94	97.89
KU976474	İspanya	<i>Cucumis melo</i>	95.48	98.42
KU976475	İtalya	<i>Phaseolus vulgaris</i>	95.32	97.89
AJ006990	Çin	<i>Phaseolus vulgaris</i>	94.68	97.37
AJ810265	Yunanistan	<i>Cucumis melo</i>	94.52	97.37
AJ810262	Bulgaristan	<i>Phaseolus vulgaris</i>	94.52	98.42
KU976471	Nijerya	<i>Capsicum</i> sp.	94.52	97.89
AJ810264	Tayland	<i>Cucumis sativus</i>	94.21	97.37
HQ829828	Çin	<i>Cucumis sativus</i>	93.55	96.84
KU297991	Güney Kore	<i>Capsicum annuum</i>	92.75	95.79
AJ810260	Hindistan	<i>Capsicum</i> sp.	92.26	95.79
EU726631	Malezya	<i>Catharanthus roseus</i>	92.10	95.26
KU976467	Sudan	<i>Capsicum</i> sp.	91.94	96.32
HE971708	Tunus	<i>Capsicum annuum</i>	98.17	99.39
KY474380	Türkiye	<i>Vigna unguiculata</i>	92.20	96.59
KU976481	Kanada	<i>Cucumis sativus</i>	78.21	84.66
AJ810254	Hollanda	<i>Spanacia oleracea</i>	78.05	84.13
KX951465	Macaristan	<i>Nerium oleander</i>	77.72	83.60
AJ632090	Almanya	<i>Cucumis sativus</i>	78.42	85.39

Nohut PSbMV izolatının amplifiye edilen 792 bp uzunluğundaki CP nükleotit dizisinin (MW052330) filogenetik analizine göre, bizim izolatımız filogenetik olarak Çin (HQ185580) ve Almanya (MN399737) izolatları ile yakın ilişki

göstermiş ve diğer izolatlarla bir dış grup oluşturmuştur (Şekil 5). Yani sıra bizim izolatımızın nükleotit ve amino asit dizisi benzerlik oranları sırasıyla % 86.59-98.98 ve % 93.04-98.86 arasında değişkenlik göstermiştir (Çizelge 9).



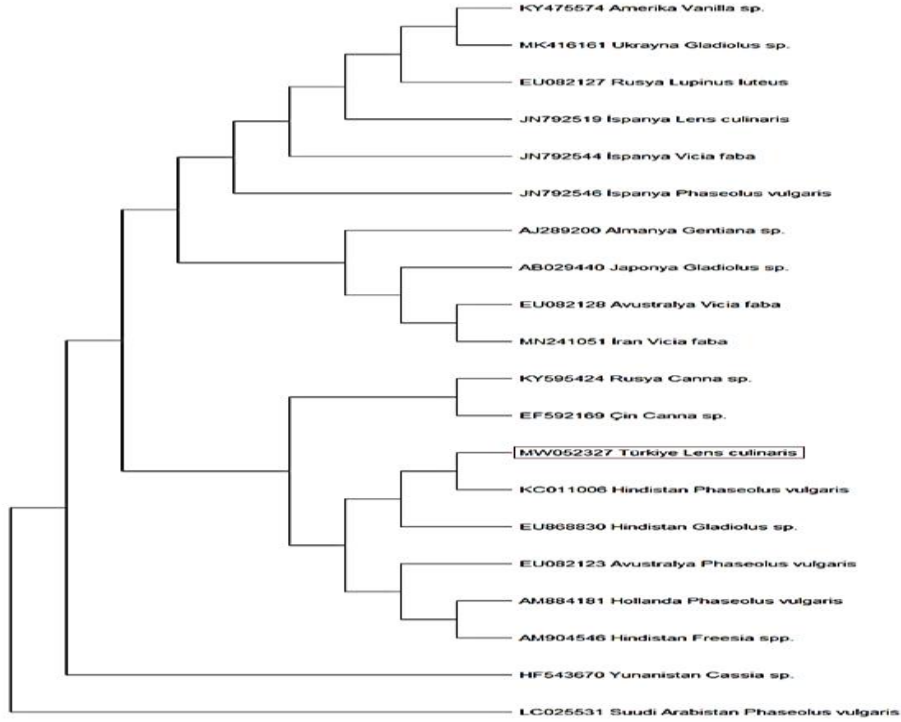
Şekil 5. PSbMV nohut izolatının kılıf gen bölgesine dayanarak oluşturulan filogenetik analizini gösteren dendrogram.

Çizelge 9. PSbMV nohut izolatı ile NCBI veri tabanında farklı konukçulardan alınan izolatların nükleotit ve aminoasit dizilerinin benzerlik oranları.

Erişim Numarası	Ülke	Konukçu	Nükleotit Benzerliği (%)	Aminoasit Benzerliği (%)
HQ185580	Çin	<i>Vicia faba</i>	98.98	98.86
KP774571	Yunanistan	<i>Lens culinaris</i>	98.57	98.80
U16215	Rusya	<i>Pisum sativum</i>	94.42	96.84
Z48509	Almanya	<i>Pisum sativum</i>	91.23	95.65
HQ185581	Avustralya	<i>Pisum sativum</i>	93.09	96.04
X87938	Danimarka	<i>Pisum sativum</i>	88.69	96.05
AF522162	Mısır	<i>Pisum sativum</i>	88.56	94.47
EU293765	Çek Cumhuriyeti	<i>Pisum sativum</i>	87.80	95.26
HQ185571	Avustralya	<i>Pisum sativum</i> cv. Kaska	86.59	94.62
LT220192	Avustralya	<i>Pisum sativum</i>	91.20	93.97
AF023148	Danimarka	<i>Lens culinaris</i>	90.40	93.91
AF023146	Danimarka	<i>Pisum sativum</i>	90.13	93.04
MN399737	Almanya	<i>Pisum sativum</i>	98.98	98.86
AF127768	Pakistan	<i>Pisum sativum</i>	98.86	98.86
HQ185577	Avustralya	<i>Pisum sativum</i> cv Bluey	95.17	96.96

Mercimek BYMV izolatının amplifiye edilen 822 bp uzunluğundaki CP nükleotit dizisinin (MW052327) filogenetik analizine göre, bizim izolatımız filogenetik olarak Hindistan (KC011006) izolatı ile yakın ilişki göstermiştir (Şekil 6). Yani sıra

bizim izolatımızın nükleotit ve amino asit dizisi benzerlik oranları sırasıyla % 80.47-94.47 ve % 84.56-97.83 arasında değişkenlik göstermiştir (Çizelge 10).



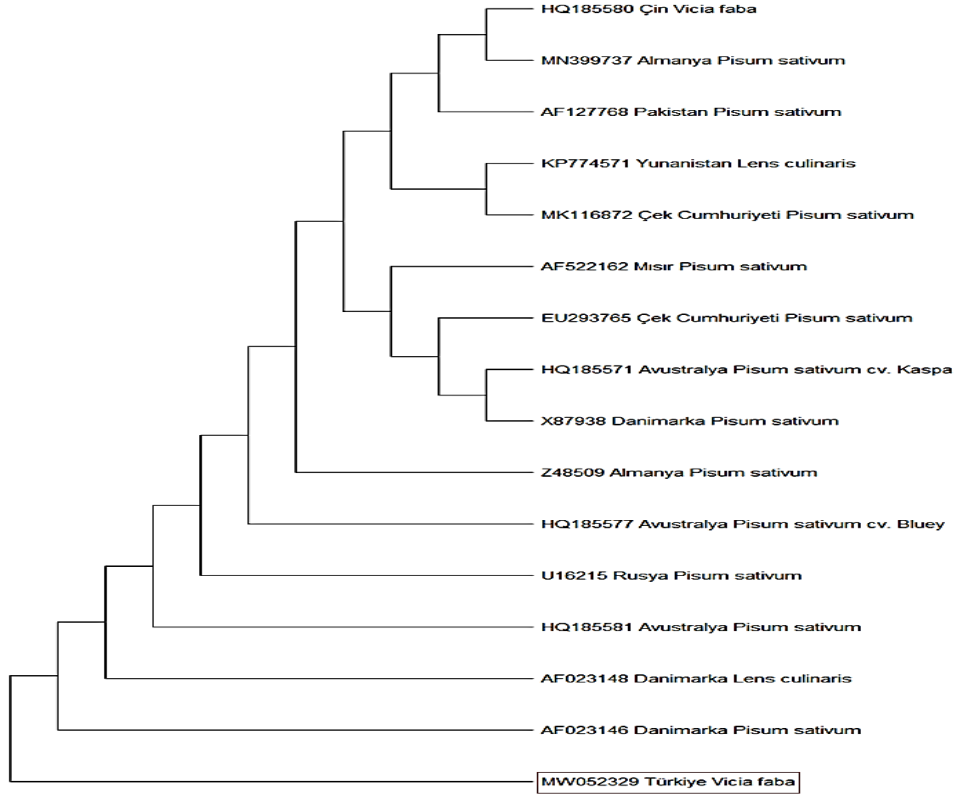
Şekil 6. BYMV mercimek izolatının kılıf gen bölgesine dayanarak oluşturulan filogenetik analizini gösteren dendrogram.

Çizelge 10. BYMV mercimek izolatı ile NCBI veri tabanında farklı konukçulardan alınan izolatların nükleotit ve aminoasit dizilerinin benzerlik oranları.

Erişim Numarası	Ülke	Konukçu	Nükleotit Benzerliği (%)	Aminoasit Benzerliği (%)
MN241051	İran	<i>Vicia faba</i>	80.47	92.92
KY595424	Rusya	<i>Canna sp.</i>	82.46	90.04
EF592169	Çin	<i>Canna sp.</i>	82.50	88.93
KC011006	Hindistan	<i>Phaseolus vulgaris</i>	94.47	96.32
EU868830	Hindistan	<i>Gladiolus sp.</i>	93.71	84.56
EU082123	Avustralya	<i>Phaseolus vulgaris</i>	91.19	93.41
AM884181	Hollanda	<i>Phaseolus vulgaris</i>	89.42	93.38
AM904546	Hindistan	<i>Freesia sp.</i>	89.23	93.75
HF543670	Yunanistan	<i>Cassia sp.</i>	85.27	96.32
LC025531	Suudi Arabistan	<i>Phaseolus vulgaris</i>	88.73	86.96
KY475574	Amerika	<i>Vanilla sp.</i>	82.50	94.94
MK416161	Ukrayna	<i>Gladiolus sp.</i>	82.67	94.79
EU082127	Rusya	<i>Lupinus luteus</i>	81.96	91.54
JN792519	İspanya	<i>Lens culinaris</i>	84.63	97.83
JN792544	İspanya	<i>Vicia faba</i>	84.40	97.83
JN792546	İspanya	<i>Phaseolus vulgaris</i>	84.40	97.10
AJ289200	Almanya	<i>Gentiana sp.</i>	86.65	96.64
AB029440	Japonya	<i>Gladiolus sp.</i>	81.99	91.54
EU082128	Avustralya	<i>Vicia faba</i>	81.02	90.81

Bakla PSbMV izolatının amplifiye edilen 756 bp uzunluğundaki CP nükleotit dizisinin (MW052329) filogenetik analizine göre, bizim izolatımız filogenetik olarak Yunanistan (KP774571) izolatı ile yakın ilişki göstermiş ve tek başına bir dış

grup oluşturmıştır (Şekil 7). Yanı sıra bizim izolatımızın nükleotit ve amino asit dizisi benzerlik oranları sırasıyla % 86.71-99.45 ve % 93.04-99.59 arasında değişkenlik göstermiştir (Çizelge 11).



Şekil 7. PSbMV bakla izolatının kılıf gen bölgesine dayanarak oluşturulan filogenetik analizini gösteren dendrogram.

Çizelge 11. PSbMV bakla izolatı ile NCBI veri tabanında farklı konukçulardan alınan izolatların nükleotit ve aminoasit dizilerinin benzerlik oranları.

Erişim Numarası	Ülke	Konukçu	Nükleotit Benzerliği (%)	Aminoasit Benzerliği (%)
HQ185580	Çin	<i>Vicia faba</i>	99.34	99.59
KP774571	Yunanistan	<i>Lens culinaris</i>	99.45	98.74
U16215	Rusya	<i>Pisum sativum</i>	94.69	96.68
Z48509	Almanya	<i>Pisum sativum</i>	91.10	95.44
HQ185581	Avustralya	<i>Pisum sativum</i>	92.88	96.04
X87938	Danimarka	<i>Pisum sativum</i>	88.84	95.85
AF522162	Mısır	<i>Pisum sativum</i>	88.44	94.19
EU293765	Çek Cumhuriyeti	<i>Pisum sativum</i>	87.90	95.02
MK116872	Çek Cumhuriyeti	<i>Pisum sativum</i>	99.20	99.59
HQ185571	Avustralya	<i>Pisum sativum</i> cv. Kaspas	86.71	94.62
AF023148	Danimarka	<i>Lens culinaris</i>	89.79	93.91
AF023146	Danimarka	<i>Pisum sativum</i>	89.79	93.04
MN399737	Almanya	<i>Pisum sativum</i>	99.34	99.59
AF127768	Pakistan	<i>Pisum sativum</i>	99.20	99.59
HQ185577	Avustralya	<i>Pisum sativum</i> cv Bluey	95.22	97.51

Bitki virüslerin teşhis ve tanısında farklı moleküler yaklaşımlar bulunmaktadır (Çelik ve Ertunç, 2021). Filogenetik analiz çalışmaları virüslerin evrimsel gelişim süreçleri hakkında aydınlatıcı bilgi veren yöntemlerdir. Filogenetik analiz sonuçları değerlendirildiğinde, bazı izolatların yüksek nükleotit ve amino asit benzerliği

gösterdiği, bazılarında nükleotit benzerliğinin amino asit benzerliğinden daha yüksek olduğu, bazılarında ise amino asit benzerliğinin nükleotit benzerliğinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum, yüksek benzerlik oranlarına rağmen yüksek genetik çeşitliliğin olabileceğini göstermektedir (Xu ve Nie, 2006; Al-Saleh ve ark.,

2014; Bergua ve ark., 2014). Bergua ve ark. (2014) tarafından birbirine yakın bölgelerden izolatların yüksek benzerlik gösterebildiği ifade edilirken, Xu ve Nie (2006) aynı bölge ve bitkiden alınan virüs izolatlarının dahi nükleotit dizilerinde farklılıklar gösterebildiğini ifade etmişlerdir. Ayrıca, Sharma ve ark. (2015) dünyanın farklı bölgelerinden ve farklı bitkilerden izole edilen izolatların yüksek benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Wylie ve ark. (2008) ise filogenetik ağaçta oluşan grupların izole edilen bitkiler ve coğrafik bölgeyle bağdaştırılabileceğini ifade etmektedirler.

Sonuç ve Öneriler

DAS-ELISA ve RT-PCR testleri sonucunda; bakla, mecimek ve nohut tohum örneklerinde farklı tiplerde tekli veya çoklu virüs enfeksiyonları belirlenirken, bezelye tohum örneklerinde araştırma konusu virüslere rastlanmamıştır. Tohum kökenli virüslerin erken teşhisi önem taşımaktadır. Bu nedenle, tohum üretimi yapan firmalar tarafından satış öncesi uluslararası standartlara uygun tohum sağlık testlerinin yapılması gerekmektedir. Biyolojik indeksleme çalışmaları sonucunda, elde edilen izolatların daha önceki çalışmalarda bildirilen virüslerle benzerlikleri ve farklılıkları bulunmaktadır. Virüs izolatlarının alındığı bölge, izole dildiği bitki türü/çeşidi ve kullanılan test bitkilerinin türüne göre biyolojik çeşitlilik gösterdiği belirlenmiştir. Virüslerin meydana getirdiği belirtiler diğer biyotik ve abiyotik etmenlerle benzerlik gösterdiğinden simptomatolojik teşhis zor olmaktadır. Belirtilerin virüs kaynaklı olup olmadığının kesin olarak belirlenmesi amacıyla ikinci bir yöntemle teyite ihtiyaç duymaktadır. Moleküler karakterizasyon çalışmaları kapsamında, çalışmamızdan elde edilen izolatlar ile dünya izolatları arasında yüksek benzerlik bulunmakta ve virüslerin türleri kendi içinde genetik çeşitlilik göstermektedir. Virüslerin CP gen bölgesine dayalı filogenetik analizi tür tayini için yeterli olsa da genetik çeşitliliğin daha detaylı belirlenmesi ve izolatlar arasındaki farklılıkların daha iyi anlaşılması amacıyla tüm genomu dayalı filogenetik analizin yapılması daha uygun olacaktır.

Teşekkür: Tez çalışmasının yürütülmesi sırasında çalışma ortamı ve imkânı sağlayan danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ'e, emekli olana kadar danışmanlığımı yürüten ve değerli görüşlerinden faydalandığım Sayın Prof. Dr. Semih ERKAN'a, değerli katkılarından dolayı Tez İzleme Komitesi üyeleri Sayın Prof. Dr. İbrahim DUMAN ve Sayın Doç. Dr. İsmail Can PAYLAN'a, tez savunma jürisine katılıp katkı sağlayan Sayın Prof. Dr. Saadetin BALOĞLU ve Sayın Prof. Dr. Ahmet BAYRAM'a ve gösterdikleri misafirperverlik için

görevli olarak bulunduğum Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü personeline teşekkür ederim.

Çıkar Çatışması Beyanı: Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti: Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

[&]Bu makale “Yemeklik Baklagil Tohumlarıyla Taşınan Bazı Virüslerin Teşhisi, Karakterizasyonu ve Mücadelesinde Çeşitli Tohum Uygulamalarının Etkinliğinin Araştırılması” adlı doktora tezinden üretilmiştir.

Kaynaklar

- Albrechtsen, S.E. 2006. Testing Methods for Seed Transmitted Viruses: Principles and Protocols, Danish Government Institute of Seed Pathology. Copenhagen, Denmark, 268p.
- Al-Khalaf, M., Kumari, S.G., Haj Kasem, A., Makkouk, K.M., Shalaby, A.-B.A. ve Al-Chaabı, S., 2008. Molecular characterization of a Bean yellow mosaic virus isolate from Syria. *Phytopathologia Mediterranea*, 47(3): 282-285.
- Al-khalaf, M.A., Kumari, S.G., Haj Kasem, A., Makkouk, K. ve Al-Chaabı, S. 2010. Bean yellow mosaic virus on cool-season food legumes and weeds: Distribution and its effect on faba bean yield and control in Syria. *Arab Journal of Plant Protection*, 28(1): 38-47.
- Al-Saleh, M.A., Amer, M.A., Al-Shahwan, I.M., Abdalla, O.A. ve Shakeel, M.T. 2014. Molecular characterization of two alfalfa mosaic virus isolates infecting potato crop in central region of Saudi Arabia. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16(5): 976-980.
- Bergua, M., Luis-Arteaga, M. ve Escriu, F. 2014. Genetic diversity, reassortment, and recombination in *Alfalfa mosaic virus* Population in Spain. *Virology*, 104(11): 1241-1250.
- Bos, L., Hampton, R.O. ve Makkouk, K.M. 1988. Viruses and virus diseases of pea, lentil, faba bean and chickpea. “Alınmıştır: World Crops: Cool Season Food Legumes.” (Eds.) Summerfield, R.J., Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 591-615.
- Clark, M.F. ve Adams, A.N. 1977. Characteristic of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant

- viruses. *Journal of General Virology*, 34(3): 475-483.
- Coutts, B.A., Prince, R.T. ve Jones, R.A.C. 2008. Further studies on Pea seed-borne mosaic virus in cool-season crop legumes: Responses to infection and seed quality defects. *Australian Journal of Agricultural Research*, 59: 1130-1145.
- Coutts, B.A., Prince, R.T. ve Jones, R.A.C. 2009. Quantifying effects of seedborne inoculum on virus spread, yield losses, and seed infection in the Pea seed-borne mosaic virus field pea pathosystem. *Phytopathology*, 99: 1156-1167.
- Çelik, A. ve Ertunç, F. 2021. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) of plum pox potyvirus Turkey (PPV-T) strain. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 1-9.
- Edwardson, J.R. ve Christie, R. 2018. Handbook of Viruses Infecting Legumes. CRC Press, Boca Raton, 505p.
- Eldin, A.S.G., El-Kady, M.A. ve El-Amrety, A.A. 1981. Pea mosaic virus (PMV) strain of Bean yellow mosaic virus isolated from pea. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 13: 23-28.
- El-Attar, S., Ghabrial, S.A. ve Nour-Eldin, F. 1971a. A strain of Alfalfa mosaic virus on broad bean in the Arab Republic of Egypt. *Agricultural Research Review*, 49: 277-284.
- El-Attar, S., Nour-Eldin, F. ve Ghabrial, S.A. 1971b. A strain of bean yellow mosaic virus naturally occurring on broad bean in the Arab Republic of Egypt. *Agricultural Research Review*, 49: 285-290.
- Erdiller G., Akbaş B. ve Sağır A. 1997. Survey of seedborne viruses in lentil seeds in Mardin province, *The Journal of Turkish Phytopathology*, 26(2-3): 69-75.
- Erkan, S. 1998. Tohum Patolojisi. Gözdem Ofis, İZMİR, 275 s.
- Fidan, Ü. 1988. Ege Bölgesinde Baklagillerde Görülen Virüs Hastalıklarının Tanılanması ve Tohumla Taşınma Durumlarının Belirlenmesi Üzerinde Araştırmalar. Doktora tezi, EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, 100s.
- Fidan, Ü. ve Yorgancı, Ü. 1990. Investigation on the detection and seed transmission of the virus diseases occurring on pulse crops in Aegean Region. *Journal of Turkish Phytopathology*, 19(1): 1-5.
- Foissac, X., Savalle-Dumas, L., Gentit, P., Dulucq, M.J. ve Candresse, T. 2001. Polyvalent detection of fruit tree Tricho, Capillo, and Foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine-containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulturae*, 550: 37-44.
- Giakountis, A., Skoufa, A., Paplomatas, E.I., Tokatlidis, I.S. ve Chatzivassiliou, E.K. 2015. Molecular characterization and phylogenetic analysis of a Greek lentil isolate of Pea seed-borne mosaic virus. *Phytoparasitica*, 43: 615-628.
- GTHB, 2016. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü Tohumculuk Daire Başkanlığı, Tohumculuk, T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Eğitim Yayın ve Yayınlar Dairesi Başkanlığı, 128s.
- GTHB, 2017. "Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Merkez Müdürlüğü, Kayıt Listeleri", <https://www.tarimorman.gov.tr/BUGEM/TTSM/Menu/30/Kayit-Listeleri> (Erişim tarihi: 29 Mart 2017).
- Hampton, R.O. 1982. Incidence of the lentil strain of Pea seed-borne mosaic virus as a contaminant of *Lens culinaris* germplasm. *Phytopathology*, 72: 695-698.
- ICTV, 2020. "International Committee on Taxonomy of Viruses", <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (Erişim tarihi: 29 Aralık 2020).
- ISTA, 2017. "International Rules for Seed Testing", https://www.seedtest.org/upload/cms/user/ISTA_Rules_2017_02_sampling.pdf (Erişim tarihi: 4 Nisan 2017).
- Jones, R.A.C. ve Barbetti, M.J. 2012. Influence of climate change on plant disease infections and epidemics caused by viruses and bacteria. *Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 7(22): 1-31.
- Jones, R.A.C. ve Coutts, B.A. 1996. Alfalfa mosaic and Cucumber mosaic virus infection in chickpea and lentil: incidence and seed transmission. *Annals of Applied Biology*, 129: 491-506.
- Jones, R.A.C., Coutts, B.A., Latham, L.J. ve McKirdy, S.J. 2008. Cucumber mosaic virus infection of chickpea stands: Temporal and spatial patterns of spread and yield-limiting potential. *Plant Pathology*, 57: 842-853.
- Kaiser, W.J. 1981. Disease of chickpea, lentil, pigeonpea and tepary bean in continental United States and Puerto Rico. *Economic Botany*, 35:300-320.
- Kaiser, W.J. ve Danesh, D. 1971. Etiology of virus-induced wilt of *Cicer arietinum*. *Phytopathology*, 61:453-457.
- Kaiser, W.J., Danesh, D., Okhovat, M. ve Mossahebi, H. 1968. Diseases of pulse crops

- (edible legumes) in Iran. *Plant Disease Reporter*, 52:687-691.
- Kararah, M., Om-Hashem, M., El-Banna, S., Zein, N. ve Abd-Elrehiem, A. 2014. Biological and serological studies on *Pea seed –borne mosaic virus* (PSbMV) on cowpea forage crop (*Vigna unguiculata* L.Walp). *Egyptian Journal of Virology*, 11(2): 288-310.
- Kavyashri, V.V., Pappachan, A., Padmaja, A.S., Nagaraju, N. ve Rangaswamy, K.T. 2016. Biological and molecular characterization of cucumber mosaic virus isolate causing severe mosaic in Gherkin (*Cucumis Anguria* L.) in India. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 10(3): 2089-2098.
- Kelaniyangoda, D.B. ve Madhubashini, L.W.M. 2010. Indicator plants: Tools for detecting Papaya ring spot potyvirus and Cucumber mosaic cucumovirus. *Journal of Food and Agriculture*, 1(2): 64-69.
- Kim, M.-K., Kwak, H.-R., Lee, S.-H., Kim, J.-S., Kim, K.-H., Cha, B.J. ve Choi, H.-S. 2011. Characteristics of Cucumber mosaic virus isolated from *Zea mays* in Korea. *Plant Pathology Journal*, 27(4):372-377.
- Kumari, S., Makkouk, K. ve Ismail, I.D. 1994. Seed transmission and yield loss induced in lentil by Bean yellow mosaic potyvirus. *Lens Newsletter*, 21(1): 42-44.
- Latham, L.J., Jones, R.A.C. ve Coutts, B.A. 2004. Yield losses caused by virus infection in four combination of non-persistently aphid transmitted virus and cool-season crop legume. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44(1): 57-63.
- Lewis, G., Schrire B., Mackinder, B. ve Lock, M. 2005. Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, U.K, 577p.
- Loebenstein, G. ve Thottappilly, G. 2003. Virus And Virus-Like Diseases of Major Crops in Developing Countries. Springer, Netherlands, 800p.
- Lundsgaard, T. 1981. Pea seedborne mosaic virus isolated from broad bean (*Vicia faba* L.) in Denmark. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 31(2): 116-122.
- Makkouk, K.M., Kumari, S.G. ve Bos, L. 1993. Pea seed-borne mosaic virus: Occurrence in faba bean (*Vicia faba*) and lentil (*Lens culinaris*) in West Asia and North Africa, and further information on host range, transmission characteristics, and purification. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 99:115-124.
- Mills, P.R. ve Ahmed, A.H. 1984. Host range and properties of cucumber mosaic virus (CMV-Su) infecting *Vicia faba* in Sudan. *FABIS Newsletter*, 9:31-33.
- Morales, F.J. 2003. Common bean. "Alınmıştır: *Virus and Virus-Like Diseases of Major Crops in Developing Countries.*" (Eds) Loebenstein, G. ve Thottappilly, G., Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 425-445.
- Musil, M. 1966. Über das Vorkommen des Virus des Blattrollens der Erbse in der Slowakei. *Biologia (Bratislava)*, 21:133-138.
- Pourrahim, R. ve Farzadfar, S. 2016. Biological and molecular characterization of Alfalfa mosaic virus infecting trumpet creeper (*Campsis radicans*) in Iran. *Journal of Phytopathology*, 164: 276-280.
- Quizbouben, A. ve Fortass, M. 1997. Survey of chickpea for viruses in Morocco. *EPPO Bulletin*, 27:249-254.
- Rao, G.P., Kumar, P.L. ve Holguin-Pen~a, R. J. H. 2008. Vegetable and Pulse Crops, Volume 3: Characterization Diagnosis and Management of Plant Viruses. Studium Press LLC, USA, 408p.
- Sastry, K.S. 2013. Seed-borne Plant Virus Diseases. Springer, India, 327p.
- Sastry, K.S. ve Zitter, T.A. 2014. Management of Virus and Viroid Diseases of Crops in the Tropics. "Alınmıştır: *Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics, Volume 2: Epidemiology and Management.*" (Eds.) Sastry, K.S. ve Zitter, T.A., Springer, Dordrecht, 149-480.
- Schwartz, H.F., Steadman, J.R., Hall, R. ve Foster, R.L. 2005. Compendium of Bean Diseases (2nd ed.). *American Phytopathological Society*, USA, 120 p.
- Sharma, P.N., Sharma, V., Sharma, A., Rajput, K. ve Sharma S.K. 2015. Identification and molecular characterization of Bean yellow mosaic virus infecting French bean in Himachal Pradesh. *Virus Disease*, 26(4): 315-318.
- Sertkaya, G., Çarpar, H. ve Sertkaya, E. 2017. Hatay ili patates üretim alanlarında Yonca Mozaik Virüsü (*Alfalfa Mosaic Virus: AMV*)'nün araştırılması. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(1): 23-29.
- Xu, H. ve Nie, J. 2006. Identification, characterization and molecular detection of Alfalfa mosaic virus in potato. *Phytopathology*, 96: 1237-1242.
- Wylie, S.J., Coutts, B.A., Jones, M.G.K. ve Jones, R.A.C. 2008. Phylogenetic analysis of *Bean yellow mosaic virus* isolates from four continents: Relationship between the seven groups found and their hosts and origins. *Plant Disease*, 92: 1596-1603.

Yardımcı, N., Eryiğit, H. ve Erdal, I. 2007. Effect of Alfalfa Mosaic Virus (AMV) on the content of some macro and micronutrients in alfalfa. *Journal of Culture Collections*, 5: 90-93.

Yeken, M. Z., Özer, G., Çelik, A., Çiftçi, V. 2018. Türkiye'de ticari fasulye (*Phaseolus vulgaris*

L.) çeşitlerinde bean common mosaic virus ve bean common mosaic necrosis virus etmenlerine dayanıklılıkla ilişkili genlerin karakterizasyonu. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 5(4): 613-619.