

Isparta, Hatay ve Hakkâri illerinde yonca yaprak kıvrıkcılığı virüsü (alfalfa leaf curl virus; ALCV)'nün PCR yöntemi ile araştırılması*

Nevin AKDURA¹, **Murat ŞEVİK**², **İsmail KARACA**³

¹Hakkari Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü, Hakkâri

²Necmettin Erbakan Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Klinik Öncesi Bilimleri Bölümü, Konya

³Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Isparta

*Bu çalışma Hakkâri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından finansal olarak desteklenmiştir (Proje No: FM20BAP4).

Alınış tarihi: 12 Ekim 2021, Kabul tarihi: 5 Nisan 2022

Sorumlu yazar: Nevin AKDURA, e-posta: nevinakdura@hakkari.edu.tr

Öz

Amaç: Bu çalışmada; Isparta, Hatay ve Hakkâri illeri yonca üretim alanlarında yonca yaprak kıvrıkcılığı virüsü (alfalfa leaf curl virus; ALCV)'nün bulunma durumunun moleküler yöntem ile ortaya konulması amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem: 2019-2020 yılları arasında Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi ile Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakülteleri'nin yonca uygulama alanlarından ve Hakkâri ilinde (Otluca Köyü) bulunan doğal alanlardan temin edilen yonca örnekleri ile çalışma yürütülmüştür. Çalışmada ALCV ile enfekte olduğu düşünülen 50 yaprak örneği toplanmıştır. ALCV'nin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction: PCR) yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. PCR uygulaması, ALCV'nin kılıf protein (Coat Protein: CP) genine spesifik 267 nükleotid uzunluğundaki gen bölgesinin çoğaltılması için gerçekleştirilmiştir.

Araştırma Bulguları: PCR çalışmaları sonucunda incelenen örneklerde ALCV tespit edilememiştir.

Sonuç: Bu çalışma, yonca bitkisinde ALCV'nin araştırılması bakımından ilk çalışma niteliğindedir.

Anahtar Kelimeler: Yonca yaprak kıvrıkcılığı virüsü, ALCV, PCR

Investigation of alfalfa leaf curl virus (ALCV) by PCR method in Isparta, Hatay and Hakkari provinces

Abstract

Objective: In this study; It is aimed to determine the presence of alfalfa leaf curl virus (ALCV) in the alfalfa production areas of Isparta, Hatay and Hakkari provinces by molecular method.

Materials and Methods: The study was carried out with alfalfa samples obtained from the alfalfa application areas of Isparta University of Applied Sciences and Hatay Mustafa Kemal University Faculty of Agriculture and natural areas in Hakkari (Otluca Village) between 2019-2020. 50 leaf samples thought to be infected with ALCV were collected in the study. The presence of ALCV was investigated using the polymerase chain reaction (PCR) method. PCR application was carried out to amplify the 267 nucleotide gene region specific to the coat protein (CP) gene of ALCV.

Results: ALCV could not be detected in the samples analyzed as a result of PCR studies.

Conclusion: This study is the first study in terms of investigating ALCV in alfalfa plant.

Keywords: Alfalfa leaf curl virus, ALCV, PCR

Giriş

Yonca (*Medicago sativa* L.) gerek besin değeri gerekse üretim kolaylığı açısından önemli bir ürün olup dünyada en çok yetiştiriciliği yapılan ve en eski yem bitkilerinin başında gelmektedir (Kaya, 2018). Yonca yetiştiriciliği yaklaşık 4000 yıldır yapılmaktadır (Yuego ve Cash, 2009). Genellikle

hayvan besini olarak kullanılmaktadır. Yonca yem bitkileri arasında diğerlerine oranla hektar başına daha fazla protein miktarına sahiptir (Rakhshani ve ark., 2009). Fungal, viral ve bakteriyel etmenler yonca ekim alanlarında önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Palumbo ve ark., 1998; Sisterson ve ark., 2010; Ali ve Gholam, 2011; Qin ve ark., 2016; Jovičić ve ark., 2016; Peterson ve ark., 2018). Yonca bitkisi, yonca mozaik virüsü (alfalfa mosaic virus; AMV), fasulye sarı mozaik virüsü (bean yellow mosaic virus; BYMV), hıyar mozaik virüsü (cucumber mosaic virus; CMV) gibi yaklaşık 31 virüsten etkilenmektedir (Paliwal, 1982; Rahman ve Peadar, 1993; Shah ve ark., 2006; Massumi ve ark., 2012; Al-Shahwan ve ark., 2017). Geminivirüsler, dünyanın birçok yerinde ortaya çıkan ve bitkileri enfekte eden tek iplikli (single strand: ss) DNA virüsleridir. Bu virüsler son 50 yılda tarımsal verimi önemli ölçüde etkilemektedir (Moffat, 1999). Monokotiledon ve dikotiledonların her ikisini de enfekte edebildikleri için dünyanın tropikal ve alt tropikal bölgelerinde bulunan gelişmekte olan ülkelerin gıda güvenliği için büyük bir tehdit oluşturmaktadırlar. Genellikle domates, mısır, pamuk ve nohut olmak üzere ekonomik olarak önemli mahsullerde ciddi verim kayıplarına sebep olmaktadır (Rey ve ark., 2012; Rybicki ve Petersen, 1999; Bock ve ark., 1974; Duffus ve Gold, 1973). Viral metagenomik tabanlı yaklaşımlar uygulanması ile bu virüs grubunun çeşitliliği ortaya çıkarılmıştır (Claverie ve ark., 2018; Roossinck ve ark., 2015). Bu ssDNA virüslerinin üzerinde en iyi çalışılanlar arasında *Geminiviridae* familyasındaki virüsler yer almaktadır. Geçtiğimiz kırk yıl içerisinde, Geminivirüslerin yol açtığı birkaç önemli bitki hastalığı dünya çapında ortaya çıkmış ve daha önce bilinmeyen ve bazen oldukça farklı geminivirüs türleri keşfedilmiştir (Bernardo ve ark., 2013; Bridson ve ark., 2010; Liang ve ark., 2015; Loconsole ve ark., 2012; Ma ve ark., 2015; Roumagnac ve ark., 2015; Varsanive ark., 2009; Yazdi ve ark., 2008).

Capulavirus cinsi, *Geminiviridae* familyasında, son on yılda keşfedilen yeni ve çeşitli geminivirüslerinde dahil edildiği yeni bir cinstir (Varsani ve ark., 2017). Bu cins içerisinde Güney ve Kuzey Avrupa, Hindistan Yarımadası ve Güney Afrika'da ekili ve ekili olmayan bitkileri enfekte eden alfalfa leaf curl virus, ALCV; euphorbia caput-medusae latent virus, EcmLV; french bean severe leaf curl virus, FbSLCV; plantago lanceolata latent virus, PLLV yer almaktadır (Bernardo ve ark., 2013; Susi ve ark., 2017). ALCV,

yonca bitkisinde ciddi hastalık belirtilerine neden olmaktadır ve yaygın olarak *Aphis craccivora* Koch yaprak biti türü ile taşınmaktadır (Davoodi ve ark., 2018a).

Bu çalışma ile Isparta, Hatay ve Hakkâri illeri yonca alanlarında ALCV'nin varlığının ortaya konulması için, kılıf protein genine spesifik 267 nükleotid uzunluğundaki gen bölgesinin çoğaltılmasını hedef alan primerler kullanılmış ve PCR yöntemi ile örnekler test edilmiştir.

Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlarda ALCV etmeninin varlığı Isparta, Hatay ve Hakkâri'den toplanan örneklerde belirlenmemiştir. Bu çalışma ülkemizde ilk çalışma olma niteliğindedir.

Materyal ve Yöntem

Örnek temini

2019-2020 yılları Nisan-Ekim ayları arasında Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi ile Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakülteleri'nin uygulama alanlarından ve Hakkâri ilinde (Otluca Köyü) bulunan doğal alanlardan yonca yaprak örnekleri toplanmıştır. Bitkiler görsel olarak tek tek incelenmiş olup ALCV semptomlarına benzer semptom gösteren bitkilerden 50 yaprak örneği (Isparta'dan 25, Hatay'dan 10 ve Hakkâri'den 15) alınmıştır. Örneklem yapılan alanların her birinden ALCV izolatu için en az 3'er yaprak örneği toplanmıştır. Arazi bölgesi bilgilerini içeren etiketler hazırlanarak zarflara konulup laboratuvara getirilerek kurutulup muhafaza edilmişlerdir.

Primer	Sekans dizilimi	Hedef Gen	Kaynak
ALCV-1 F	5'-TGG AAT ATT GTG CTG CTT GG-3'	Kılıf protein	Bernardo ve ark., 2016
ALCV-1 R	5'-ATT TTG GGA CTT GTG CTC CA-3'	Kılıf protein	

Primerlerin hazırlanması ve toplam nükleik asit izolasyonu

ALCV, kılıf protein geninin bir kısmını kapsayan primerler bu çalışmada kullanılmıştır. Bu dizilimler için tasarlanmış olan yaklaşık 267 baz çifti (base pair: bp) uzunluğundaki bölgeyi çoğaltmak için bir primer çifti sentezlettiler PCR aşamasında kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 1.'de gösterilmiştir. DNA izolasyonu, arazi çalışması ile toplanan yaprak örneklerinden Qiagen GmbH (Hilden, Almanya) firmasından temin edilen DNeasy Plant Mini Kiti ile firmanın protokolde belirttiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

PCR testi

PCR reaksiyon karışımı için; 5 µl 5X HotStart Hifidelity PCR tampon solüsyonu, 2.5 µl 10 mM Primer ALCV-1 F, ve 2.5 µl 10 mM Primer ALCV-1 R, 1 µl HotStart HiFidelity DNA Polimeraz ve 11.5 µl RNase içermeyen su ilave edilerek 50 örneklik PCR karışımı hazırlanmıştır. 50 örnek için etiketlenen her bir PCR tüpüne karışımdan 22,5 µl ve her örnekten 2.5 µl DNA ilave edildikten sonra tüpler PCR cihazına yerleştirilmiş ve amplifikasyon şartları 95°C'de 5 dakika ve daha sonra 94°C 1 dakika, 58°C 1 dakika ve 72°C 50 saniye süre ile 30 döngüyü tamamladıktan sonra 72°C'de 5 dakika bekletilerek ve son olarak da 4°C'de kalacak şekilde programlanmıştır.

Elde edilen PCR ürünleri, 100 bp plus DNA büyüklükte markör ile birlikte %1,5'lük agaroz jel içerisinde elektroforez yöntemiyle ayrıştırılıp, UV görüntüleme cihazında ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir.

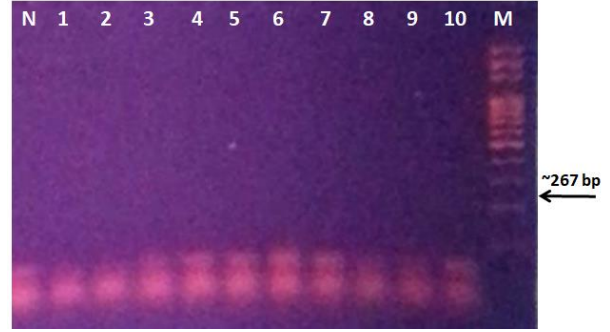
Bulgular ve Tartışma

ALCV ile bulaşık olduğu düşünülen şüpheli yonca bitkisi yaprak örneklerinde mozayik, kıvrılma, sararma, küçülme ve bitkide bodurlaşma gibi belirtiler gözlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Arazi çalışmasında yoncada gözlemlenen mozayik, kıvrıkcılık ve bodurlaşma belirtilerini gösteren bir yonca bitkisi fotoğrafı.

PCR testlerinde nukleaz içermeyen su örneği negatif kontrol olarak kullanılmıştır. ALCV ile enfekteli olduğu düşünülen yonca örnekleri ve kullanılan negatif kontrolde hedeflenen büyüklükte bir fragment elde edilmemiştir (Şekil 2).



Şekil 2. 1-10 nolu yonca örneklerinin PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforez analizi ile elde edilen görüntüleri (M; Marker, N.K; Negatif Kontrol-RNase içermeyen su)

Çalışma kapsamında PCR analizlerinde Isparta, Hatay ve Hakkâri illerinden toplanan yonca yaprak örneklerinde ALCV tespit edilmemiştir. Ülkemizde ALCV ile ilgili olarak bir araştırma yapılmadığı için yonca bitkisindeki etkisi bilinmemektedir. Bunun sonucu olarak belki de yem bitkisi olarak kullanılan yoncanın üretim değeri yüksek olmamakta ve kalitesinin düşmesi ile pazar payı bulunmamaktadır.

Yonca bitkisinde araştırılan başlıca virüslerden biri olan AMV, ülkemizde yaklaşık 40 yıl önce ilk olarak patatesten tespit edilmiştir (Çıtır, 1982). Son yıllarda yapılan çalışmalarda yonca bitkisinde Van ilinde moleküler, Hatay ili patates üretim alanlarında serolojik (DAS ELISA: Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) olarak tespit edilmiştir (Usta ve Güller, 2020; Sertkaya ve ark., 2017). Ülkemizde AMV dışında yonca bitkisinde viral etmen araştırılmamıştır.

ALCV'nin belirtilerine benzeyen bitki bodurluğu, yaprak kıvrılması, çökmesi ve buruşması gibi yonca hastalık belirtileri, 1950'lerden bu yana Avrupa'da (Fransa, Bulgaristan, Romanya ve İspanya dahil) ve Orta Doğu'da (Suudi Arabistan) bildirilmiştir (Alliot ve ark., 1972). Bu sorunun ele alınması büyük önem taşımaktadır, çünkü yonca dünyanın ılıman bölgelerinde en çok ekili olan çok yıllık yemlik baklagil bitkisidir (Annicchiarico, 2015).

2010-2014 yılları arasında Fransa ve İspanya'dan toplanan ALCV izolatları üzerine yapılan bir çalışma hem tür içi hem de türler arası rekombinasyonun, ALCV'nin evriminde önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Ek olarak, bu çalışma ALCV'nin muhtemelen Akdeniz havzasında da yaygın bir şekilde dağılımının olduğunu göstermiştir (Bernardo ve ark., 2016).

2017 yılında Ürdün (Ürdün vadisinden ve Ar Ramtha'dan 57 örnek), Lübnan (Batı ve Orta Beka

vadisinden 50 örnek), Suriye (Hama'dan 40 örnek) ve Tunus'dan (Beja, Bizerte, Ariana ve Manouba'dan 37 örnek) virüs belirtileri gösteren (yaprak kıvrılması, bodurluk, beneklilik ve yaprak kalınlaşması) toplam 184 yonca bitkisi toplanmıştır. Çalışmada, ALCV'nin kılıf protein geninin 267 baz çiftini çoğaltmak için PCR testi yapılmış ve 86 örnekte (Ürdün'den 37, Lübnan'dan 7, Suriye'den 22 ve Tunus'tan 20) ALCV'ye spesifik DNA tespit edilmiştir (Kumari ve ark., 2018). Ayrıca Ürdün, Lübnan, Suriye ve Tunus'tan gelen dört izolatin, genom bazında %94 ile %97,1 oranında birbirleri ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

ALCV daha sonra Akdeniz dışındaki ülkelerden İran ve Arjantin'de rapor edilmiştir (Davoodi ve ark., 2018b; Bejerman ve ark., 2018). Davoodi ve ark. (2018a), ALCV'nin evrimsel tarihini incelemiş ve son yıllarda ALCV'nin farklı ülkelerde yaygın bir şekilde tespit edilmesinin ya geçmiş teşhis önyargılarına ya da bu virüsün ortaya çıkıp küresel yayılımına bağlı olup olmadığını araştırmışlardır. 10 ülkeden elde edilen 120 ALCV tüm genom dizisi analiz edilmiş ve 4 ALCV genotipi (ALCV-A, ALCV-B, ALCV-C ve ALCV-D) açıkça ayırt edilmiştir. Bu çalışmaya göre, analiz edilen tüm konumlardan elde edilen dizi verileri, ALCV'nin Akdeniz havzasına ve Arjantin'e yayılmadan önce muhtemelen Orta Doğu'da ortaya çıktığı ve çeşitlendiği hipotezini desteklemektedir. 2015'ten 2017'ye kadar İran'ın 9 bölgesinden, yaprak kıvrıcılığı, marjinal kloroz ve şekil bozukluğu gösteren 137 yonca yaprak örneği toplanmıştır. Bu yonca örneklerinin DNA'ları, Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide metodu (CTAB) kullanılarak elde edilip, ALCV'nin varlığı PCR analizi ile araştırılmıştır. Toplam 22 yonca örneği ALCV için pozitif olarak tespit edilmiştir. Pozitif tespit edilen örnek sayısının beklenmedik şekilde düşük olması toplanan bitkilerde gözlenen semptomlarının diğer biyotik veya abiyotik streslerden kaynaklandığı veya PCR kaynaklı ALCV tespitinin etkinliğinin optimal olmadığı şeklinde yorumlanmıştır.

Bejerman ve ark. (2018) tarafından bodurluk gösteren yonca bitkilerinden izole edilen ALCV Arjantin izolatinin (ALCV-Arg) moleküler özellikleri araştırılmıştır. İkili karşılaştırmalarda, bu ALCV izolatu ile Avrupa ALCV izolatları arasında %83,2 ile %92,6 arasında sekans benzerliğinin olduğu tespit edilmiştir. Dizi karşılaştırmaları ve filogenetik analiz bu izolatin ALCV'nin A ve B suşlarının özelliklerini birleştirdiğini göstermiştir. Rekombinasyon analizi

ALCV-Arg'in ALCV A ve B suşları arasında intraspesifik bir rekombinasyonla üretilen rekombinant izolat olduğunu göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçları, yalnızca ALCV-Arg'in, A ve B suşlarının özelliklerini birleştirdiği için eşsiz olduğunu göstermekle kalmayıp ALCV'nin Amerika kıtasında yem mahsulünü doğal olarak etkilediğini belirlemiştir.

Sonuç ve Öneriler

Türkiye yonca üretim alanları ve üretim miktarı açısından geniş bir potansiyele sahiptir. Genel olarak bakıldığında yonca yem bitkisi olarak kullanıldığı için ALCV ile enfekteli alanların olmaması önemlidir. Yapılan bu çalışma ile Isparta, Hatay ve Hakkâri illerinde ALCV viral etmeninin tespit edilmeye çalışılması bir ilk olmuştur. Ayrıca ülkemizde de bu etmen üzerine daha önce yapılan bir çalışma bulunmamaktadır. ALCV'nin bu proje ile tespit edilememesi ülkemizdeki yaygınlığı hakkında yanıltıcı olmamalıdır. ALCV, *Aphis craccivora* Koch yaprak biti türü vektörü ile taşınabilmektedir. Bu vektörün varlığı da ülkemizde tespit edildiği için başka alanlarda ALCV etmeninin tespit edilme olasılığı bulunmaktadır. Bu virüsün İran'dan Amerika'ya yangınlığı ülkemizin bir geçiş alanı olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca virüs belirtisi sergileyen yonca yaprak örneklerinde ALCV'ye özgü yapılan moleküler çalışmaların negatif sonuç vermesi bu virüsün dışında farklı virüslerinde bulunabileceği şüphesini uyandırmıştır. Etmenin bu yöntem ile tespit edilmeye çalışılması planlanan ilgili yeni projeler için kaynak teşkil edecektir. Bu çalışma sonucunda ALCV'nin tespit edilmemesine rağmen farklı ülkelerde yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda ülkemizde daha kapsamlı çalışmaların yapılmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

Çıkar çatışması

Bu makalenin bilimsel, etik ve hukuki sorumluluğu bütünüyle biz yazarlara aittir. Makalenin yayımlanması ile ilgili olarak, yazarlar arasında bir çıkar çatışması olmadığını ve olması durumunda bunun muhtemel sonuçlarını bildiğimizi beyan ve kabul ederiz.

Yazarların katkı beyanı

Çalışmada N.A., M.Ş. ve İ.K.: örneklerin teminini; N.A ve M.Ş. ise moleküler çalışmaları gerçekleştirmişlerdir.

Kaynaklar

- Al-Shahwan, I. M., Abdalla, O. A., Al-Saleh, M. A., & Amer, M. A. (2017). Detection of new viruses in alfalfa, weeds & cultivated plants growing adjacent to alfalfa fields in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(6), 1336-1343.
- Ali, H., & Gholam, K. (2011). Detection and Identification of *Clavibacter michiganensis subsp. insidiosus* inducing Alfalfa Wilt Disease Using Specific PCR and Physiological Methods in Iran. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 15(2), 486-491.
- Alliot, B., Signoret, P. A., & Giannotti, J. (1972). Presentation of bacilliform virus-particles associated with enation disease of alfalfa (medicago-sativa l). *Cr. Acad. Sci. D Nat.*, 274, 1974-1976.
- Annicchiarico, P. (2015). Alfalfa forage yield and leaf/stem ratio: Narrow-sense heritability, genetic correlation, and parent selection procedures. *Euphytica*, 205, 409-420.
- Bejerman, N., Trucco, V., Breuil, S., Pardina, P. R., Lenardon, S., & Giolitti, F. (2018). Genome characterization of an Argentinean isolate of alfalfa leaf curl virus. *Archives of Virology*, 163, 799-803.
- Bernardo, P., Golden, M., Akram, M., Naimuddin, Nadarajan, N., Fernandez, E., Granier, M., Rebelo, A.G., Peterschmitt, M., & Martin, D.P. (2013). Identification and characterisation of a highly divergent geminivirus: Evolutionary and taxonomic implications. *Virus Res.*, 177, 35-45.
- Bernardo, P., Muhire, B., Francois, S., Deshoux, M., Hartnady, P., Farkas, K., Kraberger, S., Filloux, D., Fernandez, E., Galzi, S., Ferdinand, R., Granier, M., Marais, A., Monge Blasco, P., Candresse, T., Escriu, F., Varsani, A., Harkins, G. W., Martin, D. P., & Roumagnac, P. (2016). Molecular characterization and prevalence of two capulaviruses: alfalfa leaf curl virus from France and euphorbia caputmedusae latent virus from South Africa. *Virology*, 493, 142-153.
- Bock, K. R., Guthrie, E. J., & Woods, R. D. (1974). Purification of maize streak virus and its relationship to viruses associated with streak diseases of sugarcane and panicum maximum. *Ann. Appl. Biol.* 77, 289-296.
- Briddon, R. W., Heydarnejad, J., Khosrowfar, F., Massumi, H., Martin, D. P., & Varsani, A. (2010). Turnipcurlytopvirus, a highly divergent geminivirus infecting turnip in Iran. *Virus Res.*, 152, 169-175.
- Claverie, S., Bernardo, P., Kraberger, S., Hartnady, P., Lefevre, P., Lett, J. M., Galzi, S., Filloux, D., Harkins, G.W., & Varsani, A. (2018). From spatial metagenomics to molecular characterization of plant viruses: A geminivirus case study. *Adv. Virus Res.*, 101, 55-83.
- Çıtır, A. (1982). Erzurum ve çevresinde tohumluk patateslerdeki virüs hastalıkları ve bunların tanınması üzerinde bazı çalışmalar. *Doğa Bilim Dergisi*, 6(3): 99-109.
- Davoodi, Z., Bejerman, N., Richet, C., Filloux, D., Kumari, S. G., Chatzivassiliou, E. K., Galzi, S., Julian, C., Samarfard, S., Trucco, V., Giolitti, F., Fiallo-Olivé, E., Navas-Castillo, J., Asaad, N., Moukahel, A.R, Hijazi, J., Mghandef, S., Heydarnejad, J., Massumi, H., Varsani, A., Dietzgen, R. G., Harkins, G. W., Martin, D. P., & Roumagnac, P. (2018a). The Westward Journey of Alfalfa Leaf Curl Virus, *Viruses*, 10, 542. Erişim adresi <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-18-0571-PDN>
- Davoodi, Z., Heydarnejad, J., Massumi, H., Richet, C., Galzi, S., Filloux, D., & Roumagnac, P. (2018b). First report of alfalfa leaf curl virus from alfalfa in iran. *Plant Dis.*; 2385.
- Duffus, J. E., & Gold, A. H. (1973). Infectivity neutralization used in serological tests with partially purified beet curly top virus. *Phytopathology*, 63, 1107-1110.
- Jovičić, I., Radonjić, A., & Petrović-Obradović, O. (2016). Aphids (Hemiptera: Aphididae) on alfalfa and their Coccinellid predators in Serbia: seasonal abundance. *Acta Zoologica Bulgarica*, 68(4), 581-587.
- Kaya, K. (2018). Hatay ili yonca üretim alanlarında bulunan böcek faunasının tespiti ve bazı türlerin popülasyon yoğunlukları. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6(3), 352-359.
- Kumari, S. G., Moukahel, A. R., Richet, C., Galzi, S., Filloux, D., Roumagnac, A., Asaad, N., Hijazi, J., & Mghandef, S. (2018). First report of alfalfa leaf curl virus affecting alfalfa (Medicago sativa l.) in Jordan, Lebanon, Syria and Tunisia. *Plant Dis.*, 102, 2052.
- Liang, P., Navarro, B., Zhang, Z., Wang, H., Lu, M., Xiao, H., Wu, Q., Zhou, X., DiSerio, F., & Li, S. (2015). Identification and characterization of a novel geminivirus with monopartite genome infecting apple trees. *J.Gen.Virol.*, 96, 2411-2420.
- Loconsole, G., Saldarelli, P., Doddapaneni, H., Savino, V., Martelli, G. P. & Saponari, M. (2012). Identification of a single-stranded DNA virus associated with citrus chlorotic dwarf disease a new member in the family Geminiviridae. *Virology*, 432, 162-172.
- Ma, Y., Navarro, B., Zhang, Z., Lu, M., Zhou, X., Chi, S., DiSerio, F., & Li, S. (2015). Identification and molecular characterization of a novel monopartite

- geminivirus associated with mulberry mosaic dwarf disease. *J. Gen. Virol.*, 96, 2421-2434.
- Massumi, H., Maddahian, M., Heydarnejad, J., Hosseini Pour, A., & Farahmand, A. (2012). Incidence of Viruses Infecting Alfalfa in the Southeast and Central Regions of Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 14, 1141-1148.
- Moffat, A. S. (1999). Plant pathology geminiviruses emerge as serious crop threat. *Science*, 286, 1835.
- Paliwal, Y. C. (1982). Virus diseases of alfalfa and biology of *Alfalfa mosaic virus* in Ontario and western Quebec. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 4, 175-179.
- Palumbo, J. D., Phillips, D. A., & Kado, C.I. (1998). Characterization of a new *Agrobacterium tumefaciens* strain from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Archives of Microbiology*, 169, 381-386.
- Peterson, J. J., Samac, D. A., & Grau, C. R. (2018). First Report of Fusarium Wilt of Alfalfa Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* in Wisconsin. *Disease Notes*, 102(2), 447.
- Qin, F., Liu, D., Sun, B., Ruan, L., Ma, Z., & Wang, H. (2016). Identification of Alfalfa Leaf Diseases Using Image Recognition Technology. *PLoS ONE*, 11(12). Erişim adresi <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168274>
- Rahman, F., & Peadar, R. N. (1993). Incidence of Viruses on Alfalfa in Western North America. *Plant Disease*, 77, 160-162.
- Rakhshani, H., Ebadi, R., & Mohammadi A. A. (2009). Population dynamics of alfalfa aphids and their natural enemies, Isfahan, Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 11, 505-520.
- Rey, M. E. C., Ndunguru, J., Berrie, L. C., Paximadis, M., Berry, S., Cossa, N., Nuaila, V. N., Mabasa, K. G., Abraham, N., Rybicki, E. P., Martin, D., Pietersen, G., & Esterhuizen, L. L. (2012). Diversity of dicotyledenous infecting geminiviruses and their associated DNA molecules in southern Africa, including the South-west Indian ocean islands. *Viruses*, 4(9), 1753-1791.
- Roossinck, M. J., Martin, D. P., & Roumagnac, P. (2015). Plant virus metagenomics: Advances in virus discovery. *Phytopathology*, 105, 716-727.
- Roumagnac, P., Granier, M., Bernardo, P., Deshoux, M., Ferdinand, R., Galzi, S., Fernandez, E., Julian, C., Abt, I., Filloux, D., Mesleard, F., Varsani, A., Blanc, S., Martin, D. P., & Peterschmitt, M. (2015). Alfalfaleafcurlvirus: an aphid-transmitted geminivirus. *J. Virol.*, 89, 9683-9688.
- Rybicki, E. P., & Pietersen, G. (1999). Plant virus disease problems in the developing world. *Advances in Virus Research*, 53(53), 127.
- Sertkaya, G., Çarpar, H., & Sertkaya, E. (2017). Hatay İli Patates Üretim Alanlarında Yonca Mozaik Virüsü (*Alfalfa Mosaic Virus: AMV*)'nün Araştırılması. *İğdir Üni. Fen Bilimleri Enst. Der.*, 7(1), 23-29.
- Shah, D. A., Dillard, H. R., Mazumdar-Leighton, S., Gonsalves, D., & Nault, B. A. (2006). Incidence, spatial patterns, and associations among viruses in snap bean and alfalfa in New York. *Plant Disease*, 90, 203-210.
- Sisterson, M. S., Thammiraju, S. R., Patterson, K. L., Groves, R. L., & Daane, K. (2010). Epidemiology of Diseases Caused by *Xylella fastidiosa* in California: Evaluation of Alfalfa as a Source of Vectors and Inocula. *Plant Disease*, 94(7), 827-834.
- Susi, H., Laine, A. L., Filloux, D., Kraberger, S., Farkas, K., Bernardo, P., Frilander, M. J., Martin, D. P., Varsani, A., & Roumagnac, P. (2017). Genome sequences of a capulavirus infecting plantago lanceolata in the aland archipelago of finland. *Arch. Virol.*, 162, 2041-2045.
- Usta, M., & Güller, A. (2020). Van İlinde Yoncada Saptanan Yonca mozaik virüs (AMV) İzolatlarının Kılıf Protein Genomunun Moleküler Karakterizasyonu. *İğdir Üniversitesi Fen Bilimleri Enst. Der.*, 10(4), 2366-2377.
- Varsani, A., Shepherd, D. N., Dent, K., Monjane, A. L., Rybicki, E. P., & Martin, D. P. (2009). A highly divergent South African geminivirus species illuminates the ancient evolutionary history of this family. *Virol. J.*, 6, 36.
- Varsani, A., Roumagnac, P., Fuchs, M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Idris, A., Briddon, R. W., Rivera-Bustamante, R., Zerbini, F. M., & Martin, D.P. (2017). Capulavirus and grablovirus: Two new genera in the family geminiviridae. *Arch. Virol.*, 162, 1819-1831.
- Yazdi, H. R. B., Heydarnejad, J., & Massumi, H. (2008). Genome characterization and genetic diversity of beet curly top Iran virus: a geminivirus with a novel nonanucleotide. *Virus Genes*, 36, 539-545.
- Yuegao, H., & Cash, D. (2009). Global status and development trends of alfalfa. In: Alfalfa management guide for Ningxia. Cash D. (Ed.). *United Nations Food and Agriculture Organization, Beijing*, 1-12 p.