

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**FASULYE TOHUMLARINDAKİ
VİRAL ETMENLERİN SAPTANMASINDA
TANI YÖNTEMLERİNİN
DUYARLILIKLARININ İNCELENMESİ**

Kübra SAYAR

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Semih ERKAN

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 501.03.01

Sunuş Tarihi: 29.08.2013

Bornova-İZMİR

2013

Zir. Müh. Kübra SAYAR tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan “Fasulye Tohumlarındaki Viral Etmenlerin Saptanmasında Tanı Yöntemlerinin Duyarlılıklarının İncelenmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 29/08/13 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Semih ERKAN



Raportör Üye : Doç. Dr. Mustafa GÜMÜŞ



Üye : Prof. Dr. İbrahim DUMAN



ÖZET**FASULYE TOHUMLARINDAKİ VİRAL ETMENLERİN
SAPTANMASINDA TANI YÖNTEMLERİNİN DUYARLILIKLARININ
İNCELENMESİ**

SAYAR, Kübra

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Semih ERKAN

Ağustos 2013, 75 sayfa

Bu çalışma 2012-2013 yıllarında değişik firmalardan ve Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri bölümünden temin edilen 70 adet farklı fasulye tohum örneğinde virüslerin bulunma durumu ve bu virüslerin tanılanmasında kullanılan yöntemlerin duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür.

Temin edilen fasulye tohum örneklerinde viral etmenlerin tanılanmasında simptomatoloji, bitki yetiştirme, biyolojik endeksleme, seroloji ve moleküler yöntemler kullanılmıştır. Tohum örneklerinde 5 viral etmenin varlığı RT-PCR yöntemi, 4 virüsün tanılanması da DAS-ELISA yöntemi ile test edilerek bu yöntemlerin diğer yöntemlerle duyarlılık durumu kıyaslanmıştır.

Araştırma kapsamında testlenen toplam 70 tohum örneğinin RT-PCR yöntemi ile 69' u, DAS-ELISA yöntemi ile 62' si, biyolojik endeksleme ile 30' u tohumdaki belirtilerin görsel olarak incelenmesi ile 48' i, ve bitki yetiştirme testleri ile 70 tohum örneğinden gelişme gösteren 62 bitkiden 48' i BCMV, BCMNV, CMV ve SMV ile enfekteli bulunmuştur. Bu durumda, test sonuçlarının karşılaştırmalarında tanılama yöntemleri arasında RT-PCR' ın en duyarlı yöntem olduğu ve fasulye tohumlarının büyük bir kısmının BCMV ile enfekteli olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Fasulye, viral enfeksiyonlar, tanılama yöntemleri, BCMV, RT-PCR.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF SENSITIVITY OF DIAGNOSE METHODS ON THE DETERMINATION VIRAL AGENTS IN BEAN SEED SAMPLES

SAYAR, Kübra

MSc in Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Semih ERKAN

August 2013, 75 pages

The study was conducted to find out the presence of viral infections in 70 bean seed samples providing from different companies and Ege University Faculty of Agricultural Department of Horticulture in 2012-2013 and to determine the sensitivity of the methods used in the detection of viral infections in bean seed samples in 2012-2013.

In order to detect the viral infections in bean seed samples collected, symptomatology, growing-on test, biological test, serological and molecular methods were used. The presence of 5 viral agents in bean seed samples were checked by RT-PCR while the diagnosis of 4 viruses was done with DAS-ELISA. Considering the results obtained, the sensitivity of the methods used was investigated for the detection of viruses in bean seed samples.

Out of 70 bean seed samples, the infection of certain viruses was detected in 69 samples by RT-PCR, 62 by DAS-ELISA, 48 by viral examinations and 30 by biological indexing. In growing-on assays, the viral infections were found in 48 of 64 plants developing from 70 seed samples. In conclusion, it was seen that RT-PCR was the most sensitive methods in the detection of the viruses in bean seed samples and the majority of bean seed samples in this work was infected with *bean common mosaic virus* (BCMV).

Key words: Bean, viral infections, detection methods, BCMV, RT-PCR

TEŞEKKÜR

Çalışma boyunca bilgilerinden faydalandığım, öğrencisi olmaktan onur duyduğum, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı danışman hocam Sayın. Prof. Dr. Semih ERKAN' a sonsuz teşekkürü bir borç bilirim. İklim odasının kullanılmasına sağladığı olanaklardan dolayı Prof. Dr. Hatice ÖZAKTAN' a ve Ar. Gör. Mustafa AKBABA' ya; tohum örneklerinin teminindeki yardımları için Prof. Dr. Dursun EŞİYOK' a, Ar. Gör. Tansel KAYGISIZ AŞÇIOĞUL' a, May Agro Tohumculuk A.Ş' e, Bircan Tohumculuk' a, Tat Tohumculuk' a; laboratuvar çalışmaları esnasındaki yardımlarından dolayı Dr. İsmail Can PAYLAN' a ve Zir.Yük. Müh. Müge ERGÜN' e; sera çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Zir.Müh. Sercan PAZARLAR' a; tezin yazımı ve okunması sırasındaki fikirlerinden dolayı Zir.Müh. Sinan SARAÇOĞLU' na teşekkür ederim. Ayrıca, bu çalışmaya mali yönden destek sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Komisyonuna (2012 ZRF 033 No' lu Proje) teşekkür ederim.

Son olarak; beni bu günlere getiren maddi ve manevi destekçilerim olan annem, babam ve abime gösterdikleri sabır ve ilgiden dolayı sonsuz sevgi ve teşekkürlerimle birlikte sağlıklı ve mutlu bir hayat dilerim...

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ	6
2.1 Fasulye Tohumlarında Bulunan Viral Etmenler Konusunda Gerçekleştirilen Araştırmalar	6
2.2 Fasulye Tohumlarındaki Viral Etmenleri Tanılamada Yararlanılan Yöntemler Konusunda Gerçekleştirilen Araştırmalar	15
3. MATERYAL ve YÖNTEM	20
3.1 Araştırmada Kullanılan Materyal	20
3.1.1 Tohum örnekleri	20
3.1.2 Bitki yetiştirme testlerinde (Growing-on) kullanılan materyal	21
3.1.3 Biyolojik endekslemede kullanılan materyal	21
3.1.4 Serolojik testlerde kullanılan materyal	21

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.1.5 RT-PCR testlerinde kullanılan materyal	21
3.1.6 Çalışmada kullanılan diğer materyal.....	22
3.2 Yöntem	23
3.2.1 Simptomatoloji.....	23
3.2.2 Bitki yetiştirme testleri (Growing-on Test).....	23
3.2.3 Biyolojik Testler	24
3.2.4 Serolojik test yöntemi (DAS-ELISA)	26
3.2.5 Moleküler yöntemler (RT-PCR)	28
4.BULGULAR.....	32
4.1 Simptomatolojik İncelemeler.....	32
4.1.1 Tohum örneklerinde gözlenen belirtiler.....	32
4.1.2 Bitki yetiştirme yöntemi ile tohumdan yetiştirilen bitkilerde gözlenen belirtiler	34
4.2 Biyolojik Endekslemenin Sonuçları.....	36
4.3 Serolojik Testlerin Sonuçları	41
4.4 Moleküler Testlerin Sonuçları	41
4.5 Kullanılan Tanılama Yöntemlerinin Duyarlılık Durumunun Karşılaştırılması.....	45

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	59
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	62
ÖZGEÇMİŞ	75
EKLER	
EK 1.TNA Ekstraksiyonunda Kullanılan Kimyasallar.....	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Türkiye' de fasulye üretiminin yıllara göre değişim ve üretim miktarları	3
3.1 Bitki yetiştirme testleri için yapılan ön hazırlıklar ve tohumların ekilmesi.....	24
3.2 Çalışmada kullanılan test bitkilerinin yetiştirilmesi ve bitkilerin genel görünümü.....	24
3.3 Serolojik test öncesi örneklerin hazırlanmasına ait görünüm.....	26
3.4 Tohumlarda TNA ekstraksiyonu aşamalarından bazıları.....	29
4.1 Tohumlarda gözlemlenen renk değişiklikleri ve beneklenme, şekil bozuklukları, , mekanik zarar ve yanıklık gibi belirtiler	32
4.2 Tohumdan yetişen bitkilerde görülen bazı belirtiler.....	35
4.3 Virüsle enfekteli bitkilerden alınan kapsül ve tohumlarda gözlemlenen buruşma, renk değişikliği ve şekil bozukluğu	36
4.4 Tohum örneklerindeki virüs izolatlarının değişik test bitkilerinde ortaya koyduğu belirtiler	38
4.5 Fasulye tohumlarından elde edilen nükleik asitlerin (TNA) jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü	43

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.6 Fasulye tohumlarında BCMV için uygulanmış olan RT-PCR sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü	43
4.7 Fasulye tohumlarında SMV için uygulanmış olan RT-PCR sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü.....	43
4.8 Fasulye tohumlarında BCMNV için uygulanmış olan RT-PCR sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü	44
4.9 Fasulye tohumlarında CMV için uygulanmış olan RT-PCR sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü.....	44
4.10 Fasulye tohumlarında AMV için uygulanmış olan RT-PCR sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü.....	44
5.1 DAS-ELISA testi sonuçlarına göre fasulye tohumlarındaki virüslerin bulunma durumu	52
5.2 PCR testi sonuçlarına göre fasulye tohumlarındaki virüslerin bulunma durumu	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Fasulye bitkisinin besin içeriği ve miktarları (100 g/dane)	1
1.2 2011 yılı verilerine göre dünya fasulye üretiminde yer alan ilk 10 ülke ve üretim miktarları	3
1.3 Bölge ve illere göre fasulye üretim miktarları	4
1.4 Fasulyede enfeksiyona neden olan virüs hastalıklarından bazıları	5
3.1 Araştırmada kullanılan fasulye tohum örnekleri	20
3.2 Biyolojik testlerde kullanılan test bitkileri ve kullanıldıkları dönemler	25
3.3 RT-PCR testlerinde kullanılan primerler, baz uzunlukları ve sıcaklık döngüleri	30
4.1 Tohum örneklerinde görülen belirtiler	33
4.2 Tohumdan yetişen bitkilerde gözlemlenen belirtiler	34
4.3 Tohum örneklerinden yapılan mekanik inokulasyon sonrası test bitkilerinde oluşan belirtiler	39
4.4 Fasulye tohumlarında DAS-ELISA ile saptanan virüsler ve bu virüslerin oranları	41
4.5 Fasulye tohumlarında PCR ile saptanan virüsler ve bu virüslerin oranları	42
4.6 Virüsle enfekteli örnek miktarının yöntemlere göre belirlenme durumu ...	45
4.7 Virüsleri tanılamada kullanılan yöntemlerin karşılaştırmalı sonuçları	46

SİMGELER VE KISALTMALAR

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
μ	Mikron
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
bp	Base pair
da	Dekar
g	Gram
ha	Hektar
kg	Kilogram
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
V	Volt

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
AMV	<i>Alfalfa mosaic alfamovirus</i>
BCMv	<i>Bean common mosaic potyvirus</i>
BCMNV	<i>Bean common mosaic necrosis potyvirus</i>
QPMV	<i>Bean curly dwarf virus</i>
BGMV	<i>Bean golden mosaic virus</i>
BLRV	<i>Bean leaf roll virus</i>
BMMV	<i>Bean mild mosaic virus</i>
BPMV	<i>Bean pod mottle virus</i>
BRMV	<i>Bean rugose mosaic virus</i>
BYMV	<i>Bean yellow mosaic virus</i>
BBMV	<i>Broad bean mottle virus</i>

SİMGELER VE KISALTMALAR (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
BBNV	<i>Broad bean necrosis virus</i>
BBSV	<i>Broad bean stain virus</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic cucumovirus</i>
CCMV	<i>Cowpea chlorotic mottle virus</i>
CPSMV	<i>Cowpea severe mosaic virus</i>
DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich – ELISA
ddNTP	Dideoksinükleotid Tri Fosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid Tri Fosfat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtBr	Ethidium Bromür
EtOH	Ethanol
FAO	Food And Agriculture Organization of the United Nations
NaI	Sodyum İyodür
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEBV	<i>Pea early browning virus</i>
RNA	Ribonükleik asit
RNAse	Ribonükleaz enzim
rpm	Revolutions per Minute (Dakikadaki devir sayısı)
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction
SbCMV	<i>Soybean chlorotic mottle virus</i>
SMV	<i>Soybean mosaic potyvirus</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic tobamovirus</i>
TSV	<i>Tobacco streak ilarvirus</i>
ToRSV	<i>Tomato spotted ring virus</i>
TBRV	<i>Tomato black ring nepovirus</i>
TNA	Total Nükleik Asit
TAE	Tris-Asetik Asit-EDTA
TUİK	Türkiye İstatistik Kurumu

1. GİRİŞ

İnsanlık tarihinin beslenme alışkanlıkları içerisinde yer alan en eski besin grubunu yemeklik baklagiller oluşturmaktadır. Yemeklik dane baklagillerin tüketimine ilişkin veriler 5 bin yıllık tarihi kalıntı ve kaynaklarda bile yer almaktadır. Baklagiller antik dönemlerde Akdenizliler, Mezopotamyalılar, Mısırlılar, Macarlar, Truvalılar ve İngilizler tarafından beslenme amacıyla tüketilmiş yüksek besin değerine sahip bir ürün grubudur (Anonymous, 2011). Yaklaşık 700 cins ve 18000 tür içeren baklagiller (*Fabaceae*) familyası içinde yer alan önemli bir ürün olan fasulyenin tarihi ise (*Phaseolus vulgaris* L.) günümüzden yaklaşık 7 bin yıl önce Orta Amerika’da kültüre alınmasıyla başlamış, buradaki sıcak bölgelerden subtropikal ve ılıman bölgelere doğru yayılmasıyla devam etmiştir (Balkaya ve Yanmaz, 1999). Fasulyenin ülkemize girişinin ise yaklaşık 250 yıl önce olduğu düşünülmektedir (Şehirli, 1988).

Dünyada ekonomik öneme sahip 1000 bitki türü içinde 150 baklagil türü bulunmaktadır. Bu 150 türden fasulye, börülce, mercimek, nohut, bakla, soya ve yer fıstığı olmak üzere sekiz tanesi ana besin maddesi olarak kullanılmaktadır (Önder, 2011). Baklagiller besin değeri yönünden en besleyici tarım ürünleri arasında yer almaktadır. Besin değeri bakımından birçok üstünlüğe sahip fasulye bitkisi 100 g danede yüksek protein (21 g), düşük yağ içeriği (1.1 g), vitaminler (0.5 mg), mineral maddeler (özellikle yüksek potasyum 1464.0 ve fosfor 415.0, düşük bakır 0.8 mg ve manganez 1.4 mg) ve diyetel lifler içermesi nedeniyle yaygın oranda tercih edilmektedirler (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1 Fasulye bitkisinin besin içeriği ve miktarları (100 g/dane) (United States Agency for International Development, 2012).

İçerik	Birim	Miktarı	İçerik	Birim	Miktarı
Su	g	10.1	Sodyum	mg	8.0
Protein	g	21.0	Çinko	mg	2.6
Toplam yağ	g	1.1	Bakır	mg	0.8
Karbonhidrat	G	64.2	Manganez	mg	1.4
Kalsiyum	mg	130.0	Selenyum	mg	13.0
Demir	mg	6.8	Thiamin	mg	0.8
Magnezyum	mg	182.0	Riboflavin	mg	0.2
Fosfor	mg	415.0	Vitamin B-6	mg	0.5
Potasyum	mg	1464.0	Pantothenic acid	mg	1.0

Baklagillerin, insan beslenmesinin yanı sıra hububata göre daha kaliteli olan samanı ile hayvan beslenmesinde, tıbbi bitki olarak ilaç endüstrisinde, mobilya ve kağıt yapımında, boya ve reçine yapımı ve kozmetik sanayi gibi birçok alanda da kullanıldığı görülmektedir. Ayrıca, baklagiller simbiyotik azot fiksasyonu yapabilen tek bitki grubu olduklarından, toprak verimliliğinin artırılmasında kullanılmaktadır (Önder, 2011). Dünya genelinde insan beslenmesindeki bitkisel proteinlerin %22'si, karbonhidratların %7'si, hayvan beslenmesindeki proteinlerin %38'i ve karbonhidratların %5'i yemeklik baklagillerden sağlanmaktadır (Anonymous, 2011).

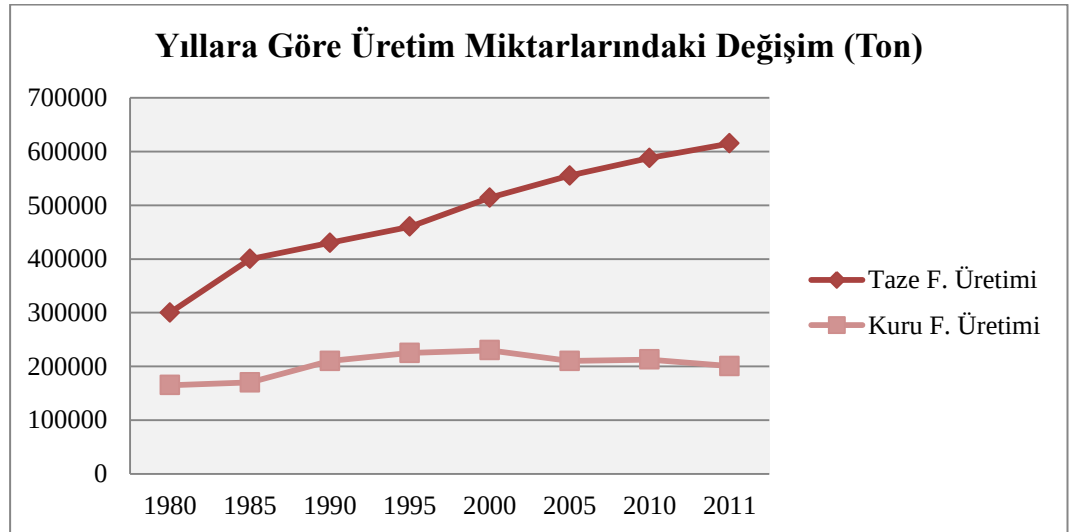
Dünya tarımı için önemli bir alan teşkil eden yemeklik baklagiller, tarla bitkileri yetiştiriciliğinde ekim alanı ve üretim bakımından tahıllardan sonra ikinci sırada gelen dane ürünü olma özelliğini taşımaktadır. Ülkemizde de tarla bitkileri üretimi yapılan toplam alanların yaklaşık % 74' ünü kaplayan tahıllar birinci, % 8.3' ünü oluşturan yemeklik dane baklagiller ise ikinci sırada yer almaktadır. Dünyada yılda kişi başına tüketilen ortalama kuru fasulye miktarı 2.50 kg iken ülkemizde yılda kişi başına tüketilen kuru fasulye miktarının 2.88 kg olduğu görülmüştür (Önder, 2011).

Dünyada en fazla ekim alanına sahip fasulye üretimi Asya ve Amerika kıtalarında yapılmaktadır. Dünya genelinde fasulye yaklaşık olarak yılda 1 470 000 ha' lık bir alanda üretilen ve yıl bazında 120 000 kg/ha üretim potansiyeline sahip olan bir sebzedir. Hem taze hem kuru şekilde üretimi yapılan fasulyenin dünyadaki taze haldeki üretimi 20 394 746 ton ve kuru haldeki üretimi ise 23 250 253 ton civarındadır. Çizelge 1.2' de görüldüğü gibi, taze fasulye üretiminde ilk sıralarda Çin, Endonezya, Hindistan ve Türkiye yer alırken, kuru fasulye üretiminde ise Hindistan, Myanmar, Brezilya ve Çin gibi ülkeler ön sıralarda bulunmaktadır (Food and Agriculture Organization, 2013).

Çizelge 1.2 2011 yılı verilerine göre dünya fasulye üretiminde yer alan ilk 10 ülke ve üretim miktarları (Food and Agriculture Organization, 2013).

Sıralama	Ülke	Taze Fasulye (ton)	Sıralama	Ülke	Kuru fasulye (ton)
1	Çin	15 716 947	1	Hindistan	4 470 000
2	Endonezya	883 802	2	Myanmar	3 721 950
3	Hindistan	617 869	3	Brezilya	3 435 370
4	Türkiye	614 948	4	Çin	1 583 498
5	Mısır	305 561	5	A.B.D.	899 610
6	Tayland	301 070	6	Tanzanya	675 948
7	Fas	231 201	7	Kenya	577 674
8	İspanya	175 000	8	Meksika	567 779
9	İtalya	163 725	9	Uganda	464 105
10	Bangladeş	94 756	10	Kamerun	380 000

Türkiye’de gerek ekim alanı gerekse ürün bakımından önemli bir yere sahip olan fasulye bazı besin özelliklerinin daha iyi anlaşılır olması ile birlikte zaman geçtikçe talep artışı görmeye başlamış ve Şekil 1.1’ de görüldüğü gibi üretim açısından 1980’ li yıllardan günümüze kadar artış göstererek gelmiştir. Ayrıca, Şekil 1.1’ de yıllara göre üretim miktarlarındaki değişimin taze fasulye de daha fazla, kuru fasulye üretimindeki değişimin ise daha az olduğu görülmektedir (Türkiye İstatistik Kurumu, 2013).



Şekil 1.1 Türkiye’de fasulye üretiminin yıllara göre değişim ve üretim miktarları (Türkiye İstatistik Kurumu, 2013).

2011 yılı verilerine göre 614.948 ton taze ve 200.673 ton kuru fasulye üretimine sahip olan Türkiye’de üretimin yapıldığı en yoğun olduğu bölge Batı Karadeniz bölgesidir. Ayrıca Ege, Akdeniz ve Marmara bölgeleri de üretimin önemli bir kısmını karşılamaktadır (Çizelge 1.3). İllere göre üretim sıralamasında ise Samsun 105,092 ton üreterek ilk sırada yer almakta ve bu ili Bursa, Antalya, Tokat ve Muğla illeri izlemektedir (Türkiye İstatistik Kurumu, 2013).

Çizelge 1.3 Bölge ve illere göre fasulye üretim miktarları (Türkiye İstatistik Kurumu, 2013).

Bölgeler	Üretim (Ton)	İller	Üretim (Ton)
Batı Karadeniz	181 744	Samsun	105 092
Akdeniz	125 596	Bursa	44 935
Ege	97 554	Antalya	44 668
Doğu Marmara	69 601	Tokat	39 061
Batı Marmara	27 817	Muğla	33 852
Batı Anadolu	26 770	İzmir	31 386
Orta Anadolu	12 133	Mersin	24 951
Doğu Karadeniz	19 665	Hatay	21 551

İnsanlığın en önemli gıda kaynakları arasında yer alan baklagillerde fasulye üretimi ve ürün kalitesi viral, bakteriyel ve fungal kökenli birçok etmen tarafından olumsuz yönde etkilenmektedir. Fasulye üretiminde hastalıkların sebep olduğu ürün kaybı yaklaşık %10 civarındadır. Hastalık yapma potansiyelindeki patojenin çokluğu, geniş alanlara yayılabilmeleri ve üründe aşırı düzeyde verim kaybına yol açabilme kapasiteleri göze alındığında, bu hastalık etmenleriyle mücadele edilmediğinde üründe meydana gelecek eksiliş yukarıda ifade edilenden çok yüksek olacaktır (Hall and Steadman, 1994). Bu yüzdeler kısm içerisinde viral etmenler büyük kayıplara yol açmasından dolayı önemlidir. Özellikle de tohumla taşınabilen ve kendilerine karşı etkin bir mücadele yolu olmayan virüs hastalıkları daha da ayrıcalıklı bir önem taşımaktadır.

Türkiye’de ve dünyada önceki yıllarda yapılan araştırmalarda belirlenen ve fasulye bitkilerinde enfeksiyona neden olan viral hastalık etmenleri Çizelge 1.4’ te görülmektedir (Descriptions of plant viruses, 2012). Ayrıca, bu virüsler özsu, tohum, polen ve yaprak bitleri ile taşınmaktadır. Bu çalışmada fasulyedeki viral etmenlerden ülkemiz için önemli olan ya da önemli olabileceği düşünülen tohumla taşınabilen virüslerin seçilmesine özen gösterilmiştir.

Çizelge 1.4 Fasulyede enfeksiyona neden olan virüs hastalıklarından bazıları
(Descriptions of plant viruses, 2012).

Virüs Adı	Akronim	Familya	Genus
<i>Alfalfa mosaic alfamovirus*</i>	AMV	<i>Bromoviridae</i>	<i>Alfamovirus</i>
<i>Bean common mosaic potyvirus*</i>	BCMV	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>
<i>Bean common mosaic necrosis potyvirus*</i>	BCMNV	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>
<i>Bean curly dwarf virus</i>	QPMV	<i>Secoviridae</i>	<i>Comovirus</i>
<i>Bean golden mosaic virus</i>	BGMV	<i>Geminiviridae</i>	<i>Begomovirus</i>
<i>Bean leaf roll virus</i>	BLRV	<i>Luteoviridae</i>	<i>Luteovirus</i>
<i>Bean mild mosaic virus</i>	BMMV	<i>Tombusviridae</i>	<i>Carmovirus</i>
<i>Bean pod mottle virus</i>	BPMV	<i>Comoviridae</i>	<i>Comovirus</i>
<i>Bean rugose mosaic virus</i>	BRMV	<i>Secoviridae</i>	<i>Comovirus</i>
<i>Bean yellow mosaic virus</i>	BYMV	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>
<i>Broad bean mottle virus</i>	BBMV	<i>Bromoviridae</i>	<i>Bromovirus</i>
<i>Broad bean necrosis virus</i>	BBNV	<i>Virgaviridae</i>	<i>Pomovirus</i>
<i>Broad bean stain virus</i>	BBSV	<i>Secoviridae</i>	<i>Comovirus</i>
<i>Cucumber mosaic cucumovirus*</i>	CMV	<i>Bromoviridae</i>	<i>Cucumovirus</i>
<i>Cowpea chlorotic mottle virus</i>	CCMV	<i>Bromoviridae</i>	<i>Bromovirus</i>
<i>Cowpea severe mosaic virus</i>	CPSMV	<i>Secoviridae</i>	<i>Comovirus</i>
<i>Pea early browning virus</i>	PEBV	<i>Virgaviridae</i>	<i>Tobravirus</i>
<i>Soybean chlorotic mottle virus</i>	SbCMV	<i>Caulimoviridae</i>	<i>Soymovirus</i>
<i>Soybean mosaic potyvirus*</i>	SMV	<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>
<i>Tobacco streak ilarvirus</i>	TSV	<i>Bromoviridae</i>	<i>Ilarvirus</i>
<i>Tomato black ring nepovirus</i>	TBRV	<i>Secoviridae</i>	<i>Nepovirus</i>
<i>Tomato spotted ring virus</i>	ToRSV	<i>Secoviridae</i>	<i>Nepovirus</i>

* Tohumla taşınan ve bu çalışmada seçilen virüsler

Bu çalışmada bazı tohum firmalarından ve Ege üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri bölümünden alınan tohum örnekleri BCMV, BCMNV, AMV, SMV ve CMV için simptomatoloji, bitki yetiştirme, biyolojik endeksleme, serolojik (DAS-ELISA) ve moleküler (PCR) yöntemleri kullanılarak test edilmiş ve daha sonra tanılamada kullanılan bu yöntemlerin duyarlılıklarının karşılaştırmasının yapılması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

Bu araştırma ile ilgili önceki yıllarda dünyada ve ülkemizde gerçekleştirilen çalışmalar; fasulye tohumlarında bulunan viral etmenler konusunda yürütülen araştırmalar ve fasulye tohumlarındaki viral etmenleri tanılamada yararlanılan yöntemler konusunda gerçekleştirilen araştırmalar olmak üzere 2 ana başlık altında ele alınmıştır.

2.1 Fasulye Tohumlarında Bulunan Viral Etmenler Konusunda Gerçekleştirilen Araştırmalar

Virüslerin neden olduğu hastalıkların bitki tohumlarıyla taşınmaları üzerinde ilk düşünceler 19. yüzyılda önem kazanmıştır. 1886 yılında Mayer yaptığı bir çalışmada hastalıklı ve sağlıklı tütün tohumlarından yetişen bitkileri mozaik belirtisiyle birbirinden farklı göründüğünü saptamıştır (Smith, 1972). İlk kez 1916 yılında Mc. Clintock' un bitki virüslerinin tohumla taşınabildiğini hıyar mozaik ve fasulye mozaik virüsleri ile kanıtlamış olduğu bildirilmektedir (Gibbs and Harrison, 1964).

Hastalıklar ile enfekteli tohumlar üretimde kullanıldığında daha başlangıçta primer inokulum kaynağı oluşmakta ve diğer taşınma yollarının da devreye girmesiyle üretim alanında hastalıklı bitki sayısında büyük artışlar olmaktadır. Yine ülkeler arası tohum ticaretinin artması nedeniyle enfekteli tohumlarda bulunan etmenler, doğal yollarla taşınması mümkün olmayan mesafelere ulaşmaktadır. Bu şekilde hastalıklar daha önce görülmedikleri alanlarda ortaya çıkabilmektedir (Yorgancı vd., 1993).

Fasulye bitkisinde doğal şartlarda 34 farklı virüs türü enfeksiyona sebep olmaktadır (Morales and Bos, 1988). Bunlar arasında *Bean common mosaic virus* (BCMV) ve *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) tüm dünyada fasulye alanlarında en yaygın ve en tahripkar virüsler olarak bilinmektedir (Florez – Estevez et al., 2003). BCMV ilk olarak fasulyede 1917 yılında Amerika' da tanımlanmış ve fasulye mozaik virüsü olarak isimlendirilmiştir (Stewart and Reddick, 1917; Pierce, 1934). Daha sonra *Bean yellow mosaic virus* (BYMV)' nden farklı özelliklere sahip olduğu ortaya konularak adı *Bean common mosaic virus* olarak değiştirilmiştir (Klein ve Wyatt, 1988). 1992 yılına kadar BCMV ve BCMNV, BCMV' nün iki ayrı serotipi (sırasıyla serotip B ve serotip A) olarak değerlendirilmiştir. Daha sonraları ayırt edici farklı özelliklerinin

belirlenmesinden sonra BCMV (Serotip A) ve BCMNV (Serotip B) iki ayrı tür olarak kabul edilmiştir (Vetten et al., 1992; McKern et al, 1992; Mink et al., 1994). BCMV ve BCMNV adlı virüslerin farklı türler olarak ayrılmasında virüs kılıf protein geninin (CP) amino asit dizilişi, enfekteli dokularda sebep oldukları sitolojik değişiklikler ve virüslerin aralarındaki serolojik ilişkiler önemli rol oynamıştır. Son virüs taksonomisindeki düzenlemelere göre BCMV ve BCMNV *Potyviriidae* familyası *Potyvirus* cinsinde yer alan iki ayrı tür olarak geçmektedir (Flores et al., 2003). Bu virüsler, tohumun embriyo ve kotiledon kısımlarında, çok ender olarak ta tohum kabuğunda yer almaktadır. Aktif olarak virüs, tohumlar 30 yıl saklandığında dahi enfeksiyöz olarak kalabilmektedir (Hall and Steadman, 1994).

Bu iki virüs üretimde ekonomik anlamda önemli zararlar vermektedir. Fasulyede BCMV'nün neden olduğu verim kaybı Küba' da % 11–62 (Lastres and Alvarez.,1989), Hindistan'da ise yetiştirilen çeşide bağlı olarak yaklaşık % 71 (Bhagawati and Bhagabati, 1994) olarak bildirilmiştir. BCMNV özellikle Afrika'da çok fazla yaygın olup şiddetli tepe nekrozu oluşumundan dolayı bazı bölgelerde *I* geni taşıyan çeşitlerden hiç ürün alınamamaktadır (Omunyin et al., 1995). Meksika'da BCMV'nün % 30' dan 80' e varan oranlarda üretimde zarara neden olduğu rapor edilmiştir (Chew et al., 2010).

BCMV ve BCMNV, fasulyede birbirine çok benzer belirtiler oluşturmaktadırlar. Bu belirtiler mozaik, cüceleşme, yaprak kıvrıkcılığı ve kloroz şeklindedir. Diğer bir belirti ise, sistemik nekrozdur. Bu belirti *tepe nekrozu* (top necrosis) veya *siyah kök* (black root) olarak da adlandırılmaktadır (Cooper and Jones, 1983). Tepe nekrozu aşırı duyarlılık reaksiyonu sonucu vasküler nekrozun ilerlemesi ile oluşmakta ve bazen bitkinin ölümüne sebep olmaktadır. Eğer fasulye çeşidi dominant *I* genine sahipse bitkide *tepe nekrozu* simptomsu oluşmaktadır. Dominant *I* genine sahip bitkiler BCMV ile enfekteli ise sistemik nekroz 30°C' nin üzerindeki sıcaklıklarda, BCMNV ile enfekteli ise bütün sıcaklıklarda oluşmaktadır (Kelly, 1997). Bu yüzden *I* genine sahip bitkilerde 30°C sıcaklıkta BCMV ve BCMNV adlı etmenlerin simptomatolojik olarak ayrımı mümkün iken, *I* geni mevcut olmayan çeşitlerde iki virüsün ayrılması zor olmaktadır (Gilbertson et al., 2001). Ayrıca, BCMV fasulye tohumlarında buruşmalara, tohum sayısında azalmalara ve normalden daha az sayıda tohum oluşmasına (Agrios, 1988), klorofil ve karotenoid içeriklerinde azalmalara neden olmaktadır (Habib et al., 1981).

BCMV ve BCMNV özsü, nonpersistent olarak bazı yaprak biti türleri (*Acyrtosiphon pisum*, *Aphis fabae* and *Myzus persicae*), yüksek oranda tohum ve polenle taşınmaktadır. Çeşitli araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda BCMV'nün fasulye tohumları ile taşınabildiğini, özellikle erken dönemde enfekte olmuş bitkilerden elde edilen tohumlarda taşınma oranının % 83'e ulaşabildiğini belirlemişlerdir (Bos, 1971; Omar et al., 1985; Richardson, 1990). Halbert et al. (1994) ise, BCMV'nün Amerika' da sık sık önemli ürün kayıplarına yol açtığını ve bu virüs nedeniyle pek çok tohum partisinin ekimine izin verilmediğini bildirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada ise BCMV' nün % 93' ten fazla oranda tohumla taşındığı ortaya konulmuştur (Schmidt, 1992). Ticari fasulye örneklerinde tohumla taşınmanın % 42 oranında olduğunu gösteren bir çalışma da mevcuttur (Capoor et al., 1985). Geçmişten günümüze kadarki BCMV' nün tohum yoluyla taşınma oranı hakkındaki çalışmalara göre bu oran % 0 ile % 83 arasında değişmektedir (Morales and Bos 1988; Hormozi-Nejad et al. 2008). Yüksek oranda tohumla taşındığından BCMV enfekteli tohumların dikimi ile tarlada önemli ölçüde ürün kayıpları görülmüş ve bu virüsün geniş çapta yayılmasına neden olmuştur. (Drijfhout 1978; Mavri and Šuštar-Vozli, 2004).

Fasulye tohumlarında önemli oranda bulunan diğer virüs *Cucumber mosaic virus* (CMV) ilk kez *Cucumis sativus* bitkisinde tanılanmıştır (Pierce, 1934). *Aphididae* familyasından 60'dan fazla tür, özsü ve yaklaşık 19 türde tohumla taşınmaktadır. Bu virüs genel olarak fasulye bitkilerinde sistemik lokal lezyon ve nekrotik lokal lezyon gibi belirtilere neden olmaktadır. Fasulye tohumları ile gerçekleştirilen bir araştırmada tohumların % 17.2'sinin CMV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir (Güzel ve Arlı-Sökmen, 2004). CMV'nün börülce tohumlarında % 4-18 oranında taşınabildiği bilinmektedir (Gibbs, 1970; Richardson, 1990). Fasulyede CMV'nün tohumla taşınması İspanyol izolatında (CMV-B₃₂) % 7 olarak (Bos and Maat, 1974), Newyork' ta CMV-b izolatında % 0.3 (Provvidenti, 1976), Porto Rico' da CMV-Pr izolatında % 1.5 (Meiners et al.,1977), Fransa' da CMV-F izolatında % 9-54 (Marchoux et al.,1977) ve Yugoslavya'da CMV-Za8 izolatında % 20 (Babovic et al.,1979) olarak rapor edilmiştir. Daha sonraki yıllarda Yeni Zelanda'da Fletcher (2001) ve Kaliforniya'da Gilbertson et al. (2002) tarafından fasulye de CMV'nün bulunma durumu ile ilgili yapılan çalışmalarda bu çalışmalara paralel sonuçlar ortaya konulmuştur. Ayrıca, Paylan (2011), 17 fasulye tohumunun 2 tanesinin CMV ile enfekteli olduğunu gösteren bir çalışma yürütmüştür.

Fasulye tohumlarında bulunan ve enfeksiyona neden olan *Soybean mosaic virus* (SMV) ilk olarak *Glycine max* bitkisinde tanılanmıştır (Clinton, 1915; Gardner and Kendrick, 1921). Bu virüs özsü, non-persistent olarak birçok yaprak biti türü veya tohum ile taşınmaktadır ve tek bilinen doğal konukçusu soya fasulyesidir. Virüsün genel belirtileri arasında rugoz, koyu yeşil damar bantlaşması, açık yeşil damar arası alanlar, yaprak kıvrılması ve tohum kabuğunda beneklenmeler görülmektedir. Ayrıca, latent lokal enfeksiyonu takiben BCMV ile benzer sistemik enfeksiyon görülebilmektedir. SMV' üne duyarlı *Phaseolus vulgaris*' ın bazı çeşitlerinde ise sistemik belirtiler, lokal nekrotik lezyonlarla birlikte sistemik nekroz ve ölüm görülmektedir. SMV ile ilgili yapılan çalışmalarda, tohumla taşınma oranı üzerine enfeksiyon zamanının etkisinin oldukça büyük olduğu ve çiçeklenmeden önce gerçekleşen enfeksiyonlarda bu oranın %16'ya çıkabildiği görülmüştür (Bowers and Goodman, 1979). Castano and Morales (1983) tarafından yapılan bir çalışmada ise Brezilya'da bu taşınma oranı %1.6 olarak belirlenmiştir.

Fasulye tohumlarında enfeksiyona neden olabilen diğer bir virüs *Alfalfa mosaic virus* (AMV) hakkındaki ilk rapor *Medicago sativa* bitkisinde A.B.D' nde yayınlanmıştır (Weimer, 1931,1934). Duyarlı bitkilerde büyük oranda özsü ve non-persistent olarak yaklaşık 13 yaprak biti türü ile kolayca taşınabilmektedir (Kennedy et al., 1962). Belirtileri virüs ırkına, konukçu çeşitliliğine ve çevresel koşullara bağlı olmakla birlikte ve bazen de latent kalabilmektedir. Virüsün birçok bitki türünde parlak sarı renkte benek, mozaik belirtileri ve nekroz oluşturduğu görülebilmektedir. Bu etmenin duyarlı konukçularından biri *Phaseolus vulgaris*' tir. *P.vulgaris* bitkisinde klorotik lokal leke, sistemik benekler, damar nekrozları ve yaprak bozuklukları görülebilmektedir. Kaiser and Hannan (1983), AMV inokule edilmiş fasulye bitkilerinden elde edilen tohumlarda, virüsün % 0.7-5 oranında taşınabildiğini belirtirken, Richardson (1990) yaptığı çalışmada inokule edilen fasulye bitkilerinden elde edilen tohumlardan yetiştirilen 144 fideden sadece birinde virüsün belirlendiğini bildirmiştir. Yeni Zelanda' da Fletcher (2001) tarafından yapılan çalışmada AMV'nün çok düşük oranlarda bulunduğu sonucuna varılmıştır. Gilbertson et al. (2002) AMV'nün varlığı için testlenen fasulyelerde bazı yıllarda bu virüse hiç rastlamazken bazı yıllarda çok düşük oranda rastlamıştır.

Dünyada ve ülkemizde tohumla taşınan fasulyedeki bu viral etmenler ve bunların bulunma durumlarına yönelik çalışmalar yapıldığı görülmektedir.

Türkiye’ de fasulyede enfeksiyon oluşturan virüslerin belirlenmesi ve yaygınlık durumunun saptanması ile ilgili yapılan çalışmalarda;

Bean common mosaic virus (BCMV) (Açıkgöz, 1984; Fidan ve Yorgancı, 1990; Lisa et al., 1994; Güzel ve Arlı-Sökmen, 2003), *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) (Güzel ve Arlı-Sökmen, 2003), *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Güzel ve Arlı-Sökmen, 2003), *Alfalfa mosaic virus* (AMV) (Güzel ve Arlı-Sökmen, 2003) belirlenmiştir.

Ege Bölgesi’nde yapılan bir çalışmada fasulyelerde BCMV’ nün tohumla taşınma oranı % 56 olarak belirlenmiştir (Fidan ve Yorgancı, 1990).

Gümüş vd. (2002), Ege Bölgesi’nde tohum üreten ve pazarlayan kuruluşlardan alınan fasulye tohum örneklerini DAS-ELISA ile test etmişler ve tohumların % 23.52’sinin BCMV ile enfekteli olduğunu belirlemişlerdir.

Kutluk Yılmaz vd., (2002), Tokat ilinde fasulye tohumlarındaki viral etmenlerin saptanması üzerine yaptıkları bir çalışmada topladıkları toplam 88 adet fasulye tohum örneklerini DAS-ELISA yöntemiyle test ettikten sonra tohumların 54’ünün BCMV ile enfekteli olduğunu ve bu değerin alınan örneklerin % 61.4’lük kısmını oluşturduğunu göstermişlerdir.

2002- 2003 yılları arasında Samsun ilinde yapılan bir çalışmada, 499 yaprak örneğinde ve 53 farklı tohum örneğinde virüslerin bulunma durumu araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda yaprak örneklerinin % 36’sının BCMV, % 10.8’inin CMV (*Cucumber mosaic virüs*), % 2.8’inin BCMNV ve % 2’sinin BYMV (*Bean yellow mosaic virüs*) ile enfekteli olduğu, tohum örneklerinin ise % 18.9’unun BCMV, % 17’sinin BCMNV ve % 17’sinin CMV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir (Güzel ve Arlı-Sökmen, 2003). Bu çalışma, Türkiye’de BCMNV’ ünün BCMV enfeksiyonundan ayırımını sağlayan ilk çalışma özelliğindedir.

Deligöz (2007), Samsun ilinde fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) yetiştiriciliğinin yapıldığı alanlarda 9 tane *Bean common mosaic virus* (BCMV) ve 3 tane *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) ile enfekteli tohum ve yaprak örneklerin bu virüslere karşı dayanıklılık düzeylerini ve sahip oldukları dayanıklılık genlerini belirlemişlerdir. Zülbiye- Özeren Seker çeşitlerinin ve 4F-3260 ıslah hattının BCMV’ ye karşı dayanıklılıkta rol oynayan dominant *I* genine, Akdağ çeşidinin NL-4 hariç BCMV ve BCMNV’ nün bilinen bütün ırklarına karşı

dayanıklılığı sağlayan resesif *bc-22* genine, Özeren Seker ve Özeren Barbunya çeşitlerinin ise BCMV' nün dört (NL-1, NL-7, US-2, NL-2) ve BCMNV' nün NL-8 ırkına karşı dayanıklılığı sağlayan *bc-12* genine sahip olduğu tespit edilmiştir.

Dünyada fasulyede yapılan çalışmalar genellikle BCMV ve BCMNV ile ilgili olup bunların yanı sıra yine tohumla taşınan CMV, AMV ve SMV gibi virüsler de ele alınmıştır. Bu konudaki çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Davis et al. (1981) fasulye tohumlarında taşınan CMV' nün bazı ülkelerde bulunma durumunu saptamak ve bu konuda koruyucu önlemlerin geliştirilmesini sağlamak amacıyla bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada Idaho, Washington ve Oregon' dan alınan 259 fasulye örneklerinden herhangi birinde bu virüse rastlanılmamıştır. Pasifik Güneybatıda tohum endüstrisinde o yıllarda problem yaratmayan bu virüsün maskelenmiş olabileceği göz önünde tutularak önemli sorun yaratabileceğine dikkat çekilmiştir.

Kaiser and Hannan (1983) AMV inokule edilmiş fasulye bitkilerinden elde edilen tohumlarda, virüsün % 0.7-5 oranında taşınabildiğini belirtirken, Richardson (1990) yaptığı çalışmada inokule edilen fasulye bitkilerinden elde edilen tohumlardan yetiştirilen 144 fideden sadece birinde virüsün belirlendiğini bildirmiştir.

Provvidenti et al. (1982) tarafından yapılan bir çalışmada SMV ile sistemik enfekteli bitkiden alınan tohumlarda (Black Turtle 2 ve Pionerr çeşidi) bu virüsün yaklaşık % 0-4 değerleri arasında tohum ile taşındığı bildirilmektedir. Ayrıca, virüsün tohumda bulunduğu yeri saptamak için Pionerr çeşidinin tohumları akan su altında 1 saat süre ile yüzey dezenfeksiyonu yapılarak tutulmuş ve kurutulmuştur. Virüs tohum kaynaklı olduğu için kotiledon ve embriyonik dokularda bulunmasına rağmen testada görülmemiştir. Fasulyenin bazı çeşitlerinde SMV' nün tohumla taşınmasının başarılı olmadığını gösteren sonuçların aksine (Costa et al., 1978; Iizuka 1973; Murayama and Han., 1971), bu çalışmada SMV' nün tohumla taşındığı gösterilmiştir.

Davis and Hampton (1986) seçilen bazı CMV izolatlarının fasulye tohumlarıyla taşınma durumunu belirlemek amacıyla aralarında kıyaslama yapmıştır. Ancak, CMV'nün tohumla taşınması çeşit ve izolata göre değişmekle birlikte virüsün dikimden 4-6 hafta sonrasında bitkiye inokule edilmesi

durumunda tohumlarda taşınma olmadığı görülmüştür. Bu virüsün tohumla taşınma oranları ise şu şekildedir; CMV-B on dört fasulye çeşidinin ikisinde % 2.4 (Tendercrop) ve % 1.8 (Red Kidney) oranında, CMV-F iki çeşidin birinde (Topcrop) % 3.3 oranında, CMV-Pg bir çeşitte % 49 oranında taşınmıştır (Topcrop). CMV-Le ise iki çeşitte de tohumla taşınmamıştır. 58 bitkinin yaklaşık 31' nde CMV-B,-F veya -Pg ile birlikte tohumda taşındığı gözlemlenmiştir.

Morales and Castano (1987) tarafından yapılan bir çalışmada duyarlı fasulye çeşitlerinde BCMV'nün tohumla taşınma oranının değişkenliği araştırılmıştır. BCMV' nün nekroza neden olan bir izolatı ve mozaik neden olan dört izolatının, 14 çeşitte farklı oranlarda tohumla taşındığı görülmüştür. Dubbele Witte, Redlands greenleaf B, Michelite, Sanilac ve Red Mexican 35 çeşitlerinde enfekteli bitkilerden alınan tohumların % 39.7-54.4' ünde BCMV' nün US 1, US 2, US 5, NL 3 ve NL4 izolatları ile taşındığı görülmüştür. İmuna ve Great Nothern 31 ve 123 çeşitlerinde ise %1 'den az olarak tohumla taşındığı, Pinto 114 çeşidinde US 2 izolatının tohumla taşınmadığı görülmüştür. Nekroza neden olan BCMV NL 3 izolatı, Sanilac ve Michelite navy fasulye çeşitlerinde tohum ile yüksek oranda taşınabildiği saptanmıştır. Ayrıca, maksimum taşınma oranının birincil yapraklı evrede bitkinin inokule olması durumunda gerçekleştiği de bildirilmektedir.

Guzman et al. (1997), Kaliforniya'da fasulye ekim alanlarında BCMNV'nün varlığını saptamak amaçlı bir önceki yılın temmuz-ağustos ayları arasında toplanan örnekleri DAS-ELISA yöntemini kullanarak testlemişler ve BCMNV'nün ağustos ayında % 5-10, eylül ayında ise % 70-90 arasında yaygın olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışma ile araştırmacılar Kaliforniya'da ilk kez BCMNV'nün varlığını belirlemişlerdir.

Ruiz De Galeretta et al. (1998), İspanya'nın Bask bölgesinde yaptıkları bir çalışmada mozaik ve nekroz belirtileri gösteren fasulye bitkilerini DAS-ELISA ve biyolojik endeksleme ile testleyerek yoğun görülen virüs hastalıkları ve bu hastalıkların bölgeye göre yaygınlık durumunu saptamışlardır. Araştırma sonucunda, fasulyenin ana virüs hastalıklarından ikisinin BCMV ve BCMNV olduğunu belirlenmiştir. Hastalığın yayılma oranı çalışmanın yapıldığı 3 bölgeye bağlı olarak değişmekle birlikte Vizcaya' da mozaik belirtileri fazla iken Guipuzcoa 'da *I* genini taşıyan bitkilerde sistemik nekrozlar görülmüştür. Alava ve Vizcaya' da 100 şüpheli bitkiden sadece 60' inin BCMV ve BCMNV ile enfekteli, Guipuzcoa' da ise 100 şüpheli bitkiden sadece 28' inin bu virüslerden birini

içerdiği ve sadece BCMNV'nün analiz edilen 100 şüpheli bitkiden 10' unda görüldüğü ortaya konmuştur. İki virüsün birlikte olmasının yaygınlığının yanı sıra çalışmanın yapıldığı yıllarda yaprak biti popülasyonunun artışına bağlı olarak zararın arttığı sonucuna da varılmıştır.

Flores-Estévez et al. (2003) tarafından Meksika'da yapılan çalışmada BCMV ve BCMNV adlı virüslerin karakterizasyonu yapılmış ve bu virüslerin yaygınlık durumu bölgeye göre saptanmaya çalışılmıştır. Toplanan 79 örneğin RT-PCR ile testlenmesi sonucu 46 örnek bir veya her iki virüs için, 29 örnek BCMV için, 21 örnek BCMNV için pozitif sonuç vermiştir. Her iki virüsün de izolatları ülkedeki farklı yerlerde görülmüştür. % 45 yaygınlığı olan BCMNV'üne Meksika'nın nemli doğu yerlerinde daha sık rastlanılırken, % 63 yaygınlığı olan BCMV'nün yarı nemli dağlık alanlarda ve yarı nemli orta sıcaklıktaki alanlarda lokalize olduğu görülmüştür. Yine bazı yarı nemli dağlık alanları kuşatan yerlerde her iki virüsün tek tek veya beraberce de bulunma durumu da söz konusu olduğu bu çalışmada belirtilmiştir. Ayrıca kılıf protein geninin amino bölgesindeki her biri ayrı virus türleri için 9 nükleotit sekansının hizalanışı virüslerin benzerliğini doğrulamış ve iki viral türün arasındaki genişletilmiş gen segmentinin büyüklüğündeki az olan farklılığın 5' primerinin yerinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

Godoy-Lutz et al. (2004), Dominik Cumhuriyeti'nde fasulye tohum partilerinden parti başına 1 kg tohum örneği alarak, her 1 kg tohumdan da rastgele 1000 tohum seçerek BCMNV'nün yaygınlığını DAS-ELISA, RT-PCR ve test bitkileri kullanarak araştırmışlar ve tohum partilerinin % 0.2-22' ye varan oranlarda BCMNV ile enfekteli olduğunu ve bu enfekteli tohumların ise % 60' ının BCMNV'nün NL-8 ırkı ile enfekteli olduğunu belirlemişlerdir.

Wang Jie Wang (2006), tarafından Çin'de yapılan bir çalışmada National Crop Genebank (NCGB)' tan temin edilen fasulye üretim materyallerinin BCMV ile enfekteli olma durumu araştırılmıştır. Örnekler RT-PCR ile test edilerek önceki nükleotit dizilimleriyle ile kıyaslanmış ve NCGB 'ta korunan örneklerinin bir çoğunun BCMV ile enfekteli olduğu sonucuna varılmıştır.

Çeşitli kaynaklardan alınan *Phaseolus vulgaris L.*' nin 15 çeşidi cam serada 10 günlük fidelere mekanik inokulasyon yapılarak enfekte edilmiş BCMV' üne karşı testlenmiştir. 15 çeşit arasından 3 tanesi (Arka Komal, IIHR 909 ve MFB-2) belirtilere dayanarak duyarlı olarak tanılanmış ve doğruluğu DAS-ELISA ile teyit

edilerek pozitif bulunmuştur. Her bir çeşidin enfekteli bitkilerinden alınan tohumlarda virüsün taşınma oranının belirlenmesi amacı ile bitki yetiştirme testleri yapılmıştır. Arka Komal çeşidinde tohumla taşınma oranı % 39 olarak belirlenirken IIHR 909 ve MFB-2 çeşitlerinde belirti görülmesine rağmen tohumla taşınmadığı görülmüştür (Nalini et al., 2006).

Monteagudo et al. (2006) İspanya'da yaptıkları bir çalışmada 43 fasulye materyalinin BCMV ve BCMNV adlı etmenlere karşı dayanıklılık durumlarını test etmişler ve 10 örneğin BCMV'ne dayanıklı olduğu, tamamının ise BCMNV'ne hassas olduğu tespit edilmiştir.

Lepe-Soltero et al. (2012) Meksika' da kuru fasulye üretiminin yapıldığı 5 önemli alanda BCMV ve BCMNV virüslerinin yaygınlığını belirlemek için yürüttükleri çalışmada toplanan 338 örnek her bir virüs türü için spesifik primerler kullanılarak RT-PCR ile test edilmiştir. 44 örnek (%13) BCMV için, 70 örnek (%21) BCMNV için pozitif reaksiyon verirken, 30 örnek (%9) her iki virüs türü için pozitif reaksiyon vermiştir. 164 örnek ise (%48) her iki virüs için negatif sonuç vermiş ve 30 örnek (%9) henüz tanımlanmayan etmenlerle enfekteli bulunmuştur.

Chiumia and Msuku (2012) Malawi' de BCMV ve BCMNV izolatlarının tanımlanması ve karakterizasyonu amacıyla yürüttükleri çalışmada ülkenin farklı bölgesinden toplanan 400 fasulye tohumunu kullanılmışlardır. 400 örneğin 53 tanesinde indiktor bitki kullanılarak BCMV'nün biyolojik karakterizasyonu yapılmış ve bu bitkilerdeki 184 izolat serolojik olarak test edilmiştir. Biyolojik ve serolojik sonuçlara dayanarak BCMV ve BCMNV izolatlarının PG1, IV, VIa, VIb and VI içeren 5 patovar olduğu ve bu izolatların sırasıyla NL1, NL6, NL3, NL5, and RU1 ile benzer olduğu görülmüştür. İki örnek dışında NL1' in dominant olduğu ve BCMNV izolatları NL3 ve NL5' in sadece bir bölgede bulunmasına rağmen tohum kaynaklı olması nedeniyle her yere dağıldığı sonucuna varılmıştır.

Shahid et al. (2013) tarafından Nepal' de farklı bir fasulye çeşidinde (*Lablab purpureus*. L) % 60-70 oranında beneklenme, yaprak deformasyonu, aşırı mozaik ve şekil bozukluğu gösteren farklı tarlalardaki 18 örnek alınmıştır. Örneklerle DAS-ELISA testi yapılmış ve BCMNV için 15 örneğin pozitif reaksiyon verdiği görülmüştür. Elektron mikroskopuyla da yaklaşık 690-720 nm x 10-12 nm boyutlarında *Potyvirus*' e yakın iplik şeklinde partiküller gözlenmiştir. Diğer bir uygulama olarak bazı test bitkileri kullanılarak mekanik inokulasyon yapılmış ve

P.vulgaris ve *Glycine max'* ta sistemik nekroz, bunu takiben ölüm; *Vigna uncinulata* ve *Psophocarpus tetragonolobus'* ta mozaik; *Arachis hypogaeae'* da damarlarla sınırlı nekroz ; *C.amaranticolar* ve *C.quinoa'* da ise lokal lezyonlar görülmüştür. Moleküler açıdan tanımlanması için PCR yapılmış, ampikonun yaklaşık 1.7 kp genişliğinde olduğu ve iki klon analiz için seçilen gen bankasındaki iki klonla (AB734777 ve AB735585) benzerliğinin % 99 olduğu görülmüştür. Bu karşılaştırmalar sonucu Nepal' de ki tatlı fasulyeler üzerinde mozaik ve nekrozun nedenini gösteren BCMNV türlerine ait ilk viral izolasyonun varlığı gözlenmiştir.

2.2 Fasulye Tohumlarındaki Viral Etmenleri Tanılamada Yararlanılan Yöntemler Konusunda Gerçekleştirilen Araştırmalar

Doğrudan mücadele yöntemi bulunmayan bitki virüs hastalıklarının yönetiminde virüslerin teşhisi ve tanısı önemlidir. Ayrıca virüs hastalıklarının kontrolünde yararlanılan önlemlerin çoğu bitkileri tedaviden ziyade korumayı temel aldığından, virüs hastalıklarının yönetiminde patojenin tanısı için güvenilir ve duyarlı yöntemlere ya da tekniklere sahip olmak gereklidir (Erkan vd., 2011).

Bitki virüslerin teşhis ya da tanısında kullanılan yöntem ya da teknikler simptomatoloji, biyolojik endeksleme, seroloji, elektron mikroskopi ve nükleik asit temelli yöntemler olarak sınıflandırılmaktadır. Kullanılan bu yöntem ve tekniklerin güvenli, özgül (spesifik), duyarlı, hızlı ve ekonomik olması istenilen özellikler arasındadır. Tanı yönteminin seçimi mevcut kaynaklara ve imkanlara, reagentlerin uygunluğuna, özgünlüğün ve duyarlılığın seviyesine, uzmanlığa ve bu çalışmaları gerçekleştirecek uygun beceriye, testlenen örneğin tip ve sayısına, saptanacak virüs hakkındaki yeterli bilgiye bağlıdır (Naidu and Hughes, 2013). Bitki virüslerinin teşhisi ve tanısında virüslere bağımlı olarak bir yöntem ya da tekniğin kullanılması yeterli olabileceği gibi, bazen kesin sonuca ulaşmak için birden fazla yöntem veya teknikten birlikte yararlanmak gerekebilmektedir.

Simptomatoloji, virüs hastalıklarının teşhisinde ilk basamağı oluşturmaktadır. Belirtiler bir hastalığı spesifik olarak açıklayabiliyorsa simptomatoloji yöntemi kolaylıkla kullanılmaktadır. Fakat virüs ırkı, konukçu bitki çeşidi, enfeksiyon zamanı ve çevre gibi bir çok faktör belirtileri etkileyebilmektedir (Matthews, 1980). Bitkiler ayrıca olumsuz çevre şartlarında, toprakta mineral besin dengesizliğinde, viral olmayan patojenlerden kaynaklı enfeksiyonlarda, böcek, nematot zararında, hava kirliliği ve pestisit tepkisinde de

virüs benzeri belirtiler gösterebilmektedir. Bazı virüsler ise hiç belirti göstermemekte, latent kalmaktadır. Ayrıca farklı virüsler benzer belirti yapabilmekte veya farklı virüs zincirine sahip olanlar aynı konukçuda farklı belirtilere neden olabilmektedir. Bu nedenlerden dolayı virüs hastalıklarında belirtileri tek başına gözlemleyerek karar almanın yanı sıra hem tarla gözlemleriyle hem de diğer yöntemler kullanılarak desteklenmelidir (Bock, 1982). Bu testler fasulyede ilk olarak tohum lotlarını BCMV' ne karşı testlemek amacıyla Fajardo (1930) and Bos (1977) tarafından önerilmiştir. Daha sonraki yıllarda diğer virüsler için bu çalışmalara yenileri eklenmiş ve geliştirilmiştir.

Biyolojik endeksleme virüslerin özsü ile nakledilebilme özelliğinden yararlanılarak ortaya konmuştur. Virüs saptanması ve tanılama tekniklerinde test bitkisi olarak bilinen duyarlı indikatör bitkilere mekanik, aşı ve vektör ile virüslerin taşınması ve oluşan belirtilerin incelenmesi esasına dayanmaktadır (Jones, 1993). İndikatör bitkilere özsü inokulasyonu ile yapılan bu yöntem ile birçok virüsün hem tanınması hem saptanması karakteristik belirtiler sayesinde ortaya konmaktadır (Horvath, 1983, 1993). Buna rağmen konukçu aralığının virüsün tanımlanmasında kesin rehber olamayabileceği göz önünde tutulmalıdır (Hamilton et al.1981). Tanıda konukçu dizini testlerin güvenilirliği deneyimle, aktif katılımı ve bitki türlerinin uygun bir aralığı kullanılarak artırılabilir. Mekanik olarak taşınmayan virüsler meyve ağaçları gibi bazı uygun indikatör bitki üzerinden aşı veya vektör ile taşınarak teşhis edilmektedir (Fridlund, 1980; Nemeth, 1986; Martelli, 1993). Birçok laboratuvarında bu kontroller sayesinde tanı sağlanmanın yanı sıra virüs kültürlerinin korunması ve çoğaltılması da mümkün olmaktadır. Fakat hem zaman tüketimi hem de virüsleri tarlada ifade edilen belirtilere dayanarak test bitkilerindeki belirtilere göre ayırt etmede bazı farklılıklar göstermesi bu yöntemin dezavantajı sayılmaktadır (Naidu and Hughes, 2013). Biyolojik endeksleme; virüse (stabilite, konsantrasyon, inokulumdaki diğer maddelerin bulunuşu), kullanılan test bitkisine (duyarlılık, fizyolojik durum), inokulasyonun etkinliğini değiştiren özelliklere (belirli özellikleri olan sera ve iklim odası , bitki özsuyuna geçebilen bazı virüs inaktivatörleri) bağlıdır (Ball, 1974).

Üstün vd. (2002) tarafından yürütülen çalışmada, son 30 yıl içerisinde tohum sağlık testlerinde önemli gelişmeler olduğu, klasik yöntemlerin yanı sıra serolojik ve moleküler yöntemlerin kullanılmasıyla tohum kaynaklı patojenlerin daha kolay ve kesin saptandığı belirtilmiştir.

Tohum virüslerinin indekslenmesi için ilk serolojik tekniklerin gelişimi Hamilton (1965) tarafından gerçekleştirilmiştir. Serolojik yöntemler virüslerin nükleik asitlerini çevreleyen kılıf ya da membran proteinlerine ve onların özelliklerine dayalı olarak yapılmakta ve immunolojideki antijen ile antikor arasındaki ilişkiler temel alınmaktadır. Bitkilerdeki virüslerin tanınması amacıyla kullanılan serolojik yöntemler ya da teknikleri presipitasyon (Çökelme) testleri, aglütinasyon testi, radyo aktif madde, enzim ve floresans boya aracılığı ile yapılan testler, immunosorbent elektron mikroskopi (ISEM) gibi sınıflandırmak mümkündür (Erkan ve ark., 2011). Bu yöntemler içerisinde ELISA radyo aktif madde, enzim ve floresans boya aracılığı ile yapılan testler içerisinde yer alan bir yöntemdir. Clark and Adams (1977) tarafından bitki virolojisi tanıtıldığından bu yana ELISA bitki materyallerinde, böcek vektörlerinde ve vejatatif materyallerde virüslerin saptanmasında kullanılmaya başlanmıştır. Tohumlardaki virüslerin tanınması amacı ile kullanılması ise daha sonraki yıllarda gerçekleşmiştir (Lange, 1986). ELISA sonuçların görsel yorumlama yerine kantitatif olarak elde edilmesi, antikorların protein kökenli bitki bileşenleri ile çoğunlukla reaksiyona girmemesi, çok sayıda örneğin kısa zamanda testlenebilmesi, uygulanabilirliğinin kolay olması, duyarlılık ve reagentlerin kullanımındaki ekonomiklikten dolayı her durumda geniş çapta tercih edilmektedir. ELISA'nın bir çok çeşidi geliştirilmiştir (Clark and Bar-Joseph 1984; Cooper and Edwards 1986; Van Regenmortel and Dubs 1993). Direkt ve indirekt olarak iki kategoriye ayrılmaktadır, bu iki yöntemin temeli ve sonuçları aynı olmakla birlikte ELISA'nın spesifikliğı, indirekt ELISA'dan daha yüksektir. Buna karşılık, ELISA ile serolojik çeşitli izolatları tespit edememe riski bulunmaktadır (Koenig, 1981).

Virüslerin saptanmasında serolojik metotlar geniş çapta kullanılmasına rağmen bazı dezavantajlara sahip olmasından dolayı yeni yöntemler geliştirilmiştir. Serolojik bir reaksiyon toplam virüs genomunun yaklaşık %10' nu gösteren virüs kılıf proteinin antijenik özelliklerine bağlıdır (Gould and Symons, 1983) ve virüs genomunun kalan miktarını reaksiyona alamamaktadır. Nükleik asite dayalı tanılama yöntemleri ise viral genomun herhangi bir bölgesinin tanılama testlerinin geliştirilmesini hedefleme gibi avantajlara sahiptir. Ek olarak viroidlerin, satellit RNA' lerin, partikül eksiğı olan virüslerin (*Groundnut rosette virus*), son derece değişik serotipler gibi olan virüsler (Hindu ve Afrikan *Peanut cump virus* and *tobacco rattle virus*) ve az antijeni olan veya saflaştırması zor olan virüslerin saptanmasında immunolojik prosedürlerin kısıtlı uygulandığı durumlarda bu yöntem avantajlı olmaktadır. (Naidu and Hughes, 2013). Nükleik

asit temelli (NAB) yöntemler özellikle polimerase chain reaction (PCR) yüksek özgüllük ve oldukça yüksek duyarlılığıyla tohum sağlığını da kapsayan bitki virüslerinin tespitinde kullanılmaktadır. NAB yöntemleri Nükleik asit hibridizasyon yöntemi, Polymerase chain reaction (PCR) içinde iki grup altında incelenmektedir. Nükleik asite dayalı tanılama yöntemlerinin duyarlılığı PCR prosedürünün gelişimi ile büyük oranda geliştirilmiştir (Mullis et al.,1986). Polimeraz zincir reaksiyonu, genetik materyaller (DNA ve RNA) üzerinde seçilmiş bir veya birden fazla bölgenin *in vitro* şartlar altında oligonükleotit primer ve *Taq* polimeraz enzim kullanılarak bir otomatik termocycle sistem yardımıyla çoğaltılma (sentezleme=amplifiye etme) metodudur. Bu yöntemde patojene ait genetik materyalin çoğaltılması ve ortaya konması amaçlanmaktadır. Ayrıca PCR hassas, seçici ve kısa sürede sonuç veren bir metottur.

Dünyada fasulyedeki viral etmenler ve bunların tanılanmasında yararlanılan yöntemlerin duyarlılıklarının saptanmasına yönelik çalışmalar yapıldığı görülmektedir. Bununla ilgili yapılan çalışmalar da PCR' in en hassas yöntem olarak vurgulandığı görülmektedir.

Bariana et al. (1994) 5 baklagil virüsünün (*Alfalfa mosaic alfamovirus*, *bean yellow mosaic potyvirus*, *clover yellow vein potyvirus*, *cucumber mosaic cucumovirus* ve *subterranean clover mottle sobemovirus*) saptanmasında sensitive multiple PCR kullanmış ve PCR'ın bütün virüs izolatlarını saptayabildiği görülmüştür. Ayrıca, AMV için DAS-ELISA testi de yapılarak iki testin duyarlılığı karşılaştırılmıştır. Virüs konsantrasyonları 2 ve 20 ng/ml arasında DAS-ELISA tarafından saptanabilirken, RT-PCR bütün konsantrasyonlarda virüsü saptamıştır ve PCR'ın DAS-ELISA' dan daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Spence and Walkey (1995), Fas'da BCMV'nün ırklarının varlığını belirlemek amacıyla fasulye alanlarından BCMV belirtisi gösteren yaprak örnekleri toplamışlardır. DAS-ELISA testi sonucunda BCMV ile enfekteli tüm örneklerin *Alfalfa mosaic virus* (AMV) ile karışık enfekteli olması sonucu bu örneklerin ırk ayırma seti ile reaksiyonlarını belirleyememişlerdir.

Sengooba et al. (1997), Tanzania'da 598 adet yabani ve kültüre alınmış baklagil örneğinde BCMNV'nün varlığını serolojik ve biyolojik indeksleme ile incelemişler ve ırk ayırma setindeki reaksiyonlara göre NL-3 ile NL-8 ırklarını tespit etmişlerdir.

Saqib et al. (2000), Batı Avustralya’ da fasulye yetiştirilen alanlarda BCMV’ nün varlığını ilk olarak serolojik ve biyolojik yöntemler kullanarak saptamışlardır. Araştırmacılar aynı zamanda RT-PCR yöntemi ile belirledikleri izolatın sekans analizi sonucu NL-1 ırkı olduğunu ortaya koymuşlardır.

Lillian and Msuka (2001), Tanzanya’da yaptıkları bir çalışmada BCMV ve BCMNV’ nün ırklarını tespit etmişlerdir. Bu amaçla ülkenin 41 farklı bölgesinden 400 tohum örneği toplayıp, toplanan örnekleri biyolojik ve serolojik olarak test etmişlerdir. Yaptıkları çalışmanın sonucunda BCMV’nün NL-1, NL-6 ve RU-1 benzeri ırklarını BCMNV’nün ise, NL-3 ve NL-5 ırklarını belirlemişlerdir.

Flores et al. (2003), Meksika’ da yaptıkları bir çalışmada, ülkenin iki farklı bölgesinden topladıkları fasulye örneklerini, PCR yöntemiyle test etmişler ve BCMNV’ nün NL-3 ırkının varlığını belirlemişlerdir.

Peyambari et al. (2006), tarafından Tahran ilinde yapılan çalışmada toplanan 3 farklı fasulye genotipindeki örneklerin BCMNV açısından tohumla taşınma yüzdesi araştırılmıştır. Toplanan örneklerden önce enfekteli olanları belirlemek amacıyla BCMNV polyclnal antiserum (AS-0239) kullanılarak DAS-ELISA ile testlenmiş ve sonrasında IC-RT-PCR (immunocapture reverse transcription polymerase chain) yapılmıştır. Butter bean ks-21478, Kidney bean ks-31170, Navy bean ks-41235 çeşitlerine inokulasyon yapılmış ve belirtilerin görülmesiyle birlikte DAS-ELISA ve IC-RT-PCR yöntemleriyle test edilmiştir. DAS-ELISA testinde % 75 oranında enfekteli örnek saptanırken IC-RT-PCR’ da enfeksiyonun toplam % 78 olduğu ve DAS-ELISA’ da negatif veren örneklerin bile IC-RT-PCR’ da pozitif sonuç vererek DAS-ELISA’ ya göre daha duyarlı olduğu görülmüştür.

Abtahi et al. (2009), Tahran’da BCMV’nü saptamak amacıyla soya fasulyesi örneklerini test bitkilerine (Cucurbitaceae, Chenopodiaceae, Solanaceae ve Leguminosae’ nin 15 türüne) inokule ederek belirti oluşan örnekleri RT-PCR ile test etmiştir. Sadece *P.vulgaris* cv.Red Kidney ve *P.vulgaris* cv.Bountiful bitkilerinde mozaik belirtileri görülmüş ve RT-PCR (L. XU *et al.*) testi sonucu bu örneklerin BCMV ile enfekteli olduğu saptanmıştır.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1 Araştırmada Kullanılan Materyal

3.1.1 Tohum örnekleri

Bu çalışma değişik firmalardan ve Ege Üniversitesi Bahçe Bitkileri bölümünden temin edilen 70 adet fasulye tohum örneği kullanılarak yürütülmüştür. Tohum örneklerinin çeşit adları ve temin edildiği yer Çizelge 3.1'de sunulmaktadır.

Çizelge 3.1 Araştırmada kullanılan fasulye tohum örnekleri.

No.	Firma Adı	Çeşit Adı	No.	Firma Adı	Çeşit Adı
1	Tat	Efsane Oturak Ginz Tip	36	May	A.no:172
2	Tat	Alman Ayşe Sırık	37	May	A:no:117
3	Tat	Oxinel Yuvarlak Baklalı Oturak	38	May	A:no:1201
4	Tat	Sarıköz Nazende	39	May	A.no:163
5	Tat	Black Turtle Oturak	40	Atatürk BKMAE	Yalova
6	Tat	Barbunya F16 Sırık	41	EUZF-BB	1
7	Tat	Barbunya Sembol Oturak	42	EUZF-BB	2
8	Bircan Toh.	39 Akman-98	43	EUZF-BB	3
9	Bircan Toh.	4 Noyanbey	44	EUZF-BB	4
10	Bircan Toh.	3 Karacaşehir	45	EUZF-BB	5
11	Bircan Toh.	2 Doruk	46	EUZF-BB	6
12	Bircan Toh.	41 Elkoca-2005	47	EUZF-BB	7
13	Bircan Toh.	42 Kantar 2005	48	EUZF-BB	8
14	Bircan Toh.	40 Eskişehir 855	49	EUZF-BB	9
15	May	A.no:135	50	EUZF-BB	10
16	May	A.no:113(1 poşet)	51	EUZF-BB	11
17	May	A.no:292	52	EUZF-BB	12
18	May	A.no:278	53	EUZF-BB	13
19	May	A.no:181	54	EUZF-BB	14
20	May	A.no:273	55	EUZF-BB	15
21	May	A.no:277	56	EUZF-BB	16
22	May	A.no:276	57	EUZF-BB	17
23	May	A.no:294	58	EUZF-BB	18
24	May	A.no:2	59	EUZF-BB	19
25	May	A.no:279	60	EUZF-BB	20
26	May	A.no:281	61	EUZF-BB	21
27	May	A.no:133(2.poşet)	62	EUZF-BB	22
28	May	A.no:121	63	EUZF-BB	23
29	May	A.no:469	64	EUZF-BB	24
30	May	A.no:168	65	EUZF-BB	25
31	May	A.no:118	66	May	May 260
32	May	A.no:295	67	May	May 249
33	May	A.no:162	68	May	May 251
34	May	A.no:131	69	May	May 246
35	May	A.no:130	70	May	May 250

3.1.2 Bitki yetiştirme testlerinde (Growing-on test) kullanılan materyal

Bitki yetiştirme testlerinde 70 örneğın tohumları, torf-toprak karışımı ve 15 cm çaplı plastik saksılar kullanılmıştır.

3.1.3 Biyolojik endekslemede kullanılan materyal

Biyolojik testlerde materyal olarak fasulyedeki virüslere duyarlı olan test bitkileri, torf-toprak karışımı, tohum ekimi yapılan küvetler, 10 cm plastik saksılar kullanılmış, inokulasyonlarda ise malzeme olarak porselen havan, havan eli, tüpleri fırça ya da papiks, tampon çözelti vb.' den yararlanılmıştır.

3.1.4 Serolojik testlerde kullanılan materyal

Çalışmada serolojik test yöntemi olarak uygulanan DAS-ELISA testleri ticari olarak temin edilen tanı kitleri ve reagentleri (antiserumlar, pozitif ve negatif örnekler ile kaplama, ekstraksiyon, konjugat, substrat ve yıkama çözeltileri), Elisa tabakları, Elisa okuyucusu, otomatik pipetler, pipet uçları ve saf su kullanılarak yapılmıştır. Çeşitli firmalara ait ticari tanı kitleri, bazı solüsyon ve çözelti ve 96 kuyucuğaa sahip polystrene maddeden yapılmış mikrolateler (Nunc F96 Maxisorp) kullanılmıştır.

Test sonuçlarının değeriendirilmesinde 405 nm dalga boyunda okuma yapan Titertek Multiskan Plus MK II marka ELISA okuyucusundan yararlanılmıştır.

3.1.5 PCR testlerinde kullanılan materyal

3.1.5.1 Total nükleik asit ekstraksiyonu aşamasında kullanılan materyal

RNA ekstraksiyonu sırasında steril havan ve havan eli, tampon çözelti, ependorf tüpleri, ayarlanabilir mikro pipetler ve pipet uçları, Sigma D37520 marka santrifuj, özelti, ETG MBT 250 marka ısıtıcı ve -30°C'ye kadar soğutma kapasitesine sahip derin dondurucu kullanılmıştır. TNA ekstraksiyonu çalışmalarında kullanılan kimyasallar Ek 1' de gösterilmiştir.

3.1.5.2 cDNA sentezi aşamasında kullanılan materyal

Daha önce hazırlanmış olan TNA örnekleri, Fermantas marka cDNA sentez kiti, ısıtıcı, çalkalayıcı (Heidolph Unimax 2010) ve inkubatör (Nüve ES500) materyal olarak kullanılmıştır.

3.1.5.3 PCR testlerinde kullanılan materyal

PE Applied Biosystems Gene Amp PCR Systems 9700 marka thermocycler, solüsyonlar, çözeltiler, viral etmenlere spesifik primerler ve Eppendorf marka PCR tüpleri materyal olarak kullanılmıştır.

3.1.5.4 Çoğaltılmış PCR ürünlerinin analizinde kullanılan materyal

Owl A2 ve Owl B1 marka jel elektroforez düzeneği, Consort E815 marka güç kaynağı, örneklerin ve jellerin hazırlanmasında ve boyanmasında kullanılan kimyasallar, çözeltiler ve DNA markerı materyal olarak kullanılmıştır. Tüm jellerin fotoğrafları DNR Bio-imaging Systems Minibis Pro marka jel görüntüleme cihazında çekilmiştir.

3.1.5.5 Çalışmada kullanılan diğer materyal

Araştırma kapsamında; Bioreba AG örnek ezme makinası, Systec 2540 otoklav, mikrodalga fırın, Sigma mikrosantrifuj, Sartorius hassas terazi, Scotsman buz makinası, Elga saf su makinası, Elga ultra saf su makinası, Heidolph Unimax 2010 çalkalayıcı, Nüve ES 500 soğutmalı inkubatör, Binder inkubatör, Memmert marka etüv, manyetik karıştırıcı, Heidolph tüp karıştırıcı, HI 9321 pH metre ve Sigma marka santrifüj tez çalışmasının çeşitli aşamalarında kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Simptomatoloji

3.2.1.1 Tohumdaki belirtilerin incelenmesi

Çalışmada kullanılan tohum örnekleri tohum renginde ve şeklinde değişme, tohum büyüklüğünde azalma, tohum kabuğunda buruşma, beneklenme, leke, çizgi, band, nekroz vb. simptomların varlığı yönünden görsel olarak incelenmiştir.

3.2.2 Bitki yetiştirme testleri (Growing-on Test)

Bu testler için tohum ekimi yapılmadan önce bazı ön hazırlıklar yapılmıştır. Kullanılacak toprak %5' lik perasitik asitle dezenfekte edilmiş ve 1 gün üzeri naylonla örtülü şekilde bekletilmiştir. Saksılar % 2' lik hazırlanan perasitik asitle daldırma usulü yıkanmış ve kurutulmuştur. Ayrıca, litreye 2 g captan ve 5 g thiram konularak hazırlanan çözeltiye çelik kaplar içerisinde tohumlar batırılmış ve steril petrilerde kurumaya bırakılmıştır (Tarım, Gıda ve Hayvancılık Bakanlığı, 2012).

Torf ve topraktan oluşan karışım dezenfekte edilerek saksılara doldurulmuş ve bu saksılara her fasulye tohum örneği için 2 tekerrürlü olmak üzere 4' er tohum ekilmiştir (Şekil 3.1). Saksılar Ege Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü' ne ait iklim odasında tohumların çimlenmesi için uygun sıcaklık 20-22 °C' de tutulmuştur (ISTA, 2012). Oluşan fidelerde gelişmenin erken dönemlerinde kök ve gövde çürümesine karşı sulama az yapılmış ve gerektiğinde uygun kimyasallarla ilaçlama yapılmıştır. Ayrıca, tohum ekiminden 7 gün sonra yüzeysel tabaka kırılarak tohumların çıkışına kolaylık sağlanmıştır. Kotiledon yapraklı evreden itibaren virüs belirtileri için başlanan gözlemlere çiçeklenme ve bakla verme döneminde de devam edilmiş ve bulgular kayıt altına alınmıştır.



Şekil 3.1 Bitki yetiştirme testleri için yapılan ön hazırlıklar ve tohumların ekilmesi.

3.2.3 Biyolojik testler

3.2.3.1 Test bitkilerinin yetiştirilmesi

Biyolojik testler için kullanılan test bitkileri sera ve iklim odasında Şekil 3.2' de görüldüğü gibi yetiştirilmiştir. Tohumların ekildiği ve fidelerin şaşırtıldığı küvet ve saksılarda yetiştirme ortamı olarak kullanılan harç 1:1 oranında toprak ve torf karışımı ile hazırlanmıştır. Fideler uygun gelişme dönemlerine ulaştıkları zaman (10 cm çaplı plastik) saksılara şaşırtılmıştır (Nogay, 1983; Matthews, 1991).



Şekil 3.2 Çalışmada kullanılan test bitkilerinin yetiştirilmesi ve bitkilerin genel görünümü.

3.2.3.2 Test bitkilerinin mekanik olarak inokulasyonu

Biyolojik endekslemede daha önce yapılan çalışmalara paralel olarak belirlenen test bitkileri uygun gelişme dönemlerine ulaştıkları zaman mekanik olarak inokule edilmiştir. Bu test bitkilerinin bilimsel adları ve inokulasyon zamanı Çizelge 3.2' de gösterilmiştir. Tohum örnekleri steril havan içinde %0.1 sodyum sülfid içeren 0,01 M fosfat tamponu (pH=7.0) kullanılarak (1/5; g/v) ekstratlar elde edilmiş ve içine enfeksiyon oluşumunu kolaylaştırmak amacı ile celite ya da karborandum tozu ilave edilmiştir. Bu ekstratlar papiks aracılığı ile test bitkilerine mekanik olarak inokule edilmiş ve test bitkilerinin yaprakları inokulasyondan 3-5 dakika sonra çeşme suyu ile yıkanmıştır (Noordam, 1973; Yorgancı, 1975; Nogay, 1983; Matthews, 1991). İnokulasyon sonrası bitkiler 20-24 °C' deki iklim odasına konulmuş ve bitkilerde ortaya çıkan belirtiler gözlemlenerek, oluşan belirti tiplerinin fotoğrafları çekilmiştir.

Çizelge 3.2 Biyolojik testlerde kullanılan test bitkileri ve kullanıldıkları dönemler.

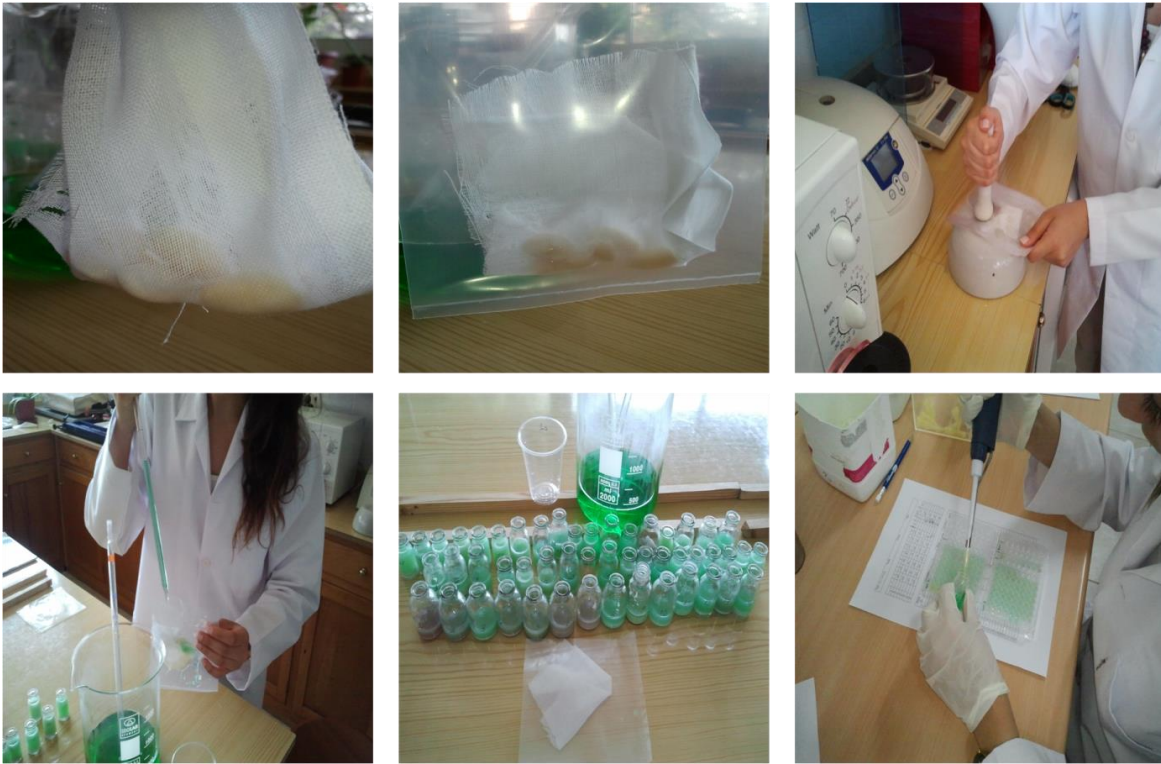
Bilimsel Adı	Türkçe Adı	Familya	Dönem
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste & Reyn.	Kaz ayağı	Chenopodiaceae	6 yapraklı devre
<i>Chenopodium quinoa</i> Quin	Akkaz ayağı	Chenopodiaceae	6 yapraklı devre
<i>Gomphrena globosa</i> L.	Hanım düğmesi	Amaranthaceae	4-8 yapraklı devre
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	Tütün	Solanaceae	4 yapraklı devre
<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Samsun	Tütün	Solanaceae	4 yapraklı devre
<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv Xanthi	Tütün	Solanaceae	4 yapraklı devre
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fasulye	Fabaceae	2 primer yapraklı devre
<i>Vigna unguiculata</i>	Börülce	Fabaceae	2 primer yapraklı devre
<i>Pisum sativum</i>	Bezelye	Fabaceae	2 yapraklı devre
<i>Vicia faba</i>	Bakla	Fabaceae	1 yapraklı devre
<i>Cucumis sativus</i>	Hıyar	Cucurbitacea	Kotiledon

3.2.4 Serolojik test yöntemi (DAS-ELISA)

Tohumlardaki viral etmenlerin bulunma durumlarını belirlemek amacı ile toplanan tohum örneklerine serolojik yöntemlerden DAS-ELISA testi uygulanmıştır (Clark ve Adams, 1977; Erkan vd., 1995). 70 tohum örneği BCMV, CMV, SMV ve AMV adlı virüslerin varlığını araştırmak için testlenmiştir.

3.2.4.1 Tohum örneklerinin hazırlanması

Fasulye tohumları yumuşatılmak amacıyla plastik bardaklar içerisinde bir gün süre ile suda ıslatılmaya bırakılmıştır. Yumuşayan tohumlar önce kare şeklindeki tülbent bezi içerisine daha sonra da bezle birlikte örnek torbaları içine konulmuştur. Havan eli ve örnek ezme makinası kullanılarak tohumlar ezilmiş ve torbadaki 10 tohuma 25 ml ekstraksiyon tamponu konulmuştur. Bu karışım önceden numaralandırılan cam tüplere süzülerek tabaklara yüklenmeye hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Serolojik test öncesi örneklerin hazırlanmasına ait görünüm.

3.2.4.2 **ELISA testinin uygulanması**

DAS-ELISA testlerinin uygulanması aşağıda belirtilen aşamaların izlenmesiyle gerçekleştirilmiştir (Clark ve Adams, 1977; Erkan vd., 1995).

1. Elisa tabaklarının her bir çukuruna kaplama tamponunda 1:1000 (Bioreba firması ticari kitleri), 1:200 (Agdia firması ticari kitleri), 1:100 (Loewe firması ticari kitleri) oranında seyreltilmiş olan IgG'den 200 µl eklenerek 37°C'de 4 saat inkube edilmesi.

2. Elisa tabaklarının yıkama tamponu ile yıkanarak 3 dakika beklenmesi ve bu işlemin 4 kez tekrarlanması.

3. Ekstraksiyon tamponu ile hazırlanan tohum örnekleri, pozitif ve negatif kontrollerin her bir çukura 200 µl olacak miktarda eklenerek 4°C'de bir gece inkube edilmesi.

4. Elisa tabaklarının ikinci aşamada açıklandığı şekilde tekrar yıkanması.

5. Konjuge edilmiş IgG, konjuge tamponu içerisinde 1:1000 (Bioreba firması ticari kitleri), 1:200 (Agdia firması ticari kitleri), 1:100 (Loewe firması ticari kitleri) oranında seyreltilip her bir çukura 200 µl eklenerek 37 °C' de 4 saat inkube edilmesi.

6. Elisa tabaklarının ikinci aşamada açıklandığı şekilde tekrar yıkanması.

7. Substrat çözeltisine 1mg/ml olacak şekilde substrat (paranitrofenilfosfat) her bir çukura 200 µl konularak oda sıcaklığında inkube edilmesi.

Sonuçlar iki şekilde değerlendirilmiştir (Erkan vd., 1995).

a) Sarı renk oluşumu gözlenerek,

b) Elisa reader cihazı kullanılarak 405 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Örneklerde sağlıklı kontrolün 2 katı olan absorbans değerleri enfekteli olarak değerlendirilmiştir.

3.2.5 Moleküler yöntemler

3.2.5.1 Tohum örneklerinin hazırlanması

Tohum örnekleri steril petri içine yerleştirilmiş steril kurutma kağıdı arasında çimlendirilmiştir. 5-6 gün sonra çimlenen fasulye tohumları steril havanda havan eli yardımıyla ezilmiştir. Tohum örneklerine karşı testler ISTA standartları çerçevesinde uygulanmıştır (ISTA, 2012). Örnekler TNA ekstraksiyon işleminde kullanılıncaya kadar küvette buz üzerinde bekletilmiştir.

3.2.5.2 Total nükleik asit (TNA) ekstraksiyonu

TNA ekstraksiyonunda kullanılan tüm malzemeler yapısına uygun olarak ekstrakte edilmiştir. Her izolat için yaklaşık 1 g tohum kullanılarak, 10 ml mercaptonol ve grinding buffer içeren çözelti ile birlikte steril havanlarda ezilmiştir. Örnekten 500 µl alınıp tüplere konulmuş ve üzerine 100 µl sarcosil (%10'luk) eklenmiştir. Tüpler ısıtıcıda 70 °C 10 dakika inkube edildikten sonra 5 dakika buzda bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş, üst sıvıdan 300 µl alınarak yeni tüplere aktarılmıştır. Tüplere 150 µl ethanol, 300 µl 6M NaI, 25 µl silika süspansiyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkubasyona bırakılmıştır. Tüpler 6000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılmış tüpün içinde kalan silika partiküllerinin yıkanması için 500 µl yıkama tampon çözeltisi eklenmiştir. Bu işlemden sonra tüpler 6000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi iki kere yapılmıştır. Yıkamadan sonra silika partikülleri içeren tüplere 150 µl RNase'dan arı steril su eklenmiştir. Tüpler 70°C'de 4 dakika ısıtıcıda inkube edilen tüpler 13000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün üst kısmında kalan sıvıdan 145µl alınarak yeni tüplere aktarılmış ve TNA ekstraksiyonu tamamlanmıştır (Şekil 3.4). Örnekler cDNA sentez ve PCR uygulamaları yapılncaya kadar -20°C'de derin dondurucuda saklanmıştır (Foissac et al., 2001).



Şekil 3.4 Tohumlarda TNA ekstraksiyonu aşamalarından bazıları.

3.2.5.3 Komplementer DNA (cDNA) sentezi

TNA ekstraksiyonu yapılmış olan örneklerle komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Fermentas firmasından temin edilen cDNA sentez kitleri kullanılmış ve firmanın belirttiği prosedür doğrultusunda cDNA sentezleri gerçekleştirilmiştir.

Bu yöntemle göre ilk olarak eppendorf tüplerin içerisine 0,1–5 µg total RNA, 1 µl random hexamer primer konulmuş ve DEPC su ile 12 µl'ye tamamlanmıştır. 70°C'de 5 dakika inkubasyon uygulandıktan sonra tüpler buz üzerine konulmuş ve içlerine sırasıyla 4 µl 5X reaction buffer, 1 µl Ribolock Ribonuclease inhibitor, 2 µl 10mM dNTP mix eklenmiştir. Kısa süreli santrifüj (3-5 saniye) uygulandıktan sonra 25°C'de 5 dakika inkubasyon uygulanmıştır ve tüplerin içine 1 M-MuLV reverse transcriptase eklenerek toplam 20 µl hacme ulaşılmıştır. Karışım daha sonra 25°C'de 10 dakika, 42°C'de 60 dakika ve 70 °C' de 10 dakika inkubasyon uygulanarak cDNA sentez aşaması tamamlanmıştır.

3.2.5.4 RT-PCR yöntemi

PCR işlemi Fermentas firmasının önerdiği prosedüre göre 25 µl hacimde yapılmıştır. RT-PCR testlerinde kullanılan primerler, baz uzunlukları ve kullanılan sıcaklık döngüleri Çizelge 3.3 'te verilmiştir.

Steril PCR tüplerine 25 µl 2x PCR master mix, 1 µl primer1, 1 µl primer 2, 2 µl cDNA ve 21 µl nuclease free su eklenmiştir. Tüpler PCR cihazına yerleştirilerek test edilecek virüs için spesifik olan program uygulanmıştır (Candresse et al., 1995). Tüm işlemler boyunca eldiven kullanılmış ve herhangi bir kontaminasyon olasılığını belirlemek için de nükleik asit eklemekten sadece karışımın yer aldığı bir tüpte (kontrol) PCR programında çoğaltma işlemine alınmıştır.

Çizelge 3.3 RT-PCR testlerinde kullanılan primerler, baz uzunlukları ve sıcaklık döngüleri.

Hedef Virüs / Primer	Primer Dizilimi	Baz Uzunluğu	PCR Döngüleri
AMV-F	GTGGTGGGAAAGCTGGTAAA	700 bp	1 X (94°C 2 dk.)
AMV-R	CACCCAGTGGAGGTCAGCATT (Martinez et al., 2004)		35 X (94°C 30sn. / 54 °C 30sn. / 72°C 30sn) 1 X (72°C 10dk.)
BCMV-1	CTGGCGACGCATCATTC	488 bp	1 X (94°C 2 dk.)
BCMV-2	GAATTACCGCGGCTGCT (Cadle-Davidson and Jahn, 2005)		35 X (94°C 30sn. / 55 °C 45sn. / 72°C 30sn) 1 X (72°C 10dk.)
BCMNV -F	CCATTGCTGCTGAGATTC	714 bp	1 X (94°C 2 dk.)
BCMNV-R	AGTTCACCGTGAGATGTC (NL-3 D) (Larsen et al., 2005)		35 X (94°C 30sn. / 48 °C 30sn. / 72°C 3dk) 1 X (72°C 7dk.)
CMV- F	GTA GAC ATC TGT GAC GCG A	540 bp	1 X (94 °C 4 dk.)
CMV-R	GCG CGA AAC AAG CTT CTT ATC (De Blas et al. 1994; Samuitienė and Navalinskienė 2008)		40 X (94 °C 1 dk. / 52 °C 2dk / 72 °C 2dk.) 1 X (72 °C 10dk.)
SMV-1	GCGTGTGGGTGATGATGGA	500 bp	1 X (94°C 5 dk.)
SMV-2	CATCTCAATGTAAGCTTCTGCTGC (Hart, 2004)		30 X (94°C 60sn. / 54 °C 60sn. / 72°C 60sn) 1 X (72°C 5dk.)

3.2.5.5. Agaroz jel elektroforez yöntemi

Agaroz jel hazırlanmasında ve elektroforez koşumunda kullanılan 1X TAE tamponu stok 50 X TAE tamponunun seyreltilmesi ile elde edilmiştir. Stok TAE

50X tamponu; 40mM Tris-acetate (pH 8), 57.1 ml Glacial Acetic Acid, 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8)'den oluşmaktadır. Bu karışım 1000 ml' ye tamamlanarak stok solüsyon oluşturulmuştur. Stok çözeltiden 20 ml alınarak distile H₂O ile 1000 ml' ye tamamlanarak 1X TAE konsantrasyon hazırlanmıştır.

Agaroz jel 100 ml 1X TAE tamponu içine 1,5 g agaroz konulup mikrodalga fırında 70 °C' de 3 dakika tutularak hazırlanmıştır.

Elektroforez koşumu, 100 V'da, yatay düzenekte 60 dakika süreyle ve 1X TAE çözeltisi içerisinde uygulanmıştır. Jel yükleme yapılmadan önce örnekler (10µl örneğe) 2µl yükleme tamponu eklenmiştir.

3.2.5.6 Jel görüntüleme cihazında PCR sonuçlarının değerlendirilmesi

Ethidium bromide ile boyanan jel, DNR Bio-Imaging marka Jel Dokümantasyon ve Analiz Sistemi ile fotoğrafı çekilerek kayıt edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Simptomatolojik İncelemeler

Virüs hastalıklarının teşhisinde kullanılan yöntemlerden ilk basamağı oluşturan yöntem simptomatoloji kesin teşhis ve tanı için bazı durumlarda yeterli olabilirken, emin olunamayan durumlarda diğer yöntemlerle birlikte değerlendirilerek sonuçlandırılmıştır. Ayrıca, bitkideki virüs belirtilerinin besin elementleri eksikliği/fazlalığı, böcek zararları, kuraklık/donma zararları vb. belirtiler ile benzerlik gösterebileceği göz önünde tutulmuştur.

4.1.1 Tohum örneklerinde gözlenen belirtiler

Yapılan araştırmada incelenen örneklerin tohumlarında renk değişmesi, sararma, tohum büyüklüğünde küçülme, buruşma, hilum renginde değişme, şekil bozuklukları ve beneklenme gibi belirtilerin bulunduğu görülmüştür (Çizelge 4.1). Fasulye tohum örneklerinde görülen bazı belirtiler Şekil 4.1' de gösterilmektedir. Ayrıca, bazı örneklerde tohumlarda kaplama hataları ve mekanik zararların da mevcut olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.1 Tohumlarda gözlemlenen renk değişiklikleri ve beneklenme (a), şekil bozuklukları (b-d), mekanik zarar ve yanıklık (c) gibi belirtiler.

Çizelge 4.1 Tohum örneklerinde görülen belirtiler.

No.	Belirtiler	No.	Belirtiler
1	Kaplama hataları	36	Renk değişimi, beneklenme
2	Sekil bozukluğu	37	Sekil bozukluğu, beneklenme
3	Beneklenme, mekanik zarar	38	Sekil bozukluğu, beneklenme
4	Sekil bozukluğu	39	Sekil bozukluğu (az)
5	Belirti yok	40	Belirti yok
6	Belirti yok	41	Sekil bozukluğu
7	Sekil bozukluğu, burusma	42	Sekil bozukluğu
8	Sekil bozukluğu (az)	43	Renk değişimi
9	Şekil bozukluğu	44	Belirti yok
10	Belirti yok	45	Renk değişimi
11	Sekil bozukluğu, burusma	46	Sekil ve renk değişimi.
12	Belirti yok	47	Sekil bozukluğu
13	Mekanik zarar	48	Sekil bozukluğu
14	Belirti yok	49	Sekil bozukluğu
15	Sekil bozukluğu, renk değişimi	50	Renk değişimi
16	Sekil bozukluğu, renk değişimi	51	Belirti yok
17	Sekil bozukluğu, mekanik zarar	52	Burusma(az)
18	Renk değişimi	53	Sekil bozukluğu
19	Sekil bozukluğu, renk değişimi	54	Renk değişimi
20	Sekil bozukluğu, renk değişimi	55	Belirti yok
21	Renk değişimi, mekanik zarar	56	Belirti yok
22	Sekil bozukluğu	57	Renk değişimi
23	Belirti yok	58	Sekil bozukluğu (az)
24	Sekil bozukluğu, mekanik zarar	59	Sekil bozukluğu
25	Sekil bozukluğu (az)	60	Belirti yok
26	Belirti yok	61	Renk değişimi
27	Renk değişimi, mekanik zarar	62	Belirti yok
28	Sekil ve renk değişimi	63	Sekil bozukluğu ve renk değişimi
29	Sekil ve renk değişimi	64	Belirti yok
30	Sekil ve renk değişimi	65	Belirti yok
31	Sekil bozukluğu, mekanik zarar	66	Belirti yok
32	Renk değişimi	67	Belirti yok
33	Renk değişimi	68	Belirti yok
34	Belirti yok	69	Belirti yok
35	Renk değişimi	70	Belirti yok

Çizelge 4.1 incelendiği zaman, çalışmadaki tohum örneklerinde gözlenen en yaygın simptomların şekil bozukluğu ve renk değişmesi olduğu, bunu mekanik zararların izlediği görülmektedir.

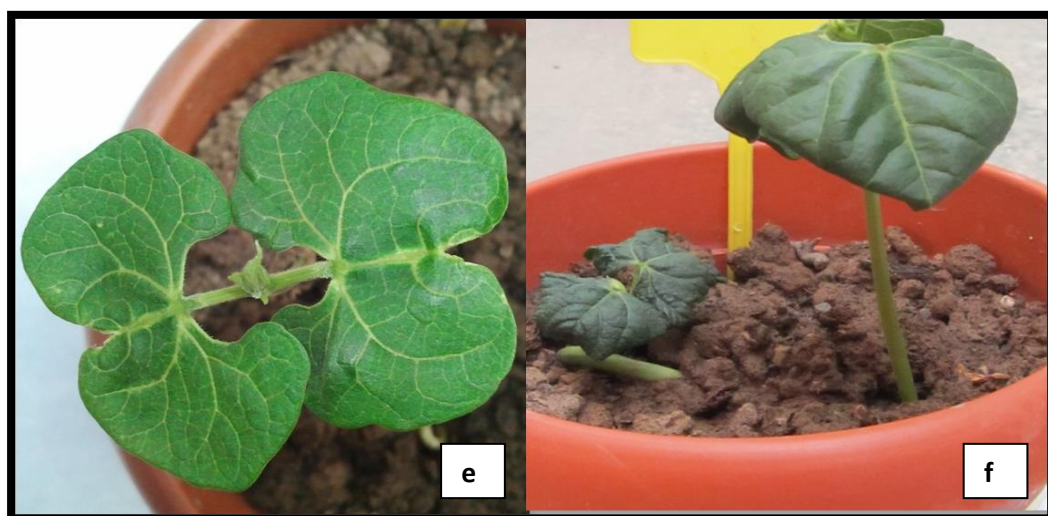
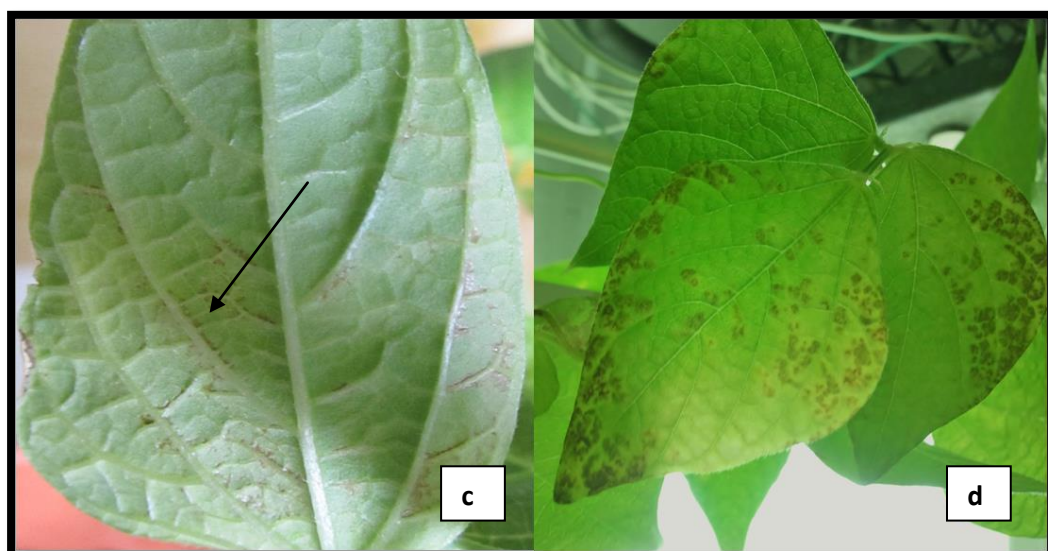
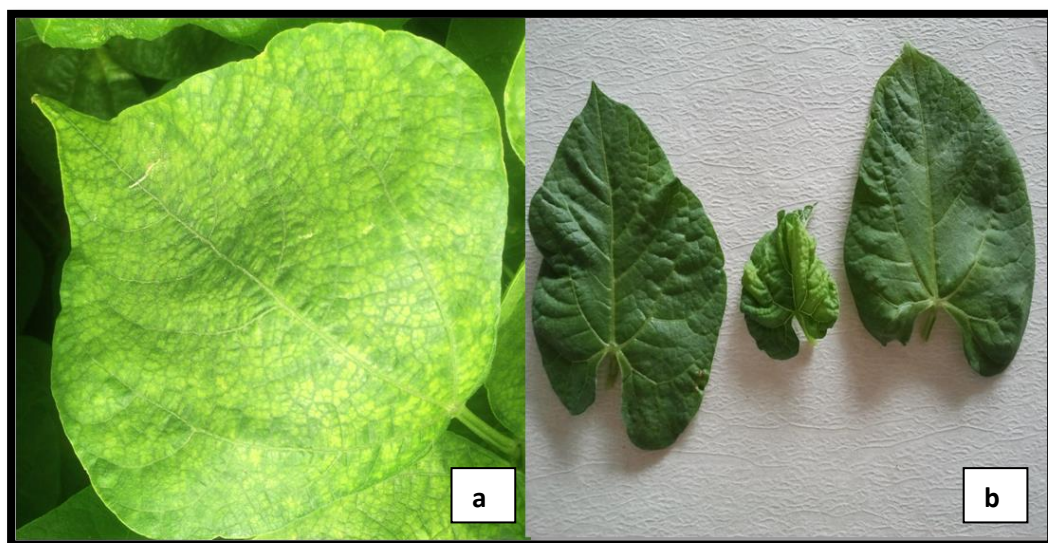
4.1.2 Bitki yetiştirme yöntemi ile tohumdan yetiştirilen bitkilerde gözlenen belirtiler

Araştırma kapsamında sera ve iklim odasında yetiştirilen bitkilerde görülen belirtiler Çizelge 4.2’de verilmiştir. Bitkilerde yaprak kıvrılması, yaprak kabarcıklaşması, şekil bozukluğu, mozaik, gelişim geriliği, damar arası sararma, yaprakta açık veya koyu yeşil renkli alanlar, klorotik damar bantlaşması, kloroz, nekrotik lekeler ve ölüm gibi belirtilerin bulunduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).

Çizelge 4.2 Tohumdan yetişen bitkilerde gözlemlenen belirtiler.

No.	Belirtiler	No.	Belirtiler
1	SY	36	SY
2	YK,SB,Ykb	37	SY
3	SY	38	Yk,SB
4	YK,DRA	39	YK,KL,M
5	-	40	-
6	-	41	SY
7	YK,SB,M	42	Ykb
8	SY	43	SY
9	YK,Ykb,DRA	44	YK,ŞB,DRA
10	GG,DRA	45	YK,Ykb,Sb,GG,DN
11	Ykb	46	YK,Ykb,M
12	Ykb	47	YK,Ykb.M
13	YK,Ykb	48	Ykb
14	Ybk,M,	49	SY
15	YK	50	SB,Ykb
16	YK,DRA	51	YK,Ykb,DRA
17	Yk,Ykb	52	YK,Ykb,SB,DRA
18	SY	53	M,GG
19	SY	54	YK,Ö
20	SB,GG	55	SY
21	SB,M	56	YK,Ykb
22	SB,DN	57	YK,Ykb,M,SB,Nl
23	YK,Ykb	58	YK,Ykb,M,SB
24	SY	59	YK
25	SY	60	Ykb
26	YK,SB	61	SY
27	GG,M	62	SY
28	DRA	63	M
29	YK,Ykb,KL	64	YK,Ykb,M
30	SY	65	YK,Ykb
31	YK	66	-
32	YK	67	YK,DRA,KL
33	YK,Ykb,SB,KL,NL	68	SB,Yk
34	YK,GG,SB	69	-
35	YK,SB	70	-

SY:Simptom yok M:Mozaik YK: Yaprak kıvrılması Ykb: Yaprak kabarcıklaşması KL:Klorotik leke GG:Gelişme geriliği DRA: Damarlarda renk açılması ŞB: Şekil bozukluğu Ö:Ölüm NL: Nekrotik leke DN: Damar nekrozu



Şekil 4.2 Tohumdan yetişen bitkilerde görülen bazı belirtiler (a: 'Mozaik' b: 'Yaprak kabarcıklanması' c: 'Damar nekrozu' d: 'Nekrotik leke' e: 'Şekil bozukluğu' f: 'Gelişme geriliği').

Ayrıca, hastalık belirtilerinin yanı sıra 6 örnekte (5, 6, 40, 66, 69 ve 70) çimlenmede sorun yaşandığı ve çıkış olmadığı da görülmüştür. Bitki yetiştirme yöntemi sonucu yetiştirilen bitkilerden elde edilen tohumlarda da küçülme, buruşma ve şekil bozukluğu olduğu fark edilmiştir (Şekil 4.3). 1, 3, 8, 18, 19, 24, 25, 30, 36, 37, 41, 43, 49, 55, 61 ve 62 nolu örneklerde ait tohumlardan yetiştirilen bitkilerde herhangi bir belirti ortaya çıkmadığı ve diğer örneklerin bitkilerinde ise değişik simptomların gözlemlendiği anlaşılmaktadır (Çizelge 4.2).



Şekil 4.3 Virüsle enfekteli bitkilerden alınan kapsül ve tohumlarda gözlemlenen buruşma, renk değişikliği ve şekil bozukluğu.

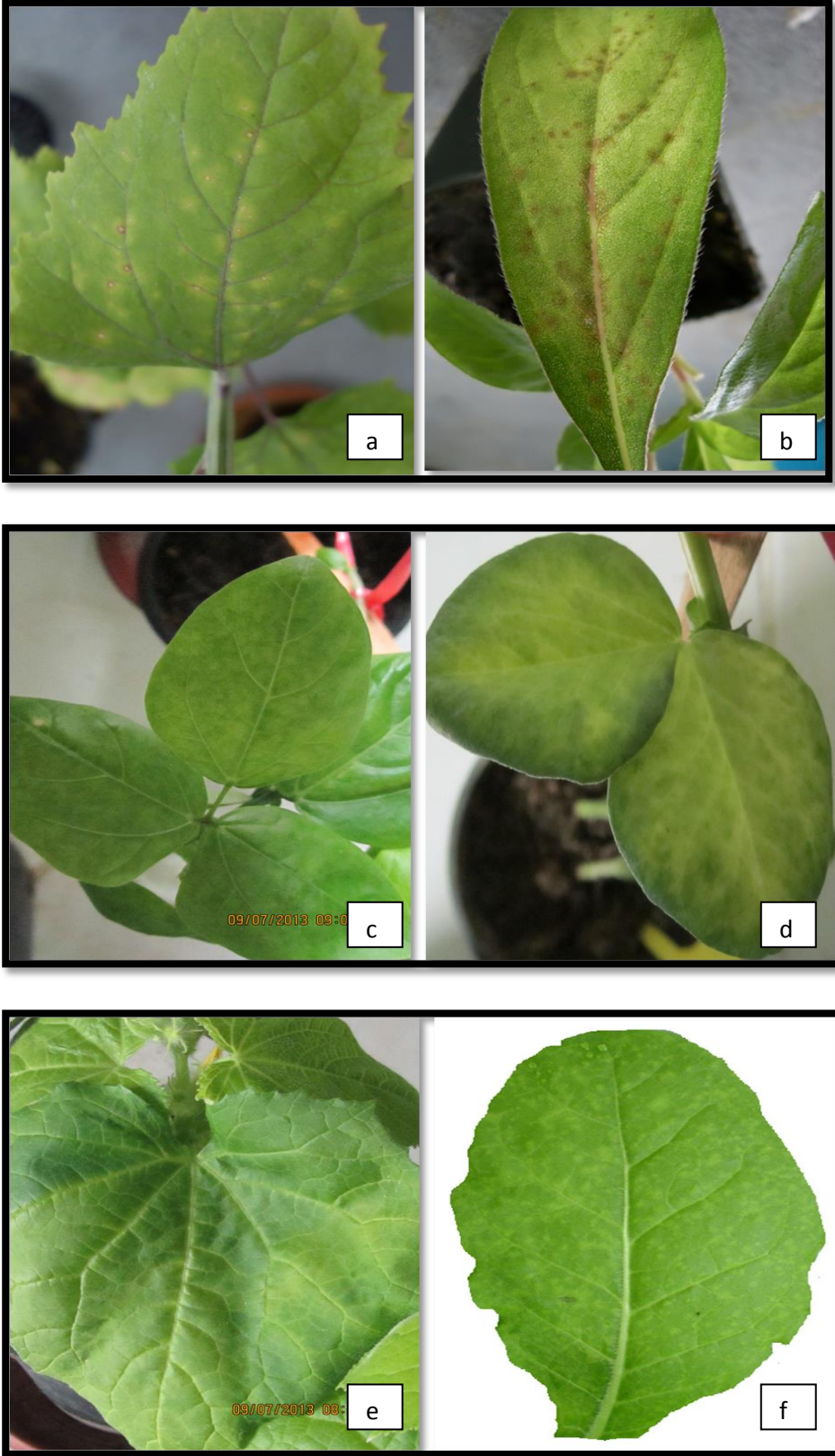
4.2 Biyolojik Endekslemenin Sonuçları

Tohum örneklerinden hazırlanan ekstratlar Çizelge 3.2' de verilen test bitkilerine inokule edilmiş ve bu bitkilerde ortaya çıkan sonuçlar Çizelge 4.3' te verilmiştir. Daha sonra, test bitkilerinden alınan yaprak örnekleri DAS-ELISA yöntemi ile test edilerek bulguların doğrulanması yapılmıştır.

Çizelge 4.3' teki sonuçlara göre tohum örneklerindeki virüs izolatlarının en fazla belirti oluşturdıkları test bitkilerinin *P.vulgaris*, *N.glutinosa*, *N.tabacum* cv.samsun ve *G.globosa* olduğu görülmektedir.

Bazı örneklerin *P. vulgaris* bitkisinde yaprakta şekil bozukluklarına, *C.quinoa* ve *C.amaranticolor* bitkisinde klorotik lekelere, *N.tabacum* bitkisinde mozaik ve nekrotik lekelere, *N.glutinosa* bitkisinde damarlarda renk açılması, mozaik ve nekrotik lekelere, *C.sativus* bitkisinde mozaik ve şekil bozukluğuna, *G.globosa* mozaik ve lokal lekelere, diğer bir kısım örneklerin ise *P. vulgaris* bitkisinde lokal nekrotik lezyonlar, mozaik, damar bantlaşması, nekrotik lokal lezyon, yaprak kıvrılması ve damar nekrozuna neden olduğu görülmüştür.

70 tohum örneğinden yapılan mekanik inokulasyonlar sonucu 30 örnek enfekteli olarak bulunmuş ve farklı test bitkilerinde oluşturduğu belirtiler Şekil 4.4' te gösterilmiştir. 2, 4, 8, 11, 15, 19, 20, 21, 25, 28, 29, 32, 35, 36, 38, 51, 52, 54, 57, 61 ve 66 nolu örneklerin, değişik test bitkilerinde ortaya çıkan belirtiler dikkate alınarak BCMV ile enfekteli olabildikleri düşünülmüştür. Test bitkilerindeki belirtiler; 6, 7, 17, 33, 43, 45, 46, 64 ve 65 nolu örneklerde BCMV'nün yanı sıra CMV ve SMV adlı etmenlerin varlığını açıklamaktadır. İnokule edilen test bitkilerinde AMV'nün neden olduğu belirtilere rastlanılmamıştır (Çizelge 4.3)



Şekil 4.4 Tohum örneklerindeki virüs izolatlarının değişik test bitkilerinde ortaya koyduğu belirtiler (a:*C.quinoa* nekrotik lokal leke; b:*G.globosa* kırmızı lokal leke; c-d:*V.unguiculata* ve *V.faba* mozaik; e:*C.sativus* mozaik; f:*N.tabacum* klorotik lokal leke).

Çizelge 4.3 Tohum örneklerinden yapılan mekanik inokulasyondan sonra test bitkilerinde oluşan belirtiler.

[illegible]

No	<i>C. quinoa</i>	<i>C. amaranticolor</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>V. faba</i>	<i>V. unguiculata</i>	<i>P. sativum</i>	<i>N. tabacum</i>	<i>N. glutinosa</i>	<i>G. globosa</i>	<i>M. sativa</i>	<i>C. sativus</i>
38	0	0	5,7,8	0	0	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	3	0	5, 6	0	0	0	0	0	4,5	0	0
47	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	0	0	5,7,8	0	0	0	0	0	0	0	0
52	0	0	1,5,6,7	5	0	0	0	0	0	0	0
53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	0	0	6,8,1,9	0	0	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	0	0	5,7,9	0	0	0	0	0	0	0	0
58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
61	0	0	1,8	3,5	0	0	0	0	0	0	0
62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
64	0	3,6	7,8	0	0	0	0	2,5	0	0	5,7
65	3	0	1,7	0	0	0	0	2,5	4	0	0
66	0	0	5,7	5	0	0	0	0	0	0	0
67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Test bitkilerinde oluşan belirtiler alınan yaprak örneğine uygulanan DAS-ELISA testi ile doğrulanmıştır.

0: Belirti yok, 1: Damar nekrozu, 2: Damarlarda renk açılması, 3: Klorotik lokal leke, 4: Lokal leke, 5: Mozaik, 6: Nekrotik lokal leke, 7: Şekil bozukluğu, 8: Yaprakta damar bantlaması, 9: Yaprak kıvrılması

4.3 Serolojik Testlerin Sonuçları

Çalışmada kullanılan 70 tohum örneğinde BCMV, CMV, SMV ve AMV adlı etmenlerin varlığını belirlemek için serolojik yöntemlerden DAS-ELISA testi kullanılmıştır.

Yapılan testler sonucunda; 8 örnekte virüs enfeksiyonunun olmadığı ve 44 örnekte BCMV, 5 örnekte ise CMV' nün tek başına bulunduğu görülmüştür. Karışık enfeksiyon olduğu belirlenen 13 tohum örneğinin 2'sinde BCMV + CMV + SMV birlikte bulunurken, 6 örnekte BCMV + CMV, 4 örnekte BCMV + SMV ve 1 örnekte de CMV + SMV bir arada oldukları belirlenmiştir (Çizelge 4.7). Fasulye tohum örneklerine ilişkin DAS-ELISA testine ait sonuçlar Çizelge 4.4'te görülmektedir.

Çizelge 4.4 Fasulye tohumlarında DAS-ELISA ile saptanan virüsler ve bu virüslerin oranları.

Virüs Adı	Enfekteli örnek sayısı	Bulunma oranı (%)
BCMV	44 (12*)	62,86
BCMNV**	-	
CMV	5 (9*)	7,14
SMV	0 (7*)	
BCMV+CMV	6	8,57
BCMV+SMV	4	5,71
CMV+SMV	1	1,43
BCMV+CMV+SMV	2	2,86
Toplam Enfekteli Örnek Sayısı	62	88,57
Toplam Sağlıklı Örnek Sayısı	8	11,43
Toplam Test Edilen Örnek Sayısı	70	100

* Karışık enfeksiyon içinde bulunan viral etmen

**BCMNV DAS-ELISA yöntemi ile test edilmemiştir.

4.4 Moleküler Testlerin Sonuçları

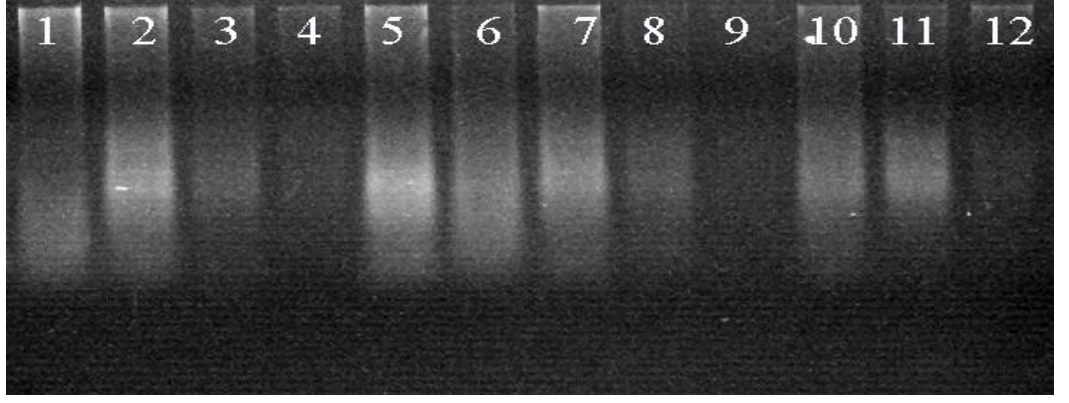
Çalışmada kullanılan 70 adet tohum örneğinin RT-PCR sonuçları Çizelge 4.7' de verilmiştir. Elde edilen bulgular, 1 örnekte virüs enfeksiyonunun bulunmadığını ve 43 örnekte ise BCMV'nün tek başına mevcut olduğunu göstermiştir. Karışık enfeksiyon olduğu belirlenen 26 tohum örneğinin 3'ünde BCMV + CMV + SMV, 12' sinde BCMV + CMV, 4' ünde BCMV + SMV ve 7'

sinde BCMV + BCMNV'nün birlikte oldukları saptanmıştır (Çizelge 4.5). Moleküler testlere ait bazı jel fotoğrafları ise Şekil 4.5- 4.10 aralığında verilmiştir.

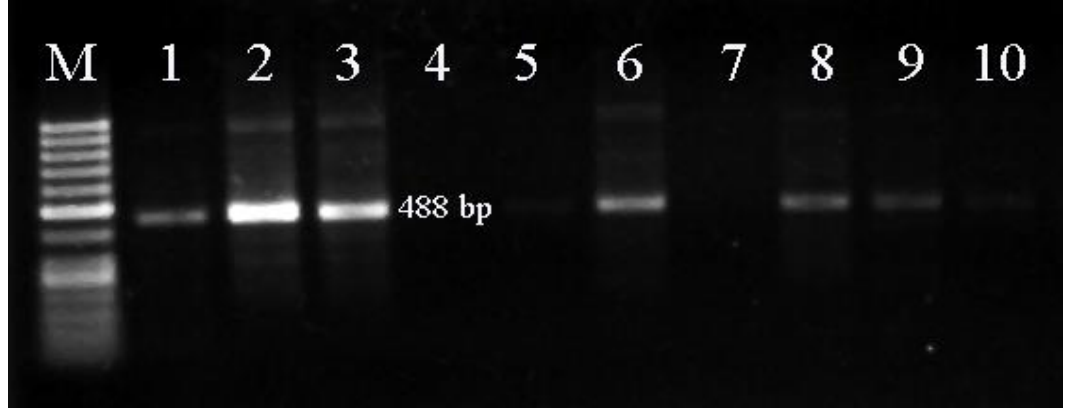
Çizelge 4.5 Fasulye tohumlarında PCR ile saptanan virüsler ve bu virüslerin oranları.

Virüs Adı	Enfekteli örnek sayısı	Bulunma oranı (%)
BCMV	43 (26*)	61,43
BCMNV	0 (7*)	
CMV	0 (15*)	
SMV	0 (7*)	
AMV	0	
BCMV - BCMNV	7	10
BCMV - CMV	12	17,14
BCMV- SMV	4	5,71
BCMV - CMV - SMV	3	4,29
Toplam Enfekteli Örnek Sayısı	69	98,57
Toplam Sağlıklı Örnek Sayısı	1	1,43
Toplam Test edilen Örnek Sayısı	70	100

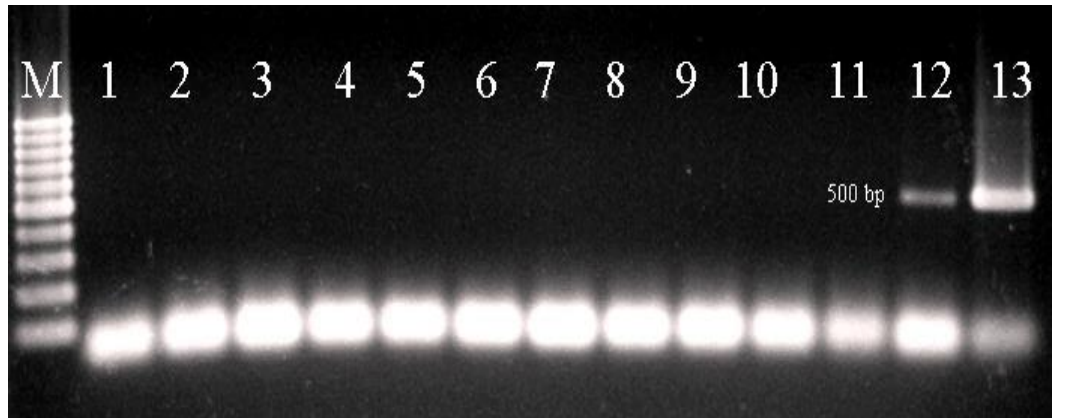
* Karışık enfeksiyon içinde bulunan viral etmen



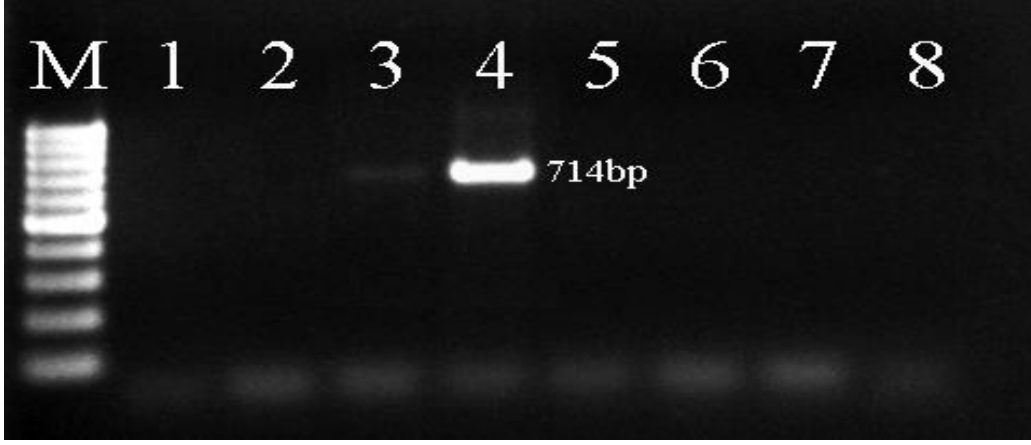
Şekil 4.5 Fasulye tohumlarından elde edilen nükleik asitlerin (TNA) jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü.



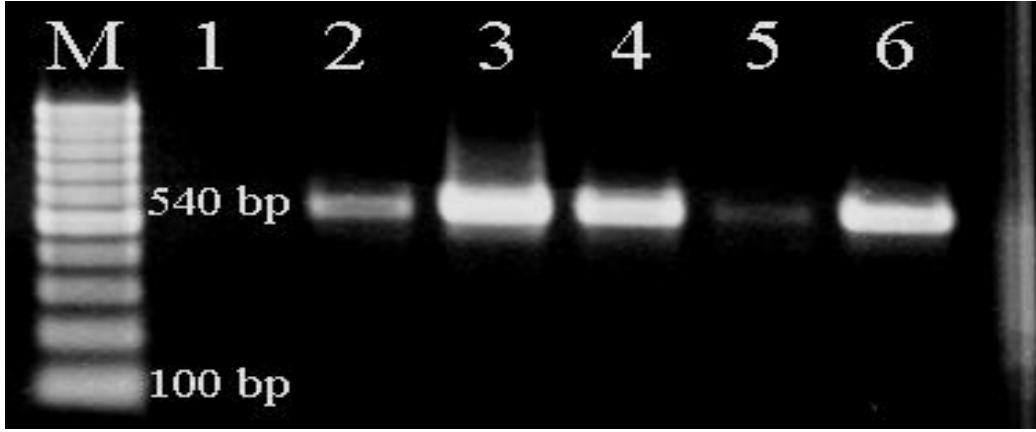
Şekil 4.6 Fasulye tohumlarında BCMV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü.



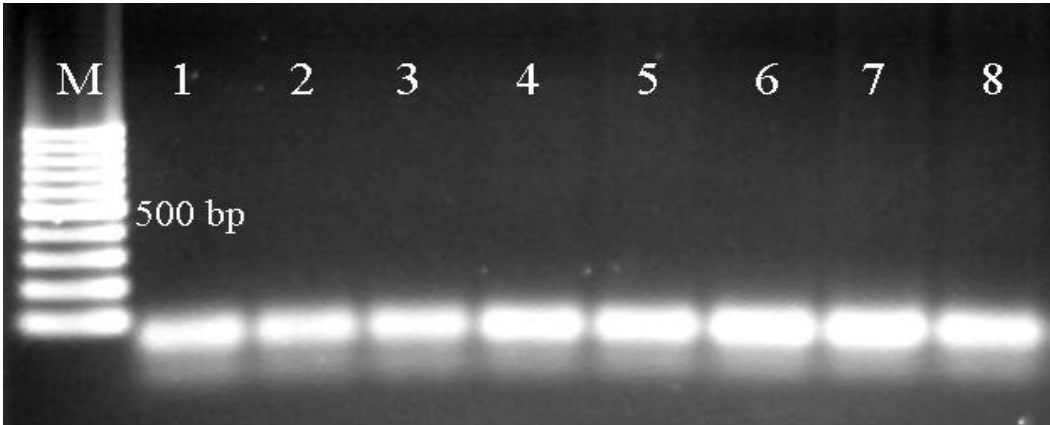
Şekil 4.7 Fasulye tohumlarında SMV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü.



Şekil 4.8 Fasulye tohumlarında BCMNV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü.



Şekil 4.9 Fasulye tohumlarında CMV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü.



Şekil 4.10 Fasulye tohumlarında AMV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü.

4.5 Kullanılan Tanılama Yöntemlerinin Duyarlılık Durumunun Karşılaştırılması

Tohum örneklerine yapılan test sonuçlarının karşılaştırmalarında tanılama yöntemleri arasında RT-PCR yönteminin; denemelerde tüm yöntemlerle belirlenen pozitif örneklerin tamamını saptayarak tanılamada %100 oranında bir başarı sağladığı görülmüştür. Bu yöntemin sonuçları baz alındığında, DAS-ELISA yönteminin % 89,85, test bitkilerine inokulasyon yönteminin % 43,47, simptomatolojinin % 69,56 ve bitki yetiştirme yönteminin % 69,30 oranlarında başarılı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6).

BCMV, BCMNV, CMV ve SMV adlı virüsler ile en fazla enfekteli örnek sayısı diğerlerine göre daha duyarlı yöntem olan PCR yöntemi ile saptanmıştır. BCMNV ise sadece PCR yöntemi test edilmiş ve 7 örnekte bu virüsün bulunduğu görülmüştür (Çizelge 4.6). Virüsleri tanılamada kullanılan yöntemlerin detaylı karşılaştırılmalı sonuçları Çizelge 4.7' da verilmektedir.

Çizelge 4.6 Virüsle enfekteli örnek miktarının yöntemlere göre belirlenme durumu.

<u>Virüs</u>	<u>Enfekteli Tohum Örneği Sayısı</u>		
	<u>PCR</u>	<u>DAS-ELISA</u>	<u>BİYOLOJİK ENDEKSLEME</u>
BCMV	69	56	30
BCMNV	7	-	-
CMV	15	14	8
SMV	7	7	4
AMV	0	0	0

0 : enfekteli örnek sayısı bulunmamaktadır.

- : BCMNV DAS-ELISA ile test edilmemiştir.

[illegible]

No	RT-PCR					DAS-ELISA				Test Bitkilerine İnokulasyon					Simptomatoloji	
	BCM	BCM	CM	AM	SM	BCM	CM	AM	SM	BCM	BCM	CM	AM	SM	Tohum	Bitki
38	+					+				+					+	+
39	+					+									+	+
40	+					+										Çy
41	+					+									+	
42	+					+									+	+
43	+		+		+	+	+		+	+		+		+	+	
44	+					+										+
45	+		+			+	+			+		+			+	+
46	+				+	+			+	+				+	+	+
47	+														+	+
48	+		+				+								+	+
49	+					+									+	
50	+														+	+
51	+		+				+			+						+
52	+		+							+					+	+
53	+		+		+		+		+						+	+
54	+				+	+			+	+					+	+
55	+		+				+									
56	+		+			+	+									+
57	+		+			+	+			+					+	+
58	+		+			+	+								+	+
59	+		+				+								+	+
60	+															+
61	+									+					+	+
62	+															
63	+					+									+	+
64	+		+			+	+			+		+			+	+
65	+		+				+			+		+				+
66	+					+				+						Çy
67	+					+										+
68	+					+										+
69	+					+										Çy
70	+															Çy

+:Enfekteli Çy: Çıkış olmayan

5. TARTIŞMA

Araştırma kapsamında fasulye tohumlarındaki ekonomik öneme sahip viral etmenlerin simptomatolojik, biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler ile tanınması ve bu etmenlerin tohumlarda bulunma durumlarının belirlenmesi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu sonuçlardan yola çıkarak kullanılan tanılama yöntemleri arasındaki duyarlılığın saptanması amaçlanmıştır.

Araştırma için temin edilen 70 fasulye tohum örneğinin simptomatolojik açıdan görsel olarak incelenmesi sonucunda 48 örnekte tohum renginde değişme, sararma, tohum büyüklüğünde küçülme, buruşma, hilum renginde değişme, şekil bozuklukları ve beneklenme görülmüştür (Çizelge 4.1). Ayrıca kaplama hataları ve mekanik zararlar da fark edilmiştir. Fasulye tohumlarında uygulanan bitki yetiştirme testleri (growing-on) uygulanarak büyüyen bu bitkilerin incelenmesi sonucunda, yaprak kıvrılması, yaprak kabarcıklaşması, şekil bozukluğu, mozaik, gelişim geriliği, damar arası sararma, yaprakta açık veya koyu yeşil parçalar, klorotik damar bantlanması, kloroz, nekrotik lekeler ve ölüm gibi belirtiler görülmüştür (Çizelge 4.2). 70 fasulye tohumunun yetiştirilmesi sonucu 6 bitkide çıkış görülmez iken yetişenler arasındaki 48 bitki de bu belirtiler görülmüştür. Tohumların yarıdan fazlasında belirtiler görülmesine rağmen hangi virüs ile enfekteli olduğunun belirlenememesi durumu simptomatoloji yönteminin duyarlılığını kısıtlamaktadır. Simptomatolojik olarak herhangi bir belirti göstermeyen ve görünüşte sağlıklı olarak değerlendirilen tohum örneklerinde viral enfeksiyonların da olabileceğine yapılan denemeler sonucunda ulaşılmıştır. Aynı zamanda belirtilere bakarak fungal ya da bakteriyel olduğu düşünülen bazı tohumlarda belirtilerin nedeninin viral kaynaklı olduğu da görülmüştür.

Daha önceki çalışmalarda da simptomatoloji yönteminin kullanıldığı görülmektedir. BCMV ile sistemik enfekteli bitkilerin daha küçük tohum oluşturmaları, enfekteli tohum zarflarının bazen küçük ve koyu yeşil lekeli olması gibi farklılıklardan bu tohumların gözle incelenerek ayırt etmenin mümkün olduğu bildirilmektedir (Zaumeyer and Goth,1964; Zaumeyer and Thomas, 1975).

Agarwal and Sinclair (1988) tohumlarda meydana gelen değişik renkteki beneklenmenin SMV virüsü ile ilişkili olabileceğini belirtirken Paylan (2011), çalışmasında 3 örnekte SMV etmeninin bulunduğunu belirlemiş ve bu tohumlarda söz konusu benzer beneklenmelerin olduğunu kayıt etmiştir.

Virüslerin teşhisinde simptomatoloji yönteminin kullanıldığı çalışmaların aksi olarak yapılan başka bir çalışmada BCMV ve SMV ile enfekteli bitkileri tarla koşulları altında ayırmanın zor olduğu ve simptomatoloji yönteminin kullanılmadığı bildirilmektedir (Provvidenti et al., 1982).

Simptomatoloji yöntemi uzun zaman alan ve gözlem yapan kişinin deneyimli olmasını gerektiren bir yöntemdir. Tohumlarda bulunan virüslerin tanınması yalnızca tohumlardaki belirtilere bakılarak yapılamamaktadır. Bitki yetiştirme yoluyla belirti izlemenin güvenilirliği ise belirti görünümüne bağlıdır. Bu yöntemde virüsün karakteristik belirtileri fidelerin erken dönemlerinde ortaya çıktığı zaman ve belirti oluşması için gerekli ortam koşulları iyi bilindiğinde güvenle kullanılabilir. Bu nedenle virüs enfeksiyonları daha doğru ve güvenilir tanılama teknikleri ile doğrulanmalıdır (Erkan, 1998).

Araştırmada gerçekleştirilen biyolojik testlerde ISTA' nın önerdiği kriterler dikkate alınmıştır. Önceki çalışmalarda test bitkilerine inokulasyon amacıyla tohum ekstraktlarını hazırlamak için gerekli olan tohum sayısının, virüsün tohum ile taşınma oranına ve tohum büyüklüğüne bağlı olarak örnek başına en az 700 ile 3000 adet arasında olması gerektiği belirtilmiştir (Neergard, 1983).

Tohum örneklerinden gerçekleştirilen biyolojik testler sonucunda test bitkilerinde gözlenen simptomlar yapraklarda klorotik lokal lezyonlar, mozaik, renk açılmaları, deformasyonlar ve nekrotik lekelerdir (Çizelge 4.3). 70 tohum örneğinin 30' u bu belirtilerin bazılarını beraber verirken bazılarında ise sadece bir belirti gözlenmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlar biyolojik endeksleme konusunda yapılan çalışmalarla paralel olarak CMV, SMV, AMV, BCMV ve BCMNV için gerçekleştirilmiş ve benzer sonuçlar elde edilmiştir (Matthews, 1991; Petrović et al., 2010; Neergard, 1972).

CMV'nün *Glycine max* bitkisinde mozaik ve hafif yaprak kıvrılmasına, *Datura stramonium* bitkisinde klorotik alanların oluşumunda mozağe, *N.tabacum* var.*samsun* bitkisinde sarı yeşil alanlarda hafif mozağe, *N.glutinosa* bitkisinde kesikli çizgi mozağe neden olduğu bir çalışmada bildirilmiştir (Petrović et al., 2010).

Başka bir kaynakta ise *Phaseolus vulgaris* bitkisinde sistemik lokal lezyon ve nekrotik lokal lezyon; *C.quinoa* ve *C.amaranticolor* bitkisinde klorotik lekeler neden olduğu belirtilmektedir (DPV, 2012). Yapılan çalışmalara benzer şekilde bu çalışmada da CMV' nün *Phaseolus vulgaris* bitkisinde yaprakta şekil bozukluklarına; *C.quinoa* ve *C.amaranticolor* bitkisinde klorotik lekeler; *N.tabacum* bitkisinde mozaik ve nekrotik lekeler; *N.glutinosa* bitkisinde damarlarda renk açılması, mozaik ve nekrotik lekeler; *C.sativus* bitkisinde mozaik ve şekil bozukluğuna; *G.stramonium* mozaik ve lokal lekeler neden olduğu görülmüştür.

Deligöz (2007), BCMV' nün fasulye çeşitlerine mekanik inokulasyonu sonucu bu bitkilerde sistemik mozaik, sistemik nekroz, hafif mozaik, nekrotik lokal lezyon ve damar nekrozu gibi belirtiler verdiğini bildirmektedir (Deligöz, 2007).

Abtahi et al. (2009), tarafından BCMV ile enfekteli soya fasulyesi örneklerinin Cucurbitaceae, Chenopodiaceae, Solanaceae ve Leguminosae familyasındaki 15 türüne ait test bitkilerine yapılan mekanik inokulasyonu sonucu sadece *P.vulgaris* cv.Red Kidney ve *P.vulgaris* cv.Bountiful bitkilerinde mozaik belirtileri görülmüştür.

Yapılan diğer bir çalışmada ise BCMV' nün *Glycine max* bitkisinde yeşil sarı alanlarda hafif mozaik, *Lupinus albus* bitkisinde damar etrafında koyu yeşil alanlarda şiddetli mozaik, *N.tabacum* var.samsun ve *N.glutinosa* bitkisinde ise belirti vermediği gösterilmiştir (Petrović et al., 2010). Bu çalışmada ise BCMV' nün *P.vulgaris* bitkisinde mozaik, damar bantlaşması, nekrotik lokal lezyon, yaprak kıvrılması ve damar nekrozu gibi belirtileri oluşturduğu, *N.tabacum* ve *N.glutinosa*' da ise belirti oluşturmadığı görülmüştür.

BCMNV hakkında Nepal'de yapılan bir çalışmada bu virüsün *Glycine max* bitkisinde nekrotik lekeleri takiben sistemik nekroz ve ölüme, *V.unguiculata* bitkisinde sistemik mozaığe, *C.quinoa* ve *C.amaranticolor* bitkilerinde klorotik lokal lezyonlara neden olduğu görülmüştür (Shahid, 2013).

Petrović et al.,(2010) tarafından BCMNV *Glycine max* bitkisinde mozaik, *Lupinus albus* bitkisinde de damar etrafında mozaığe neden olduğu bildirilirken, bu çalışmada BCMNV' nün test bitkilerine ait belirtileri üzerinde çalışılmamıştır.

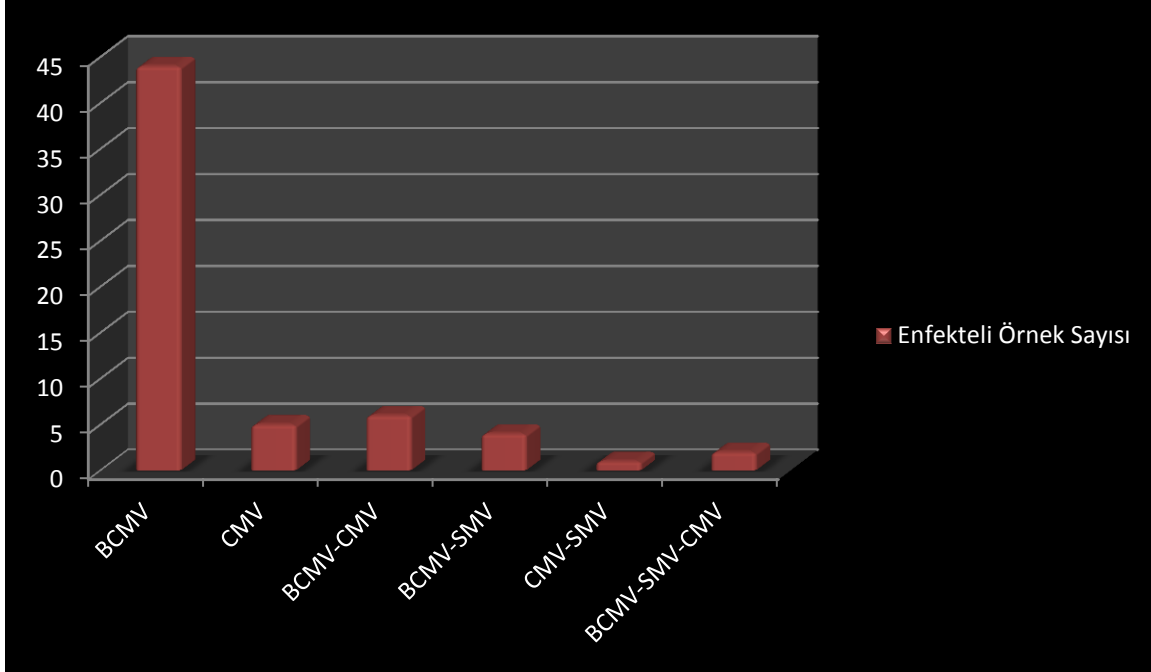
SMV genel olarak *Glycine max* bitkisinde rugoz, koyu yeşil damar bantlaşması, açık yeşil damar arası alanlar, yaprak kıvrılmasına neden olmaktadır (DPV, 2012). Ayrıca, *Phaseolus vulgaris*' in bazı çeşitlerinde ise BCMV' e benzer sistemik belirtiler, lokal nekrotik lezyonlarla birlikte sistemik nekroz görüldüğü de bildirilmiştir (Provvidenti et al., 1982). Yapılan çalışmalara paralel olarak bu çalışmada benzer belirtiler elde edilerek SMV' nün *Phaseolus vulgaris* bitkisinde lokal nekrotik lezyonlara neden olduğu görülmüştür.

Fasulye tohumlarında bulunan diğer bir virüs olan AMV' nün *Glycine max* bitkisinde yaprak deformasyonları ve mozaïque, *Zinnia elegans* bitkisinde klorotik alanlarda mozaïque, *N.tabacum var. samsun* bitkisinde mozaïque, *N.glutinosa* bitkisinde yassı yaprakların buruşması gibi belirtilere neden olduğu bir çalışmada bildirilmiştir (Petrović et al., 2010). Yapılan bu çalışmaların aksine AMV ile enfekteli örnek tanılamada kullanılan diğer yöntemlerde olduğu gibi biyolojik endekslemede de pozitif sonuç vermemiş ve test bitkilerinde herhangi bir belirti oluşmasına neden olduğu gözlemlenmemiştir.

Biyolojik testler sayesinde etmenlerin tanınması sağlanmakta ayrıca virüs kültürlerinin korunması ve çoğaltılması da mümkün olmaktadır. Fakat sera ve iklim odası gibi alanlara ihtiyaç duyulması, virüs konsantrasyonlarının düşük olması durumunda indikatör bitkilerde belirti oluşmaması, bitki özsuyuna geçebilen bazı virüs inhibitörlerinin indikatör bitkilerde belirti oluşumunu engellemesi vb. bazı olumsuz yönleri bulunmaktadır. Zaman tüketimi ve virüsleri tarlada ifade edilen belirtilere dayanarak test bitkilerindeki belirtilere göre ayırt etmede bazı farklılıklar göstermesi de bu yöntemin dezavantajı sayılmaktadır (Naidu and Hughes, 2013). Yapılan bu çalışmada da biyolojik endeksleme yönteminde hem belirtinin oluşması için gereken süre hem de belirtili yaprakların DAS-ELISA ile test edilerek doğrulanmasının gerekliliğinden dolayı uzun zaman aldığı görülmüştür. Biyolojik testlerin bu dezavantajları araştırmacıları daha pratik ve kısa süreli tanılama yöntemleri arayışı içerisine sokmuştur (Ball, 1974).

Araştırma kapsamında fasulye tohumlarında gerçekleştirilen serolojik test (DAS-ELISA) sonuçlarına göre değişik çeşitlere ait tohum örneklerinin % 62,86 BCMV, % 7,14 CMV ile enfekteli olduğu görülmüştür. 44 örnekte BCMV, 5 örnekte CMV ve 13 örnekte karışık enfeksiyon olmak üzere toplam 62 örnekte 1 yada daha fazla sayıda viral etmen bulunduğu saptanmıştır. Karışık enfeksiyon olduğu belirlenen 13 tohum örneğinin 2'sinde BCMV, CMV ve SMV etmenleri birlikte bulunurken, 6 örnekte BCMV ve CMV, 4 örnekte BCMV ve SMV, 1

örnekte de CMV ve SMV etmenlerinin birlikte oldukları görülmüştür (Çizelge 4.4). Fasulye tohumlarında BCMV ile enfekteli örnek sayısının diğer virüslere oranla daha fazla olması dikkat çekmektedir (Şekil 5.1). Ayrıca diğer virüslerin DAS-ELISA testi sonuçlarına göre fasulye tohumlarında bulunma oranı sıralamasında BCMV' nü CMV ve SMV takip etmiştir.



Şekil 5.1 DAS-ELISA testi sonuçlarına göre fasulye tohumlarındaki virüslerin bulunma durumu

Dünyada ve ülkemizde yapılan çalışmalarda da bu sonuçlara benzer raporlar bulunmaktadır. Kutluk-Yılmaz vd. (2002), yaptıkları bir çalışmada topladıkları toplam 88 adet fasulye tohum örneklerini DAS-ELISA yöntemiyle test ettikten sonra tohumların yarıdan fazlasının (% 61.4) BCMV ile enfekteli olduğunu saptamışlardır.

Gümüş vd. (2002), Ege Bölgesi'nde tohum üreten ve pazarlayan kuruluşlardan alınan fasulye örneklerini DAS-ELISA ile test edilmeleri sonucu örneklerin % 23.52'sinin BCMV ile enfekteli olduğunu belirlemişlerdir.

Petrović et al. (2010), Sırbistan'da yaptıkları bir çalışmada tohumların ELISA ile test edilmesi sonucu bu tohumların büyük bir kısmının (% 30.53) BCMV ile enfekteli olduğunu görmüşlerdir. Bu oranları CMV (5.34) ve AMV (3.41) takip etmiştir. Hastalıklı bitkilerin % 90.1' inin tek virüs tarafından, % 9.9'

unun iki virüs tarafından enfekteli olduğu da belirtilmiştir. En yaygın çift virüs enfeksiyonlarının BCMV+CMV (2.67), BCMV+BCMNV (1.53) ve BCMNV+AMV (0.39) olduğu sonucuna dikkat çekilmiştir.

Gilbertson et al. (2002) fasulyede 5 virüsün yaygınlık durumunu saptamak amacıyla yaptıkları çalışmada yöntem olarak kullandıkları DAS-ELISA testi sonuçlarına göre en fazla BCMV' nün görüldüğünü ve daha az oranda ise CMV, AMV, BCMNV saptandığını belirtmiştir.

Kılıç ve Yardımcı (2012) Burdur' un Çine ovasında fasulyelerdeki CMV' nün belirlenmesi amacıyla toplanan 50 yaprak örneğini ELISA ve IC-RT-PCR yöntemi ile testlemişlerdir. DAS-ELISA ile testlenen örneklerin 25 tanesinin pozitif sonuç verdiği ve bu örneklerin IC-RT-PCR ile sonuçlarının desteklenmesi ile 678 bp' de bant oluştuğu görülmüştür.

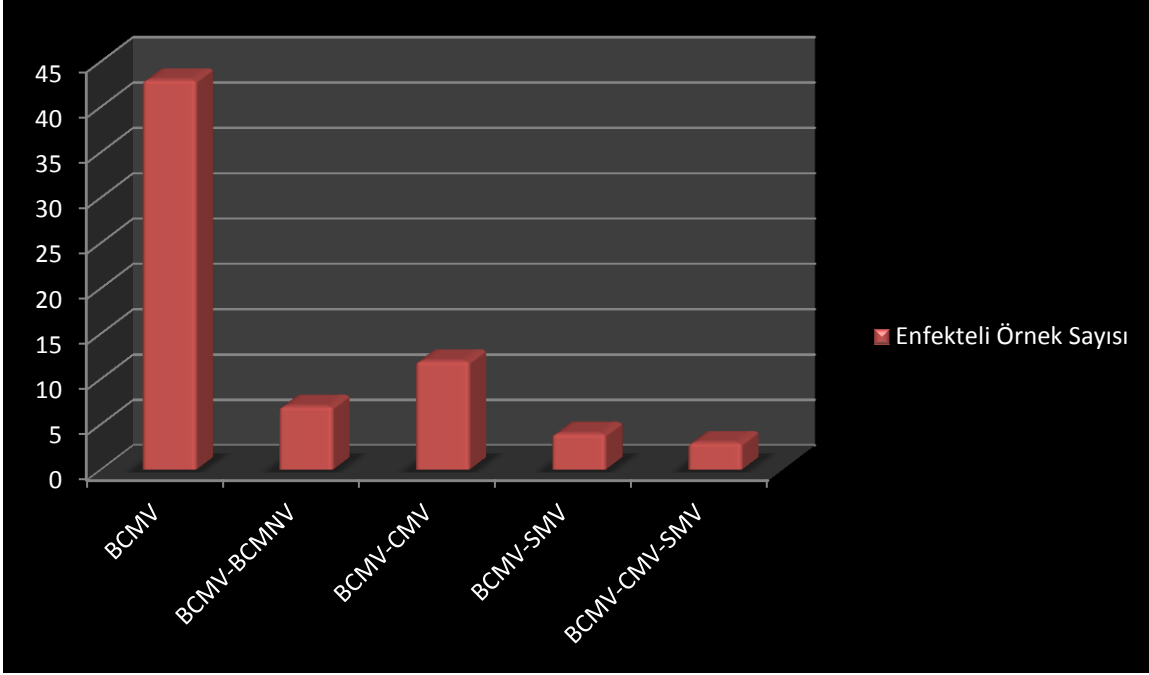
Shahid et al. (2013) fasulyede BCMNV için DAS-ELISA testi uygulamışlar ve bu virüsün bulunma oranını % 83.3 bulmuşlardır.

Yukarıdaki çalışmalara benzer yapılan bu çalışma ile birlikte fasulye tohumlarında en yaygın bulunan virüsün BCMV olduğu, bunu takiben BCMNV, CMV, SMV' nün ise daha az oranlarda bulunduğu, AMV' nün ise az bulunduğu veya hiç bulunmadığı DAS-ELISA testi sonuçlarına göre ulaşılmaktadır. Ayrıca bu çalışmalarda tohumların birden fazla virüs ile enfekteli olma oranının yüksek olduğu dikkat çekmektedir.

DAS-ELISA sonuçların görsel yorumlama yerine kantitatif olarak elde edilmesi, çok sayıda örneğin kısa zamanda test edilebilmesi, uygulanabilirliğinin kolay olması, duyarlılık ve reagentlerin kullanımındaki ekonomiktikten dolayı her durumda geniş çapta tercih edilen bu yöntemin sonuçları daha hassas olan moleküler yöntemle (PCR) de desteklenmiş ve kıyaslama yapılmıştır.

PCR testi sonuçlarına göre tohum örneklerinin 43 tanesinde BCMV ve 26 örnekte karışık enfeksiyon olmak üzere toplam 69 örnekte 1 yada daha fazla sayıda viral etmen bulunduğu saptanmıştır. Karışık enfeksiyon olduğu belirlenen 26 tohum örneğinin 3'ünde BCMV, CMV ve SMV etmenleri birlikte bulunurken, 12 örnekte BCMV ve CMV, 4 örnekte BCMV ve SMV, 7 örnekte de BCMV ve BCMNV etmenlerinin birlikte oldukları belirlenmiştir (Çizelge 4.5). Fasulye tohumlarında yapılan PCR testi sonuçlarına göre DAS-ELISA testindeki sonuçlar

gibi BCMV ile enfekteli örnek sayısının diğer virüslere oranla daha fazla sayıda olduğu görülmüştür (Şekil 5.2).



Şekil 5.2 PCR testi sonuçlarına göre fasulye tohumlarındaki virüslerin bulunma durumu

Flores-Estévez et al. (2003) tarafından yapılan çalışmada BCMV ve BCMNV virüslerinin yaygınlık durumu PCR ile belirlenerek % 63 ve % 45 olarak bulunmuştur.

Çin'de National Crop Genebank (NCGB)'tan temin edilen fasulye üretim materyallerinin çoğunun BCMV ile enfekteli olduğu PCR ile test edilerek rapor edilmiştir (Wang Jie Wang, 2006).

Meksika'da fasulye tohumlarındaki BCMV ve BCMNV' nin bulunma durumu RT-PCR ile sırasıyla % 13 BCMV ve % 21 BCMNV saptanmıştır. % 9' luk oran ise her iki virüsün bulunma durumudur (Lepe-Soltero et al., 2012).

Hem dünyada hem ülkemizde yapılan PCR testi sonuçlarına göre de fasulye tohumlarında BCMV' nün yaygın olduğu görülmüştür. Ayrıca, BCMNV' nün yaygınlık durumunun BCMV' e göre az olduğu, fakat Meksika gibi bazı ülkelerde ise BCMV' nden daha yaygın olduğu da görülmüştür. Ayrıca, diğer virüslerin bulunma oranlarına göre sıralanmasında CMV, BCMNV ve SMV şeklinde olduğu görülmüştür.

PCR hassas, seçici ve kısa sürede sonuç veren bir yöntemdir. Seroloji (ELISA) dışındaki diğer moleküler metotlar ile tanısı mümkün olmayan birçok obligat fungal ve bakteriyel mikroorganizmalar gibi yapay kültür ortamlarında çoğaltılamayan (virüs, viroid, mikoplazma ve riketsia) patojenlerin sebep olduğu hastalıkların teşhisi PCR ile kolayca yapılabilmektedir.

Bu kadar önemli oranda bulunan bu virüslerin ekonomik anlamda yarattığı sonuçlar da azımsanmayacak düzeydedir. Daha önce yapılan çalışmalarda bu virüslerin dünya çapında fasulye üretiminde ekonomik anlamda önemli zararlar verdiği kayıt altına alınmıştır. Fasulyede BCMV'nün neden olduğu verim kaybı örneklerinden bazıları Küba' da % 11–62 (Lastres ve Encinosa.,1989), Hindistan'da ise yetiştirilen çeşide bağlı olarak yaklaşık %71 (Bhagawati and Bhagabati, 1994) olarak bildirilmiştir. Oregon'da çeşitli hastalık seviyelerine bağlı olarak değişmekle birlikte ürün kaybı % 53-68 arasında olduğu açıklanmıştır (Hampton, 1975). Meksika' da BCMV % 30' dan 80' e varan oranlarda üretimde zarara neden olduğu rapor edilmiştir (Chew *et al.*, 2010). BCMNV'nün de önemli kayıplara neden olduğu bildirilmektedir. Özellikle Afrika'da bu virüs yaygın olup şiddetli tepe nekrozu oluşumundan dolayı bazı bölgelerde *I* geni taşıyan çeşitlerden hiç ürün alınamamaktadır (Omuniy et al., 1995). Ülkemizde üretimde verdiği ekonomik zarar hakkında bir çalışma bulunmamaktadır.

BCMV ve BCMNV virüslerinin dünyada en tahripkar virüsler olarak geçmesinin nedenlerinden biri yüksek oranda tohum ile taşınmalarıdır. Çeşitli araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda BCMV'nün tohumla taşınma oranının % 83' e kadar ki oranlarda görüldüğünü belirlemişlerdir (Bos, 1971; Omar et al., 1985; Richardson, 1990). Schmidt (1992), ise bu oranın % 93' ten fazla olduğunu saptamıştır. Yüksek oranda tohumla taşınmasından dolayı BCMV ile enfekteli tohumların dikimi ile tarlada önemli ölçüde ürün kayıpları görülmüş ve bu virüsün geniş çapta yayılmasına neden olduğu bildirilmiştir (Drijfhout 1978; Mavri and Šuštar-Vozli, 2004).

CMV, SMV ve AMV gibi virüsler de fasulye tohumlarında BCMV ve BCMNV kadar yüksek oranlar da olmasa da tohumla taşınmaktadır. Kaiser and Hannan (1983), AMV inokule edilmiş fasulye bitkilerinden elde edilen tohumlarda, virüsün % 0.7-5 oranında taşınabildiğini belirtirken, Castaño and Morales (1983) Brezilya'da SMV'nün taşınma oranını % 1.6 olarak belirlemiştir. Yeni Zelanda' da Fletcher (2001) ve Kaliforniya'da Gilbertson et al. (2002) tarafından fasulye de CMV' nün az oranda bulunduğu ortaya konulmuştur.

Tohumla taşınma bilindiği gibi virüs, virüs zinciri, konukçu türleri ve çeşidi, üretim sırasındaki çevre koşulları ve inokulasyon zamanı gibi birçok değişken tarafından etkilenmektedir (Bennett, 1969; Shepherd, 1972). Fas'ta yapılan bir çalışmada BCMV'nün tohum kaynaklı yayılmasına % 50 oranında afitlerin neden olduğunu belirtmiştir (Lockhart and Fischer, 1974). SMV ile ilgili yapılan çalışmalarda, tohumla taşınma oranı üzerine enfeksiyon zamanının etkisinin oldukça büyük olduğu ve çiçeklenmeden önce gerçekleşen enfeksiyonlarda bu oranın % 16'ya çıkabildiği görülmüştür (Bowers and Goodman, 1979). CMV'nün tohumla taşınması izolata bağlı olarak ıspanyol izolatında (CMV-B₃₂) % 7 olarak (Bos and Maat, 1974), Newyork' ta CMV-b izolatında 0.3% (Provvidenti, 1976), Porto Rico' da CMV-Pr izolatında % 1.5 (Meiners et al.,1977), Fransa' da CMV-F izolatında % 9-54 (Marchoux et al., 1977) ve Yugoslavya' da CMV-Za8 izolatında % 20 (Babovic et al.,1979) olarak rapor edilmiştir. Tohumun konukçu ile arasındaki ilişki ise BCMV' nün bazı fasulye çeşitlerinde (Sanilac, Michelite, Dubbele Witte, relands greenleaf B ve Red Mexican 35) tohum ile % 39.7-54.4 oranında taşınabildiği gösterilirken Pinto 114 çeşidinde ise US2 zincirinin tohumla taşınmadığı gösterilmiştir. Ayrıca maksimum taşınma oranının birincil yapraklı evrede bitkinin inokule olması durumunda gerçekleştiği de bildirilmektedir (Morales et al.,1987).

Yüksek oranda tohumla taşınan ve ekonomik anlamda önemli zararlara neden olan BCMV ve diğer virüsler için kontrol çok önemlidir. Sertifikalı tohum veya dayanıklı çeşit kullanımı ile bu virüsler kontrol altına alınabilmektedir (Galvez and Morales, 1989; Hall, 1991). Tohum sertifikasyonu tohum kaynaklı enfeksiyonları başlatma olasılığını azaltma da birçok ülkede başarılı olarak çalışmasına rağmen yapılan bir çalışmada Afrika' da genellikle çiftçilerin dikecekleri tohumu önceki yıldan saklaması ve kullanmasından dolayı sertifikalı tohum kullanımının imkansız olduğu bildirilmiştir (Kirkby, 1987). Kaliforniya' da da sertifikalı tohumların % 5' inden fazlasının enfekteli olduğundan geri döndürüldüğü bilinmekte ve sertifikasyon olayının daha ciddi önemle yapılması gerektiği vurgulanmaktadır (Gilbertson, et al., 2001, 2002). Bu virüsler için dayanıklı çeşit kullanımının uzun süreli koruma için en etkili ve ekonomik yöntem olduğunu söylemek mümkündür. Dikim gününün değişimi ile duyarlı çeşitlerde BCMV' nün tekerrürü azaltılabilmektedir. Duyarlı çeşitleri afitlerin daha az olduğu dönemlerde erken dikerek baklagil virüslerinden korunmanın mümkün olduğu bildirilmektedir (Burke, 1964). Buna rağmen Afrika gibi bazı ülkelerde sulamadan kaynaklı olarak afitlerin az olduğu dönemlerde dikim gününü ayarlamak zor olmaktadır. BCMV ve diğer virüsler için olası genel

kontrol önlemleri sağlıklı tohumları dikimde kullanmak, kültürel uygulamaları arttırma, vektör kontrolü ve konukçu-bitki dayanıklılığını içermektedir (Plantwise Knowledge Bank, 2013).

Tohum örneklerinin deneme sonuçlarından baz alınarak yapılan karşılaştırmalarda tanılama yöntemleri arasında RT-PCR yöntemi; denemelerde tüm yöntemlerle belirlenen pozitif örneklerin tamamını saptayarak tanılamada % 100 oranında bir başarı sağlamıştır. DAS-ELISA yönteminde % 89,85 oranında başarı sağlanırken, test bitkilerine inokulasyon yönteminde bu oran % 43,47 olarak saptanmıştır. Tohumda belirtilerin görsel olarak incelenmesinde % 69,56 ve bitki yetiştirme yöntemi ile % 69,3 olarak bulunurken PCR yönteminin bu yöntemler arasında en duyarlı ve başarılı olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 4.7 'de görüldüğü gibi bazı tohumlarda belirti yokken yetiştirilen bitkide belirtilerin olduğu, bunun tersine tohumda belirtilerin olmasına rağmen bu tohumdan yetişen bitkide belirtinin olmadığı durumlarla karşılaşmıştır. Tohumda herhangi bir belirti görülmezken tohumdan yetişen bitkinin belirtiler göstermesi ve bu belirtilerin RT-PCR ile doğrulanması gerçekleştirilmiştir. Bu durumdan yola çıkarak simptomatolojinin kendi içinde dahi sonuçlarının değişebileceği ve kesin sonuca ulaşmanın mümkün olmayacağı açıktır.

Hem tohumda hem bitkide belirti göstermeyen örneklerde dahi RT-PCR testi ile virüsün varlığı saptanmıştır. Benzer şekilde mekanik inokulasyon sonucunda da belirti oluşturmeyen örneklerin de virüsle enfekteli olduğu veya belirti oluşturan örneklerde virüs bulunmadığı da RT-PCR testi ile görülmüştür. Bunun yanında, test bitkilerinde belirti oluşturarak şüphe duyulan AMV gibi bazı virüsleri doğrulamak amacıyla yapılan DAS-ELISA ve RT-PCR testlerinde bu virüse rastlanılmayarak biyolojik endekslemenin de çok duyarlı olmadığı görülmüştür. Biyolojik endekslemenin duyarlılığını azaltan diğer bir neden ise test bitkilerindeki benzer belirtilere farklı virüslerin neden olabilmesidir. Örneğin SMV, CMV ve BCMV adlı virüsler *C.quinoa* ve *C.amaranticolor*' da aynı belirtiyi (klorotik lokal lezyon) yapabilmektedir.

DAS-ELISA testinde de negatif sonuç veren örneklerin RT-PCR yöntemi ile pozitif sonuç vermesinden dolayı PCR yönteminin en duyarlı yöntem olduğunu söylemek mümkündür. BCMV için ELISA testi ile 13 örnekte virüs saptayamaz iken PCR testi ile bu örneklerde virüsün bulunduğu görülmüştür. CMV için ELISA testinde örneklerin 14' ünün virüslü olduğu saptanırken PCR testi 1 örneği

daha enfekteli olarak saptamıştır. SMV ve AMV için ELISA ve PCR testi sonuçları aynı kalmış ve enfekteli örnek sayısı SMV için 7 iken AMV için 0 olarak bulunmuştur.

Daha önce yapılan araştırmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiş ve RT-PCR yöntemi diğer yöntemlere göre daha duyarlı bulunmuştur. Peyambari et al. (2006) bir çalışmada DAS-ELISA testinde örneklerin % 75 'i BCMNV ile enfekteli sonuç verirken, RT-PCR testinde enfeksiyonun % 78 olduğu görülmüştür. Yani ELISA' da negatif veren örneklerin bile IC-RT-PCR' da pozitif olduğu ve ELISA' ya göre daha duyarlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Bariana et al. (1994) tarafından AMV için ELISA ve PCR kullanılarak iki testin duyarlılığı karşılaştırılmıştır. ELISA' nın 2 ve 20 ng/ml arasındaki konsantrasyonlarda virüsü saptayabilirken PCR' ın bütün konsantrasyonlarda virüsü saptadığı görülmüş ve PCR' ın daha duyarlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Yapılan bir çalışmada 23 tohum örneğinin tamamı RT-PCR yöntemi ile enfekteli bulunmuş (% 100), DAS-ELISA yöntemi ile 22'si (% 96), test bitkilerine inokulasyon yöntemi ile uygulamaya alınan 19 enfekteli örneğin 18'i (% 95) saptanabilirken, 23 enfekteli örneğin 7'sinde de (% 30) viral simptomlar olduğu gözlemlenmiştir (Paylan, 2011).

Bu sonuçlar ışığında viral etmenleri tanılamada kullanılan yöntemler arasında moleküler yöntemlerden PCR testleri en güvenilir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Güvenilir olması gibi avantajlarının yanında, moleküler testlerin çok dikkat gerektiren, pahalı ve zahmetli yöntemler olması da göz önünde bulundurulması gereken etmenler arasındadır. DAS-ELISA testleri de yüksek başarı oranı, çok sayıda örneği aynı anda test edebilme imkanı ve kısa sürede sonuç vermesi gibi özellikleri ile öne çıkan tanılama yöntemleri arasında yer almaktadır. Biyolojik endeksleme ve simptomatoloji ise uzun zaman alması ve sonuçların doğruluğunun desteklenme gerekliliği durumundan daha az tercih edilmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmanın tamamlanması ile ülkemiz fasulye yetiştiriciliği ve fasulye tohum üretiminin yapıldığı yerlerden alınan tohumlarda bulunan viral etmenlerin varlığının belirlenmesi ve bu etmenlerin tanımlanmasında yararlanılan yöntemlerin duyarlılıkları belirlenmiştir. Bu bilgilerin gelecekte yapılacak diğer araştırmalar için de yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Tohum bitkisel üretimde önemli bir girdi olduğundan ve kültür bitkilerinin yaklaşık % 90' a yakın kısmı tohum aracılığı ile üretildiğinden tohumlarda oluşacak bir zararın önemli kayıplara yol açacağı bilinmektedir. İnsanlığın en önemli gıda kaynakları arasında yer alan baklagillerden fasulye üretimi ve ürün kalitesi viral, bakteriyel ve fungal kökenli birçok etmen tarafından olumsuz yönde etkilenmektedir. Bunlar içerisinde de viral etmenler büyük kayıplara yol açmasından dolayı önemlidir.

Fasulye tohumlarında bulunan ve tohumla taşınan etmenlerden BCMV, BCMNV, SMV, CMV gibi virüslerin mevcut tohumlarda bulunduğu görülmüştür. BCMV' nün tohumlarda bulunma yüzdesi azımsanmayacak düzeydedir.

Araştırma süresince simptomatoloji, biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler ile test edilen 70 tohum örneğinde % 98,57 oranında viral enfeksiyonlar olduğu belirlenmiştir. Yüksek oranda enfekteli olan fasulye tohumlarında virüslerin tek başlarına mevcut olmalarının yanında, bazı örneklerde birden fazla virüsün bir arada bulunarak karışık enfeksiyonlar oluşturduğu tespit edilmiştir.

Bu virüsleri tanılamada kullanılan yöntemler arasında simptomatoloji ve biyolojik endeksleme yöntemi uzun zaman alan, gözlem yapan kişinin deneyimli olmasını gerektiren bir yöntem olması ve belirtinin net oluşması için çevre koşullarının sağlanmasının gerekliliğinden dolayı daha doğru ve güvenilir tanılama teknikleri ile doğrulanmalıdır. ELISA ise sonuçların görsel yorumlama yerine kantitatif olarak elde edilmesi ve çok sayıda örneğin kısa zamanda test edilebilmesi gibi avantajlarından dolayı klasik yöntemlere göre daha üstündür.

Yapılan çalışmada kullanılan teknikler arasında RT-PCR testlerinin duyarlı ve güvenli bir yöntem olduğu belirlenmiştir. RT-PCR testleri denemelerde belirlenen pozitif örneklerin tamamını saptayarak % 100 oranında başarı göstermiştir. Genelde biyolojik ve serolojik testler ile benzer sonuç vermesine

karşın, bu iki yöntemle saptanmayan enfeksiyonların RT-PCR yöntemi ile tanılanması, bu moleküler yöntemin etkinliğini vurgulamaktadır. RT-PCR yönteminin hızlı ve güvenilir olmasına karşın, çok sayıda kimyasal madde, alet ve ekipmanlara gereksinimi, test aşamalarının yoğunluğu ve pahalı oluşu kullanımını kısıtlamaktadır.

Çalışma sonuçları ve literatür bilgileri doğrultusunda tohumda virüsün elde edilmesindeki zorluk nedeniyle tanı yöntemlerinde en duyarlı ve hassas yöntemlerin seçilmesi gereklidir. Ayrıca test sonucu için gerekli sürenin de önemli olduğu göz önünde tutulmalıdır. Karantina gibi hızlı sonuç istenen durumlarda simptomatoloji ve biyolojik endeksleme yöntemi uzun zaman aldığından tercih edilmemektedir.

Tohumla taşınan ve ekonomik düzeyde zararlara neden olan bu viral etmenlerin varlığını belirlemek ve enfeksiyon seviyelerini değerlendirmek gerekli koruma önlemlerini alma ve virüsten ari tohum alışverişini sağlama açısından çok önemlidir.

Bu sonuçlardan yola çıkarak;

- Tohum sağlık testlerine önem verilmeli ve bu konuda modern testlerin kullanımı tercih edilmelidir.
- Modern sağlık testlerini gerçekleştirecek resmi laboratuvarlar cihaz, ekipman yönünden; testi yapacak kişi ise eğitim yönünden donatılmış olmalıdır.
- Tohumla taşınan virüsler için sertifikasyonun çok önemli olduğu unutulmamalı ve ülkede tohumun yayılmasında mutlaka sertifikasyon aranmalıdır.
- Dayanıklı çeşit kullanımı ile bazı virüslerden uzun süreli ve etkili korunabilmek mümkün olduğundan bu çeşitlerin geliştirilmesi için konukçu-virüs üzerinde çalışılmalıdır.
- Vektörlerle taşınan bazı virüsler için doğru zamanlarda kimyasal mücadele yapılmalı ve virüsün bu yolla yayılımı önlenmelidir.

- Tohum kökenli viral etmenlerin konukçusu olabilecek *Taraxacum officinale*, *Echinocystis lobata*, *Capsella bursa pastoris* gibi yabancı otlarla mücadele edilmelidir.
- Tohumun alındığı tarlalarda önceki yıldan kalan bitki atıklarının hastalıklı olabilme riski göz önünde bulundurularak bu bitkiler temizlenmelidir.
- Tohum virüslerin uzun yıllar aktif kalabilme durumu dikkate alınarak uygun depolarda muhafaza edilmelidir.
- Tohumun önemi, tohum sağlığı ve sertifikasyon gibi konularda üreticinin yapılacak yayım çalışmalarıyla bilgilendirilmesi sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abtahi, F. S., Koohi Hbib, M. and Khodaei Motlagh, M.,** 2009, Some Biological and Molecular Characterization of *Bean Common Mosaic Necrosis Virus* Isolated from Soybean in Tehran Province, *Iran International Journal of Biological and Life Sciences* 5:3p.
- Açıkgöz, S.,** 1984, Erzincan ve Erzurum Yörelerinde *Phaseolus vulgaris* Üzerinde Virüslerin Tanılanması, Yayılışları ve Zararları Üzerinde Araştırmalar, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, 75s.
- Agarwal, V.K. and Sinclair, J.B.,** 1988, Principles of Seed Pathology, Vols I and II. CRC Press, Boca Raton, Florida, United States, 154 p.
- Agrios, G.N.,** 1988, Plant Pathology, Academic Pres. Inc. California. USA, 695p.
- Anonymous,** 2011, Baklagiller, *Tarlasera Dergisi*, 11:60-66 s.
- Babovic, M., Perisic, M., Markovic, S., Spasic, M. and Milijic, S.,** 1979, Investigation of *cucumber mosaic virus* transmission through bean seeds, *Zast. Bilja* 30:65-70pp.
- Balkaya, A. and Yanmaz, R.,** 1999, The promising green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars candidate determined by pedigree selection method in the Black Sea Region, Türkiye 3. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi Bildirileri, 504-508pp.
- Ball, E.M.,** 1974, Serological tests for the identification of plant viruses, *American Phytopathological Society Monograph*, 31p.
- Bariana, H.S., Shannon, A.L., Chu, P.W.G., and Waterhouse, P.M.,** 1994, Detection of five seedborne legume viruses in one sensitive multiplex polymerase chain reaction test, *Phytopathology*, 84:1201-1205pp.
- Bhagawati, R. and Bhagabati, K..N.,** 1994, Incidence of *bean common mosaic virus* of French bean and its effect on grain yield, *Indian Journal of Virology*, 10 (2): 141-143pp.
- Bennett, C. W.,** 1969, Seed transmission of plant viruses, *Advances Virus Research*, 14:221-261pp.
- Bock, K.R.,** 1982, The identification and partial characterization of plant viruses in the tropics, *Tropical Pest Management*, 28: 399–411pp.
- Bos, L.,** 1971, *Bean Common Mosaic Virus* C.M.I./A.A.B, *Description of Plant Viruses*, 73p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bos, L.**, 1977, Seed-borne viruses, In: Hewitt, W.B. and Chiarappa, L., (eds) Plant Health and Quarantine in International Transfer of Genetic Resources, CRC. Press, Boca Raton, Florida, 39-69pp.
- Bos, L. and Maat, H.Z.**, 1974, A strain of *cucumber mosaic virus*, seed-transmitted in beans, Netherlands. *Journal Plant Pathology* 80:113-123pp.
- Bowers, G. R.Jr. and Goodman, M. R.**, 1979, *Soybean mosaic virus*: infection of soybean seed parts and seed transmission, *Phytopathology*, 25:7p.
- Burke, D.W.**, 1964, Time of planting in relation to disease incidence and yields of beans in central Washington. Plant Dis. Rep. 48(10):789-793pp.
- Cadle-Davidson, M. and Jahn, M.**, 2005, Resistance conferred against *bean common mosaic virus* by the incompletely dominant I locus of *Phaseolus vulgaris* is active at the single cell level, *Archives of Virology*, 150: 2601–2608pp.
- Candresse, T., Lanneau, T., Revers, F., Grasseau, N., Macquere, G., German, S., Malinowsky, T. and Dunez, J.**, 1995, An immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of apple chlorotic leaf spot virus, *Acta Horticulture*, 386:136-147pp.
- Capoor, S.P., Rao, D.G. and Sawant, D.M.**, 1985, A note on a virus disease of French bean, *Indian Phytopathology*, 38: 152–154pp.
- Castaño, M. and Morales, F. J.**, 1983, Seed transmission of *soybean mosaic virus* in *Phaseolus vulgaris* L. *Phytopathologica Brasileira*, 8 (1): 103-107pp.
- Chew, M.Y.I., Velásquez, V.R., Mena, C.J. and Gaytán, M.A.**, 2010, Virus de frijol en la Comarca Lagunera y Zacatecas. Folleto Técnico Campo Experimental Zacatecas CIRNOC-INIFAP, Zacatecas, 41p.
- Chiumia, L. and Msuku, W.A.**, 2012, Status of common Bean mosaic Virus in common beans in Malawi, Bean Seed Workshop, Arusha, January 12-14, Tanzania.
- Clark, M.F. and A.N. Adams.**, 1977, Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses, *Journal of General Virology*, 34: 475–483pp.
- Clark, M.F. and Bar-Joseph, M.**, 1984, Enzyme immunosorbent assays in plant virology, *Methods in virology*, Academic Press, New York, USA., 51–85pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Clinton, G.P.**, 1915, Reports of the botanist for 1915: Soybeans, Annual Report, Connecticut Agricultural Experiment Station, 446p.
- Cooper, L.I and Jones, A.T.**, 1983, Responses of plants to viruses: Proposals for the use of terms, *Phytopathology*, 73:127-128pp.
- Cooper, J.I. and Edwards, M.L.**, 1986, Variations and limitations of enzyme-amplified immunoassays. in Developments and applications in virus testing, Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK.139-154pp.
- Costa, A. S., Vega,J. and Gaspar, C.**, 1978, Non-transmission of the soybean virus through bean seed from infected plants Summa, *Phytopathology* 4:24p.
- Davis, R.F., Weber, Z., Poapieszny, H., Silbernagel, M. and Hampton, R.O.**, 1981, Seedborne *cucumber mosaic virus* in selected *Phaseolus vulgaris* germ plasm and breeding lines in Idaho, Washington and Oregon, Plant Disease 65:492-494pp.
- Davis, R.F. and Hampton, R.O.**, 1986, *Cucumber mosaic virus* isolates seedborne in *Phaseolus vulgaris*:Serology, host-pathogen relationship and seed transmission, *Phytopathology*, 76-999-1004pp.
- De Blas C., Borza MJ., Saiz M. and Romero, J.**, 1994, Broad spectrum detection of *cucumber mosaic virus* (CMV) using the Polymerase Chain Reaction, *Journal of Phytopathology* 141: 323-329pp.
- Deligöz, İ.**, 2007, Samsun İlinde Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Alanlarında Enfeksiyon Oluşturan *Bean common mosaic virus* (BCMV) ve *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV)'un Irklarının Belirlenmesi ve Bazı Fasulye Çesitlerinin BCMV ve BCMNV'e Karşı Dayanıklılık Düzeylerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, 72s.
- Descriptions of Plant Viruses**, "List of descriptions sorted by name", <http://www.dpvweb.net/dpv/dpvnameidx.php> (Erişim Tarihi: 27 Mayıs 2012).
- Drijfhout, E.**, 1978, Genetic interaction between *Phaseolus vulgaris* and *Bean common mosaic virus* with implications for strain identification and breeding for resistance, PhD thesis, University of Wageningen.
- Erkan, S.**, 1998, Tohum Patolojisi, E. Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Bornova, İzmir, Gözdem Ofis, 275 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Erkan, S., Gümüş, M., Türküsay, H. ve Duman, İ.,** 1995, Sanayi Domatesi Çeşitlerine Ait Tohum Örneklerinde Tohum Kaynaklı Bazı Hastalık Etmenlerinin Bulunma Durumunun Saptanması Üzerinde Araştırmalar, Sanayi Domatesi Üretimini Geliştirme Projesi (SANDOM) 7:47-55s.
- Erkan, S., Gümüş, M., Paylan, İ.C. ve Sipahioğlu, H.M.,** 2011, Bitki virüslerinin tanılanmasında kullanılan serolojik yöntemler. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR 9* (2):35-49pp.
- Fajardo, T.G.,** 1930, Studies on the Mosaic Disease of Bean (*Phaseolus vulgaris*), *Phytopathology* 20, 469-494pp.
- Food and Agriculture Organization,** "FAO statistics division" [http://faostat.fao.org/site/567/Dekstopdefault.aspx? #ancor](http://faostat.fao.org/site/567/Dekstopdefault.aspx?#ancor) (Erişim Tarihi: 9 Mart 2013).
- Fletcher, J. D.,** 2001, New hosts of *Alfalfa mosaic virus*, *Cucumber mosaic virus*, *Potato virus Y*, *Soybean dwarf virus* and *Tomato spotted wilt virus* in New Zealand, *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 29: 213-217pp.
- Flores-Estévez, N.A., Acosta-Gallegos, J.A. and Silva-Rosales, L.,** 2003, *Bean common mosaic virus* and *Bean common mosaic necrosis virus* in Mexico, *Plant Disease*, 87:21-25pp.
- Fidan, Ü. ve Yorgancı, Ü.,** 1990, Investigation on the detection and seed transmission of the virus diseases occurring on the pulse crops in Aegean Region, Seed transmission of virus diseases by grower seeds of artificial infected pulse crops, *Journal Turkish Phytopathology*, 19: 1-6pp.
- Foissac, X., Savalle-Dumas, L., Gentit, P., Dulucq, M.J. and Candresse, T.,** 2001, Polivalent detection of Fruit tree Tricho, Capillo and research Number 45:33-35pp.
- Fridlund, P.R.,** 1980, Glasshouse indexing for fruit tree viruses, *Acta Horticulturae*, 94: 153– 158pp.
- Galvez, G. E., and Morales, F. J.** 1989, Whitefly-transmitted viruses, Pages 379-390 in "Bean Production in the Tropics" (H. F. Schwartz and M. A. Pastor-Corrales, Eds.), Cent. Int. Agr. Trop., Cali, Colombia, 654 pp.
- Gardner, M.W. and Kendrick, J. B.,** 1921, *Soybean mosaic virus*, *Journal of Agricultural Research* 22: 111-114pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı**, “Bitki koruma Ürünleri”
<http://www.tarim.gov.tr/Sayfalar///Icerikler.aspx?rid=120&NodeValue=120&KonuId=115&zGroup=0&ListName=Icerikler> (Erişim tarihi: 10 Nisan 2012).
- Gibbs, A.J.**, 1970, *Cucumber mosaic virus*, C.M.I./A.A.B, Descriptions of plant viruses 1.
- Gibbs, A. and Harrison, B.**, 1964, Nematode-transmitted Viruses in Sugar Beet in East Anglia. *Plant Pathology*, 13:144-150pp.
- Gilbertson, R.L., Guzman, P., Rojas, M., Crnov, R. and Mkandawire, A.**, 2001, Detection of bean-infecting viruses in California with an emphasis on the CRSP-facilitated work, Bean/Cowpea Collaborative Research Support Program-East Africa Proceedings: Bean Seed Workshop Arusha, Tanzania, 4pp.
- Gilbertson, R. L., Guzman, P., Rojas, M., Crnov, R. and Mkandawire A.**, 2002, Detection of bean-infecting viruses in California with an emphasis on the crsp-facilitated work. Bean Seed Workshop, Arusha, Tanzania, January 12-14pp.
- Godoy-Lutz, G., Segura, Y., Stedman, J.R. and Miklas, P.**, 2004, Presence of *bean common necrotic virus* in the Dominican Republic, Bean Improvement Cooperative Annual Report, 37:119-121pp.
- Gould, A.R. and Symons, R.H.**, 1983, A molecular biological approach to relationships among viruses, *Annual Review of Phytopathology* 21: 179–199pp.
- Guzman, P., Rojas, M.R. and Davis, R.M.**, 1997, First report of *bean common mosaic necrosis potyvirus* (BCMNV) infecting common bean in California, *Plant Disease*, 81: 831-834pp.
- Gümüş, M., Erkan, S., Yorgancı, Ü. ve Duman, İ.**, 2002, Bazı Sebzelerin Tohumlarında Bulunan Viral Etmenlerin Biyolojik ve Serolojik Tanı Yöntemleri İle Saptanması ve Bu Yöntemlerin Duyarlılıklarının Karşılaştırılması, Tübitak Tarp-2385 Nolu Proje Raporu, İzmir, VI+66+IVs.
- Güzel, Ö. and Arlı-Sökmen, M.**, 2003, Determination of some viruses infecting common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and their incidences in seed lots in Samsun Province, *Journal Turkish Phytopathology*, 32(2): 99-106pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Güzel, Ö. ve Arlı-Sökmen, M.,** 2004, Samsun'da Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Üretim Alanlarında Enfeksiyon Oluşturan Virüslerin Ve Tohuma Bulaşma Oranlarının Belirlenmesi, Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, Samsun, 215s.
- Habib, S.A., El-Atta, O.K., El-Hammady, M. and Awad, M.,** 1981., Interaction between Bean common mosaic virus and *Bean yellow mosaic virus* in relation to morphological characters of bean plants. Research Bulletin. Faculty of Agriculture. Ain Shams University, N: 1606, 1-14, Review. Plant Pathology, 62(10):409p.
- Hall, R.,** 1991, Compendium of bean diseases. APS Press. 73 pp.
- Hall, R. and Steadman, J.R.,** 1994, White mold. İn: Compendium of Bean Diseases, APS press, American Phytopathological Society, 73 p.
- Halbert, S.E., Mink, G.I., Silbernagel, M.J. and Mowry, T.M.,** 1994, Transmission of *bean common mosaic virus* by cereal aphids (Homoptera: Aphididae), Plant disease, 78:983-985pp.
- Hamilton, R.I.,** 1965, An Embryo Test for Detecting Seed-borne *Barley Stripe Mosaic Virus* in Barley, *Phytopathology* 55:798-799pp.
- Hamilton, R.I., Edwardson, J.R., Francki, R.I.B., Hsu, H.T., Hull, R., Koenig, R. and Milne, R.G.,** 1981, Guidelines for the identification and characterization of plant viruses, *Journal of General Virology* 54: 223–241pp.
- Hampton, R. O.,** 1975, The nature of bean yield reduction by *bean yellow* and *bean common mosaic viruses*, *Phytopathology* 65:1342-1346pp.
- Hart, P.,** 2004, Application of Real Time PCR for Detection and Identification of Soybean Pests in Michigan, Michigan State University, Department of Plant Pathology (Project Number: GR03-004).
- Hormozi-Nejad, M.H., Mozafari, J. and Rakhshanderoo, F.,** 2008, Production and certification of virus-free nucleus seeds in common bean, First national congress on seed science and technology, 12-13 November 2008, Gorgan, Iran.
- Horvath, J.,** 1983, New artificial hosts and nonhosts of plant viruses and their role in the identification and separation of viruses, XVIII. Concluding remarks, *Acta Phytopathologica Hungarica*, 18: 121–161pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Horvath, J.**, 1993, Host plants in diagnosis, *Diagnosis of Plant Virus Diseases*, edited by R.E.F. Matthews, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 15–48p.
- Iizuka, N.**, 1973, Seed transmission of viruses in soybean, *Tohoku Nati. Agr. Exp. Sta. Bull.* 45:131-141pp.
- International Seed Testing Association**, “Seed testing international”, http://www.seedtest.org/en/seed-testing-international-_content---1--1085.html (Erişim Tarihi: 10 Ocak 2012).
- Jones, A.T.**, 1993, Experimental transmission of viruses in diagnosis, *Diagnosis of plant virus diseases*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 49–72pp.
- Kaiser, W.J. and Hannan, R.M.**, 1983, Additional hosts of *alfalfa mosaic virus* and its seed transmission in tumble pigweed and bean, *Plant Disease*, 67(12):1354-1357pp.
- Kılıç, H. ve Yardımcı N.**, 2012, Burdur Çine Ovası fasulye alanlarında *Hıyar mozayik virüsü*, *Mehmet Akif Ersoy Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 3 (2): 12-15pp.
- Kelly, J.D.**, 1997, A review of varietal response to *Bean common mosaic potyvirus* in *Phaseolus vulgaris*, *Plant Var. Seeds*, 10: 1-6pp.
- Kennedy, J.S., Day, M.F. and Eastop, V.F.**, 1962, A Conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses, Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, 114 pp.
- Klein, R.E. and Wyatt, S.D.**, 1988, Indicence of *Bean common mosaic virus* in USDA *Phaseolus* germ plasm collection, *Plant Disease*, 72: 301-302pp.
- Kirkby, R.A.**, 1987, Research on grain legumes in eastern and central Africa. Summary proceedings of the consultative group meeting for eastern and central Africa regional research on grain legumes, 8-10 December 1986, ILCA, Addis.
- Kutluk-Yılmaz, N.D., Gümüş, M. ve Erkan, S.**, 2002, Tokat İlinde Fasulye Tohumlarındaki Viral Etmenlerin Saptanması Üzerinde Araştırmalar, *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 39 (3): 49-55.
- Koenig, R.**, 1981, Indirect ELISA Methods for the Broad Specificity Detection of Plant Viruses, *Journal of General Virology*, 55: 53-62pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lange, L.**, 1986, The practical application of new developments in test procedures for the detection of viruses in seed, *Developments in Applied Biologists* 1:269-281pp.
- Larsen, R.C., Miklas, P.N., Druffel, K.L. and Wyatt, S.D.**, 2005, NL3-K strain is a stable and naturally occurring interspecific recombinant derived from *bean common mosaic necrosis virus* and *bean common mosaic virus*, *Phytopathology*. 95 (9): 1037-1042pp.
- Lastres-Gonzalez, N. and Alvarez Encinosa, S.**, 1989, Evaluation of damage in varieties of bean by two strains of *bean common mosaic virus*, *Ciencias de la Agricultura* 36 (6): 5-10pp.
- Lepe-Soltero, D., Sánchez-García B.M. Jiménez H. Y., Salinas-Perez, R.A. , García-Neria, M.A., González de León D., Becerra-Leor, N.E., Acosta-Gallegos J.A. and Silva-Rosales L.**, 2012, Presence of BCMV and BCMNV in Five Dry bean-Producing states in Mexico, *Tropical agroecosystems*, 15: 313-321pp.
- Lillian, C. and Msuku, W. A. B.**, 2012, Status of *Common Bean Mosaic Virus* in Common Beans in Malawi, *Bean/Cowpea Collaborative Research Support Program, East Africa Proceedings: Bean Seed Workshop Arusha, Tanzania*.
- Lisa, V., Dellavalle G., Vaira, A. M. and Morales, F. J.**, 1994, *Bean yellow mosaic virus* and other viruses in Bean in Western Asia, South-Eastern Europe and Northern China. The Bean Improvement Cooperative Annual Report, 37:217-218pp.
- Lockhart, B.E.L. and Fischer, H.U.**, 1974, Identification and characteristics of a strain of *tobacco mosaic virus* causing severe crop loss in Morocco. *Plant Disease. Repr.* 58: 309-311pp.
- Marchoux, G., Quiot, J.B. and Devergne, J.C.**, 1977, Caractérisation d'un isolate du virus de la mosaïque du concombre transmis par les graines du haricot (*Phaseolus vulgaris* L.), *Phytopathology* 9:421-434pp.
- Martelli, G.P.**, 1993, Leafroll in Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis, ICVG/FAO, Rome, Italy, 37-44pp.
- Martinez-Priego, M. C. Córdoba and C. Jordá**, 2004, First Report of *Alfalfa mosaic virus* in *Lavandula officinalis*, *Disease Notes*, 88(8): 90p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Matthews, R.E.F.**, 1980, Host plant responses to virus infection. *in* Comprehensive virology, , virus-host interaction, viral invasion, persistence, and diagnosis, Plenum Press, New York, USA. 16: 297-359pp.
- Matthews, R.E.F.**, 1991, Plant Virology, 3rd ed., Acad. Pres, New York, 897 p.
- Mavri, I. and Sustar-Vozlij.**, 2004, Virus diseases and resistance to *Bean common mosaic* and *Bean common mosaic necrosis potyvirus* in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Acta agriculturae Slovenica*, 83:181-190pp.
- McKern, N.M., Mink. G.I., Barnett, O.W., Mishra, A., Whittaker, L.A., Silbernagel, M.J., Ward, C.W. and Shukla, D.D.**, 1992, Isolates of *bean common mosaic* virus comprising two distinct potyviruses, *Phytopathology*, 82: 923-929pp.
- Meiners, J.P., Waterworth, H.E., Smith, F.F., Alconero, R. and Lawson, R.H.**, 1977, A seed-transmitted strain of *cucumber mosaic virus* isolated from bean, *Journal Agriculture Univ. Puerto Rico*, 61(2):137-147pp.
- Mink, G.I., Vetten, J., Ward,C.W., Berger, P., Morales, F., Myers, J.R., Silbernagel, M.J. and Barnett, O.W.**, 1994, Taxonomy and classification of legume infecting potyviruses, A proposal from the Potyvirus Study Group of the Plant Virus Subcommittee of ICTV, *Archieve Virology*, 139:231–235pp.
- Monteagudo, A.B., Rodino, A.P., Lema, M., Fuente, M., Santalla, M., Ron, A.M. and Singh, S.P.**, 2006, Resistance to infection by fungal, bacterial 67 and viral pathogens in a common bean core collection from Iberian Peinsula, *Hort Science* 41(2): 319-322pp.
- Morales, F.J., and Castaño, M.** 1987, Seed transmission characteristics of selected *bean common mosaic virus* strains in differential bean cultivars, *Plant Disease*, 71:51-53pp.
- Morales, F.J. and Bos, L.**, 1988, *Bean common mosaic virus*. No. 337. In: Descriptions of Plant Viruses, Association of Applied Biologists, Wellesbourne, England.
- Mullis, K.F., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, and H. Erlich.**, 1986, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biology*, 51: 263–273pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Murayama, D. and Y- H. Han.,** 1971, Occurrence of *soybean mosaic virus* in Taiwan. PI. Protect. Bull. 13:75-85pp.
- Naidu, R.A. and Hughes, J.d'A.,** “Methods for the detection of plant virus diseases”, http://old.iita.org/cms/details/virology/pdf_files/233-260.pdf (Erişim Tarihi: 10 Ocak 2013).
- Nalini, M.S., Prakash, H.S., Shetty, H.S. and Prabhakar M.,** 2006, Reaction of French bean Accessions and Varieties to *Bean common mosaic potyvirus* and seed transmission of the virus, 29 (2): 126-129pp.
- Neergard, P.,** 1972, International and National Cooperation in Seed Health Testing and Certification. Proc.Int. Seed Test.Ass. 37: 117-138pp.
- Neergard, P.,** 1983, Seed Pathology, volume I, Revised Edition, The Macmillan Press Ltd., London, 839p.
- Nemeth, G.,** 1986, Virus, mycoplasma, and rickettsia diseases of fruit trees, Akademiai Kiado, Budapest, Hungary.
- Nogay, A.,** 1983, Marmara bölgesi cucurbitaceae familyası kültür bitkilerinde görülen virüs hastalıklarının tanılanması, tohumla geçiş durumlarının ve konukçu dizilerinin saptanması üzerinde araştırmalar. Doktora tezi, Erenköy- İstanbul, 120s.
- Noordam, D.,** 1973, Identification of Plant Viruses, Methods and Experiments, PUDOC, Wageningen, the Netherlands, 208p.
- Omuniy, M.E., Gathuru, E.M. and Mukunya, D.M.,** 1995, Pathogenicity groups of *Bean common mosaic virus* isolates in Kenya, *Plant Disease*, 79: 985-989pp.
- Omar, R. A., Mehia, F. F., Zayed, E. A. and Deit, A. A.,** 1985, Biological studies on some seed-borne viruses and their effect on vegetative growth and yield component of the host plant. *Acta Phytopathology*, 20 (3): 80-85pp.
- Önder, M.,** 2011, Türkiye'de yemeklik tane baklagillerin ekonomik önemi, *Tarım Türk Dergisi*, 28:66-68 s.
- Paylan, İ.C.,** 2011, Bazı Sebze Türlerinin Tohumlarındaki Virüslerin Belirlenmesi ve Tohumlardaki Viral Enfeksiyonların İnaktifleştirilmesi Üzerinde Araştırmalar, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, 146s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Petrović, D., Ignjatov, M., Nikolić, Z., Vujaković, M., Vasić, M., Milošević, M. and Ajduković T.K.,** 2010, Occurrence and Distribution of Viruses Infecting the Bean in Serbia, *Archieve. Biology Science*, 62 (3):595-601pp.
- Peyambari, M., Habibi, M.K., Mosahebi, G. and Izadpanah, K.,** 2006, Determination of seed-born percentages of *bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) in three genotypes of *Phaseolus vulgaris*, 71(3):1221-7pp.
- Pierce, W.H.,** 1934, Viruses of the bean, *Phytopathology*, 24:875-888pp.
- Plantwise Knowledge Bank,** *Bean common mosaic virus*, <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/Datasheet.aspx?dsID=9424> (Erişim Tarihi: 27 Şubat 2013).
- Provvidenti, R.,** 1976, Reaction of *Phaseolus* and *Macroptilium* species to a strain of *cucumber mosaic virus*, *Plant Disease. Rep.* 60:289-293pp.
- Provvidenti, R., D. Gonsalves and Ranalli, P.,** 1982, *Inheritance of resistance to soybean mosaic virus in Phaseolus vulgaris*, *J. Heredity* 73:302-303pp.
- Richardson, M. J.,** 1990, An annotated list of seed borne diseases, The International Seed Testing Assosication (ISTA), Zurich, Switzerland.
- Ruiz De Galeretta, J.I., Perez De San Roman, C., Abad, J.M. and Legorburu, F.J.,** 1998, *Bean common* (BCMV) and *bean common mosaic necrosis* (BCMNV) *potyviruses* in relation to bean landraces in the Basque Country, *Invest.Agr.: Prod. Prot. Veg.* 13: 1-2pp.
- Samuitienė, M. and Navalinskienė, M.,** 2008, Occurrence of *Cucumber mosaic cucumovirus* on ornamental plants in Lithuania, *Zemdirbyste-Agriculture*, 95 (3): 135-143.
- Saqib, M., Jones, R. A. C., Cayford, B. and Jones, M. G. K.,** 2000, First report of *Bean common mosaic potyvirus* in Western Australia, *New disease reports*, 10:43p.
- Schmidt, H.E.,** 1992, Bean mosaic In: *Plant Diseases of International Importance*. Vol. II, Chaube HS, Singh US, Mukhopadhyaya AN, Kumar J(Eds.), Prentice Hall, New Jersey, 40–73pp.
- Sengooba, T.N., Spence, N.J., Walkey, D.J. and Femi Lana, A.,** 1997, The occurrence of bean common mosaic necrosis virus in wild and forage legumes in uganda, *Plant Pathology*, 46: 95-103.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shahid, M.S., Pudashini B.J. and Natsuaki K.T.,** 2013, First Report of *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) Infecting Sweet Bean in Nepal, The American Phytopathological Society, 97 (2): 290p.
- Shepherd, R.J.,** 1972, Transmission of viruses through seed and pollen, in : Principles and Techniques in Plant Virology, C.I.Kado and H.O. Agrawal. eds., 267-292, Van Nostrand Reinhold, New York, 668 pp.
- Smith, K.,** 1972, A Textbook of Plant Virus Diseases, Academic Press, London and New York, 684p.
- Spence, N.J. and Walkey D. G. A.,** 1995, Variation for pathogenicity among isolates of *bean common mosaic virus* in Africa and a reinterpretation of the genetic relationship between cultivars of *Phaseolus vulgaris* and pathotypes of BCMV, *Plant Pathology*, 44:527-546pp.
- Stewart, V.B and Reddick, D.,** 1917, *Bean mosaic virus* (Abstract), *Phytopathology*, 7(28):61p.
- Şehirali, S.,** 1988, Yemeklik Dane Baklagiller, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları:1089, Ders Kitabı, A.Ü. Basımevi, Ankara, 314s.
- Türkiye İstatistik Kurumu,** "Bitkisel Üretim İstatistikleri", <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Erişim tarihi: 10 Mart 2013).
- United States Agency for International Development,** "Food Commodity Fact Sheets", http://www.usaid.gov/our_work/humanitarian_assistance/ffp/crg/fsbeansnavy (Erişim tarihi: 10 Mayıs 2012).
- Üstün, N., Demir, G. ve Saygılı H.,** 2002, Tohum Sağlık Testlerinde Son Teknolojik Gelişmeler. Türkiye I. Tohumculuk Kongresi, Bornova-İzmir, 139-145p.
- Van Regenmortel, M.H.V. and M.-C. Dubs.,** 1993, Serological procedures, in *Diagnosis of plant virus diseases*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA., 159-214pp.
- Vetten, H.J., Lesemann, D.E. and Maiss, E.,** 1992, Serotype A and B strains of *Bean common mosaic virus* are two distinct potyviruses, *Archives of Virology*, 5:415-431pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang Jie Wang, X.M.**, 2006, Detection of Bean common mosaic virus in the seeds of common bean by RT-PCR' http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-ZWBF200604002.htm (Erişim Tarihi: 6 Kasım 2012).
- Weimer, J. L.**, 1931, *Alfalfa mosaic virus*, *Phytopathology*, 21:122 – 123pp.
- Weimer, J. L.**, 1934, Studies on *Alfalfa mosaic virus*, *Phytopathology*, 24:239 – 247pp.
- Yorgancı, Ü.**, 1975, İzmir İlinde Domateslerdeki Virüs Hastalıkları, Yayılma ve Zarar Durumları, Elde Edilen İzolatlarla Biyolojik ve Serolojik Araştırmalar (Doçentlik Tezi). TOAG/127 No'lu Proje Nihai Raporu. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bornova-İzmir, 102 s.
- Yorgancı, Ü., Erkan, S., Özaktan, H. ve Eser, B.**, 1993, Biber, Domates, Patlıcan ve Hıyar Tohumlarında Viral ve Bakteriyel Hastalık Etmenlerinin Tanılanması ve İnaktifleştirilmesi Üzerinde Araştırmalar, TÜBİTAK, Proje No: TOAG-822.
- Zaumeyer, W.J., and Goth, R.W.**, 1964, A new severe symptom-inducing strain of *bean common mosaic virus*, *Phytopathology* 54:1378-1385pp.
- Zaumeyer, W.J and Meiners, J.P.**, 1975, Disease resistance in beans, Annual Review, *Phytopathology*, 13:313-334pp.

ÖZGEÇMİŞ

23/01/1987 tarihinde Kahramanmaraş'ta doğdu. İlk öğrenimini, Kahramanmaraş İlköğretim Okulu'nda, orta öğrenimini Kadriye Çalık Anadolu Lisesi' nin Fen bilimleri programında tamamladı. 2006 yılında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ziraat Mühendisliği bölümüne girerek Bitki Koruma Bölümü' nü seçti. 2010 yılında Prague Life Sciences University'de fitopatoloji ve toprak bilimi konularında eğitim aldı. 2011 yılında lisans eğitimini tamamlayarak aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Fitopatoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2012 yılında BASF'ta pazarlama bölümünde proje asistanı olarak çalıştı. Şu an Anadolu Tıgем' de Ziraat Mühendisi olarak görev yapmaktadır.

EKLER

Ek 1. “Silica Capture” Yöntemlerinde Kullanılan Kimyasallar

EK 1. “Silica Capture” Yöntemlerinde Kullanılan Kimyasallar

“Silica Capture” Yönteminde Kullanılan Kimyasallar

Grinding Buffer

- Guanidine thiocyanate 4 M
- NaOAc 0.2 N (pH:5.2)
- EDTA 25 mM
- KOAc 1M
- PVP-40 2.5% (w/v)
- Mercaptanol

NaI Solüsyonu (6M)

- Na₂SO₃
- NaI

Washing Buffer

- Tris-HCl 110mM (pH:7.5)
- EDTA 5M (0.5 mM)
- NaCl 50mM (0.5M)
- Ethanol 50%

Silica

- Silicon dioxide