

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI**



**ANKARA VE KONYA İLLERİ ŞEKER PANCARI ÜRETİM
ALANLARINDA TOPRAK KÖKENLİ VİRÜSLERİN
ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Vedat CEYLAN

Danışman

Prof. Dr. Nazlı Dide KUTLUK YILMAZ

SAMSUN
2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Vedat CEYLAN tarafından, Prof. Dr. Nazlı Dide KUTLUK YILMAZ danışmanlığında hazırlanan “ANKARA VE KONYA İLLERİ ŞEKER PANCARI ÜRETİM ALANLARINDA TOPRAK KÖKENLİ VİRÜSLERİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 1.6.2023 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Xxxxx XXXX Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ana Bilim Dalı	☐ Kabul ☐ Ret
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Xxxxxx XXXX Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ana Bilim Dalı	☐ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Xxxxx XXXX Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ana Bilim Dalı	☐ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Xxxxxx XXXX Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ana Bilim Dalı	☐ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Xxxxx XXXX Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ana Bilim Dalı	☐ Kabul ☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

05.07.2023
Vedat CEYLAN

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : ANKARA VE KONYA İLLERİ ŞEKER PANCARI ÜRETİM ALANLARINDA TOPRAK KÖKENLİ VİRÜSLERİN ARAŞTIRILMASI

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 05.07.2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 8

Tek kaynak oranı : % 2 çıkmıştır.

05 /07/ 2023
Prof. Dr. Nazlı Dide KUTLUK YILMAZ

ÖZET

ANKARA VE KONYA İLLERİ ŞEKER PANCARI ÜRETİM ALANLARINDA TOPRAK KÖKENLİ VİRÜSLERİN ARAŞTIRILMASI

Vedat CEYLAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Bitki Koruma Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans, Haziran /2023

Danışman: Prof. Dr. Nazlı Dide KUTLUK YILMAZ

Toprak kökenli virüs hastalıkları şeker pancarı üretiminde verimi sınırlayan etmenler arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Bu çalışma Ankara ilinin Ayaş, Beypazarı, Sincan, Polatlı ve Haymana ilçeleri ve Konya ilinin Meram, Çumra ve Yunak ilçelerinde şeker pancarı üretim alanlarında enfeksiyon oluşturan toprak kökenli virüsler ile onların vektörleri arasında olan *Plasmodiophorid* ve *Chytridioid* türlerin saptanması ve bulaşıklık oranlarının ortaya konulması amacıyla yürütülmüştür. Bu illere bağlı 18 köyden 2021 yılında toplam 52 farklı tarladan toprak örneği alınmış ve bu örneklerde tuzak bitki testi yöntemine göre şeker pancarı bitkileri kontrollü şartlar altında yetiştirilmiştir. Ardından, bu örnekler; Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), Beet black scorch virus (BBSV), Tobacco necrosis virus (TNV), Tobacco rattle virus (TRV) ve Tobacco mosaic virus (TMV) için DAS-ELISA yöntemine göre test edilmiştir. Bir diğer toprak kökenli virüs olan Beet soil-borne virus (BSBV)'ün bulunma durumu ise, her iki ile ait seçilen 12 örnekte virüsün kılıf protein gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır.

Çalışma sonucunda, örneklerin büyük bir çoğunluğunda (%78.8) BNYVV enfeksiyonu tespit edilmiştir. BSBV'nin varlığı ise 12 örneğin sekizinde (%66.7) belirlenmiştir. İncelenen 52 örneğin tamamının köklerinde BNYVV ve BSBV'nin vektörü olan *Polymyxa betae*'nin dinlenme spor yapıları saptanmıştır. Öte yandan, BBSV ve TNV ile bulaşık hiçbir örneğe rastlanılmamıştır. Ancak, bu virüslerin vektörü *Olpidium* spp., şeker pancarı köklerinde %57.7 oranında saptanmıştır. Ayrıca, 16 örneğin (%30.8) TMV ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir. İncelenen bir diğer virüs olan TRV ise örneklerin hiçbirinde belirlenmemiştir.

Bu çalışma, rhizomania hastalığının etmeni olan BNYVV ve vektörü *P. betae*'nin Ankara ve Konya illerinde şeker pancarı üretim alanlarında oldukça yaygın olduğunu göstermiştir.

Anahtar Sözcükler: Şeker pancarı, ELISA, RT-PCR, Virüs, *P. betae*, *Olpidium* spp.

ABSTRACT

INVESTIGATIONS OF SOIL-BORNE VIRUSES IN SUGAR BEET PRODUCTION AREAS OF ANKARA AND KONYA PROVINCES

Vedat CEYLAN

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Plant Protect

Master, June/2023

Supervisor: Prof. Dr. Nazlı Dide KUTLUK YILMAZ

Soil-borne virus diseases are among the most important factors limiting the yield in sugar beet production. This study was carried out in Ayaş, Beypazarı, Sincan, Polatlı and Haymana districts of Ankara province and Meram, Çumra and Yunak districts of Konya province in order to determine the soil-borne viruses infecting sugar beet production areas and *Plasmodiophorid* and *Chytridioid* species, which are among their vectors, and to reveal their infection rates. Soil samples were taken from a total of 52 different fields from 18 villages of these provinces in 2021 and sugar beet plants were grown in these samples under controlled conditions according to the bait plant test method. Then, these samples were tested for Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), Beet black scorch virus (BBSV), Tobacco necrosis virus (TNV), Tobacco rattle virus (TRV) and Tobacco mosaic virus (TMV) by DAS-ELISA method. The presence of Beet soil-borne virus (BSBV), another soil-borne virus, was investigated by RT-PCR using primers specific to the coat protein gene region of the virus in 12 selected samples from both provinces.

As a result of the study, BNYVV infection was detected in the majority of the samples (78.8%). The presence of BSBV was detected in eight of 12 samples (66.7%). Resting spore structures of *Polymyxa betae*, the vector of BNYVV and BSBV, were detected in the roots of all 52 samples. On the other hand, no samples contaminated with BBSV and TNV were found. However, the vector of these viruses, *Olpidium* spp. was detected in 57.7% of sugar beet roots. In addition, 16 samples (30.8%) were found to be infested with TMV. TRV, another virus analysed, was not detected in any of the samples.

This study showed that BNYVV, the causal agent of rhizomania disease, and its vector *P. betae* are quite common in sugar beet production areas in Ankara and Konya provinces.

Keywords: Sugar beet, ELISA, RT-PCR, Virus, *P. betae*, *Olpidium* spp.

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamın planlanması, yürütülmesi ve yazılmasında olduğu kadar eğitimimin her aşamasında yardım ve desteğini gördüğüm, öğrencisi olmaktan ve birlikte çalışmaktan büyük gurur duyduğum, çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Nazlı Dide KUTLUK YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Maddi ve manevi destekleri için aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Biriminde PYO.ZRT.1904.22.015 nolu proje ile desteklenmiştir. Proje çalışmaları süresince verdikleri desteklerden dolayı kurum çalışanlarına da teşekkürlerimi sunarım.

Vedat CEYLAN

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1. <i>Polomyxa betae</i> ve taşıdığı virüsler	5
2.1.1. Beet necrotic yellow vein virus (Şeker pancarı nekrotik sarı damar virüsü; BNYVV)	7
2.1.2. Beet soil borne virus (Şeker pancarı toprak kökenli virüsü; BSBV)	12
2.2. Chytrid Vektörler ile Taşınan Virüsler	14
2.2.1. Beet black scorch virus (Şeker pancarı siyah yanıklık virüsü; BBSV)	17
2.2.2. Tobacco necrosis virus (Tütün nekroz virüsü; TNV)	21
2.3. Nematod Vektörler ile Taşınan Virüsler	24
2.3.1. Tobacco rattle virus (Tütün kırık virüsü; TRV)	24
2.4. Tobacco mosaic virus (Tütün mozaik virüsü; TMV)	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM	30
3.1. Materyal	30
3.1.1. Şeker Pancarı Tohumları	30
3.1.2. Toprak Örnekleri	30
3.1.3. Antiserum	30
3.1.4. Mikropleyter	30
3.1.5. Primerler	31
3.1.6. Test Bitkileri	31
3.1.7. Referans İzolatlar	32
3.2. Yöntem	32
3.2.1. Sürvey Çalışmaları	32
3.2.2. Tuzak Bitki Testi Yöntemi	33
3.2.3. ELISA Testi	35
3.2.4. Tuzak Bitki Köklerinde Vektör <i>P. betae</i> ve <i>Olpidium</i> spp.'nin Dinlenme Spor Yapılarının Kök Boyaması Yöntemi ile Araştırılması	36
3.2.5. Moleküler Çalışmalar	36
3.2.6. RNA İzolasyonu	37
3.2.7. Tuzak Bitki Köklerinde Yürütülen RT-PCR Çalışmaları	38
3.2.8. Agaroz Jelin Hazırlanması	41

3.2.9. Biyolojik Çalışmalar	41
3.2.10. Test Bitkilerinde Yürütülen Moleküler Çalışmalar.....	42
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	43
4.1. Bulgular.....	43
4.1.1. Tuzak Bitki Testi ve ELISA Testi Sonuçları	43
4.1.2. Tuzak Bitki Örneklerinde Tobacco ratte virus'un RT-PCR Yöntemi ile Araştırılması.....	49
4.1.3. Tuzak Bitki Örneklerinde Beet soil-borne virus'ün RT – PCR Yöntemi ile araştırılması.....	50
4.1.4. Tuzak Bitki Örneklerinde Beet black scorch virus'ün RT-PCR Yöntemi ile Araştırılması.....	51
4.1.5. Tuzak Bitki Köklerinde Vektör <i>Plymyxa betae</i> ve <i>Olpidium spp'</i> nin Belirlenmesi.....	54
4.1.6. Tuzak Bitki Köklerinde Vektör Tobacco mosaic virus' un RT-PCR Yöntemi ile araştırılması	56
4.1.7. Biyolojik Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular.....	59
4.1.7.1. TMV ile İlgili Yürütülen Biyolojik Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular.....	59
4.1.7.2. Beet black scorch virus, Tobacco necrosis virus ve Tobacco rattle virus ile İlgili Yürütülen Biyolojik Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular.....	72
4.1.7.3. Test Bitkilerinde Yürütülen Moleküler Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular.....	80
4.2. Tartışma	84
5. SONUÇ	91
KAYNAKLAR	92
ÖZGEÇMİŞ.....	105

SİMGELER VE KISALTMALAR

BVQ	: Beet virus Q
BNYVV	: Beet necrotic yellow vein virus
BSBV	: Beet soil-borne virus
BSBMV	: Beet soil-borne mosaic virus
BtMV	: Beet mosaic virus
BYV	: Beet yellows virus
BWYV	: Beet western yellow virus
BCTV	: Beet curly top virus
BLCV	: Beet leaf curl virus
BBSV	: Beet black scorch virus
TMV	: Tobacco mosaic virus
TNV	: Tobacco necrosis virus
TRV	: Tobacco rattle virus
BOLV	: Beet oak-leaf virus
PTGS	: Post transcriptional gene silencing
ICTV	: International Committee on Taxonomy of Viruses
PEBV	: Pea early-browning virus
PepRV	: Pepper ringspot virus
CMV	: Cucumber mosaic virus
FAO	: Food and Agriculture Organization
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
CP	: Coat protein (Kılıf proteini)
DAS-ELISA	: Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay
dsRNA	: Double stranded RNA
ORF	: Open reading frame
RNA	: Ribonükleik asit
RT-PCR	: Reverse transcriptase polymerase chain reaction

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dünyada şeker pancarının ilk kültüre alınması ve ilk şeker pancarı fabrikalarının kurulması.....	1
Şekil 1.2. Dünyanın önde gelen şeker pancarı üretimi yapan ülkeleri.....	2
Şekil 2.1. <i>Polymyxa betae</i> 'nin dünyadaki coğrafik yayılımı.....	6
Şekil 2.2. <i>Polymyxa betae</i> 'nin yaşam döngüsü.....	7
Şekil 2.3. BNYVV'nin coğrafik yayılımı.....	7
Şekil 2.4. BNYVV'nin düz çubuk şeklindeki partiküllerinin elektron mikroskop altında görünümü.....	8
Şekil 2.5. BNYVV'nin genom organizasyonu.....	9
Şekil 2.6. Rhizomania'ya dayanıklı çeşitlerde belirlenen yapraklardaki renk açılması (A), köklerdeki sakallanma (B)	10
Şekil 2.7. Rhizomania hastalığının dayanıklı çeşit (<i>Rz1</i>) yetiştiriciliği yapılan tarlada genel görünümü.....	11
Şekil 2.8. BNYVV ile enfekteli şeker pancarı bitkisinin yapraklarında oluşan nekrotik sarı damar symptomunun görünümü.....	11
Şekil 2.9. BSBV'nin coğrafik yayılımı.....	12
Şekil 2.10. <i>Pomovirus</i> 'lerin düz çubuk şeklindeki partiküllerinin elektron mikroskop altında görünümü.....	13
Şekil 2.11. Beet soil-borne virus'un genom organizasyonu	13
Şekil 2.12. Işık mikroskobu altında <i>Olpidium bornovanus</i> (A), <i>O. brassicae</i> (B) ve <i>O. virulentus</i> 'un dinlenme spor yapılarının görünümü (C).....	15
Şekil 2.13. Chytrid vektörlerin yaşam döngüsü.....	16
Şekil 2.14. Beet black scorh virus'ün coğrafik yayılımı	18
Şekil 2.15. <i>Betanecrovirus</i> 'lerin ikosaedral şekilli partiküllerinin elektron mikroskop altında görünümü (A) ile virionun şematize görünümü (B).....	18
Şekil 2.16. Beet black scorh virus'un genom organizasyonu.....	19
Şekil 2.17. Şiddetli BNYVV symptomu (kök sakallanması ve iletim demetlerinin lifsileşmesi) gösteren BBSV ile de bulaşık şeker pancarı bitkilerinin görünümü (A) ile şeker pancarı bitkilerinin yapraklarında oluşan klorotik lezyonlar (B) ve BBSV'ün <i>C. quinoa</i> 'ya mekanik inokülasyonu sonucu bu bitkinin yapraklarında oluşan klorotik/nekrotik lokal lezyonlar (C ve D) ile bazen bu bitkinin yapraklarında oluşan damarların koyu yeşil bantla sınırlandığı sistemik symptomların (E ve F) görünimleri	21
Şekil 2.18. Tobacco necrosis virus-A'nın genom organizasyonu	22
Şekil 2.19. Hibrit virüs BvANV-1'in genom organizasyonu	22
Şekil 2.20. Tobacco rattle virus'ün coğrafik yayılımı.....	24
Şekil 2.21. Tobacco rattle virus partiküllerinin elektron mikroskop altında görünimleri.....	25
Şekil 2.22. Tobacco rattle virus'un genom organizasyonu ve ekspresyon stratejisi.....	25

Şekil 2.23. Tobacco rattle virus'un şeker pancarına ard arda üç aktarımı sonrası bu bitkinin virüs inoküle edilen yapraklarında oluşan klorotik benekler (A) ile sistemik klorotik benek belirtilerinin görünümü (B)	27
Şekil 2.24. Tobacco mosaic virus partiküllerinin elektron mikroskop altındaki görünümü.....	27
Şekil 2.25. Tobacco mosaic virus'un genom organizasyonu	28
Şekil 3.1. Sürvey çalışmalarının yürütüldüğü iller	30
Şekil 3.2. Kum üzerinde ön çimlendirme yapıldıktan sonra saksılara şaşırtılan şeker pancarı fidelerinin görünümleri (A, B ve C)	34
Şekil 3.3. İklim odasında tuzak bitki testi yöntemine göre yetiştirilen BNYVV'ye hassas şeker pancarı bitkilerinin (cv. Ansa) genel görünümü.....	34
Şekil 3.4. Hasat sonrası bitkilerin tartım işlemleri ve çalışmalar için hazırlanma aşaması (A, B ve C)	35
Şekil 3.5. DAS-ELISA yöntemi	36
Şekil 4.1. Şeker pancarı bitkisinin yapraklarında gözlenen kloroz (A ve B)	43
Şekil 4.2. Şeker pancarının yapraklarda kloroz ile birlikte oluşan nekrotik lekeler (A ve B).....	44
Şekil 4.3. Şeker pancarı bitkisinin yapraklarında oluşan form bozuklukları (ipliksileşme) (A) ve bazı yapraklarda gözlenen iri sarı lekeler (B)	44
Şekil 4.4. TRV'e spesifik antiserum ile yürütülen ELISA testi çalışmasında substrat ilavesini takiben tüm pleytte oluşan sararmanın görünümü.....	48
Şekil 4.5. A-B. Seçilen örneklerin Tobacco rattle virus'un PCR yöntemi ile araştırılması.....	49
Şekil 4.6. Tobacco rattle virus'un hareket proteinine spesifik primerler kullanılarak RT-PCR yöntemi ile araştırılması.....	50
Şekil 4.7. A-B. Beet soil-borne virus izolatlarının kılıf protein gen bölgesinin RT-PCR yöntemi ile çoğaltılması.....	51
Şekil 4.8. Beet back scorch virus'un RT-PCR yöntemi ile araştırılması.....	51
Şekil 4.9. Beet back scorch virus'un RT-PCR yöntemi ile araştırılması.....	52
Şekil 4.10. Işık mikroskobu altında şeker pancarı bitkilerinin kılcal kök hücrelerinde belirlenen bal peteği şeklindeki <i>Polymyxa betae</i> 'nin zoosporangium (A) ve dinlenme spor yapılarının görünümüleri (B, C ve D).....	54
Şekil 4.11. Işık mikroskobu altında şeker pancarı bitkilerinin kılcal köklerinde belirlenen <i>Olpidium</i> spp.'ye ait dinlenme spor yapılarının görünümüleri (A, B ve C).....	55
Şekil 4.12. Işık mikroskobu altında şeker pancarı köklerinde <i>P. betae</i> (sarı ok ile işaretli) ve <i>Olpidium</i> spp. (beyaz ok ile işaretli)'ye ait dinlenme spor yapılarının birlikte görünümüleri.....	55
Şekil 4.13. Şeker pancarı bitkilerinin kökünde belirlenen <i>Cyanobacteria</i> spp.'nin ışık mikroskobu altında görünümü.....	56
Şekil 4.14. Şeker pancarı bitkileri köklerinden elde edilen toplam RNA'lar kullanılarak TMV'nin RT-PCR yöntemi ile araştırılması.....	56
Şekil 4.15. Şeker pancarı bitkileri köklerinde TMV'nin PCR yöntemi ile araştırılması.....	57

Şekil 4.16. Şeker pancarı köklerinden TMV'nin PCR yöntemi ile araştırılması.....	58
Şekil 4.17. Şeker pancarı kök örneklerinde TMV'nin PCR yöntemi ile araştırılması.....	58
Şekil 4.18. Şeker pancarı kök örneklerinde TMV'nin RT-PCR yöntemi ile araştırılması.....	59
Şekil 4.19. Tobacco mosaic virus'un biyolojik karakterizasyonu için seçilen ve sadece TMV ile enfekteli olarak belirlenen 19 no'lu (ELISA absorbans değeri: 0.856) (A) ve 25 no'lu toprak örneğinde (ELISA absorbans değeri: 0.500) (B) yetiştirilen şeker pancarı bitkilerinde gözlenen hafif kloroz belirtisinin görünümü.....	60
Şekil 4.20. 19 no'lu kök örneğinin şeker pancarı bitkisine (cv. Smart Briga) mekanik inokulasyonu sonrası sağlıklı kontrol (-C) ve inokule edilen bitkinin genel görünümü. Virus-inokule edilen yapraklarda gözlenen klorotik lokal lezyonlar (A) ve üst yapraklarda inokulasyondan üç hafta sonra oluşan kıvrılma görünümü (B).....	61
Şekil 4.21. 25 no'lu kök örneğinin şeker pancarı bitkisine (cv. Smart Briga) mekanik inokulasyonu sonrası sağlıklı kontrol (-C) ve inokule edilen bitkinin genel görünümü. Virus-inokule edilen yapraklarda gözlenen klorotik lokal lezyonlar (A) ve üst yapraklarda inokulasyondan üç hafta sonra oluşan kıvrılma görünümü (B).....	61
Şekil 4.22. 19 no'lu şeker pancarı kök örneğinin <i>Chenopodium quinoa</i> bitkisine mekanik inokulasyon sonrası virus-inokule edilen yapraklarda gözlenen klorotik lokal lezyonlar	61
Şekil 4.23. 25 no'lu şeker pancarı kök örneğinin <i>Chenopodium quinoa</i> bitkisine mekanik inokulasyonu sonrası virus-inokule edilen yapraklarda gözlenen damar açılmaları.....	62
Şekil 4.24. 19 no'lu şeker pancarı kök örneğinin <i>Nicotiana benthamiana</i> bitkisine mekanik inokulasyonu sonrası sağlıklı kontrol (-C) ve inokule edilen bitkinin genel görünümü (A) ve virus-inokule edilen bitkilerin yapraklarında gözlenen klorotik lokal lezyonlar (B).....	62
Şekil 4.25. 25 no'lu şeker pancarı kök örneğinin <i>Nicotiana benthamiana</i> bitkisine mekanik inokulasyonu. Virus-inokule edilen üst yapraklarda inokulasyondan üç hafta sonra oluşan kıvrılma görünümü (A) ve inokule edilen yapraklarda gözlenen klorotik lokal lezyonlar (B).....	62
Şekil 4.26. 19 no'lu şeker pancarı kök örneğinin <i>Nicotiana rustica</i> bitkisine mekanik inokulasyonu sonrasında sağlıklı kontrol (-C) ve inokule edilen bitkinin genel görünümü (A) ve virus-inokule edilen yapraklarında gözlenen klorotik lokal lezyonlar (B).....	63
Şekil 4.27. 25 no'lu şeker pancarı kök örneğinin <i>Nicotiana rustica</i> bitkisine mekanik inokulasyonu sonrasında sağlıklı kontrol (-C) ve bu bitkinin genel görünümü (A) ve virus-inokule edilen yapraklarda inokulasyondan üç hafta sonra oluşan hafif klorotik lekeler (B).....	63
Şekil 4.28. 19 no'lu şeker pancarı kök örneğinin domates bitkisine mekanik inokulasyonu sonrasında bu bitkinin ve kontrol bitkisinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen yapraklarında gözlenen klorotik lokal lezyonlar ve üst yapraklarda inokulasyondan üç hafta sonra oluşan hafif bombeleşme (B).....	63

- Şekil 4.29. 25 no'lu şeker pancarı kök örneğinin domates bitkisine mekanik inokulasyonu sonrasında bu bitkinin ve kontrol bitkinin genel görünüşleri (A) ile virus-inokule edilen yapraklarında gözlenen klorotik lokal lezyonlar ile üst yapraklarda inokulasyondan üç hafta sonra oluşan hafif bombenin görünümü (B).....64
- Şekil 4.30. 19 no'lu örneğin biber bitkisine mekanik inokulasyonu sonrasında sağlıklı kontrol ve bu bitkinin genel görünüşleri (A) ile virus-inokule edilen yapraklarında gözlenen klorotik lokal lezyonlar ile üst yapraklarda inokulasyondan üç hafta sonra oluşan hafif bombe oluşumunun görünümü (B).....64
- Şekil 4.31. 25 no'lu örneğin biber bitkisine mekanik inokulasyonu sonrasında sağlıklı kontrol ve bu bitkinin genel görünüşleri (A) ile virus-inokule edilen yapraklarında gözlenen klorotik lokal lezyonlar ile üst yapraklarda inokulasyondan üç hafta sonra oluşan hafif bombe oluşumunun görünümü (B).....64
- Şekil 4.32. Tobacco mosaic virus'un biyolojik karakterizasyonu için seçilen ve TMV+BNYVV ile enfekteli olarak belirlenen 3 no'lu toprak örneğinde yetiştirilen şeker pancarı bitkilerinin genel görünüşleri.....65
- Şekil 4.33. 3 no'lu örneğin şeker pancarı bitkisine (cv. Smart Briga) mekanik inokulasyonu sonrasında bu bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen ve edilmeyen yapraklarında gözlenen hafif klorotik lokal lezyonlar (B).....66
- Şekil 4.34. 3 no'lu örneğin *Chenopodium quinoa* bitkisine mekanik inokulasyonu sonrası virus-inokule edilen yapraklar oluşan damar açılmaları ve/ ya da ufak klorotik lekeler ile ELISA ile BNYVV-pozitif olarak belirlenen virüs-inoküle edilmeyen üst yapraklarında gözlenen şekil bozukluğu.....66
- Şekil 4.35. 3 no'lu örneğin *Nicotiana benthamiana* bitkisine mekanik inokulasyonu iki hafta sonra bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen yaprağında klorotik lokal leke oluşumu (B).....67
- Şekil 4.36. Sağlıklı kontrol ile 3 no'lu örneğin *Nicotiana rustica* bitkisine mekanik inokulasyonundan iki hafta sonrasında genel görünüşleri (A) ile virus-inokule edilen ve edilmeyen yapraklarda gözlenen hafif bombeleşme (B) 67
- Şekil 4.37. Sağlıklı kontrol ile 3 no'lu örneğin domates bitkisine mekanik inokulasyonu iki hafta sonra genel görünüşleri (A) ile virus-inokule edilen ve edilmeyen yapraklarda gözlenen hafif şekil bozuklukları (B).....67
- Şekil 4.38. Sağlıklı kontrol ile 3 no'lu örneğin domates bitkisine mekanik inokulasyonu iki hafta bu bitkide oluşan cüceleşme (A) ile virus-inokule edilen ve edilmeyen yapraklarda gözlenen hafif bombe görünümü (B).....68
- Şekil 4.39. BNYVV (ELISA absorbans değeri: 0.391) ve TMV (ELISA absorbans değeri: 0.983) ile bulaşık 20 no'lu toprak örneğinde tuzak bitki testi tekniğine göre yetiştirilen şeker pancarı bitkilerinin I. Ekim ve II. Ekim sonrası genel görünüşleri.....68
- Şekil 4.40. BNYVV (ELISA absorbans değeri: 1.025) ve TMV (ELISA absorbans değeri: 0.776) ile bulaşık 46 no'lu toprak örneğinde tuzak bitki testi tekniğine göre yetiştirilen şeker pancarı bitkilerinin I. Ekim ve II. Ekim sonrası genel görünüşleri.....69

- Şekil 4.41. TMV ve BNYVV ile bulaşık 46 no'lu toprak örneğinde yetiştirilen şeker pancarlarına ait yaprak özsuyunun hıyar bitkisine mekanik inokulasyondan üç hafta sonra bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen ve edilmeyen üst yapraklarda oluşan nekrotik lokal lezyonların görünümü (B) 69
- Şekil 4.42. TMV ve BNYVV ile bulaşık 20 no'lu toprak örneğinde yetiştirilen şeker pancarlarına ait yaprak özsuyunun biber bitkisine mekanik inokulasyondan üç hafta sonra bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen yapraklarda oluşan klorotik lokal lezyonlar ve üst yapraklarda oluşan kıvrılma (B).....70
- Şekil 4.43. TMV ve BNYVV ile bulaşık 20 no'lu toprak örneğinde yetiştirilen şeker pancarlarına ait yaprak özsuyunun biber bitkisine mekanik inokulasyondan üç hafta sonra bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen yapraklarda oluşan klorotik lokal lezyonlar ile üst yapraklarda oluşan kıvrılma (B) 70
- Şekil 4.44. TMV ve BNYVV ile bulaşık 20 no'lu toprak örneğinde yetiştirilen şeker pancarlarına ait yaprak özsuyunun hıyar bitkisine mekanik inokulasyondan üç hafta sonra bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen ve dileyen üst yapraklarda oluşan nekrotik lokal lezyonlar (B).....71
- Şekil 4.45. TMV ve BNYVV ile bulaşık 46 no'lu toprak örneğinde yetiştirilen şeker pancarlarına ait yaprak özsuyunun hıyar bitkisine mekanik inokulasyondan üç hafta sonra bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen ve edilmeyen üst yapraklarda oluşan nekrotik lokal lezyonlar (B) 71
- Şekil 4.46. TMV ve BNYVV ile bulaşık 46 no'lu toprak örneğinde yetiştirilen şeker pancarlarına ait yaprak özsuyunun hıyar bitkisine mekanik inokulasyondan üç hafta sonra bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen ve edilmeyen üst yapraklarda oluşan nekrotik lokal lezyonlar (B) 71
- Şekil 4.47. BNYVV ile enfekteli (ELISA absorbans değeri: 3.450) ve *Olpidium* spp. 15 no'lu toprak örneğinde tuzak bitki testi tekniğine göre yetiştirilen şeker pancarı bitkilerinin II. Ekim sonrası genel görünümleri.....72
- Şekil 4.48. BNYVV (ELISA absorbans değeri: 0.635) ve vektör türlerden *P. betae* ile *Olpidium* spp ile bulaşık Konya iline ait 42 no'lu toprak örneğinde tuzak bitki testi tekniğine göre yetiştirilen şeker pancarı bitkilerinin I. Ekim ve II. Ekim sonrası genel görünümleri.....73
- Şekil 4.49. Sağlıklı kontrol ile 15 no'lu örneğin şeker pancarı bitkisine (cv. Smart Briga) mekanik inokulasyondan üç hafta sonrasında bu bitkilerin genel görünümleri (A) ve virus-inokule edilen yapraklarında gözlenen form bozukluğu, ufak siyah lekelerin oluşumu ile üst yapraklarda gözlenen şekil değişiklikleri (B).....75
- Şekil 4.50. *Chenopodium quinoa* bitkisine 15 no'lu örneğin mekanik inokulasyondan sonrası virus-inokule edilen yapraklarda oluşan damar açılmaları ve/ ya da ufak klorotik lekeler ile virüs-inokule edilmeyen üst yaprakların genel görünümü...75
- Şekil 4.51. *Nicotiana benthamiana* bitkisine 15 no'lu örneğin mekanik inokulasyondan üç hafta sonra bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen yapraklarında gözlenen ufak siyah lekeler ve üst yapraklarda oluşan hafif kıvrılma belirtilerinin görünümü (B).....76
- Şekil 4.52. Sağlıklı kontrol ile 15 no'lu örneğin *Nicotiana rustica* bitkisine mekanik inokulasyondan üç hafta sonra genel görünümleri (A) ve virus-inokule edilen yapraklarında gözlenen siyah dairesel leke ile klorotik lokal lezyonun görünümü ve üst yapraklarda oluşan iri klorotik lekeler (B).....76

Şekil 4.53. Sağlıklı kontrol ile 15 no'lu örneğin domates bitkisine mekanik inokulasyondan üç hafta sonraki genel görünümü (A) ve virus-inokule edilen ve edilmeyen üst yapraklarda oluşan şekil bozuklukları (B)	77
Şekil 4.54. Biber bitkisine 15 no'lu örneğin mekanik inokulasyonu sonrasında bu bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen yapraklarda oluşan nekrotik lekeler ve virüs-inokule edilmeyen üst yaprakların görünümü (B).....	77
Şekil 4.55. <i>Nicotiana benthamiana</i> bitkisine 42 no'lu örneğin mekanik inokulasyondan üç hafta sonra bitkinin genel görünümü (A) ve virus-inokule edilen yapraklarında gözlenen iri nekrotik ve klorotik lekeler ile üst yapraklarda oluşan bombeleşme (B)	78
Şekil 4.56. Sağlıklı kontrol ile 42 no'lu örneğin <i>Nicotiana rustica</i> bitkisine mekanik inokulasyondan üç hafta sonra bu bitkilerin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen yapraklarında gözlenen iri klorotik lokal lezyonlar ile üst yapraklarda oluşan küçük klorotik lekeler (B).....	78
Şekil 4.57. Biber bitkisine 42 no'lu örneğin mekanik inokulasyonu sonrasında bu bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen ve virüs-inokule edilmeyen üst yaprakların görünümü (B).....	78
Şekil 4.58. <i>Chenopodium quinoa</i> bitkisine 42 no'lu örneğin mekanik inokulasyondan sonrası virus-inokule edilen yapraklar oluşan klorotik ve nekrotik lekeler ile virüs-inoküle edilmeyen üst yapraklar gözlenen form bozukluğu.....	79
Şekil 4.59. Sağlıklı kontrol ile 42 no'lu örneğin domates bitkisine mekanik inokulasyondan üç hafta sonraki genel görünümü (A) ve virus-inokule edilen yapraklarda oluşan şekil bozuklukları ile simptom sergilemeyen üst yaprakların görünümü (B).....	79
Şekil 4.60. Şeker pancarı bitkisine 42 no'lu örneğin mekanik inokulasyonu sonrasında bu bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen ve virüs-inokule edilmeyen üst yaprakların görünümü (B).....	79
Şekil 4.61. 22 no'lu toprakta yetişen şeker pancarlarına ait kök örneklerinin <i>Nicotiana rustica</i> bitkisine mekanik inokulasyondan takiben üç hafta sonra bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen yaprakta oluşan klorotik lekeler (B).....	80
Şekil 4.62. Test bitkilerinde Tobacco rattle virus'un RT-PCR yöntemi ile araştırılması.....	82
Şekil 4.63. Test bitkilerinde Tobacco rattle virus'un RT-PCR yöntemi ile araştırılması.....	82
Şekil 4.64. Test bitkilerinde Tobacco rattle virus'un RT-PCR yöntemi ile araştırılması.....	82
Şekil 4.65. Test bitkilerinde Tobacco rattle virus'un RT-PCR yöntemi ile araştırılması.....	83

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Dünyada ilk sıralarda yer alan şeker pancarı üreticisi ülkelerin ekim alanı, üretim ve verim değerleri	2
Tablo 1.2. Türkiye’de son on yılda şeker pancarı ekim , üretim ve verim miktarları.....	3
Tablo 1.3. Konya ve Ankara illerine göre şeker pancarı üretim alanları, üretim miktarları ve verim değerleri	4
Tablo 2.1. <i>Olpidium</i> spp. tarafından taşınan virüsler.....	17
Tablo 3.1. Moleküler çalışmalarda kullanılan primerler, nükleotit dizileri, virüs, hedef RNA ve gen bölgesi ile beklenen bant büyüklükleri	31
Tablo 3.2. Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılacak test bitkileri ve temin edileceği yerler	31
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan toprak örneklerinin temin edildiği il, ilçe ve köyler ile toprak numaraları	33
Tablo 3.4. Moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen örneklerin orjinleri, örnek numaraları, semptomları, vektörlerin bulunma durumu ve ELISA testi ile örneklerde saptanan virüs türleri.....	37
Tablo 3.5. Anışa şeker pancarı çeşidi (<i>rz1</i>) ekimi yapılarak gerçekleştirilen tuzak bitki testi sonrası, RNA saflaştırılması yapılan örneklerin numaraları ve bu örneklere ait RNA konsantrasyonları	38
Tablo 4.1. Ankara ili toprak örneklerinde tuzak bitki testi yöntemine göre yetiştirilen şeker pancarı bitkilerinde gözlenen semptomlar, P. betae ve <i>Olpidium</i> spp. ile bulaşıklık durumları ve BNYVV, BBSV, TNV ve TMV’ye ait ELISA sonuçları.....	45
Tablo 4.2. Konya ili toprak örneklerinde tuzak bitki testi yöntemine göre yetiştirilen şeker pancarı bitkilerinde gözlenen semptomlar, P. betae ve <i>Olpidium</i> spp. ile bulaşıklık durumları ve BNYVV, BBSV, TNV ve TMV’ye ait ELISA sonuçları.....	47
Tablo 4.3. Tuzak bitki kök örneklerinde TRV, BSBV ve BBSV’ün bulunma durumunun RT-PCR yöntemi ile araştırılması.....	52
Tablo 4.4. Ankara ve Konya illerine ait toprak örneklerinin tekli ve karışık virüs ile bulaşıklık durumları	53
Tablo 4.5. Tobacco mosaic virus’ün biyolojik karakterizasyonu için seçilen ve sadece TMV ile enfekteli olarak belirlenen 19 no’lu ve 25 no’lu şeker pancarı kök örneklerinin test bitkilerine aktarımı sonucu bu bitkilerde gözlenen semptomlar ve ELISA testi sonuçları.....	60
Tablo 4.6. BNYVV ve TMV ile bulaşık 3 no’lu toprak örneğinde tuzak bitki testi yöntemine göre yetiştirilen şeker pancarı yapraklarının test bitkilerine mekanik inokulasyonundan iki hafta sonra bu bitkilerde kayıt edilen semptomlar ile lokal ve sistemik yapraklarında BNYVV ve TMV’nin ELISA sonuçları.....	66
Tablo 4.7. Tuzak bitki testi sonucuna göre seçilen bazı örneklere ait kök ya da yaprakların test bitkilerine inokulasyonunu takiben bu bitkilerde gözlenen semptomlar ve ELISA sonuçları	69
Tablo 4.8. Tuzak bitki testi sonucu seçilen bazı örneklere ait kök ya da yaprakların test bitkilerine inokulasyonunu takiben bu bitkilerde gözlenen semptomlar (*) ve ELISA testi sonuçları	74

Tablo 4.9. Tuzak bitki testi sonucu seçilen bazı örneklere ait kök ya da yaprakların test bitkilerine inokulasyonunu takiben bu bitkilerde gözlenen simptomlar (*) ve ELISA testi sonuçları	74
Tablo 4.10. Test bitkilerinde yürütülen moleküler çalışmalar için seçilen örneklerin numaraları ve bu bitkilerde gözlenen lokal ve sistemik simptomlar ile RNA izolasyonu yapılan bitki yaprakları	81
Tablo 4.11. Mekanik inokulasyon yapılan test bitkilerinden RNA saflaştırılması yapılan örneklerin kodları, numaraları, örnek alınan bitki parçaları ve bu örneklere ait RNA konsantrasyonları.....	81



1. GİRİŞ

Şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.), *Amaranthaceae* familyasında yer alan (Monteiro et al., 2013) iki yıllık bir endüstri bitkisi olup, birinci yıl toprak altında gövdesini oluşturmakta, ikinci yıl ise sapa kalkarak tohum vermektedir (Elçi vd., 1994). Bu bitki ülkemizde şeker sanayinin hammaddesi olarak yetiştirilmekle birlikte; şeker pancarının işlenmesi sonucu ortaya çıkan küspe, melas ve etanol gibi yan ürünleri de stratejik niteliği olan ürünlerdendir. Melas ve küspe hayvan yemi olarak değerlendirilmekle birlikte; ispiroto içki sanayinin önemli bir hammaddesini oluşturmakta, bunlara ilaveten maya, antibiyotik, bio-etanol gibi birçok ürün ise ülke ekonomisi için önem taşımaktadır (Şiray, 1990; Sunulu and Sunulu, 2016).

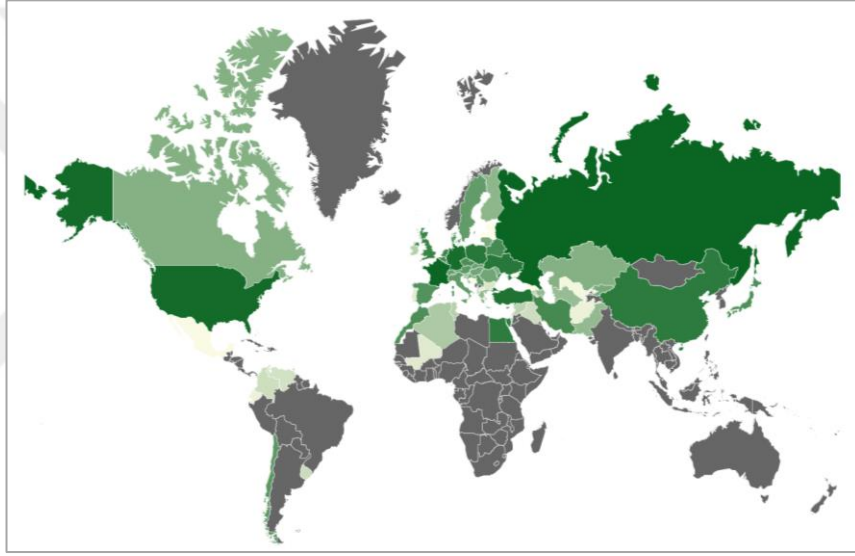
Pancar yüzyıllardır bir sebze olarak kullanılmış, ancak ilk olarak 1747’de Alman bilim adamı Andreas Sigismund Marggraf tarafından ıslah ve şeker üretimi üzerine çalışmalara başlanılmıştır. Bununla birlikte, Marggraf’ın bu buluşunu bir sanayi hamlesi haline getirme fikri ise öğrencisi olan Franz Achard’a ait olup, Achard dünyanın ilk şeker fabrikasını 1801 yılında Silezya’da kurmuş (Şekil 1.1) ve çeşitli pancar tiplerini seçerek üretimini gerçekleştirmiştir. Bu şekilde elde edilen ve ‘Beyaz Silezya Pancarı’ adı verilen çeşit, günümüzdeki şeker pancarı çeşitlerinin temelini oluşturmuştur (Akınerdem, 2022). Böylelikle, ilk zamanlarda pancardan elde edilen şeker oranı %0.5-1.5 iken; yürütülen çalışmalarla günümüzde bu oran %14-25’lere ulaşmıştır.



Şekil 1.1. Dünyada şeker pancarının ilk kültüre alınması ve ilk şeker pancarı fabrikalarının kurulması (Pathak et al., 2022)

Ülkemizde ise, 1923 yılında Uşak ve Alpullu Şeker Fabrika'ları ile ilk yerli şeker sanayimiz hizmete girmiştir. Günümüzde Türkiye'de; özel, kooperatif ve devlete ait olmak üzere 33 adet şeker fabrikası bulunmaktadır (Akınerdem, 2022). Bazı yabancı pancar çeşitlerinin anavatanı Anadolu olduğu için ülkemiz pancar tarımı için çok uygundur. Nitekim; Doğu Karadeniz, Ege ve Akdeniz'in kıyılarında ve Güney Doğu Anadolu Bölgesi dışındaki tüm bölgelerde şeker pancarı üretimi yapılmaktadır (Şentürk, 2020).

Dünyada 52 ülkede yılda yaklaşık 253 milyon ton şeker pancarı üretilmektedir (Şekil 1.2). Türkiye 23 milyon ton şeker pancarı üretimi ile %9.1'lik dilimle Rusya, ABD, Fransa ve Almanya'nın ardından 5. sırada yer almaktadır (Tablo 1.1).



Şekil 1.2. Dünyanın önde gelen şeker pancarı üretimi yapan ülkeleri (Anonim, 2020)

Tablo 1.1. Dünyada ilk sıralarda yer alan şeker pancarı üreticisi ülkelerin ekim alanı (ha), üretim (ton) ve verim (ton/ha) değerleri (FAO, 2022)

Ülke	Ekim Alanı (ha)	Üretim (ton)	Verim (ton/ha)
Rusya	916.647	33.915.086	37.0
ABD	462.280	30.497.740	66.0
Fransa	420.890	26.195.460	62.2
Almanya	386.000	28.618.100	74.1
Türkiye	336.348	23.025.738	68.5
Mısır	263.543	13.043.612	49.5
Polonya	245.920	14.171.540	57.6
Ukrayna	220.000	9.150.180	41.6
Çin	195.246	11.597.764	59.4
İngiltere	111.100	5.980.000	53.8
Diğerleri	881.099	56.773.623	47.8
Dünya	4.439.073	252.968.843	56.99

Türkiye İstatistik Kurumu 2022 yılı verilerine göre, ülkemizde şeker pancarı yaklaşık 2.745.392 da ekim alanı ve 19 milyon ton üretim miktarı ile önemli kültür bitkileri arasında yer almaktadır. Ortalama şeker pancar verimi ise 6.921 ton/da olarak belirlenmiştir. 2022 yılında şeker pancarı ekim alanlarında bir önceki yıla göre düşüş gözlenmekle birlikte; üretim miktarı ve verimde artışın olması dikkat çekmiştir (Anonim, 2022) (Tablo 1.2).

Tablo 1.2. Türkiye’de son on yılda şeker pancarı ekim (da), üretim (ton) ve verim (kg/da) miktarları (TÜİK, 2022)

Yıllar	Ekim Alanı (da)	Üretim (ton)	Verim (kg/da)
2012	2.806.945	14.919.940	5.325
2013	2.913.282	16.488.590	5.668
2014	2.887.851	16.743.045	5.824
2015	2.744.873	16.022.783	5.848
2016	3.224.477	19.592.731	6.086
2017	3.392.742	21.149.20	6.241
2018	2.921.044	17.436.100	5.998
2019	3.137.891	18.054.320	5.822
2020	3.381.078	23.025.738	6.846
2021	3.054.051	17.767.085	5.876
2022	2.745.392	19.000.000	6.921

Şeker pancarı verimini olumsuz etkileyen nedenler arasında hastalıklar önemli bir yer tutmaktadır. Dünyada pancar verimini olumsuz etkileyen fungus, bakteri ve virüs olmak üzere 82 hastalıktan 51’i ülkemizde de sorun oluşturmaktadır (Özgür, 2003). Günümüzde tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de özellikle toprak kaynaklı viral hastalıklar şeker pancarı üretimini olumsuz yönde etkilemektedir. Bunlardan en önemlisi olarak kabul edilen, protozoan vektör *Polymyxa betae* Keskin ile taşınan “rhizomania” olarak bilinen hastalık, Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV; Şeker pancarı nekrotik sarı damar virüsü) tarafından oluşturulmaktadır. Ayrıca, aynı vektör tür tarafından taşınan Beet soil-borne virus (BSBV; Şeker pancarı toprak kökenli virüsü), Beet virus Q (BVQ; Şeker pancarı Q virüsü) ve Beet soil-borne mosaic virus (BSBMV; Şeker pancarı toprak kökenli mozaik virüsü)’de şeker pancarında sorun oluşturmaktadır (Meunier et al., 2003). Diğer taraftan; *Chytrid* vektör *Olpidium* spp. tarafından taşınan Beet black scorch virus (BBSV; Şeker pancarı siyah yanıklık virüsü) ve Tobacco necrosis virus (TNV; Tütün nekroz virüsü)’ün de pancar bitkilerinde enfeksiyona sebep olduğu bilinmektedir (Liu et al., 1999; Cao et al., 2002). Son yıllarda, nematod vektör ile taşınan Tobacco rattle virus (TRV; Tütün kırık virüsü)’ün de şeker pancarında problem oluşturduğu

bildirilmektedir (Dikova, 2006). Ayrıca, bilinen en stabil virüslerden biri olan ve toprakta uzun yıllar kalıcılığını yitirmeyen Tobacco mosaic virus (TMV; Tütün mozayik virüsü)'ünde pancar bitkilerinde enfeksiyona sebep olduğu belirtilmektedir (Wang et al., 2008).

Ülkemizde şeker pancarı üretiminin yapıldığı iller incelendiklerinde; 732.344 da ekim alanı ve 5.989.214 ton üretim ile Konya ili ve 89.892 da ekim alanı ve 587.809 ton üretim ile Ankara ili ilk sıralarda yer almaktadır (Anonim, 2022) (Tablo 1.3).

Tablo 1.3. Konya ve Ankara illerine göre şeker pancarı üretim alanları, üretim miktarları ve verim değerleri (Anonim, 2022)

Yıllar	KONYA			ANKARA		
	Ekim Alanı (da)	Üretim (ton)	Verim (kg/da)	Ekim Alanı (da)	Üretim (ton)	Verim (kg/da)
2018	731.688	5.079.242	6.944	99.728	629.101	6.308
2019	885.218	5.875.116	6.646	115.670	717.886	6.280
2020	914.750	7.228.473	7.911	133.715	859.161	6.425
2021	891.797	5.725.947	6.472	114.736	667.896	5.832
2022	732.344	5.989.214	8.179	89.892	587.809	6.539

Bu tez çalışmasında; Konya ve Ankara illerinde 2021 yılında gerçekleştirilen sürvey çalışmaları ile toplanan 52 adet toprak örneğinde BNYVV, BBSV, TMV, TNV ve TRV'ün bulunma durumları ELISA yöntemi ile araştırılmıştır. BBSV'nin varlığı ise her iki ile ait seçilen 12 örnekte spesifik primerler kullanılarak RT-PCR yöntemi incelenmiştir. Ayrıca, bu örneklerle ait bitki köklerinde mikroskopik olarak vektör *P. betae* ve *Ospidium* spp.'nin varlığı araştırılmıştır. İlave olarak, TMV ile enfekteli örnekler seçilerek yürütülen biyolojik çalışmalar ile konukçu çevresi irdelenmeye çalışılmıştır. Ayrıca, tuzak bitki testinde şeker pancarı bitkilerinde gözlenen semptomlar temel alınarak seçilen bazı örneklerin test bitkilerine aktarımı sonrası TRV, TNV ve BBSV'in bu örneklerde bulunma durumları hem serolojik, hem de moleküler yönden araştırılmıştır.

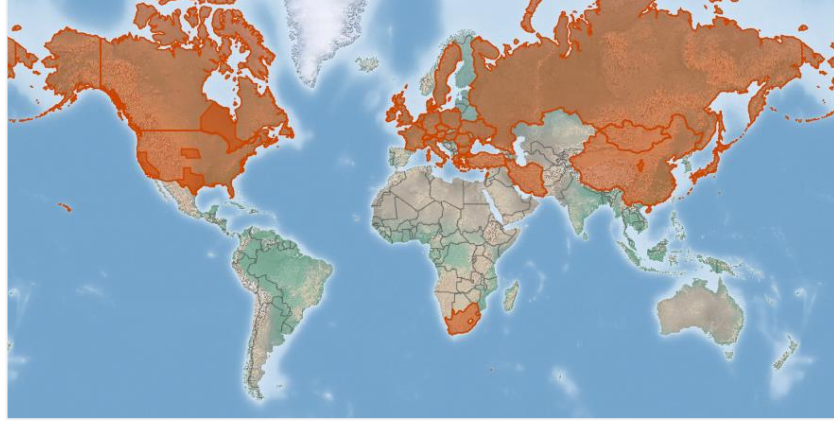
2. KAYNAK ÖZETLERİ

Toprak kökenli virüs hastalıkları şeker pancarı üretiminde verimi sınırlayan etmenler arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Protozoan vektör *Polymyxa betae* Keskin tarafından taşınan başlıca toprak kökenli virüsler; Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), Beet soil-borne virus (BSBV), Beet virus Q (BVQ) ve Beet soil-borne mosaic virus (BSBMV)'tür. Bu virüsler dünyanın çeşitli bölgelerinde şeker pancarında verim kayıplarına neden olmaktadır (Gonzalez-Vazquez et al., 2009). Diğer taraftan; *Chytrid* vektör *Olpidium* spp. tarafından taşınan Beet black scorch virus (BBSV) ve Tobacco necrosis virus (TNV) de pancar bitkilerinde enfeksiyona sebep olmaktadır. Son yıllarda, nematod vektörler ile taşınan Tobacco rattle virus (TRV)'ün de şeker pancarlarında problem oluşturduğu bildirilmektedir. Ayrıca, bilinen en stabil virüslerden biri olan ve toprakta uzun yıllar kalıcılığını yitirmeyen Tobacco mosaic virus (TMV)'de pancarda enfeksiyona sebep olduğu bilinmektedir.

2.1. *Polymyxa betae* ve taşıdığı virüsler

1964 yılında, *Polymyxa betae*'nin ilk teşhisi Dr. Bahattin Keskin tarafından yapılmıştır (Keskin, 1964). Bu tür 2000'li yıllara kadar *Myxomycota*'nın bir üyesi olarak gruplandırılırken, yürütülen moleküler ve sekans analizi çalışmaları ile elde edilen bulgular doğrultusunda daha sonra bu gruptan çıkarılmış ve Protozoa aleminin *Plasmodiophoromycetes* sınıfına yerleştirilmiştir (Ward et al., 2003). Ardından, yürütülen araştırmalarla *P. betae*'nin; Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) (Ivanoviç, 1983), Beet soil-borne virus (BSBV), Beet virus Q (BVQ), Beet soil-borne mosaic virus (BSBMV) (Meunier et al, 2003; McGrann et al., 2009) ve Beet oak-leaf virus (BOLV) (Liu and Gulati Sakhuja, 2011) gibi toprak kökenli virüslerin vektörü olduğu belirlenmiştir.

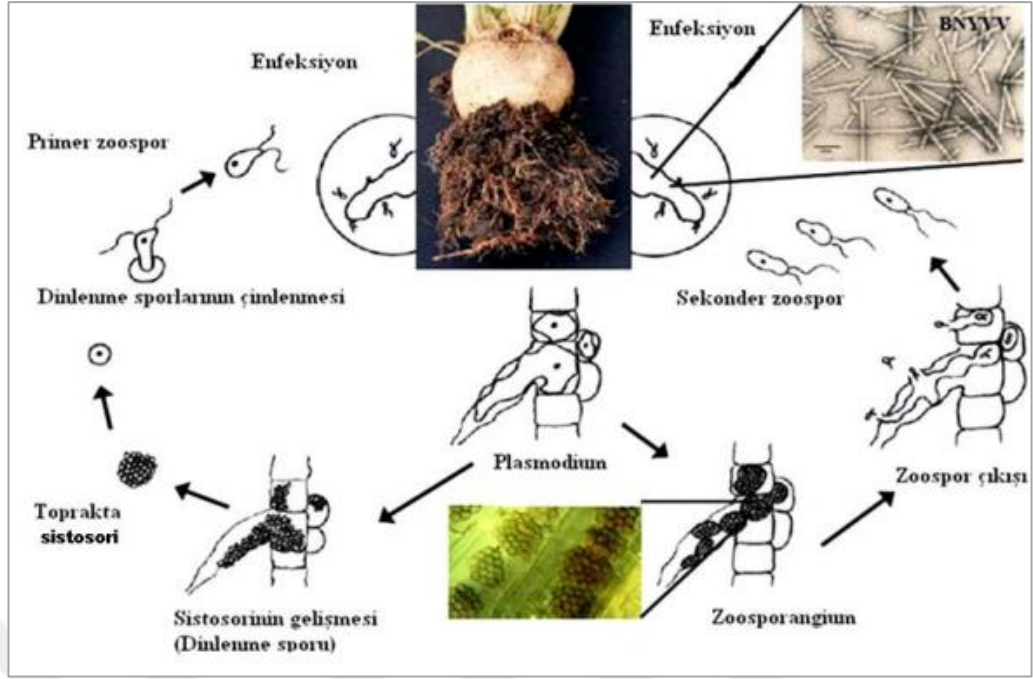
Günümüzde *P. betae*'nin Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika kıtasında yaygın olarak bulunduğu bilinmektedir (Canova, 1966; D'ambra and Mutto, 1977; Falk and Duffus, 1977) (Şekil 2.1). Bu türün konukçu çevresi oldukça sınırlıdır. *Chenopodiaceae*, *Amaranthaceae*, *Caryophyllaceae* ve *Portulacaceae* familyalarına ait üyeleri enfekte edebilmektedir. Bununla birlikte; 2010'lu yıllarda, *Crucifera* familyasından *Raphanus raphanistrum* L. (yabani turp)'un da *P. betae* ve BNYVV'nin doğal konukçusu olduğu bildirilmiştir (Kutluk Yılmaz vd., 2016).



Şekil 2.1. *Polymyxa betae*'nin dünyadaki coğrafik yayılımı (Anonim, 2022)

Polymyxa betae'nin enfeksiyon oluşturmalarını etkileyen en önemli faktörlerin başında topraktaki serbest su ve uygun konukçunun varlığının yanı sıra; toprak sıcaklığı gelmektedir (Legreve et al., 2002). Vektörü olduğu virüs türlerinden BNYVV'nin enfeksiyon oluşturmaabilmesi için en uygun toprak sıcaklığının 20-25°C (Blunt et al., 1991; Prillwitz and Schlösser, 1993); BSBV için ise 20°C olduğu bildirilmektedir (Prillwitz and Schlösser, 1993). Diğer taraftan; toprak pH'sının ise 6-8 arasında olması enfeksiyon oluşumu bakımından önem taşımaktadır (Asher and Blunt, 1987). Kutluk Yılmaz vd. (2010) 7.4 üzerindeki pH değerlerinde *P. betae* enfeksiyonunun yüksek olduğunu ve ayrıca toprakta yüksek miktarda CaCO_3 ve Mg olmasının BNYVV ve BSBV enfeksiyonunu teşvik ettiğini belirtmişlerdir.

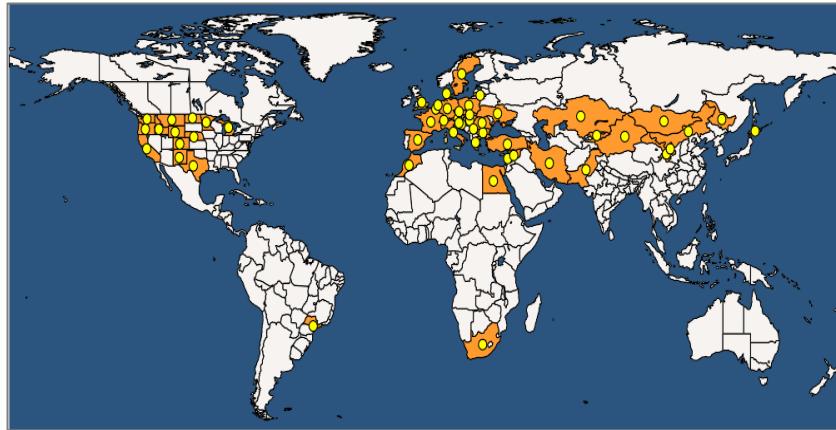
Bu protozoa, sporosori (dinlenme sporu) adı verilen kalın duvarlı kışlama spor yapıları şeklinde toprakta uzun süre kalabilmektedir. Enfekteli bitkilerin köklerinde oluşan bu yapılar köklerin çürümesi sonucu toprağa karışmaktadır. Ortamda konukçunun varlığı, sıcaklık, nem gibi uygun şartlar oluştuğunda; sporosori'ler çimlenerek primer zoosporları oluşturmakta ve toprak neminde hareket eden bu primer zoosporlar bitki köklerine ulaşarak enkist formuna dönüşmekte (kamçısını kaybetmekte) ve yaklaşık 2 saatlik bir zaman dilimi içerisinde zoosporların içeriği bitki dokusuna aktarılmaktadır. Şayet zoospor virüs içeriyorsa, bu esnada zoosporun içeriği ile birlikte taşıdığı virüste konukçu bitkiye giriş yapmaktadır. Ardından, zoosporların çekirdekleri bölünerek ilk olarak plasmodium yapısını oluşturmaktadır. Takiben, çevresel faktörlere veya konukçu tipine bağlı olarak; plasmodium'lardan ya sekonder zoosporların olduğu zoosporangium ya da sporosori'nin olduğu sporogenik plasmodium şekillenmektedir. Böylelikle, bir döngü yaklaşık 60 saat içerisinde tamamlanmaktadır (Rush, 2003) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. *Polymyxa betae*'nin yaşam döngüsü (Pferdmenges, 2007)

2.1.1. Beet necrotic yellow vein virüs (Şeker pancarı nekrotik sarı damar virüsü; BNYVV)

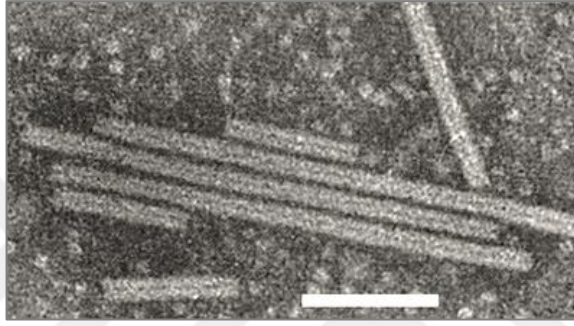
Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) ilk olarak 1950'lerde İtalya'da şeker pancarı üretim alanlarında rapor edilmiştir (Canova, 1959). Virüse pancar bitkilerinde yumruda gözlenen en karakteristik simptomsu olan aşırı kılcık kök oluşumundan dolayı 'kök deliliği' anlamına gelen İtalyanca bir terim olan "rhizomania" adı verilmiştir (Canova, 1966). Günümüzde; Asya, Avrupa ve Amerika kıtalarında şeker pancarı yetiştirilen alanların büyük bir kısmına yayılmıştır (Putz et al., 1990; Suarez et al., 1999) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. BNYVV'nin coğrafik yayılımı (EPPO; Son erişim 23.05.2023)

Ülkemizde ise BNYVV ilk olarak 1987 yılında Dr. Koch tarafından Erbaa ve Taşova bölgeleri ile Uzunköprü ve Keşan bölgelerinde tespit edilmiştir (Özgür, 1995).

BNYVV; *Benyviridae* familyasının, *Benyvirus* cinsinin tipik bir üyesi olup genomu dört (RNA-1, RNA-2, RNA-3, RNA-4) veya beş (RNA-5) adet düz çubuk şeklinde (Şekil 2.4), pozitif duyarlı, ss (tek sarmal) RNA komponentinden oluşmaktadır (Gilmer and Ratti, 2017). Virüs partiküllerinin eni 20 nm olup, uzunlukları ise sırasıyla 390 nm, 270 nm, 105 nm, 90 nm ve 80 nm'dir (Tamada et al., 1989).



Şekil 2.4. BNYVV'nin düz çubuk şeklindeki partiküllerinin elektron mikroskop altında görünümü (Bar 100 nm'yi ifade etmektedir) (Tamada, 2002)

RNA-1 replikasyonda rol oynayan, 237 kDa'luk bir polipeptidi kodlayan tek bir ORF (Open reading frame: açık okuma çerçevesi) içermektedir (Van Regenmortel et al., 2000). RNA-2, altı adet ORF'ye sahip olup, ilk iki ORF kılıf protein readthrough (CP-RT) bölgesini oluşturmakta olup bu bölge virüs partikül oluşumu ve vektör ile taşınmada rol oynamaktadır. Sonrasında yer alan triple (üçlü) gen bloğu bölgesi ise BNYVV partiküllerinin hücreden hücreye taşınmasında görev almaktadır (Tamada, 2002). Bu segmentin 3' ucunda bulunan son ORF'den ise, sistein açısından zengin, RNA susturulmasında viral baskılayıcı olarak rol oynayan P14 proteini sentezlenmektedir (Dunoyer et al., 2002; Andika et al., 2012) (Şekil 2.5).

RNA-3 üzerinde yer alan P25 proteini; symptom oluşumu ve BNYVV'nin patojenitesinde etkin rol oynamakta ve özellikle 67-70. pozisyonlardaki amino asitlerde (aa) büyük bir varyasyon oluşması sebebi ile, bu bölgedeki aa'ler 'hipervariable tetrat' (aşırı değişken tetrat) olarak adlandırılmaktadır (Koenig et al.,

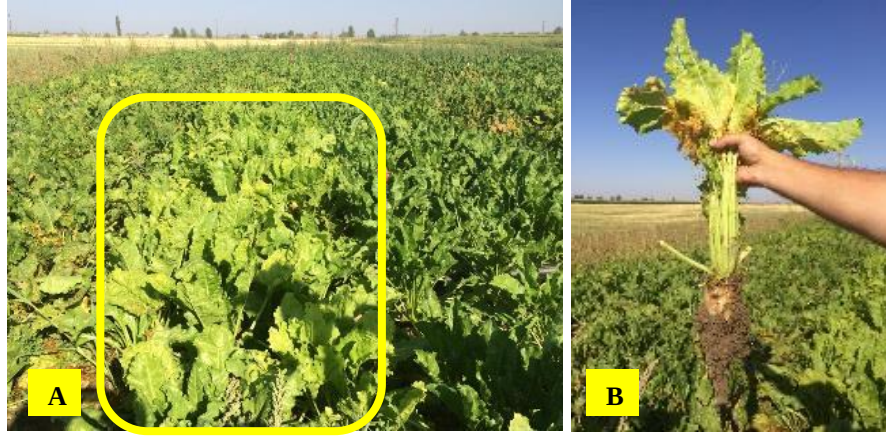
Yılmaz vd., 2016; 2018), İtalya ve Hollanda (Liebe and Varrelmann, 2022)'da saptanmıştır.

BNYVV sınırlı bir konukçu çevresine sahiptir (Tamada and Baba, 1973; Barr and Asher, 1992; Hugo et al., 1996). Bu virüs doğada, şeker pancarı, kırmızı pancar, ıspanak, pazı, hayvan pancarı ve *R. raphanistrum*'da (Tamada, 2016; Roberts et al., 2015; Kutluk Yılmaz vd., 2016) enfeksiyon oluşturmaktadır. Ana konukçusu olan şeker pancarındaki en karakteristik belirtisi yumruda görülmektedir. Nitekim; BNYVV'ye hassas şeker pancarı genotipleri ile BNYVV-dayanıklılığının kırıldığı dayanıklı genotiplerde yan kökler aşırı derecede çoğalmakta ve bir sakal görünümü almaktadır (Şekil 2.6-A). Ayrıca, bu yumruların enine kesitinde ise iletim demeti halkalarının kahverengi renk alması dikkat çekmektedir (Şekil 2.6-B).



Şekil 2.6. Rhizomania ile bulaşık şeker pancarı köklerindeki sakallanma belirtileri (A) ve BNYVV ile enfekteli yumrunun enine kesitinde kahverengi halkaların görünümü (B) (Kutluk Yılmaz vd., 2019)

Bulaşık tarlalarda ise yer yer renk açılımı gösteren bitki toplulukları görülmektedir (Şekil 2.7). Bu alanlarda, genellikle mevsim sonuna doğru BNYVV ile enfekteli bitkilerin yaprakları donuk sarı bir renk almakta, yaprak sapları uzamakta ve yapraklar daha dik bir gelişim göstermektedir (Şekil 2.7). Nadiren, yapraklarda özellikle damarlar boyunca yayılan parlak sarı alanlar da (virüse adını veren nekrotik sarı damar belirtisi) oluşabilmektedir (Şekil 2.8) (Tamada, 2016).



Şekil 2.7. Rhizomania hastalığının dayanıklı çeşit (*Rz1*) yetiştiriciliği yapılan tarlada genel görünümü (Kutluk Yılmaz vd., 2019)



Şekil 2.8. BNYVV ile enfekteli şeker pancarı bitkisinin yapraklarında oluşan nekrotik sarı damar semptomunun görünümü (Gilmer, 2017)

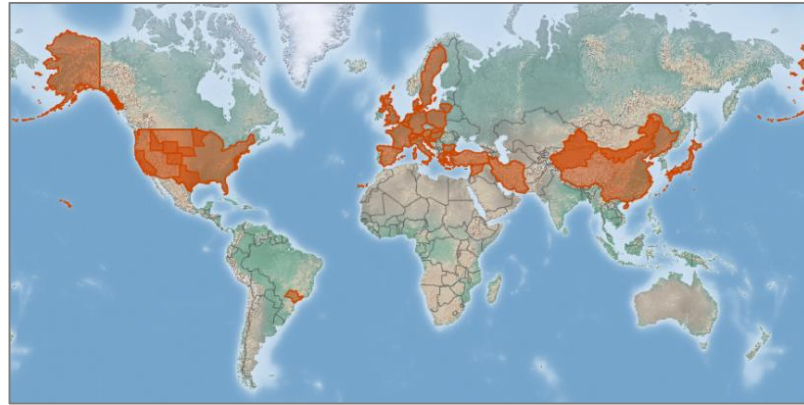
Hastalıklı bitkilerin şeker içeriğinde %10 ve kök oluşumunda ise %90 azalma olduğu bildirilmiştir (Lennefors, 2006). Kaya (2009) ise, ülkemiz koşullarında hastalığın kök veriminde %90, şeker üretiminde ise %70 oranında azalmaya neden olabildiğini ortaya koymuştur. Diğer taraftan; Rezaei et al. (2014) BNYVV ile bulaşık ve bulaşık olmayan alanlarda yürüttükleri denemeler sonucu; enfekteli bitkilerin yaprak alan endeksinde %24, kuru madde miktarında ise %57 oranında kayıba neden olduğunu saptamıştır (Rezaei et al., 2014). Ayrıca, virüs ile enfekteli pancarlarda melas oluşturunca sodyum ve potasyum oranının artması nedeniyle, fabrikada işleme safiyetinin bozulduğu da bildirilmiştir (Kajiyama et al., 1990). Bazı araştırmacılar, hastalıktan dolayı alpha-amino N ve K gibi bazı melas bileşiklerinin azaldığını ve N'un belirgin şekilde arttığını belirtmişlerdir (De Biaggi et al., 1986; Rosso et al., 1988; Skribic, 1995). Ek olarak, BNYVV ile enfekteli bitkilerin düşük sıcaklıklara karşı direncinin azaldığı bildirilmiştir (Strausbaugh and

Eujayl, 2018). Üstelik, depo koşullarında enfekteli yumrulara süktroz kayıplarının da arttığı ortaya konulmuştur (Strausbaugh, 2018).

BNYVV'nin vektör *P. betae*'nin kışlama spor yapılarında en az 15 yıl toprakta canlı kalması sebebiyle (Abe and Tamada, 1986), rhizomania hastalığının en etkili ve en ekonomik kontrolü dayanıklı çeşitlerin yetiştiriciliğinin yapılması yolu ile olmaktadır. Günümüzde ticari olarak yetiştirilen BNYVV'ye dayanıklı şeker pancarı çeşitlerinin büyük bir kısmı *Rz1* ve *Rz2* dayanıklılık genlerini içermekte olup tüm dünyada bulaşık alanlarda yoğun olarak bu genleri içeren çeşitlerin yetiştiriciliği yapılmaktadır. Yabani pancarlarda farklı dayanıklılık genleri de (*Rz3-Rz5*) belirlenmiş olmasına rağmen (Grimmer et al., 2008), henüz bu genlerin ticari çeşitlere aktarımı gerçekleştirilmemiştir (Wetzel et al., 2021).

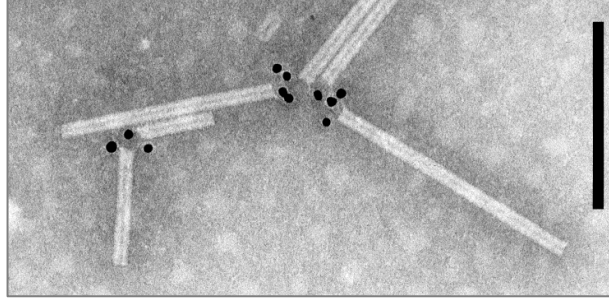
2.1.2. Beet soil-borne virus (Şeker pancarı toprak kökenli virüsü; BSBV)

Beet soil-borne virus (BSBV), dünya çapında şeker pancarı üretim alanlarında yaygın olarak görülen bir virüstür (Torrance, 2008) (Şekil 2.9). İlk olarak, Ivanovic ve McFarlane (1982) tarafından İngiltere'nin şeker pancarı üretim alanlarına ait kök örneklerinden izole edilmiştir. Ardından, BSBV'nin Ahlum ve Wierthe olmak üzere iki serotipinin olduğu belirlenmiştir (Lesemann et al., 1989). Daha sonra, Wierthe serotipi ayrı bir virüs olarak kabul edilmiş ve Beet virus Q (BVQ; Şeker pancarı Q virüsü) olarak adlandırılmıştır (Koenig et al., 1998).



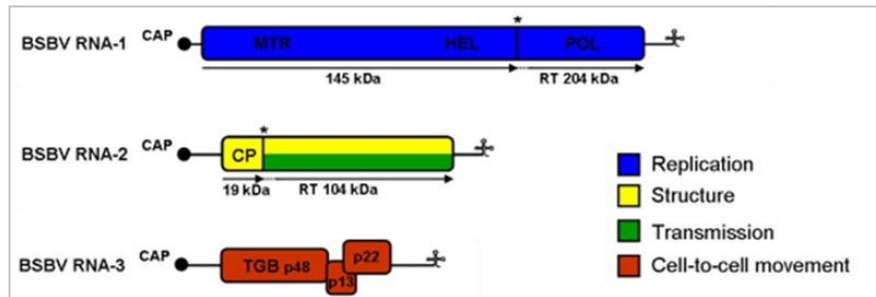
Şekil 2.9. BSBV'nin coğrafik yayılımı (<https://www.cabi.org/isc/datasheet/10213#toDistributionMaps>
Son erişim tarihi: 20.06.2022)

Beet soil-borne virus'un genomu; pozitif duyarlı, tek sarmal RNA içeren, üç adet düz çubuk şeklinde partiküllerden oluşmaktadır (Barbarossa et al., 1992) (Şekil 2. 10). Virüs partikülleri 19 nm genişliğinde; 65 nm, 150 nm ve 300 nm uzunluğundadır (Ivanoviç et al., 1983).



Şekil 2.10. *Pomovirus*'lerin düz çubuk şeklindeki partiküllerinin elektron mikroskop altında görünümü (Bar 100 nm'yi ifade etmektedir) (I.M. Roberts)

Bu viral etmen taksonomik olarak *Virgaviridae* familyası, *Pomovirus* cinsi içerisinde sınıflandırılmaktadır (Adams et al., 2009). RNA-1'den replikasyonda görev alan iki proteinin (P145 ve P204) sentezi gerçekleşmektedir. RNA-2, 19 kDa'luk CP ve *P. betae* ile taşınmada etkin CP-readthrough (RT) bölgesi kodlanmaktadır (Torrance, 2009). RNA-3'den ise TGB proteinleri (P48, P13 ve P22) sentezlenmekte ve bu proteinler virüs partiküllerinin hücreden hücreye taşınmasında rol oynamaktadır (Koenig et al., 1998) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Beet soil-borne virus'un genom organizasyonu (Crutzen, 2010)

BSBV; doğal koşullarda şeker pancarı, kırmızı pancar, pazı, ıspanak ve *Chenopodium* türlerinde enfeksiyon oluşturmaktadır (Rysanek et al., 2006). Bu virüs ana konukçusu olan şeker pancarında kökler ile sınırlı olmakla birlikte; bu bitkinin kök ve yapraklarında herhangi bir belirti oluşturmamaktadır (Rush and Heidel, 1995). BSBV şeker pancarında tek olarak enfeksiyona neden olabilmekte ve ayrıca aynı vektör tarafından taşınan BNYVV ve/ya da BVQ ile ortak enfeksiyon da

oluşturabilmektedir (Meunier et al., 2003). Diğer taraftan, BSBV'nin çok sayıda mutantının bulunmasından dolayı, aynı toprak örneğinde yetişen bitkilerde bile patojenisinde farklılık olabileceği ve bu sebeple BSBV'nin pancarda %0 ile %70 arasında verim kaybı oluşturabileceği ifade edilmektedir (Prillwitz and Schlösser, 1992; Koenig et al., 2000). Ayrıca, yürütülen saksı denemeleri sonucunda; BSBV'nin genç bitkilerin taze ağırlığını azalttığı ve BNYVV'nin neden olduğu ürün kayıplarını arttırdığı bildirilmiştir (Kaufmann et al., 1993).

2.2. *Chytrid* Vektörler ve Taşıdıkları Virüsler

Bitki virüslerinin vektörü olarak kabul edilen beş zoosporik organizma türü bulunmaktadır. Yakın zamana kadar, gerçek funguslar olarak bilinen ve *Chytridiomycetes* sınıfının *Olpidiaceae* familyası içinde yer alan ve virüs vektörü olan tür sayısı iki ile sınırlı idi. Bu türler ise, *Olpidium bornovanus* (= *O. radiale*) ve *O. brassicae* olarak bilinmekteydi (Campbell, 1985; Campbell, 1996; Rochon et al., 2004).

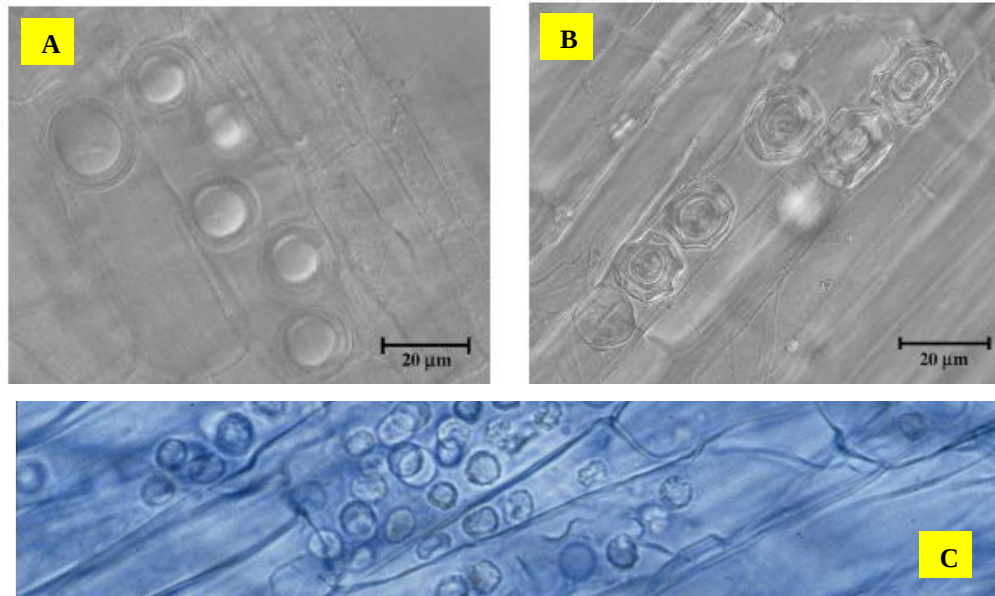
Daha önce, *O. brassicae*'nin crucifer (turpgiller) streyninin eşeyli üremesi rapor edilmiş olmasına rağmen; non-crucifer streynin eşeyli üremediği bildirilmiştir (Koganezawa et al., 2004). Non-crucifer streynin tek-sporangium izolatından elde edilen zoosporlar çiftleşme olmaksızın dinlenme sporları geliştirmiştir. Crucifer streynin tek-sporangium izolatına ait zoosporlar ise dinlenme sporu geliştirmemiş ancak farklı çiftleşme tiplerine sahip (eşeyli) zoosporlar arasında çiftleşmeden sonra dinlenme sporları oluşmuştur. *O. brassicae*'nin crucifer ve non-crucifer streynleri arasındaki bu karakteristik fark ilk olarak Şahtiyancı (1962) tarafından gösterilmiştir.

Olpidium brassicae'nin non-crucifer ve crucifer streynleri arasında konukçuya özelleşme, morfoloji ve virüs taşınımı açısından önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Marul ve domates gibi crucifer olmayan bitkilerin köklerinde kolayca çoğalan non-crucifer streyn, oldukça yaygındır; ancak lahana ve hardal gibi turpgil bitkilerin köklerinde kolayca çoğalan crucifer streyn ise, daha fazla konukçuya özelleşmiştir (Şahtiyancı, 1962; Temmink et al., 1970; Koganezawa et al., 2005). Morfolojik olarak, non-crucifer streynin zoosporangia ve çıkış tüpleri, crucifer streyn'kinden biraz farklılık göstermektedir. Bununla birlikte, bu morfolojik farklılık, ayırım yapmak için yeterli olmamaktadır (Şahtiyancı, 1962; Koganezawa et al., 2004). Marul streyninin Tobacco necrosis virus (TNV)'ün vektörü olduğu, ancak

turpgillerden olan hardal streyninin ise TNV’i bulaştıramadığı belirtilmiştir (Temminck et al., 1970). Crucifer olan ve crucifer olmayan streynler için tanımlanan karakteristik farklılıklara dayanarak, Sahtiyancı (1962) *Olpidium brassicae*’yı; *Olpidium brassicae* ve *Olpidium virulentus* olmak üzere iki ayrı türe ayırmış, ancak önerisi uzun süre ihmal edilmiştir. Bununla birlikte, daha sonra Şahtiyancı’nın bu gözlemleri doğrulanmış ve *Olpidium virulentus* (Sahtiyancı) ayrı bir tür olarak önerilmiştir (Koganezawa et al., 2004).

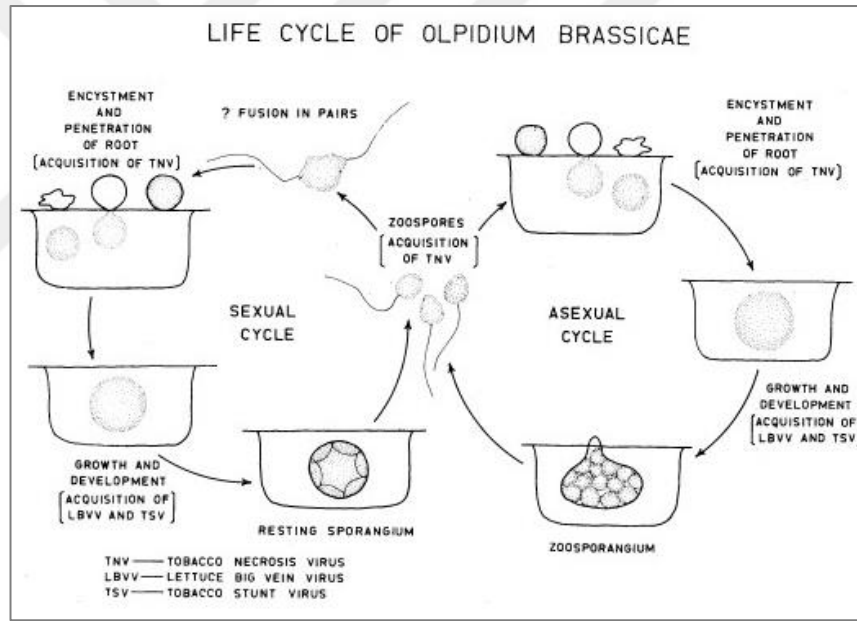
Farklı *Olpidium* türlerinin tanımlanması için fungal ribozomal DNA’nın ITS (internal transcribed spacer) bölgesinin yeterli olduğu gösterilmiştir (Dunne et al., 2002; Hartwright et al., 2010). Daha sonra, *Olpidium* spp., konukçuya özelleşme, virüs taşınma şekli ve fungal ribozomal DNA’nın ITS bölgesinin moleküler analizi dikkate alınarak taksonomik olarak üç türe (*O. brassicae*, *O. bornovanus* ve *O. virulentus*) ayrılmıştır (Maccorone et al., 2010).

Lange ve Insunza (1977), *Olpidium* türlerini konukçuya özelleşme ve morfolojilerine göre ayırt etmiştir. *O. bornovanus* düz dairesel dinlenme sporlarına (Şekil 2.12-A) ve elipsoidal zoosporlara sahipken, *O. brassicae* yıldız şeklinde dinlenme sporlarına (Şekil 2.12-A) ve küresel zoosporlara sahiptir. Morfolojik olarak, *O. brassicae* ve *O. virulentus* (Şekil 2.12.C) biraz farklılık göstermektedir. Nitekim; *O. brassicae*’nin zoosporangium’u *O. virulentus*’unkinden daha büyüktür (Şahtiyancı, 1962).



Şekil 2.12. Işık mikroskobu altında *Olpidium bornovanus* (A), *O. brassicae* (B) (Herrera-Vasquez et al., 2009) ve *O. virulentus*’un dinlenme spor yapılarının görünümü (C)

Olpidium spp.'nin yaşam döngüsüne ilişkin mevcut bilgilerin çoğu, Temmink (1971) tarafından yapılan çalışmalara dayanmaktadır. Toprak suyunda serbest olarak hareket eden zoosporlar, konukçu bitki ile karşılaştıklarında, bitkinin hücre duvarına yaklaşarak burada kamçısını absorbe ederek, enkist formuna dönüşmektedir. Ardından, kist içinde mitozla çekirdek bölünmesi gerçekleşir ve çim tüpü aracılığıyla bitki köküne içeri aktarılmaktadır. Takiben meydana gelen çok çekirdekli form komşu hücrelere yayılarak zoosporangiumları (zoospor keselerini) oluşturmaktadır. Sonrasında bu keseler patlayarak zoosporlar etrafa yayılmaktadır. Bunların bir kısmı bitkiyi tekrar enfekte etmekte, diğer kısmı ise eşeyli üreme yapıp çoğalmaktadır. Bunun sonucunda ise, dayanıklı dinlenme sporları oluşmaktadır (Şekil 2.12). Olumsuz koşulları bu şekilde geçirmektedirler (Rochon et al., 2004).



Şekil 2.13.Chytrid vektörlerin yaşam döngüsü (Rochon et al., 2004)

Chytrid vektörler (*O. virulentus*, *O. bornovanus* ve *O. brassicae*) obligat kök parazitleri olup genellikle gelişimleri için nispeten düşük sıcaklıklara ihtiyaç duymaktadır (Navarro et al., 2004, 2005; Varanda et al., 2015). Enfekteli bitki köklerinde dinlenme sporu veya zoosporangia olarak bulunurlar. Ayrıca dormant olarak bulaşık topraklarda 20 yıla kadar bitkileri enfekte etme yeteneklerini koruyabilmektedirler (Campbell, 1985).

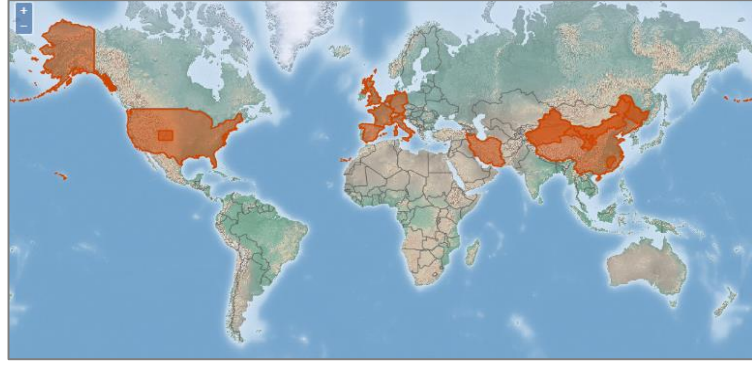
Şimdiye kadar 30 kadar bitki virüsünün *Olpidium* türleri tarafından taşındığı saptanmıştır. Bu virüslerden bazıları, vektör türleri, kazanım şekilleri ve bu virüslerin partikül yapıları Tablo 2.1’de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. *Olpidium* spp. tarafından taşınan virüsler (Güncel literatürler gözönüne alınarak Rochon et al. (2004)’dan modifiye edilmiştir)

Virüs	Kısaltma	Cins	Vektör	Kazanım şekli	Partikül yapısı
Familiya: Tombusviridae					
Alt Familiya 1: Provedovirinae					
Cucumber necrosis virus	CNV	<i>Tombusvirus</i>	<i>O. bornovanus</i>	İn vitro	izometrik
Cucumber leaf spot virus	CLSV	<i>Aureusvirus</i>	<i>O. bornovanus</i>	İn vitro	izometrik
Melon necrotic spot virus	MNSV	<i>Gammacarmovirus</i>	<i>O. bornovanus</i>	İn vitro	izometrik
Cucuber soilbore virus	CSBV	<i>Zeavirus</i>	<i>O. bornovanus</i>	İn vitro	izometrik
Chenopodium necrosis virus	ChNV	<i>Zeavirus</i>	<i>O. brassicae</i>	İn vitro	izometrik
Olive mild mosaic virus	OMMV	<i>Alphoncrovirus</i>	<i>O. virulentus</i>	İn vitro	izometrik
Tobacco necrosis virus A	TNV-A	<i>Alphoncrovirus</i>	<i>O. brassicae</i>	İn vitro	izometrik
Tobacco necrosis virus D	TNV-D	<i>Betanecrovirus</i>	<i>O. brassicae</i>	İn vitro	izometrik
Beet black scorch virus	BBSV	<i>Betanecrovirus</i>	<i>O. brassicae</i>	İn vitro	izometrik
Alt Familiya 2: Regnessovirinae					
Red clover necrotic mosaic virus	RCNMV	<i>Dianthovirus</i>	<i>O. bornovanus</i>	İn vitro	izometrik
Familiya: Secoviridae					
Squash necrosis virus	SqNV	<i>Carmovirus</i>	<i>O. bornovanus</i>	İn vitro	izometrik
Familiya: Alphaflexiviridae					
Pepino mosaic virus	PepMV	<i>Potexvirus</i>	<i>O. virulentus</i>	İn vitro	çubuk
Familiya: Aspiviridae					
Miafiori lettuce big-vein virus	MiLBVV	<i>Ophiovirus</i>	<i>O. virulentus</i>	İn vivo	iplik
Bluberry mosaic associated v.	BIMaV	<i>Ophiovirus</i>	<i>O. virulentus</i>	İn vivo	iplik
Lettuce ring necrosis virus	LRNV	<i>Ophiovirus</i>	<i>O. brassicae</i>	İn vivo	iplik
Tulip mild mottle mosaic virus	TMMV	<i>Ophiovirus</i>	<i>O. brassicae</i>	İn vivo	iplik
Familiya: Rabdoviridae					
Lettuce big-vein associated v.	LBVaV	<i>Varicosavirus</i>	<i>O. virulentus</i>	İn vivo	çubuk
Tobacco stunt virus	TStV	<i>Varicosavirus</i>	<i>O. brassicae</i>	İn vivo	çubuk

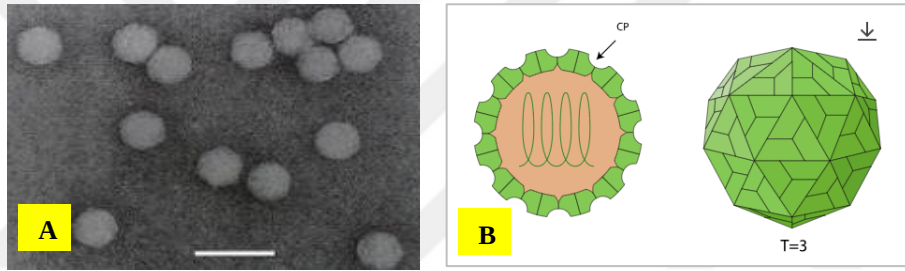
2.2.1. Beet black scorch virus (Şeker pancarı siyah yanıklık virüsü; BBSV)

Beet black scorch virus (BBSV) ilk olarak 1980’lerin sonlarında Çin’in İç Moğolistan bölgesinde tanımlanmıştır (Liu and Xian, 1995; Zhang, 1996; Li et al., 2008). Ardından, ABD (Weiland et al., 2007), İran (Koenig and Valizadeh, 2008) ve Avrupa’da çeşitli ülkelerde kayıt edilmiştir (Gonzalez-Vazquez et al., 2009) (Şekil 2.14.).



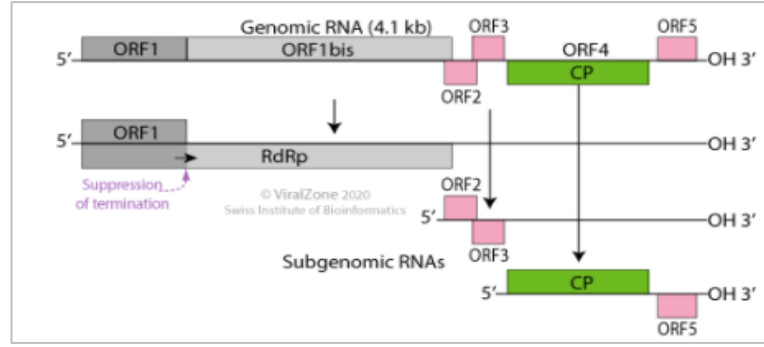
Şekil 2.14. Beet black scorch virus'ün coğrafik yayılımı

Beet black scorch virus 28 nm çapında ikosahedral şekilli partiküllere sahip (Fauquet et al., 2005) (Şekil 2.15) olup son yıllarda *Tombusviridae* familyasına ait *Betanecrovirus* cinsinin yeni bir türü olarak tanımlanmıştır (Cao et al., 2002; Yuan et al., 2006; King et al., 2011).



Şekil 2.15. *Betanecrovirus*'lerin ikosahedral şekilli partiküllerinin elektron mikroskop altında görünümü (A) ile virionun şematize görünümü (B) (Bar 50 nm'yi ifade etmektedir) (<https://viralzone.expasy.org/4861>; Son erişim tarihi: 29.11.2023)

BBSV, pozitif duyarlı, tek sarmal RNA genomuna sahiptir (Cao et al., 2002). ORF 1'den replikasyonda görev alan RdRp, ORF 2 ve ORF3'den hücreden hücreye hareket için gerekli proteinler, ORF 4'den ise CP bölgesi sentezlenmektedir. Hücreden hücreye hareket proteinleri ve CP, sırasıyla sgRNA1 ve sgRNA2 olarak adlandırılan iki farklı subgenomik RNA'dan (sgRNA) çevrilmektedir (Yuan et al., 2006) (Şekil 2.16). CP; virionların toplanması, bitkide virüsün sistemik yayılımı ve konukçu bitkilerde simptom oluşumunda rol oynamaktadır.



Şekil 2.16. Beet black scorch virus'un genom organizasyonu (<https://viralzone.expasy.org/4861>; Son erişim tarihi: 29.11.2023)

Çin'in Ningxia ve Xinjiang eyaletlerinde sırasıyla BBSV-N ve BBSV-X olarak adlandırılan iki BBSV izolatu rapor edilmiş olup bu izolatların nükleotit dizilimi bakımından %99.45 benzer oldukları tespit edilmiştir (Cao et al., 2002; Xi et al., 2006). Buna ek olarak, ABD'nin Colorado eyaletinde ise BBSV-N ile %93 oranında benzerlik gösteren BBSV-Co izolatu belirlenmiştir (Weiland et al., 2006, 2007).

Beet black scorch virus'un *Nicotiana benthamiana*'da seri çoğaltımı sırasında, wild tip (yabani tip) BBSV'den daha yüksek enfeksiyon yeteneğine sahip, 3' UTR'de 3477. pozisyonda yer alan tek bir nükleotitte farklılık olan bir BBSV mutanlığı [BBSV-m294; (BM) olarak adlandırıldı] saptanmıştır (Xu et al., 2012). Viral genom RNA'sına ek olarak, 615 nt'lik, linear, tek sarmal bir RNA daha belirlenmiş ve BBSV-X izolatının sat-RNA'sı olarak tanımlanmıştır (Guo et al., 2005).

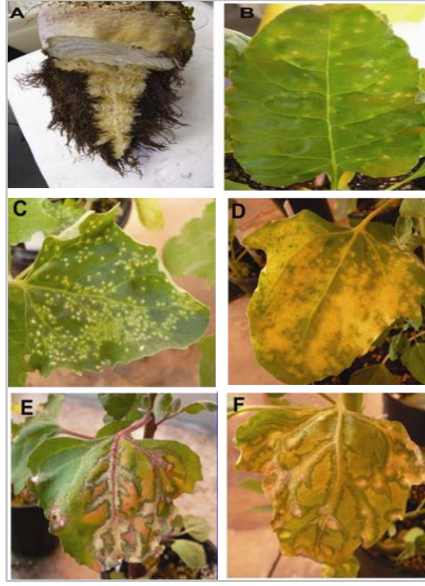
Bitki virüslerinin uydu RNA'ları (sat-RNA'ları), replikasyon ve enkapsidasyon için yardımcı virüse ihtiyaç duymakta, ancak yardımcı virüs (helper virüs) genomu ile çok az dizi benzerliği göstermekte ya da hiç benzerlik göstermemektedir (Murant and Mayo, 1982; Hu et al., 2009). Genom büyüklüğüne göre sat-RNA'lar iki sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar; yapısal olmayan bir proteini kodlayan büyük sat-RNA'lar ve kodlama kapasitesi olmayan küçük sat-RNA'lar şeklindedir (Simon et al., 2004). Sat-RNA'lar genellikle yardımcı virüslerin replikasyonunu inhibe etmekte; ve konukçu faktörleri, yardımcı virüsler ve sat-RNA'lar arasındaki etkileşime bağlı olarak yardımcı virüslerin hastalık simptomlarını değiştirebilmektedirler (Collmer and Howell, 1992; Hull, 2002). Yardımcı virüslerin birikimini etkilemeden hastalık simptomlarını azaltan sat-RNA'lar olmasına rağmen, çoğu sat-RNA, muhtemelen ortak replikasyon faktörleri için yardımcı virüsle rekabet ederek hem hastalık simptomlarını, hem de yardımcı virüsün titresini azaltmaktadır (Roossinck et al.,

1992; Hull, 2002). Ayrıca, sat-RNA'ların ko-enfeksiyonlar sırasında hastalık belirtilerini artırdığı istisnalar da bulunmaktadır. Örneğin, Cucumber mosaic virus (CMV) sat-RNA'larının birkaçı, sat-RNA'lar tarafından taşınan belirli diziler nedeniyle tütün ve domates bitkilerinde hastalık belirtilerini şiddetlendirmektedir (Roossinck et al., 1992; Simon et al., 2004).

Tombusviridae familyası üyelerinden Turnip crinkle virus (TCV), Cymbidium ringspot virus (CyRSV), Tomato bushy stunt virus (TBSV) ve Cucumber necrosis virus (CuNV)'de yardımcı virüs ile ilişkili sat-RNA'lar içermektedir. Nitekim; BBSV sat-RNA genomu, boyut olarak CyRSV (~0.7 kb) ve TBSV (~0.7 kb)'ün uydu RNA'larına benzemektedir (Guo et al., 2005). Yu vd. (2016) yürüttükleri araştırma sonucu; BBSV sat-RNA'sının ve düşük sıcaklığın (18°C) *Nicotiana benthamiana*'da BBSV'nin sistemik enfeksiyonunu artırdığını ortaya koymuşlardır.

Beet black scorch virus'ün Çin izolatları şeker pancarı bitkisinin yapraklarında siyah yanıklık, bitkide cüceleşme ve köklerinde ise nekroza sebep olmaktadır (Cao et al., 2002). Bununla birlikte; Amerika, Avrupa ve İran'a ait izolatlar ise yapraklarda siyah yanıklık oluşturmamakla, çeşitli araştırmacılar tarafından bu virüsün şiddetli rhizomania-benzeri semptom sergileyen (kök sakallanması) bitkilerde tespit edildiği bildirilmektedir (Şekil 2.17-A) (Weiland et al., 2006, 2007; Koenig and Valizadeh, 2008; Gonzalez-Vazquez et al., 2009). Diğer taraftan, Weiland et al. (2007) ise, herhangi bir virüs-benzeri semptom sergilemeyen şeker pancarlarında da BBSV'i tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

BBSV, doğada *chytrid* vektör *O. brassicae*'nin zoosporları tarafından non-persistent bir şekilde taşınmaktadır (Jiang et al., 1999). Buna ek olarak, virüs bir dizi otsu konukçuya mekanik olarak da taşınabilmektedir. BBSV; şeker pancarı (Şekil 2.17-B), *Chenopodium* spp. (Şekil 2.17-C ve -D), *Tetragonia expansa* (Yeni Zelanda ıspanağı) ve *Spinacia oleracea*'da genellikle klorotik ya da nekrotik lokal lezyonlara neden olmaktadır (Cai et al., 1993; Weiland et al., 2007). Nadiren de *C. quinoa*'nın yapraklarında damarların koyu yeşil bantla sınırlandığı sistemik belirtiler oluşturabilmektedir (Şekil 2.17-E ve -F) (Weiland et al., 2007). Öte yandan, *Nicotiana* spp., *Solanum lycopersicum*, *Physalis floridana* ve *Lactuca sativa* ise virüsün asimptomatik konakçıları olarak bilinmektedir (Cai et al., 1993).



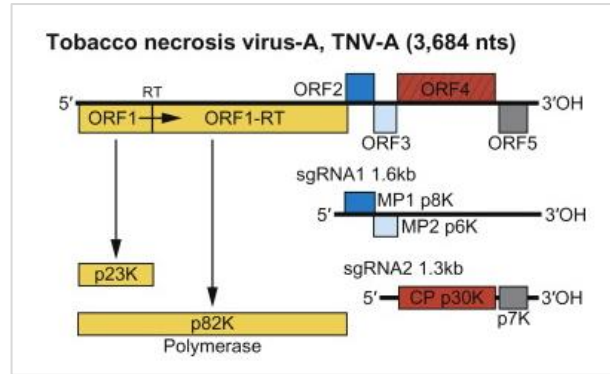
Şekil 2.17. Şiddetli BNYVV belirtisi (kök sakallanması ve iletim demetlerinin lifsileşmesi) gösteren BBSV ile de bulaşık şeker pancarı bitkilerinin görünümü (A) ile şeker pancarı bitkilerinin yapraklarında oluşan klorotik lezyonlar (B) ve BBSV'nin *C. Quinoa*'ya mekanik inokülasyonu sonucu bu bitkinin yapraklarında oluşan klorotik/nekrotik lokal lezyonlar (C ve D) ile bazen bu bitkinin yapraklarında oluşan damarların koyu yeşil bantla sınırlandırıldığı sistemik belirtilerin (E ve F) görünüşleri (Weiland et al., 2007).

2.2.2. Tobacco necrosis virus (Tütün nekroz virüsü; TNV)

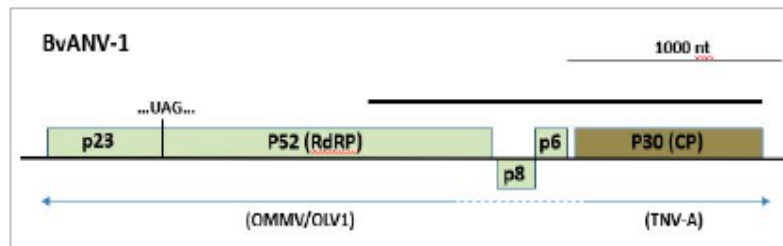
Tobacco necrosis virus (TNV) ilk olarak 1930'larda tanımlanmıştır (Smith and Bald, 1935). 1935'teki ilk raporundan bu yana, 20'den fazla TNV izolatı ve birkaç ilgili uydu virüsü (STNV) karakterize edilmiştir. Simptomoloji, konukçu çevresi, immünolojik çapraz reaksiyon düzeyi ve TNV izolatının spesifik uydu virüslerin replikasyonunu destekleme yeteneğine bağlı olarak, TNV izolatları iki serotipe (TNV-A ve TNV-D) ayrılmıştır (Kurstak, 1981). Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi'nin (ICTV) yedinci raporunda, iki farklı TNV serotipi, kısmen iki serotip arasındaki düşük sekans benzerliğinden dolayı farklı türler olarak tanımlanmış ve Tobacco necrosis virus-A (TNV-A) ve Tobacco necrosis virus-D (TNV-D) olarak yeniden adlandırılmıştır. TNV-A, "Tütün nekroz virüsü"nün yerini almak üzere *Necrovirus* cinsinin tip türü olarak aday gösterilmiştir (Lommel et al., 2000). Günümüzde ise, *Tombusviridae* familyasında yer almakla birlikte; TNV-A *Alphoncavirus*; TNV-D ise *Betanecrovirus* cinsinin bir üyesi olarak kabul edilmektedir.

Tütün nekroz virüsü (TNV), yaklaşık 3.8 kb uzunluğunda, pozitif anlamlı (+) tek sarmal RNA genomuna sahip (Fang and Coutts, 2013; Newburn et al., 2014) olup virionları ikosahedral şekildedir (Russo et al., 1994) (Şekil 2.15).

TNV-A ve TNV-D grupları arasındaki baz dizisi benzerliği %40-60 kadardır. TNV-D ve diğer Necrovirüs'ler arasında, rekombinasyonun var olduğunu gösteren gen değişimleri tespit edilmiştir. Bu nedenle, serolojik özellikler ve kısmi nükleotit sekansı muhtemelen bir Necrovirus'ü tanımlamak için yeterli olmamaktadır (Cardoso et al., 2005). Nitekim, Weiland vd. (2020), ABD'de rhizomania semptomu sergileyen farklı pancar üretim alanlarından beş toprak örneğinde şeker pancarlarını yetiştirmiş ve daha sonra RNAseq yöntemine göre analiz etmişlerdir. Bu çalışmada, her bir örnek için, 60.000.000 okuma gerçekleştirilmiş ve incelenen okumaların %98'den fazlasının BNYVV, BSBMV ve BBSV ile uyum gösterdiğini bildirmişlerdir. Ek olarak, bu çalışmada yapılan detaylı analizler ile, TNV-A (Şekil 2.18)'nin bir varyantını da belirlemişlerdir. Muhtemel virüs dizisinin, P8 ve P6 genlerinin Olive mild mosaic virus (OMMV) ya da Olive latent virus-1 (OLV-1)'e; CP ve 3'UTR bölgelerinin ise TNV-A'ya benzer olduğunu, toplam 3682 nt uzunluğunda hibrit bir virüs olabileceği bildirilmiş ve (BvANV-1) olarak isimlendirilmiştir (Cins: *Alphanecrovirus*; Familya: *Tombusviridae*) (Şekil 2.19).



Şekil 2.18. Tobacco necrosis virus-A'nın genom organizasyonu (King et al., 2011)



Şekil 2.19. Hibrit virüs BvANV-1'in genom organizasyonu (Weiland et al., 2020)

Ayrıca, Weiland vd. (2020) yürüttükleri bu çalışma ile daha önce bildirilmemiş iki satellit virüs belirlemiştir. Bunlardan biri, Maize white line mosaic virus (MWLMV) ile zayıf benzerliğe sahip bulunurken, diğerinin ise Tobacco necrosis virus-C ile orta derecede benzerliğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu satellitlerin helper virüsünün ise; TNV-D ya da *Betanecrovirus* ile ilgili bir virüs olabileceği belirtilmiştir. Şu ana kadar; BBSV ile ilişkili sat-RNA'lar bilinmesine rağmen, replikasyonu için BBSV'e bağımlı hiçbir sat-virüs saptanmamıştır.

Tobacco necrosis virüs; monokotiledon, dikotiledon, otsu ve odunsu bitkileri içeren; 37 familyaya ait 80 bitki türünde enfeksiyon oluşturmakta, ancak nadiren bu bitkilerde sistemik enfeksiyona neden olmaktadır. Soya fasulyesi, domates, biber, tütün ve kavun gibi ekonomik öneme sahip birçok bitki konukçuları arasında yer almaktadır (Jiang et al., 2008). İlave olarak, TNV'nin zeytinde de enfeksiyon oluşturduğu bildirilmiştir (Felix and Clara, 2002). Liu vd. (1999) ise, ABD'de California'da şeker pancarında TNV enfeksiyonunu rapor etmiştir.

Bu etmen bir kök patojeni olup çoğunlukla nemli ve yoğun sulanan alanlarda görülmektedir. Virüs toprakta kalmakta ve chytrid vektör *O. brassicae* (Jiang et al., 2008) ve *O. virulentus*'un zoosporları tarafından non-persistent şekilde taşınmaktadır (Varanda et al., 2015). TNV vektörün sporlarının yüzeyine tutunmaktadır. Virüs taşıyan bu zoosporlar muhtemelen birkaç saat hayatta kalmaktadır. Ancak toprakta serbest halde bulunan virüs, yeni salınan zoosporlar tarafından alınabilir ve bitkiye bulaştırılabilmektedir. Toprak nemliyse, *Olpidium* spp.'nin zoosporları en az 11 hafta boyunca TNV'yi topraktan geri kazanabilmektedir (Hull, 2002). Ancak, *Olpidium* tarafından taşınan virüsler hava kurusu toprakta yaşamamaktadırlar. Genel olarak, bu tipteki virüsler geniş konukçu aralıklarına sahip olup muhtemelen ardışık konukçuya bulaşması yoluyla toprakta hayatta kalmaktadırlar. Drenaj suyu, toprak ve kök parçalarının hareketi bu virüslerin bir bölgeden diğerine yayılmasında önem taşımaktadır (Hull, 2002).

Ayrıca, TNV mekanik inokülasyon yöntemi ile de yedi familyaya ait 29 bitki türüne kolaylıkla taşınabilmektedir (Lommel et al., 2005; Jiang et al., 2008). TNV, *N. benthamiana* ve *C. amaranticolor* bitkilerinin yapraklarında nekrotik lokal lezyon oluşturmaktadır. TNV'nin sistemik yayılımı son derece nadir olmakla birlikte (Rubino and Martelli, 2010); *N. benthamiana*'da sistemik enfeksiyon oluşumu da

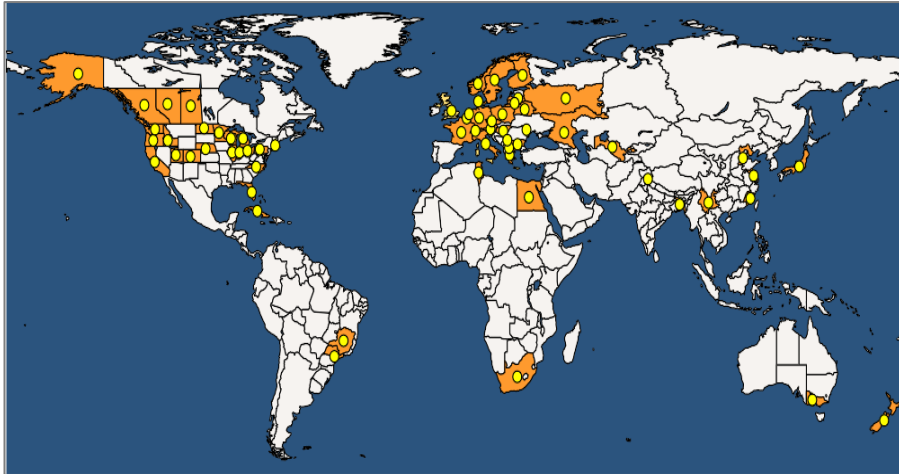
belirlenmiştir (Molnar et al., 1997). Öte yandan, TNV ile inokule edilen soya fasulyesi bitkilerinde ise sistemik nekroz oluşturabilmektedir (Jiang et al., 2008). Ayrıca, bu bitkide yapraklarda kaşıklaşma, nekrotik halkalı lekeler, yaprak damarları üzerinde nekrotik çizgiler ve virüs inokülasyonu yapılan yapraklarda ise nekrotik lokal lezyonlar da görülmektedir (Xi et al., 2008).

2.3. Nematod Vektörler ile Taşınan Virüsler

Bitkilerde zarar meydana getiren nematodlardan sadece *Dorylamida* takımı virüs vektörü olarak görev yapmaktadır. *Dorylamida* takımından iki familya (*Longidoridae* ve *Trichodoridae*)'ya ait dört cins (*Trichodorus*, *Paratrachodorus*, *Xiphinema*, *Longidorus*) virüs vektörü türleri içermektedir. *Longidoridae* familyasına bağlı nematodlar *Nepovirus* cinsine ait polihedral virüsleri taşıırken, *Trichodoridae* familyasına bağlı nematodlar ise *Tobravirus* cinsine ait çubuk şekilli virüsleri taşımaktadır (Şevik ve Akyazı, 2008).

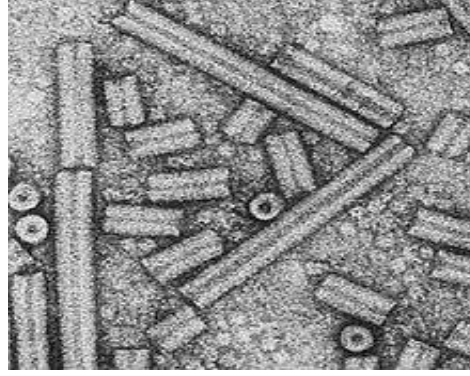
2.3.1. Tobacco rattle virus (Tütün kırık virüsü; TRV)

Tobacco rattle virus (TRV) ilk olarak 1931'de Almanya'da rapor edilmiş olup günümüzde hemen hemen her kıtaya yayılmış durumdadır (Şekil 2.20). Bununla birlikte, TRV genellikle Avrupa (Rusya dahil), Japonya, Yeni Zelanda ve Kuzey Amerika'da görülmektedir (Jackson et al., 2011).



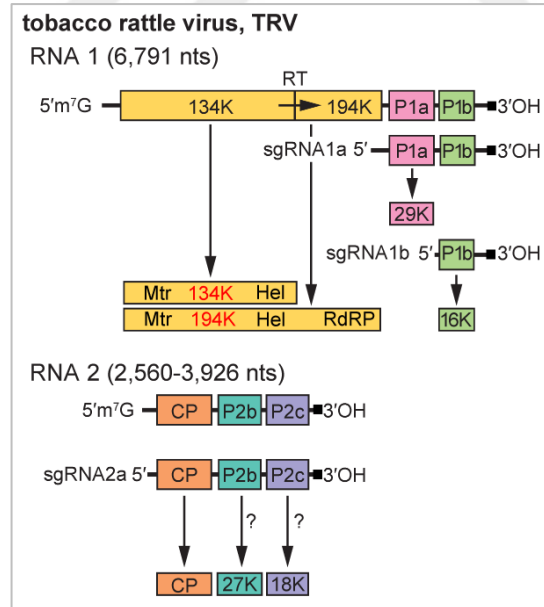
Şekil 2.20. Tobacco rattle virus'ün coğrafik yayılımı (EPPO; Son erişim tarihi: 23.05.2023)

Tobacco rattle virus; *Virgaviridae* familyasının, *Tobravirus* cinsinin bir üyesidir ve genomu iki adet düz çubuk şeklinde (Şekil 2.21), pozitif duyarlı ssRNA partikülünden oluşmaktadır (Garfinkel et al., 2017).



Şekil 2.21. Tobacco rattle virus partiküllerinin elektron mikroskop altında görünüşleri (<https://ictv.global/report/chapter/virgaviridae/virgaviridae/tobravirus>; Son erişim tarihi: 26.06.2023)

Tobacco rattle virus'un genom segmentlerinden RNA-1 bitkilerde bağımsız replikasyon ve sistemik yayılma yeteneğine sahiptir. 134-141kDa ve 194-201kDa replikasyon proteinleri doğrudan transkripsiyon ile oluşurken, P1a ve P1b sırasıyla subgenomik (sg) RNA türleri 1a ve 1b vasıtasıyla transkripsiyon olmaktadır. RNA-2'nin kendisi messenger (haberci) aktivitesine sahip değildir; CP sgRNA-2a'dan oluşmaktadır. Diğer RNA-2 kodlu proteinlerin hangi yolla ifade edildiği bilinmemektedir ancak muhtemelen sgRNA'ları içermektedir (Şekil 2.22) (Jackson et al., 2011).

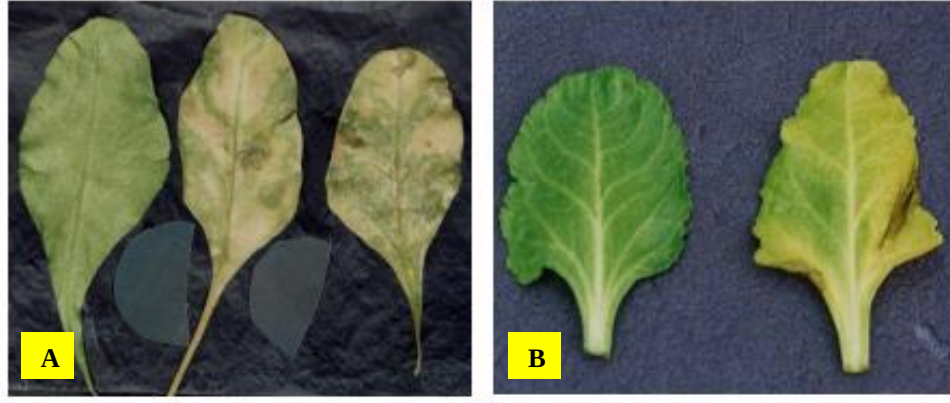


Şekil 2.22. Tobacco rattle virus'un genom organizasyonu ve ekspresyon stratejisi (Jackson et al., 2011)

RNA-1 dört yapısal olmayan proteini kodlamaktadır. Bunlardan; 134-141 kDa'lık ve 194-201 kDa'lık bir proteinler RNA'nın replikasyonunda görev

almaktadır. 29-30 kDa protein (P1a) virüsün hücreler arası taşınmasında; 12-16 kDa'lık protein (P1b) ise RNA susturma baskılayıcısı olarak rol oynamaktadır. Diğer taraftan; RNA-2'den üç proteinin (CP, P2b ve P2c) sentezi gerçekleşmektedir. Bu proteinlerden P2b nematodlar tarafından virüsün taşınması için gereklidir (Şekil 2.22) (Jackson et al., 2011).

Tobravirüsler geniş bir konukçu çevresine sahip olup 50'den fazla tek çenekli ve çift çenekli bitki familyası üyelerinde enfeksiyon oluşturmaktadır. Doğada *Trichodorus* ve *Paratrichodorus* (*Trichodoridae*) cinsindeki nematodlar tarafından taşınmaktadır, farklı türler belirli virüs türleri için spesifiktir. Hem ergin, hem de larvalar virüsü bulaştırabilmektedir. Ancak, nematodun deri değiştirmesi sırasında virüs kaybedilmektedir (Jackson et al., 2011). Nematodlarla taşınma böceklerle semi-persistent taşınmaya benzemektedir (Dijkstra and Khan, 2002). Alınan virüs partikülleri nematodların özofagus duvarına yapışmakta ve tükürük bezi salgıları tarafından serbest bırakılmakta ve keşif amaçlı beslenme emgileri sırasında ise virüs partiküllerinin duyarlı kök hücrelerine geçtiği düşünülmektedir. Virüsün vektörde çoğaldığına dair bir kanıt olmamakla birlikte muhtemelen nematod yumurtaları yoluyla da bulaşma gerçekleşmemektedir (Jackson et al., 2011). Vektör nematodlar, virüsü aylarca hatta yıllarca bünyesinde kaybetmeden taşıyabilmektedir. Örneğin; TRV, nematod tarafından bir kez toprağa bulaştırıldıktan sonra uzun yıllar topraktan arındırılmayabilir. Taylor ve Robertson (1970), Avrupa ve Amerika'da tanımlanmış çoğu *Trichodorus* türünün TRV'ü taşıdığını belirtmişlerdir. Virüs uzun bir süre nematod bünyesinde kalabilmektedir. Örneğin, *Paratrichodorus pachydermus* toprakta iki yıl kaldıktan sonra bile TRV'ü taşıyabilmektedir (Macfarlane, 2003). Bu grupta yer alan virüsler birçok konukçu türünün tohumları aracılığıyla da taşınabilmektedir. TRV, çok çeşitli kültür bitkilerinin yanı sıra yabancı otlar ve diğer yabani bitkilerde de hastalıklara neden olmaktadır; bunlar arasında patatesten corks ringspot (mantar halkalı leke) ve gövde beneği, tütünde kırık, nergis ve lalede çizgili mottle, sümbülde malaria, glayölde çentikli yaprak ve şeker pancarında sarı leke (Şekil 2.23) sayılabilir (Jackson et al., 2011).

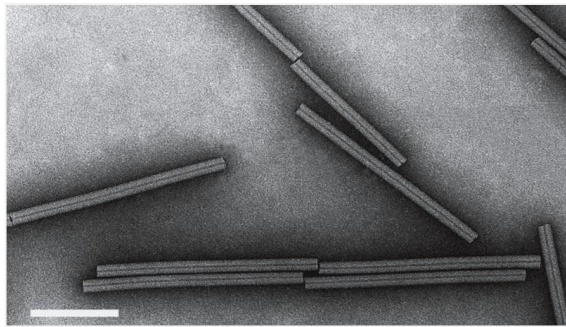


Şekil 2.23. Tobacco rattle virus'un şeker pancarına ard arda üç aktarımı sonrası bu bitkinin virüs inoküle edilen yapraklarında oluşan klorotik benekler (A) ile sistemik klorotik benek belirtilerinin görünümü (B) (Dikova, 2006)

Ayrıca, TRV enfekteli bir bitkinin özsuynun başka bir bitkiyle temas etmesiyle de bulaşabilmektedir (Bonkowski, 2021). Sistemik olarak istila edilen bitkilerin çoğu dokusu enfekte olabilir, ancak birçok türde virüs köklerdeki ilk enfeksiyon bölgesinde lokalize kalmaktadır (Jackson et al., 2011).

2.4. Tobacco mosaic virus (Tütün mozayik virüsü; TMV)

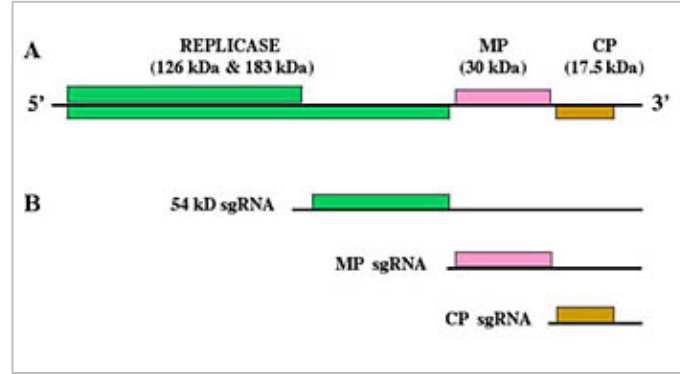
Tobacco mosaic virus (TMV) bir asırdan daha uzun bir süre önce keşfedilen ilk bitki virüsü olup *Virgaviridae* familyasının, *Tobamovirus* cinsi içerisinde yer alan, pozitif özellikte, ss RNA içeren, 300 nm x 18 nm boyutunda düz çubuk şeklinde partiküllere sahip bir hastalık etmenidir (Şekil 2.24) (Agrios, 1988). Partikül ağırlığının %5'ini RNA, %95'ini ise protein oluşturmaktadır (Walkey, 1991).



Şekil 2.24. Tobacco mosaic virus partiküllerinin elektron mikroskop altındaki görünümü (Bar 100 nm'yi ifade etmektedir) (Jackson et al., 2011)

Tobamovirus'lerin genomu tek parçalı olup replikasyonla ilişkili 126 ve 183 kDa'luk yapısal olmayan iki protein doğrudan genomik RNA'dan çevrilmiştir. Diğer yapısal olmayan protein, bitkilerde virüsün hücreden hücreye hareket için

gerekli olup, 30 kDa'lık bu hareket proteini (MP), subgenomik bir RNA-1 (sgRNA1) aracılığıyla eksprese edilirken, 17.5-kDa'lık kılıf proteini (CP) ise, subgenomik RNA-2'den (sgRNA2) eksprese edilmektedir (Dawson, 1992) (Şekil 2.25).



Şekil 2.25. Tobacco mosaic virus'un genom organizasyonu (<https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/viral/pdlessons/Pages/TobaccoMosaic.aspx>; Son erişim tarihi: 28.12.2023)

TMV; tüm dünyada yayılış gösteren ve çok sayıda sebze, süs bitkisi ve yabancı otu içeren geniş bir konukçu dizinine sahip bir virüs türü olup 30 familyaya ait 190 farklı bitki türünü enfekte edebilmektedir (Shew and Lucas, 1991). Biber, domates, patlıcan, tütün ve diğer bazı bitkilerde önemli kayıplar oluşturmakla birlikte; asma, elma ve armut gibi meyvelerde ise belirti göstermeden latent olarak bulunduğu saptanmıştır (Erkan ve Yorgancı, 1983; Agrios, 1988). Şeker pancarı da, TMV'nin bilinen doğal konukçuları arasındadır (Krstic et al., 1997). Virüsün bitkilerde oluşturduğu belirtiler; virüs ırkı/izolatı, enfeksiyon zamanı, bitki türü, bitki yaşı ve ortam koşullarına göre değişim gösterebilmektedir. Bununla birlikte; TMV ile enfekteli bitkilerde genel olarak görülen simptomlar; değişik şiddette sararma, mozayik, yapraklarda girintili çıkıntılı görünüm, kıvrılma ve şekil bozuklukları, bitkide cüceleşme, çiçek ve meyvelerde renk ve şekil bozuklukları, bazı bitkilerin yapraklarında nekrotik lekelerin oluşumu şeklindedir (Gibbs, 1977; Hoffmann et al., 1985; Agrios, 1988).

Virüs bitki özsuyunun mekanik inokülasyonu, aşılama, kültürel işlemler esnasında bitkiler arasındaki temasla, tohumla ve bazı ısıricı-çiğneyici ağız yapısına sahip böcek türleriyle taşınmaktadır (Anonim, 2008).

TMV sistemik olarak konukçunun kök, gövde ve yapraklarında bulunmaktadır. Ayrıca, tohumun dış yüzeyinde, tohum kabuğunda ve ender olarak da tohum endosperminde bulunabilmektedir. TMV stabil bir virüs olup hastalıklı bitki artıklarında, sigara ve tütünde, yabancı otlarda, bulaşık topraklarda uzun süre hastalık

yapma yeteneğini sürdürebilmektedir (Anonim, 2008). Ayrıca, TMV kurutulmuş yaprak üzerinde 30 dakika süre ile 50°C'ye kadar dayanabilmektedir (Islam et al., 2018).



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Şeker Pancarı Tohumları

Bu çalışmada, BNYVV'ye hassas Ansa şeker pancarı çeşidi (*rz1*) kullanılmış olup bu çeşidin tohumları Türkiye Şeker Fabrikaları A. Ş. Şeker Enstitüsü'nden temin edilmiştir.

3.1.2. Toprak Örnekleri

Ankara ve Konya illeri şeker pancarı üretim alanlarından Türkiye Şeker Fabrikaları A. Ş. Şeker Enstitüsü'nün yardımlarıyla 2021 yılı Eylül-Ekim aylarında yapılan sürvey çalışmaları ile bu çalışma için gerekli toprak materyali temin edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Sürvey çalışmalarının yürütüldüğü iller

3.1.3. Antiserum

Serolojik çalışmalarda; yurt içindeki firmalardan temin edilen BNYVV, TNV, TMV (Bioreba), BBSV ve TRV (DSMZ)'e spesifik poliklonal antiserumlar kullanılmıştır.

3.1.4. Mikropleytlar

Çalışmada 96 çukurlu polystrene maddeden yapılmış olan ve düz tabanlı mikropleytlar (Nunc, Danimarka) kullanılmıştır.

3.1.5. Primerler

Bu çalışmada, Oligomer (Ankara) ve Genoks (Ankara) firmaları tarafından sentezlenen primerler kullanılmış olup kullanılan bu primerler ilgili genel bilgiler Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Moleküler çalışmalarda kullanılan primerler, nükleotit dizileri, virüs, hedef RNA ve gen bölgesi ile beklenen bant büyüklükleri

Primer	Nükleotid dizilimi (5' → 3')	Virüs, Hedef RNA ve Bölgesi	Beklenen Bant Büyüklüğü	Literatür
BSBV/F	CATTACGTCATCTGTAAAGATG	BSBV, RNA-2, CP	495 bp	Lennefors et al., 2004
BSBV/R	GGCGGAGCAGTTGATTGCTA			
F-3666	ATGGTACGAACGGCGGCAG	Tobamovirus genel	1052 bp	Luria et al., 2017
R-4718	CAATCCTTGATGTGTTTAGCAC			
TRVF	TACATCACATCTGCCTGC	TRV, MP	562 bp	Koile et al., 2010
TRVR	CTTCATTCACACAACCCTTG			
BBSBfwd	ATTAGATCCCACATCCTGGTGTG-GTTAATC	BBSV, 3' UTR	303 bp	Samiei et al., 2019
BBSVrev	GGGCACCTGGAAACCAGGTATA-TAAG			
Fneb5	ACAATAGTCTCCAACTCGGAG	TNV	300 bp	Zitikaite and Staniulis, 2009
Rneb3	ATCATAACCTGCGTAAGG			

3.1.6. Test Bitkileri

TRV ve TMV izolatlarının konukçu reaksiyonlarının belirlenebilmesi için mekanik inokulasyon çalışmalarında, farklı familyalara ait çeşitli test bitkileri kullanılmıştır. Bu bitkilerin tohumlarının temin edildiği yerler Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2. Mekanik inokulasyon çalışmalarında kullanılan test bitkileri ve temin edildiği yerler

Botanik Adı	Temin Edilen Yer
<i>Beta vulgaris</i> (cv. Smart Briga)	B
<i>Chenopodium quinoa</i>	A
<i>Nicotiana benthamiana</i>	A
<i>N. rustica</i>	A
<i>N. glutinosa</i>	A
<i>Solanum lycopersicum</i>	A
<i>Cucumis sativus</i> L.	A

A: OMU, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Viroloji Laboratuvarı tohum stokları

B: Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş. Şeker Enstitüsü

3.1.7. Referans İzolatlar

Moleküler çalışmalarda pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere BBSV ile enfekteli liyofilize edilmiş bitki materyali (*N. benthamiana*) UCL Üniversitesi (Belçika)'nden Prof. Dr. Claude Bragard'dan; TRV ile enfekteli bitki materyali Ankara Ziraî Mücadele Enstitüsü'nden Zir. Yük. Müh. Ali Ferhan Morca'dan; TMV ile bulaşık bitkisel materyal ise OMÜ, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nden Prof. Dr. Miray Sökmen'den temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Sürvey Çalışmaları

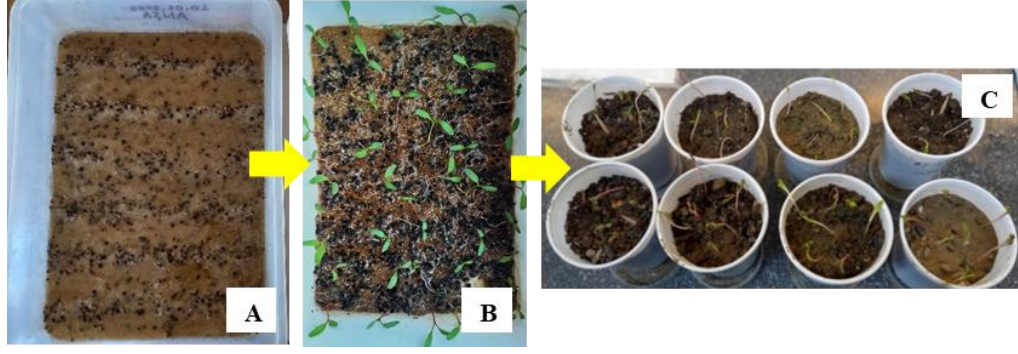
Bu çalışmada, sürvey çalışmaları Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş. Şeker Enstitüsü'nün yardımlarıyla 2021 yılı Eylül-Ekim ayları içerisinde gerçekleştirilmiştir. Toprak örnekleri; Ankara iline bağlı Ayaş, Beypazarı, Sincan, Polatlı ve Haymana ilçeleri ile Konya iline bağlı Çumra, Yunak ve Meram ilçelerine ait köylerdeki şeker pancarı üretim alanlarından toplam 52 adet olmak üzere şansa bağlı olarak toplanmıştır (Şekil 3.1; Tablo 3.3). Örnekler tarlanın büyüklüğüne göre tarlayı temsil edecek şekilde en az 1500 g olmak koşulu ile 0-20 cm derinlikten ve farklı noktalardan alınmıştır.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan toprak örneklerinin temin edildiği il, ilçe ve köyler ile toprak numaraları

Örnek No	İl	İlçe	Köy	Örnek No	İl	İlçe	Köy
1	Ankara	Ayaş	Sinanlı	30	Konya	Meram	Fidanlık
2			Sinanlı	31		Çumra	Güvercinlik
3			Sinanlı	32			Güvercinlik
4			Sinanlı	33			Güvercinlik
5			Sinanlı	34			Güvercinlik
6		Beypazarı	Fasıl	35			Güvercinlik
7			Harmancık	36			Güvercinlik
8			Harmancık	37			Güvercinlik
9		Sincan	Bacı	38			Güvercinlik
10			Bacı	39			Fethiye
11			Bacı	40		Yunak	Odabaşı
12			Bacı	41			Odabaşı
13			Girmeç	42			Odabaşı
14		Polatlı	Tozlu	43			Odabaşı
15			Tozlu	44			Odabaşı
16			Tozlu	45			Odabaşı
17			Beylikköprü	46			Hacıfakılı
18			Beylikköprü	47			Saray
19			Beylikköprü	48			Saray
20			Beylikköprü	49			Saray
21			Kıranharmanı	50			Saray
22			Kıranharmanı	51			Saray
23			Kıranharmanı	52			Saray
24			Kıranharmanı				
25		Haymana	Kerpiç				
26			Saatli				
27			Durutlar				
28			Sarıdeğirmen				
29			Sarıdeğirmen				

3.2.2. Tuzak Bitki Testi Yöntemi

Sürvey çalışmaları ile toplanan toprak örnekleri (52 adet) tuzak bitki testi çalışmalarında kullanılmıştır. Bu çalışmada, öncelikle, geniş plastik kaplar içerisinde ıslatılmış steril kum üzerine şeker pancarı tohumları (cv. Ansa) serilerek, plastik kapların üstü naylon poşetler ile kapatılmış ve iklim odasında 7-10 gün süre ile inkübe edilmiştir. Bu şekilde ön çimlenmesi gerçekleştirilen şeker pancarı fideleri, denemede bitkisel materyal olarak kullanılmıştır (Şekil 3.2).



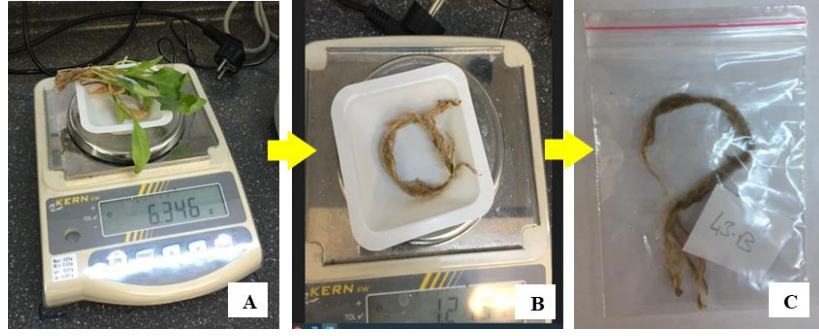
Şekil 3.2. Kum üzerinde ön çimlendirme yapıldıktan sonra saksılara şaşırtılan şeker pancarı fidelerinin görünüşleri (A, B ve C)

Ardından, topraklar 1: 2 oranında steril kum ile karıştırılmıştır. Takiben, bu karışımlar plastik bardaklara konularak, her birine kürdan yardımı ile delikler açılarak 10'ar adet şeker pancarı fidesi şaşırtılmıştır. Her bir toprak örneği için 2'şer tekerrür uygulanmıştır. Saksılar iklim odasına yerleştirilip, gündüz 25°C, gece ise 20°C'de tutularak bitkiler sekiz hafta süre ile yetiştirilmiştir. Ayrıca, aynı şartlarda, steril toprak-kum karışımı içeren ortamda yetiştirilen bitkiler negatif kontrol olarak denemede yer almıştır (Şekil 3.3). Tüm saksılardaki bitkiler haftada bir defa Hoagland solüsyonu (EK 1) ile sulanmıştır.



Şekil 3.3. İklim odasında tuzak bitki testi yöntemine göre yetiştirilen BNYVV'ye hassas şeker pancarı bitkilerinin (cv. Ansa) genel görünümü

Bu süreç sonunda; her bir saksıdaki şeker pancarları ayrı ayrı hasat edilmiş ve bitki kökleri musluk suyunda yıkanarak topraktan arındırılmıştır (Meunier et al., 2003). Hasat sonrası ise, her bir saksıdaki bitkilere ait bitki ve kök ağırlığı hassas terazi yardımı ile tartılarak (Şekil 3.4), kaydedilmiştir. Daha sonra, bu bitkilerin kök bölgeleri alınarak ELISA testi, kök boyaması, moleküler ve biyolojik çalışmalarda kullanılmak üzere ayrı ayrı etiketlenerek -80°C'deki derin dondurucuda saklanmıştır.



Şekil 3.4. Hasat sonrası bitkilerin tartım işlemleri ve çalışmalar için hazırlanma aşaması (A, B ve C)

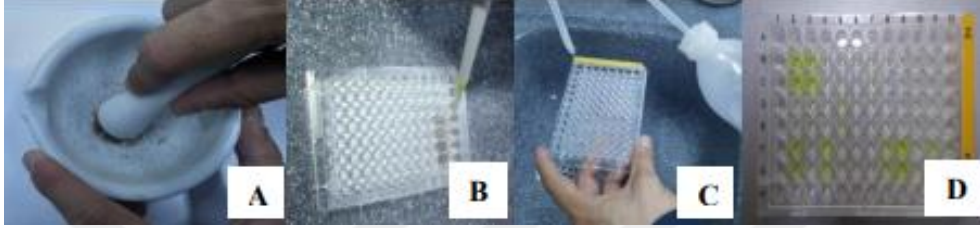
Bu tuzak bitki testi sonucunda, örneklerin büyük bir kısmında çalışmaların tamamı için yeterli şeker pancarı kökü olmadığı anlaşılmış ve bu sebeple aynı deneme bir kez daha kurularak, tekrarlanmıştır.

3.2.3. ELISA Testi

Serolojik çalışmalarda; BNYVV, TNV, TMV (Bioreba), BBSV ve TRV (DSMZ)'e spesifik poliklonal antiserumlar kullanılmıştır. Tuzak bitki testi çalışmaları ile sağlanan şeker pancarı bitkilerine ait kök örnekleri ve mekanik inokülasyon çalışması sonucu elde edilen test bitkilerine ait yaprak örnekleri Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Imuno Sorbent Assay (DAS-ELISA) testi çalışmalarının ana materyalini oluşturmuştur. Bu yöntem Clark ve Adams (1977) ve antiserumların temin edildiği firmaların açıklamaları göz önüne alınarak uygulanmıştır. Bu amaçla; öncelikle kaplama tampon çözeltisinde (Ek-2) 1:1000 oranında sulandırılarak hazırlanan antiserum ELISA mikropleytlerindeki her kuyuya 100 µl olarak ilave edilmiştir. Yaklaşık dört saat süre ile etüvde inkübasyonun ardından, mikropleytler yıkama tampon solüsyonu ile üç defa yıkanmış ve ekstraksiyon tampon çözeltisinde 1: 10 oranında sulandırılarak ezilen bitki örnekleri kuyulara iki tekerrürlü olarak ilave edilmiştir. Böylelikle, bir gece buzdolabında (+4°C) bekletilen mikropleytler, yıkama tampon çözeltisi (Ek-2) ile beş defa yıkandıktan sonra, konjugat tampon çözeltisinde (Ek-2) 1:1000 oranına göre sulandırılan alkalın fosfataz enzimi ile işaretli virüse spesifik IgG (konjugat)'den 100 µl olacak şekilde her bir kuyuya ilave edilmiştir.

Konjugat inkübasyonu BNYVV, TNV ve TMV için 30°C'de beş saat; BBSV ve TRV için ise 37°C'de dört saat süre ile yapılmıştır. Ardından, tekrar yıkama tampon çözeltisi ile mikropleyt kuyuları üç defa yıkanmış ve substrat olarak p-

nitrofenil fosfat, substrat tampon çözeltisinde (Ek-2) 0.5 mg/ml konsantrasyonda sulandırıldıktan sonra mikropleyt çukurlarına 100'er µl ilave edilmiştir. Sonrasında, bu mikropleytler oda sıcaklığında 1-2 saat süre ile substrat inkubasyonu için bırakılmıştır. Sonuçlar ELISA mikropleyt okuyucusunda (Tecan Spectra II) 405 nm dalga boyunda absorbans değerlerinin alınmasıyla elde edilmiştir (Şekil 3.5). Her bir virüs türü için negatif kontrollerin absorbans değerlerinden iki katı ve daha fazla değer veren örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Mouhanna et al., 2002).



Şekil 3.5. DAS-ELISA yönteminin uygulanışı

3.2.4. Tuzak Bitki Köklerinde Vektör *P. betae* ve *Olpidium* spp.'nin Dinlenme Spor Yapılarının Kök Boyaması Yöntemi ile Araştırılması

Tuzak bitki testi sonucunda elde edilecek olan şeker pancarı lateral kök örnekleri %0.1 asit fuksin içeren laktogliserin çözeltisi ile muamele edilerek, örneklerde *P. betae* ve *Olpidium* spp.'nin kışlama spor kümeleri araştırılmıştır (Abe and Tamada, 1986). Bu uygulamada; her bir örneğin kökünden yaklaşık 8-10 parça alınarak alev ile lama fikse edilmiş ve sonrasında ışık mikroskobu altında vektör *P. betae* ve *Olpidium* spp.'ye ait kışlama spor yapıları araştırılmıştır. Nitekim, konukçu bitki köklerinde *P. betae*'nın bal peteği şeklinde dinlenme spor yapıları oluşturduğu bilinmektedir (Abe and Tamada, 1986). Diğer taraftan; bitki köklerinde *O. bornovanus* petek benzeri desene sahip düz duvarlı; *O. brassicae* ise yıldız şeklinde dinlenme spor yapıları (sistosori) oluşturmaktadır (Lange and Insunza, 1977). *O. virulentus*'un dinlenme sporları ise daha çok *O. brassicae*'ya benzerlik göstermektedir. Böylelikle, köklerde belirlenen dinlenme sporlarının fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.5. Moleküler Çalışmalar

Bu tez çalışmasında; incelenen örneklerde BSBV'ün bulunma durumunun ELISA yöntemi ile araştırılması planlanmasına rağmen, virüse spesifik antiserumun mevcut bütçe kapsamında satın alınamaması nedeniyle; virüsün araştırılmasında bir

diğer tanılama yöntemi olan RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Bununla birlikte; moleküler çalışmaların maliyetinin çok yüksek olmasından dolayı; örnek sayısında sınırlama yapılmak durumunda kalınmıştır. Literatürde BSBV'ün genellikle BNYVV ile birlikte ortak enfeksiyon oluşturduğu bildirilmekte olup (Meunier et al., 2003; McGrann et al., 2009; Biancardi and Tamada, 2016) bu sebepten dolayı örneklerin seçiminde; BNYVV ve vektör *P. betae* ile bulaşıklık durumu, coğrafik orijinleri ve tuzak bitki testinde şeker pancarlarında gözlenen belirtiler göz önüne alınmıştır. Öte yandan, seçilen bu örneklerin TMV'nin moleküler karakterizasyonu çalışmalarının yürütülebilmesi amacıyla aynı zamanda TMV ile de bulaşık olmasına dikkat edilmiştir (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere seçilen örneklerin orjinleri, örnek numaraları, belirtileri, vektörlerin bulunma durumu ve ELISA testi ile örneklerde saptanan virüs türleri

İl	İlçe	Köy	Örn. No	Makroskobik Gözlem*	<i>Olpidium</i> spp.	<i>P. betae</i>	ELISA testi sonucu**	
							BNYVV	TMV
Ankara	Ayaş	Sinanlı	2	HK	+	+	+	+
	Beyazır	Fasıl	6	NBG	+	+	+	+
	Sincan	Bacı	9	HK	+	+	+	-
	Sincan	Girmeç	13	HK, NL	+	+	+	-
	Polatlı	Beylikköprü	17	K, M	+	+	+	-
	Haymana	Sarıdeğirmen	28	NBG	+	+	-	-
Konya	Meram	Fidanlık	30	HK	-	+	+	+
	Çumra	Güvercinlik	31	KL, K	+	+	+	+
	Çumra	Güvercinlik	35	NBG	+	+	+	+
	Yunak	Odabaşı	44	YFB	+	+	+	-
	Yunak	Odabaşı	45	KL	+	+	+	+
	Yunak	Saray	52	YD, NL, K	-	+	+	-

*NBG: Normal bitki gelişimi, HK: Hafif kloroz, K: Kloroz; KL: Klorotik leke, M: Mozayik, NL: Nekrotik leke, YFB: Yapraklarda form bozukluğu, YD: Yaprakta deformasyon

**+: virüs ile bulaşık; -: virüs le bulaşık değil

3.2.6. RNA İzolasyonu

Seçilen 12 örnek (Tablo 3.4) ve çalışmada kontrol olarak kullanılan sağlıklı şeker pancarı bitkilerinin köklerinden toplam RNA'lar PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen) kullanılarak, kit protokolüne göre izole edilmiştir. Öncelikle, her bir örneğe ait şeker pancarı bitki köklerinden 0.1-0.2 g alınmış ve liyofilizatör'de -55°C'de iki gün süre ile dondurularak kurutulmuştur. Daha sonra, bu kök örnekleri steril havanda 600 µl Lysis buffer ve 6 µl β-mercaptoethanol içeren karışım içerisinde iyice ezilmiş ve takiben mikrosantrifüj tüplerine transfer edilmiştir. Vorteks ile örneklerin karışımı sağlandıktan sonra, karışım içeren bu tüpler 12.000 rpm'de 2 dk süre ile santrifüj edilmiş ve üstte kalan sıvı faz dikkatlice alınarak temiz

mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Transfer edilen sıvının hacmi kadar %70'lik etanol ilavesinin ardından, örnekler vorteks yardımı ile karıştırılıp, altına toplama tüpü yerleştirilen spin cartridge içeren kolona transfer edilmiş ve 12.000 rpm'de 15 s süre ile santrifüj edilmiştir. Alta geçen sıvı faz dökülerek, örneğin tamamı kolona transfer edilinceye kadar bu işleme devam edilmiştir. Daha sonra, aynı kolona 700 µl yıkama tamponu I (Wash buffer I) eklenmiş ve 12.000 rpm de 15 s santrifüj edilmiştir. Takiben, kolon yeni tüpe yerleştirilip üzerine 500 µl yıkama tamponu II (Wash buffer II) ilave edilerek 12.000 rpm'de 15 s santrifüj işlemine tabi tutulmuş ve alta geçen sıvı faz dökülerek, aynı işlem bir defa daha tekrarlanmıştır. Sonraki basamakta ise, kolon boş olarak 12.000 rpm'de 1-2 dk santrifüj edilmiş ve kolon yeni tüplere transfer edilmiştir. Ardından, her bir kolonun tam merkezine isabet edecek şekilde 40 µl RNase içermeyen su ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 1 dk bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda, örnekler son bir kez 12.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiş ve kolon atılarak altındaki tüp içerisinde toplanan RNA'lar, derin dondurucuda (-80°C) moleküler çalışmalar yapılncaya kadar muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.5. Ansa şeker pancarı çeşidi (*rz1*) ekimi yapılarak gerçekleştirilen tuzak bitki testi sonrası, RNA saflaştırılması yapılan örneklerin numaraları ve bu örneklerle ait RNA konsantrasyonları

İl	İlçe	Köy	Örn. No	Total RNA	
				Konsantrasyon (ng/µl)	260/280
Ankara	Ayaş	Sinanlı	2	492	2.141
	Beypazarı	Fasıl	6	338	1.284
	Sincan	Bacı	9	512	2.114
	Sincan	Girmeç	13	704	1.756
	Polatlı	Beylikköprü	17	480	2.160
	Haymana	Sarıdeğirmen	28	260	2.114
Konya	Meram	Fidanlık	30	593	1.979
	Çumra	Güvercinlik	31	699	1.866
	Çumra	Güvercinlik	35	716	1.756
	Yunak	Odabaşı	44	610	2.013
	Yunak	Odabaşı	45	558	2.084
	Yunak	Saray	52	440	2.089

3.2.7. Tuzak Bitki Köklerinde Yürütülen RT-PCR Çalışmaları

Moleküler çalışmalar için seçilen toplam 12 adet şeker pancarı kök örneğinde BSBV'nin bulunma durumunun araştırılması amacıyla, iki aşamalı RT-PCR yöntemi uygulanmıştır. Bu çalışmada, BSBV'nin RNA-2 segmenti üzerinde yer alan kılıf protein (CP) gen bölgesinin çoğaltılması yoluna gidilmiş olup Lennefors vd. (2004)'nin belirttikleri BSBV/F ve BSBV/R primerleri kullanılmıştır (Tablo 3.1).

Öncelikle; RT aşaması M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) enziminin protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; steril santrifuj tüpüne 1 µl reverse primer (2 pmol), 1 µl RNA, 1 µl 10 mM dNTP mix, 9 µl RNase-free su ilave edilerek karışımları sağlanmış ve sonrasında 65°C’de 5 dk ısıtıcı blokta inkübasyona bırakılmıştır. Ardından, karışım içeren tüpler 1 dk süre ile buz içerisinde bekletilmiş ve sonrasında kısa süreli santrifuj edilmiştir. Takiben, karışımın üzerine 4 µl 5X First-Strand Buffer, 2 µl DTT, 1 µl RNase inhibitör (40 U/µl) ilave edilerek 37°C’de 2 dk inkübatörde inkübe edilmiştir. Daha sonra, bu karışıma 1 µl M-MLV RT enzimi (200 U/µl) ilave edilmiş ve 37°C’ye ayarlı etüvde 50 dk süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, bu karışımı içeren tüpler enzimin inaktivasyonu için 70°C’de 15 dk bekletilmiştir.

PCR aşamasında ise Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, ABD) enzimi kullanılmıştır. PCR reaksiyonu; 2 µl 5XGC Buffer, 0.2 µl dNTP mix (10 mM), primerlerin her birinden 0.5 µl (10 µM), 0.3 µl DMSO, 0.1 µl Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, ABD) enzimi, 5.4 µl RNase-free su ve 1 µl cDNA’dan oluşmuştur. Amplifikasyonlar Bio-Rad MJ Mini PCR thermocycler (ABD)’da 98°C’de 30 s başlangıç denatürasyon basamağının ardından, 25 döngü olacak şekilde; 98°C’de 10 s, 54.2°C’de 30 s, 72°C’de 30 s ve 1 döngü 72°C’de 5 dk ile tamamlanmıştır.

Bu çalışmada; örneklerde TRV’nin bulunma durumunun araştırılmasında yürütülen ELISA testi çalışmalarında pleytlerdeki tüm kuyuların sararması sonucu yaşanan olumsuzluk nedeniyle, bu virüsün RNA izolasyonu yapılan 12 örnekte RT-PCR yöntemi ile de araştırılması yoluna gidilmiştir. MMLV enzimi kullanılarak 12 örnekte cDNA sentezini takiben, Phusion High-Fidelity DNA Polymerase enzimi (Thermo Fisher Scientific) ile PCR çalışması yürütülmüştür. Bu çalışmada kullanılan TRVF ve TRVR primerlerinin (Koile et al., 2010) nükleotit dizileri Tablo 3.1’de verilmiştir. PCR reaksiyonu; 2 µl 5 X HF Buffer, 0.2 µl dNTP mix (10 mM), her bir primerden (TRVF ve TRVR) 0.5 µl (10 µM), 0.1 µl Phusion High-Fidelity DNA Polymerase enzimi, 5.7 µl RNase-free su ve 1 µl cDNA’dan oluşturulmuştur. Thermocycler’da uygulanan basamaklar, sıcaklıklar ve döngü sayıları ise şu şekilde gerçekleştirilmiştir: ilk denatürasyon (98°C’de 30 s), 30 döngü olacak şekilde denatürasyon (98°C’de 10 s), primer bağlanma (67°C’de 10 s), uzama (72°C’de 30 s) ve 1 döngü son uzama (72°C’de 5 dk). Bu uygulamada sonuç alınamadığı için

PCR’da daha sonra farklı cDNA konsantrasyonları (0.5 µl, 2 µl ve 1 µl’nin 1/10 seyreltmesi) kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

PCR çalışmaları ile TRV için sonuç alınamaması nedeniyle, örneklerde TRV tek basamaklı RT-PCR yöntemi ile de araştırılmıştır. Çalışmada Qiagen firmasının one step RT-PCR kiti kullanılmıştır. PCR reaksiyonu; 2 µl 5 X Buffer, 0.4 µl dNTP mix (10 mM), her bir primerden (TRVF ve TRVR) 0.1 µl (10 µM), 0.4 µl Qiagen enzim mix, 0.2 µl RNase inhibitör, 5.8 µl RNase-free su ve 1 µl RNA’dan oluşturulmuştur. Bu kit ile gerçekleştirilen amplifikasyonlar thermocycler’de, 50°C’de 30 dk, 95°C’de 15 dk, 34 döngü olacak şekilde 94°C’de 30 s, 48°C’de 30 s, 72°C’de 2 dk ve 1 döngü 72°C’de 7 dk ile tamamlanmıştır.

Öte yandan, BBSV’ün araştırılmasında; Samiei vd. (2019)’nin belirttikleri BVQ’nun 3' UTR bölgesine spesifik primerler kullanılmıştır (Tablo 1.3). Tek basamaklı olarak yürütülen RT-PCR (Qiagen) çalışmalarında, 10 µl’lik reaksiyon karışımı; 2 µl 5X OneStep RT-PCR buffer, 0.4 µl dNTP karışımı (10 mM), her bir primerden 0.1 µl (0.6 µM), 0.4 µl Qiagen enzim mix, 0.2 µl RNase inhibitör, 5.8 µl steril su ve 1 µl RNA’dan oluşturulmuştur. Amplifikasyonlar thermocycler’de, 50°C’de 30 dk, 95°C’de 15 dk, 34 döngü olacak şekilde 94°C’de 30 s, 56°C’de 30 s, 72°C’de 1 dk ve 1 döngü 72°C’de 10 dk ile tamamlanmıştır.

Ayrıca, BSBV’ün araştırılması amacıyla seçilen 12 örneğin dördünde (2, 6, 31 ve 45 no’lu), TMV iki basamaklı RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Bu çalışmada Luria vd. (2017)’nin belirttikleri *Tobamovirus*’lere spesifik F-3666 ve R-4718 primerleri kullanılmıştır (Tablo 3.1). RT basamağı yukarıda belirtildiği şekilde M-MLV enzimi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR aşamasında ise Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, ABD) enzimi kullanılmıştır. PCR reaksiyonu; 2 µl 5 X HF Buffer, 0.2 µl dNTP mix (10 mM), primerlerin her birinden 0.5 µl (10 µM), 0.3 µl DMSO, 0.1 µl Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, ABD) enzimi, 5.4 µl RNase-free su ve 1 µl cDNA’dan oluşmuştur. Amplifikasyonlar thermocycler’da 98°C’de 30 s başlangıç denatürasyon basamağının ardından, 30 döngü olacak şekilde; 98°C’de 10 s, 61°C’de 30 s, 72°C’de 45 s ve 1 döngü 72°C’de 5 dk ile tamamlanmıştır. Ancak, bu uygulamadan olumlu sonuç alınamamıştır. Bu sebeple, one step RT-PCR kitinin (Qiagen) kullanımı ile çalışmalara devam edilmiştir. Bu aşamada, TMV ile bulaşık bitkisel materyal temin edilmiş ve bu örnekten RNA izolasyonu yapılarak pozitif

kontrol olarak çalışmalara dahil edilmiştir. Reaksiyon karışımı; 2 µl 5X OneStep RT-PCR buffer, 0.4 µl dNTP karışımı (10 mM), her bir primerden 0.1 µl (0.6 µM), 0.4 µl Qiagen enzim mix, 0.2 µl RNase inhibitör, 5.8 µl steril su ve 1 µl RNA'dan oluşturulmuştur. Amplifikasyonlar thermocycler'de, 50°C'de 30 dk, 95°C'de 15 dk, 34 döngü olacak şekilde 94°C'de 30 s, 48°C'de 30 s, 72°C'de 1 dk ve 1 döngü 72°C'de 10 dk ile sonlandırılmıştır.

3.2.8. Agaroz Jelin Hazırlanması

PCR sonrası oluşan DNA fragmentlerinin analizi edilmesi amacıyla %1'lik agaroz jel kullanılmıştır. 50 ml'lik 1XTBE tampon çözeltisi içerisine 0.5 g agaroz (Merck, Almanya) ilave edilerek mikro dalga fırın içerisinde ısıtılmış ve agarın erimesi sağlanmıştır. Karışımın ılımasını takiben içerisine 2.5 µl (10 mg/ml) ethidium bromür eklenerek, jel yatay elektroforez tabağına dökülmüştür. Jel tamamen katılaştıktan sonra, 1XTBE çözeltisi bulunan elektroforez cihazının tankına yerleştirilmiş ve tarak dikkatli bir şekilde çıkarılmıştır. Ardından, ilk kuyuya bantların moleküler büyüklüğünü saptamak amacıyla 6 µl markör (100 bp/1 Kb DNA Ladder) konulmuştur. Diğer kuyulara ise, 10 µl DNA ve 2 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak incelenecek örnekler yerleştirilmiş ve 90 mA akımda yaklaşık bir saat süre ile elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra, jeldeki DNA fragmentlerinin analizi ise GelDoc 2000 (Biorad, ABD) görüntüleme sistemi yardımı ile gerçekleştirilmiş ve jelde oluşan bantların görüntüleri fotoğraflanmıştır.

3.2.9. Biyolojik Çalışmalar

Biyolojik çalışmalarda Tablo 3.2'de verilen yedi farklı test bitkisi kullanılmıştır. İlk olarak, belirtilen bu test bitkilerinin tohumları içerisinde torf bulunan plastik kaplara ekilmiştir. Bitkiler inokulasyon için uygun döneme geldiklerinde; torf içeren plastik bardaklara şaşırtılarak, gündüz sıcaklığı 25°C'ye ayarlı iklim odasında muhafaza edilmiştir. Bu süreç içerisinde; rutin olarak kontrolleri yapılarak, zaman zaman yaprak biti, akar ve/ya da tripslere karşı ilaflanmıştır.

Tuzak bitki testi ile elde edilen rhizomania'ya hassas şeker pancarı (cv. Ansa) kök ya da yaprak örnekleri (toplam yedi adet), mekaniksel inokülasyon yöntemi ile test bitkilerine aktarılmıştır. Bu amaçla, seçilen bu bitkilere ait 1 g kök örneği/5 ml tampon çözelti olacak şekilde steril havanda homojenize edilmiştir. Tampon çözelti

olarak %1 oranında 2-mercapto ethanol içeren 0.01 M sodyum fosfat tampon çözeltisi (pH: 7.0) kullanılmıştır (Mehrvar, 2009). Böylelikle elde edilen bitki özsuvarı, 400 mesh'lik karborandum tozu ile tozlanmış ve Tablo 3.2'de verilen indikatör bitkilerin yapraklarına inoküle edilmiştir. Her bir uygulama için 1 adet de kontrol bitki bırakılarak, bu bitkiler sadece tampon çözelti ile muamele edilmiştir. İnokulasyon sonrası, bitki artıkları ve karborandumdan arındırmak amacıyla bitkilerin yaprakları musluk suyu altında dikkatlice yıkanmıştır. İnokule edilen tüm bitkiler gündüz sıcaklığı 25°C, gece sıcaklığı ise 20°C'ye ayarlı iklim odasına yerleştirilmiş ve bitkilerde oluşan belirtiler periyodik olarak yaklaşık 2-4 hafta boyunca incelenip, kayıt edilmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Daha sonra, tipik virüs benzeri semptom görülen ve görülmeyen test bitkilerinin virüs ile inoküle edilen ve edilmeyen yapraklarından örnekleme yapılarak DAS-ELISA yöntemine göre BNYVV, TNV, TMV ve/ ya da BBSV için test edilmiştir. Alınan örneklerin bir kısmı ise RNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmak amacıyla -80°C'deki derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

3.2.10. Test Bitkilerinde Yürütölen Moleküler Çalışmalar

Bu tez çalışmasının proje metninde bulunmamasına rağmen; şeker pancarı örneklerinin mekanik inokulasyonu sonrası virüs benzeri semptom sergileyen bazı test bitkilerinin (*N. benthamiana*, *N. rustica*, şeker pancarı ve domates) inokulasyon yapılan ve/ya da inokulasyon yapılmayan üst yapraklarından örnekler alınmış ve toplam 10 örnekte Yöntem 3.2.6'da belirtildiği şekilde RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından, bu örneklerde TRV ve TNV'nin bulunma durumu ise Qiagen firmasının One-step RT-PCR kiti ile Yöntem 3.2.7.'de izah edildiği şekilde uygulanmıştır.

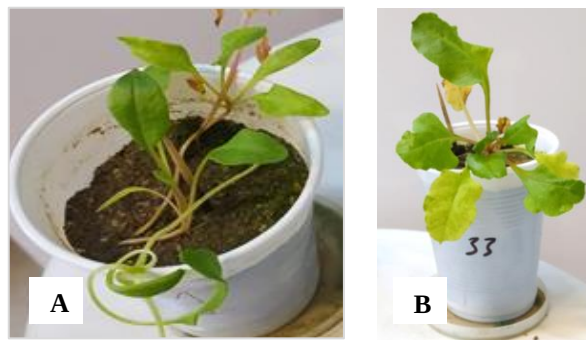
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Tuzak Bitki Testi ve ELISA Testi Sonuçları

Konya ve Ankara illeri şeker pancarı üretim alanlarından toplanan 52 farklı tarlaya ait toprak örneğinde, BNYVV'ye hassas şeker pancarları (cv. Ansa) tuzak bitki testi yöntemine göre yaklaşık sekiz hafta boyunca yetiştirilmiştir. Hasattan önce; her bir bardakta gelişen bitkilerin simptomları kayıt edilmiş ve farklı belirti gösteren bitkilerin fotoğrafları çekilmiştir. Hasat sonrası ise, bitkilerin kök ve toplam ağırlıkları ölçülmüş, ardından her bir örneğin kök bölgesi alınarak; BNYVV, BBSV, TNV ve TMV ile bulaşıklık durumlarını ortaya koymak amacıyla DAS-ELISA yöntemine ile test edilmiştir.

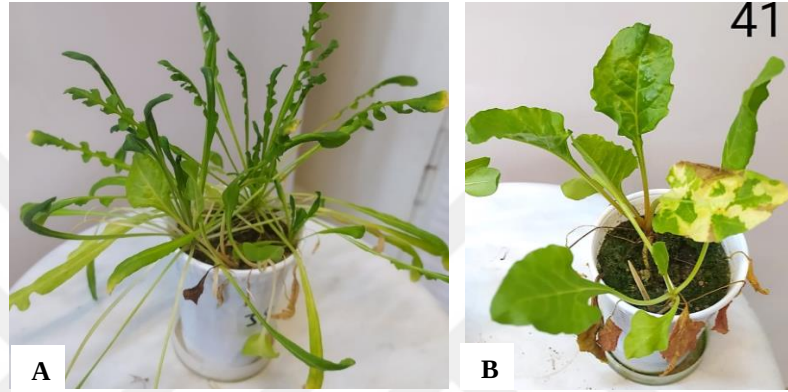
Konya ve Ankara illerine ait incelenen örneklerin kök ve bitki ağırlıkları, ortalama ELISA absorbans değerleri ile makroskobik gözlemlere ait veriler Tablo 4.1 ve Tablo 4.2'de gösterilmiştir. Bu tablolar incelendiğinde, toplam 52 farklı tarladan alınan toprak örneğinde yetiştirilen şeker pancarı bitkilerinde en sıklıkla rastlanan belirtilerin; kloroz (Şekil 4.1) ve nekrotik leke (Şekil 4.2) şeklinde olduğu görülmektedir. İlaveten, bazı örneklerde şeker pancarı bitkilerinin yapraklarında ipliksi yapı (Şekil 4.3.-A) ve iri sarı lekelerin oluşumu (Şekil 4.3.-B) da dikkat çekmiştir. Simptomlu örneklerin kök (0.015-0.275 g) ve bitki ağırlıkları (0.287-1.591 g) ise geniş bir dağılım göstermiştir (Tablo 4.1, Tablo 4.2).



Şekil 4.1. Şeker pancarı bitkisinin yapraklarında gözlenen kloroz (A ve B)



Şekil 4.2. Şeker pancarının yapraklarda kloroz ile birlikte oluşan nekrotik lekeler (A ve B)



Şekil 4.3. Şeker pancarı bitkisinin yapraklarında oluşan form bozuklukları (ipliksileşme) (A) ve bazı yapraklarda gözlenen iri sarı lekeler (B)

Bu çalışmada; DAS-ELISA yöntemi ile 52 örneğin tamamı BNYVV, BBSV, TNV, TRV ve TMV'nin araştırılması amacıyla test edilmiştir. Buna göre; incelenen örneklerin %78.8 (41 adet)'inde BNYVV enfeksiyonun olduğu belirlenmiştir. İller bazında incelendiğinde; Ankara ilinde virüs ile bulaşıklık oranının %79.3, Konya ilinde ise bu oranının %78.3 olduğu saptanmıştır. Ayrıca, Ankara ilinin Ayaş, Beypazarı ve Sincan ilçeleri ile Konya ilinin Meram ilçesine ait incelenen toprak örneklerinin tamamının BNYVV ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan, bu çalışmada her iki ile ait incelenen örneklerin hiçbirinde BBSV ve TNV enfeksiyonuna rastlanılmamıştır (Tablo 4.1, Tablo 4.2).

Tablo 4.1. Ankara ili toprak örneklerinde tuzak bitki testi yöntemine göre yetiştirilen şeker pancarı bitkilerinde gözlenen simptomlar, *P. betae* ve *Olpidium* spp. ile bulaşıklık durumları ve BNYVV, BBSV, TNV ve TMV'ye ait ELISA sonuçları

Örn. No	İlçe	Köy	Ortalama Ağırlık (g)		Simptom*	Mikroskopik inceleme**		ELISA Absorbans Değeri**			
			Bitki	Kök		<i>P. betae</i>	<i>Olpidium</i> spp.	BNYVV	BBSV	TNV	TMV
1	Ayaş	Sinanlı	0.567	0.031	K	+	+	0.331 (+)	0.097 (-)	0.113 (-)	0.336 (-)
2		Sinanlı	0.423	0.025	HK	+	+	1.750 (+)	0.099 (-)	0.107 (-)	1.019 (+)
3		Sinanlı	0.373	0.026	HK	+	+	2.839 (+)	0.100 (-)	0.125 (-)	1.106 (+)
4		Sinanlı	0.371	0.029	NBG	+	-	3.328 (+)	0.095 (-)	0.113 (-)	0.306 (-)
5		Sinanlı	0.873	0.066	HK	+	-	3.455 (+)	0.096 (-)	0.116 (-)	0.524 (+)
Toplam		5				5	3	5	0	0	3
6	Beypazarı	Fasıl	0.350	0.047	NBG	+	+	3.550 (+)	0.100 (-)	0.118 (-)	0.927 (+)
7		Harmancık	0.342	0.031	NBG	+	+	3.205 (+)	0.095 (-)	0.114 (-)	0.221 (-)
8		Harmancık	0.322	0.037	NBG	+	+	3.465 (+)	0.087 (-)	0.114 (-)	0.408 (-)
Toplam		3				3	3	3	0	0	1
9	Sincan	Bacı	0.438	0.015	HK	+	+	3.143 (+)	0.097 (-)	0.124 (-)	0.383 (-)
10		Bacı	0.400	0.035	HK	+	-	2.302 (+)	0.110 (-)	0.108 (-)	0.290 (-)
11		Bacı	0.464	0.042	NL, HK	+	-	1.756 (+)	0.100 (-)	0.113 (-)	0.428 (-)
12		Bacı	0.569	0.030	HK	+	-	1.574 (+)	0.105 (-)	0.122 (-)	0.235 (-)
13		Girmeç	0.475	0.055	HK, NL	+	+	3.383 (+)	0.096 (-)	0.118 (-)	0.371 (-)
Toplam		5				5	2	5	0	0	0
14	Polatlı	Tozlu	0.287	0.035	HK	+	+	0.987 (+)	0.091 (-)	0.116 (-)	0.386 (-)
15		Tozlu	0.512	0.031	HK, YUNL	+	+	3.450 (+)	0.108 (-)	0.124 (-)	0.275 (-)
16		Tozlu	0.571	0.057	HK	+	+	2.203 (+)	0.094 (-)	0.114 (-)	0.420 (-)
17		Beylikköprü	0.445	0.017	K, M	+	+	3.459 (+)	0.088 (-)	0.109 (-)	0.332 (-)
18		Beylikköprü	0.496	0.053	HK, HM	+	+	3.132 (+)	0.090 (-)	0.119 (-)	0.220 (-)
19		Beylikköprü	0.522	0.074	HK	+	-	0.198 (-)	0.094 (-)	0.113 (-)	0.856 (+)
20		Beylikköprü	0.601	0.078	YFB, NL	+	+	0.391 (+)	0.097 (-)	0.111 (-)	0.983 (+)

Tablo 4.1. (Devam)

Örn. No	İlçe	Köy	Ortalama Ağırlık (g)		Simptom*	Mikroskopik inceleme**		ELISA Absorbans Değeri**			
			Bitki	Kök		<i>P. betae</i>	<i>Olpidium spp.</i>	BNYVV	BBSV	TNV	TMV
21	Polatlı	Kıranharmanı	0.473	0.026	NBG	+	-	0.198 (-)	0.100 (-)	0.123 (-)	0.198 (-)
22		Kıranharmanı	0.456	0.056	NL, HK	+	+	2.668 (+)	0.109 (-)	0.111 (-)	0.299 (-)
23		Kıranharmanı	0.610	0.044	NL, K	+	-	3.227 (+)	0.096 (-)	0.105 (-)	0.495 (+)
24		Kıranharmanı	0.622	0.045	HK	+	-	3.280 (+)	0.092 (-)	0.121 (-)	0.292 (-)
Toplam		11				11	7	9	0	0	3
25	Haymana	Kerpiç	0.419	0.054	HK	+	-	0.217 (-)	0.097 (-)	0.105 (-)	0.500 (+)
26		Saatli	1.591	0.091	HK	+	-	1.609 (+)	0.090 (-)	0.107 (-)	0.417 (-)
27		Durutlar	0.785	0.024	NBG	+	-	0.196 (-)	0.098 (-)	0.110 (-)	0.234 (-)
28		Sarıdeğirmen	0.425	0.024	NBG	+	+	0.185 (-)	0.100 (-)	0.121 (-)	0.298 (-)
29		Sarıdeğirmen	0.507	0.023	NBG	+	+	0.201 (-)	0.098 (-)	0.111 (-)	0.304 (-)
Toplam		5				5	2	1	0	0	1
İl Genel Toplam (% enfeksiyon)		29				29 (100)	19 (65.5)	23 (79.3)	0 (0)	0 (0)	8 (27.6)

*: NBG: Normal bitki gelişimi, HK: Hafif kloroz, K: Kloroz; M: Mozayik, HM: Hafif mozayik, NL: Nekrotik leke, YUNL: Yaprak ucunda nekrotik leke, YFB: Yapraklarda form bozukluğu

** : -: Etmen tespit edilmedi, + : Etmen tespit edildi.

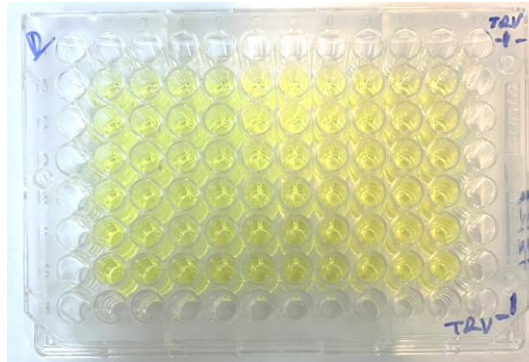
Tablo 4.2. Konya ili toprak örneklerinde tuzak bitki testi yöntemine göre yetiştirilen şeker pancarı bitkilerinde gözlenen semptomlar, *P. betae* ve *Olpidium* spp. ile bulaşıklık durumları ve BNYVV, BBSV, TNV ve TMV'ye ait ELISA sonuçları

Örn. No	İlçe	Köy	Ortalama Ağırlık (g)		Simptom*	Mikroskopik inceleme**		ELISA Absorbans Değeri**			
			Bitki	Kök		<i>P. betae</i>	<i>Olpidium</i> spp.	BNYVV	BBSV	TNV	TMV
30	Meram	Fidanlık	0.599	0.046	HK	+	-	3.507 (+)	0.093 (-)	0.105 (-)	0.478 (+)
	Toplam	1				1	0	1	0	0	1
31	Çumra	Güvercinlik	0.689	0,115	KL, K	+	+	3.302 (+)	0.098 (-)	0.103 (-)	0.659 (+)
32		Güvercinlik	0.605	0.115	HK, YUK, YİDK	+	+	2.130 (+)	0.092 (-)	0.115 (-)	0.528 (+)
33		Güvercinlik	1.384	0.058	K	+	+	0.457 (+)	0.100 (-)	0.103 (-)	0.309 (-)
34		Güvercinlik	1.187	0.268	HK, NL	+	+	0.987 (+)	0.099 (-)	0.118 (-)	0.596 (+)
35		Güvercinlik	0.481	0.087	NBG	+	+	3.407 (+)	0.093 (-)	0.118 (-)	0.238 (-)
36		Güvercinlik	1.268	0.275	NBG	+	+	0.204 (-)	0.100 (-)	0.112 (-)	0.417 (+)
37		Güvercinlik	0.372	0.031	HK	+	+	2.505 (+)	0.109 (-)	0.108 (-)	0.303 (-)
38		Güvercinlik	0.897	0.072	HK, Yİ	+	-	3.547 (+)	0.095 (-)	0.125 (-)	0.270 (-)
39		Fethiye	0.413	0.075	NL, HK	+	-	3.261 (+)	0.107 (-)	0.106 (-)	0.253 (-)
	Toplam	9				9	7	8	0	0	4
40	Yunak	Odabaşı	0.765	0.049	K, NL, YFB	+	+	1.482 (+)	0.102 (-)	0.115 (-)	0.347 (-)
41		Odabaşı	0.792	0.108	YSL	+	-	1.341 (+)	0.101 (-)	0.114 (-)	0.270 (-)
42		Odabaşı	0.466	0.049	NL, HK	+	+	0.635 (+)	0.093 (-)	0.108 (-)	0.331 (-)
43		Odabaşı	0.974	0.157	HK	+	-	2.578 (+)	0.090 (-)	0.108 (-)	0.402 (-)
44		Odabaşı	0.492	0.052	HK, YFB	+	+	0.906 (+)	0.097 (-)	0.114 (-)	0.309 (-)
45		Odabaşı	0.511	0.059	KL	+	+	1.354 (+)	0.101 (-)	0.108 (-)	0.426 (+)
46		Hacıfakılı	0.552	0.085	YSL, HK	+	-	1.025 (+)	0.118 (-)	0.120 (-)	0.776 (+)
47		Saray	0.529	0.095	NL, HK	+	-	1.714 (+)	0.098 (-)	0.122 (-)	0.186 (-)
48		Saray	0.339	0.021	M, NL	+	-	1.075 (+)	0.101 (-)	0.114 (-)	0.266 (-)
49		Saray	0.623	0.068	NBG	+	-	0.170 (-)	0.107 (-)	0.123 (-)	0.381 (-)
50		Saray	0.520	0.056	NL, HK	+	-	0.136 (-)	0.099 (-)	0.116 (-)	0.548 (+)
51		Saray	0.317	0.055	YUK, KL	+	-	0.163 (-)	0.103 (-)	0.113 (-)	0.240 (-)
52		Saray	1.026	0.137	YD, NL, K, YKRA	+	-	2.534 (+)	0.103 (-)	0.115 (-)	0.235 (-)
	Toplam	13				13	4	9	0	0	3
İl Genel Toplam (% Enfeksiyon)						23 (100)	11 (47.8)	18 (78.3)	0 (0)	0 (0)	8 (34.8)

*: NBG: Normal bitki gelişimi, HK: Hafif kloroz, K: Kloroz, KL: Klorotik leke, M: Mozayik, HM: Hafif mozayik, NL: Nekrotik leke, YUK: Yaprak ucunda kloroz, YFB: Yapraklarda form bozukluğu, Yİ: yapraklarda ipliksileşme, YSL: yapraklarda sarı leke, **: Etmen tespit edilmedi, +: Etmen tespit edildi, TE: Test edilmedi

TMV'nin bulunma durumunun ortaya konulması amacıyla yürütülen ELISA yöntemi sonucunda, incelenen örneklerin %30.8 (18 adet)'inin TMV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. İller bazında TMV'nin bulaşıklık durumu incelendiğinde ise; Ankara ilinde TMV ile bulaşıklık oranının %27.6, Konya ilinde ise bu oranının %34.8 olduğu saptanmıştır (Tablo 4.1, Tablo 4.2). Elde edilen bu sonuç, Türkiye şeker pancarı üretim alanlarında TMV'nin varlığının ilk kaydı niteliğini taşımaktadır.

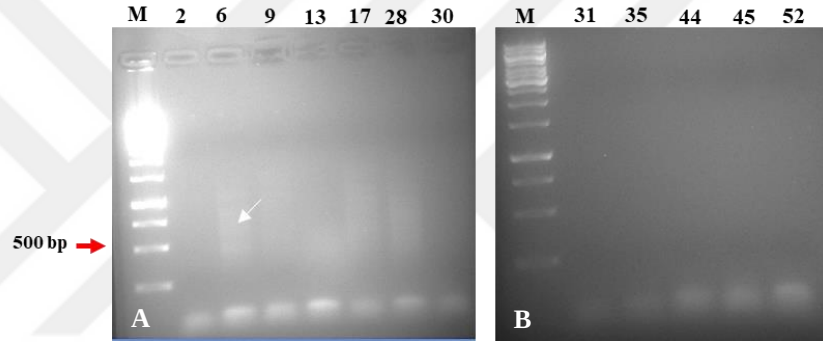
Diğer taraftan; TRV'e spesifik antiserum ile yürütülen ELISA çalışmasında, son aşama olan substrat ilavesini takiben negatif kontrollerde dahil olmak üzere testte kullanılan iki pleytin tüm kuyularında sararma oluşmuş (Şekil 4.4) ve bu sebeple ELISA sonuçlarının değerlendirilmesi mümkün olamamıştır (Tablo 4.1, Tablo 4.2). Enteresan olarak, eş zamanlı olarak yürütülen ve tamamen aynı tampon solüsyonlar ile örneklerin kullanıldığı TNV ve TMV'e spesifik antiserumlar ile gerçekleştirilen ELISA testlemelerinde ise böyle bir problem ile karşılaşılmamış, testler düzgün ve doğru bir şekilde çalışmıştır. Bu sebeple, problemin TRV antiserumundan kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu nedenle, bölge örneklerinde TRV'nin bulunma durumunun 12 örnekte RT-PCR yöntemi ile araştırılmasına karar verilmiştir. Ayrıca seçilen bazı örnekler test bitkilerine mekanik olarak inokule edilmiş ve bu örnekler hem simptomatolojik olarak hem de RT-PCR yöntemi ile incelenmiştir.



Şekil 4.4. TRV'ye spesifik antiserum ile yürütülen ELISA testi çalışmasında substrat ilavesini takiben tüm pleytte oluşan sararmanın görünümü

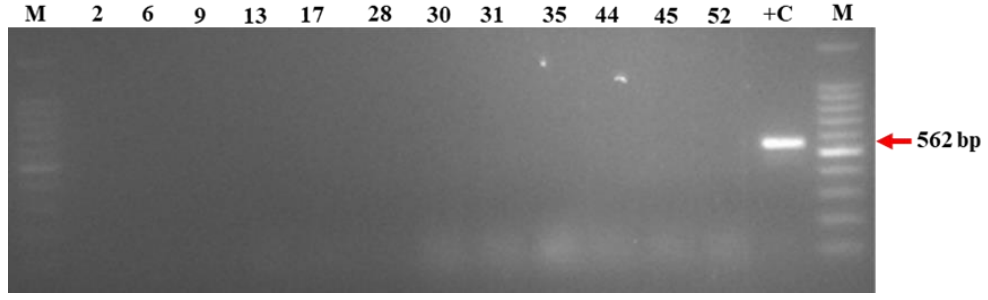
4.1.2. Tuzak Bitki Örneklerinde Tobacco ratte virus'un RT-PCR Yöntemi ile Araştırılması

İncelenen örneklerde TRV'nin bulunma durumunun araştırılması amacıyla yürütülen ELISA yönteminde yaşanan olumsuzluk nedeniyle, bu virüsün 12 örnekte RT-PCR yöntemi ile araştırılması yoluna gidilmiştir. Bu amaçla; cDNA sentezini takiben, Phusion High-Fidelity DNA Polymerase enzimi (Thermo Fisher Scientific) ve TRV'e spesifik primerler (TRV-F ve TRV-R) (Tablo 3.1) kullanılarak PCR çalışması yürütülmüştür. PCR ürünlerinin jel görüntüleme cihazında incelenmesi sonucunda; sadece 6 no'lu örnekte zayıf çoklu bant oluşumu içerisinde bu bölgeye spesifik olduğu düşünülen 600 bp civarında amplifikasyon ürünü gözlenmiş olup diğer incelenen örneklerde ise herhangi bir ürün oluşmamıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5.A-B. Seçilen örneklerde Tobacco rattle virus'un PCR yöntemi ile araştırılması [M: 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 2: Sinanlı-Ayaş, 6: Fasil-Beypazarı, 9: Bacı-Sincan, 13: Gırmeç-Sincan, 17: Beylikköprü-Polatlı, 28: Sarıdeğirmen-Haymana, 30: Fidanlık-Merem, 31: Güvercinlik-Çumra, 35: Güvercinlik-Çumra, 44: Odabaşı-Yunak, 45: Odabaşı-Yunak, 52: Saray-Yunak şeker pancarı kök örneklerinden elde edilen RNA]

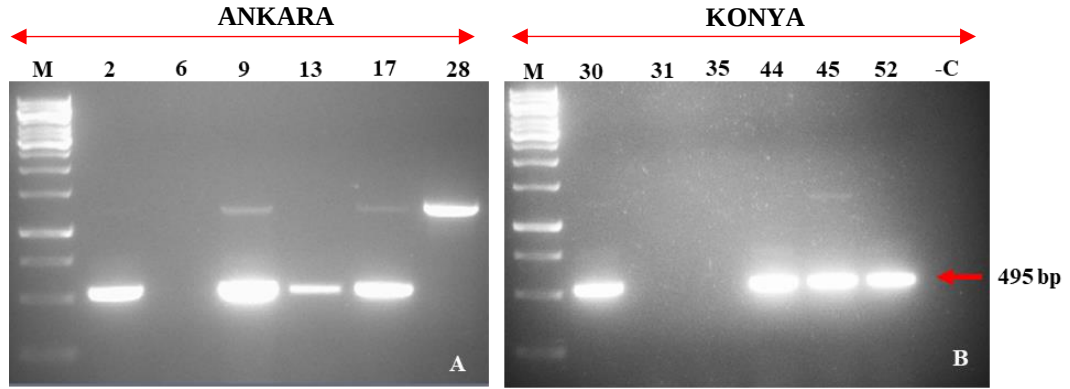
Daha sonra, Phusion High-Fidelity DNA Polymerase enzimi ile PCR çalışmalarına bazı örneklerde (2 ve 6 no'lu) farklı cDNA konsantrasyonları (0.5 µl, 2 µl ve 1 µl'nin 1/10 seyreltmesi) denenerek devam edilmiş, ancak pozitif bir sonuç sonuç alınamamıştır. Yaşanan bu olumsuzluktan dolayı çalışmalara Qiagen firmasının one step RT-PCR kiti kullanılarak devam edilmiştir. Ayrıca, TRV-pozitif olan patates örneği de kontrol amaçlı çalışmaya dahil edilmiştir. On iki örnekte gerçekleştirilen RT-PCR testlemeleri sonucunda; pozitif kontrol hariç incelenen örneklerin hiçbirisinde TRV için beklenen büyüklükte (562 bp) ürün elde edilememiştir (Şekil 4.6, Tablo 4.3).



Şekil 4.6. Tobacco rattle virus'un hareket proteinine spesifik primerler kullanılarak RT-PCR yöntemi ile araştırılması [M: 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 2: Sinanlı-Ayaş, 6: Fasıl-Beypazarı, 9: Bacı-Sincan, 13: Gırmeç-Sincan, 17: Beylikköprü-Polatlı, 28: Sarıdeğirmen-Haymana, 30: Fidanlık-Meram, 31: Güvercinlik-Çumra, 35: Güvercinlik-Çumra, 44: Odabaşı-Yunak, 45: Odabaşı-Yunak, 52: Saray-Yunak şeker pancarı kök örneklerinden elde edilen RNA; M: 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), + C: Pozitif kontrol (TRV ile bulaşık liyofilize patates örneğinden elde edilen RNA)]

4.1.3. Tuzak Bitki Örneklerinde Beet soil-borne virus'ün RT-PCR Yöntemi ile Araştırılması

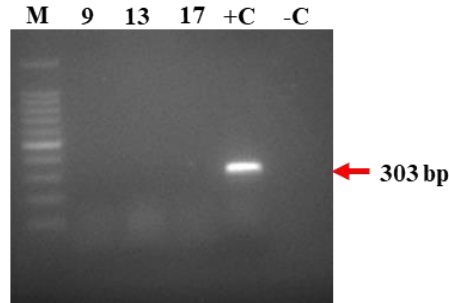
Konya ve Ankara illerine ait seçilen 12 örnekte BSBV'nin RT-PCR yöntemi ile araştırılmasında CP gen bölgesine spesifik primerler (BSBV/F ve BSBV/R) (Tablo 3.1) kullanılmıştır. Bu bölgenin çoğaltılmasında, RT-PCR çalışmaları iki basamaklı olarak yürütülmüştür. MMLV enzimi ile gerçekleştirilen RT aşamasından sonra; bu cDNA'lar ve Phusion High-Fidelity DNA Polymerase enzimi (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak PCR çalışması ile izolatların CP bölgesi çoğaltılmıştır. PCR ürünlerinin jel görüntüleme cihazı ile incelenmesi sonucunda; sekiz örnekte (2, 9, 13, 17, 30, 44, 45 ve 52 no'lu) 495 bp büyüklüğünde bu bölgeye spesifik ürün elde edilmiştir (Şekil 4.7). Diğer taraftan, 28 no'lu örnekte ise yaklaşık 1.250 bp büyüklüğünde non-spesifik bant oluşumu dikkat çekmiştir. Bu örnekte gözlenen non-spesifik bant oluşumu 9, 17 ve 45 no'lu örneklerde de spesifik bant ile birlikte (495 bp) gözlenmiştir. Böylelikle, Ankara ve Konya illerine ait incelenen 6'şar örneğin 4'ünün BSBV ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7, Tablo 4.3).



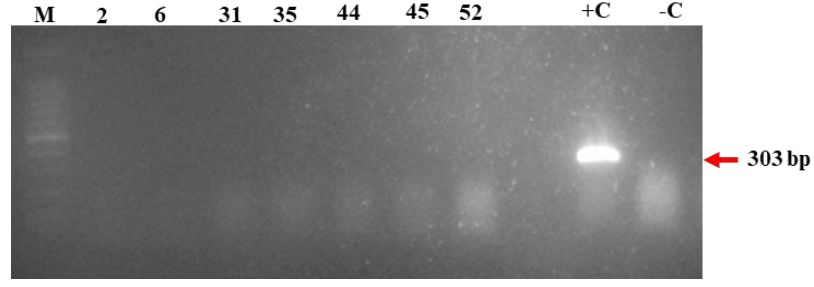
Şekil 4.7. A-B. Beet soil-borne virus izolatlarının kılıf protein gen bölgesinin RT-PCR yöntemi ile çoğaltılması [M: 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 2: Sinanlı-Ayaş, 6: Fasil-Beypazarı, 9: Bacı-Sincan, 13: Gırmeç-Sincan, 17: Beylikköprü-Polatlı, 28: Sarıdeğirmen-Haymana, 30: Fidanlık-Meram, 31: Güvercinlik-Çumra, 35: Güvercinlik-Çumra, 44: Odabaşı-Yunak, 45: Odabaşı-Yunak, 52: Saray-Yunak şeker pancarı kök örneklerinden elde edilen RNA; - C: Negatif kontrol (sağlıklı şeker pancarı kökünden elde edilen RNA)]

4.1.4. Tuzak Bitki Örneklerinde Beet black scorch virus'ün RT-PCR Yöntemi ile Araştırılması

Bu çalışmada ELISA testi sonuçları negatif olmasına rağmen; şeker pancarı bitkilerinin köklerinde BBSV'ün daha hassas bir teknik olan RT-PCR yöntemi ile de araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, BBSV'e spesifik primerler kullanılarak yürütülen tek basamaklı olarak gerçekleştirilen RT-PCR çalışması sonucunda incelenen 10 örneğin (2, 6, 9, 13, 17, 31, 35, 44, 45 ve 52 no'lu) hiçbirinde pozitif kontrolde gözlenen ve BBSV'nin 3' UTR bölgesine spesifik 303 bp büyüklüğünde bant elde edilememiştir (Şekil 4.8-Şekil 4.9, Tablo 4.3).



Şekil 4.8. Beet black scorch virus'ün RT-PCR yöntemi ile araştırılması [M: 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 9: Bacı-Sincan, 13: Gırmeç-Sincan, 17: Beylikköprü-Polatlı şeker pancarı kök örneklerinden elde edilen RNA; + C: Pozitif kontrol (BBSV ile bulaşık liyofilize *C. quinoa* yaprak örneğinden elde edilen RNA); - C: Negatif kontrol (sağlıklı şeker pancarı kökünden elde edilen RNA)]



Şekil 4.9. Beet back scorch virus'un RT-PCR yöntemi ile araştırılması [M: 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 2: Sinanlı-Ayaş, 6: Fasıl-Beypazarı, 31: Güvercinlik-Çumra, 35: Güvercinlik-Çumra, 44: Odabaşı-Yunak, 45: Odabaşı-Yunak, 52: Saray-Yunak şeker pancarı kök örneklerinden elde edilen RNA; + C: Pozitif kontrol (BSBV ile bulaşık liyofilize *C. quinoa* yaprak örneğinden elde edilen RNA); - C: Negatif kontrol (sağlıklı şeker pancarı kökünden elde edilen RNA)]

Tablo 4.3. Tuzak bitki kök örneklerinde TRV, BSBV ve BBSV'ün bulunma durumunun RT-PCR yöntemi ile araştırılması

İl	İlçe	Köy	Örn. No	TRV	BSBV	BBSV
Ankara	Ayaş	Sinanlı	2	-	+	-
	Beypazarı	Fasıl	6	-	-	-
	Sincan	Bacı	9	-	+	-
	Sincan	Girmeç	13	-	+	-
	Polatlı	Beylikköprü	17	-	+	-
	Haymana	Sarıdeğirmen	28	-	-	TE
Toplam	5	6	6	0	4	0
Konya	Meram	Fidanlık	30	-	+	TE
	Çumra	Güvercinlik	31	-	-	-
	Çumra	Güvercinlik	35	-	-	-
	Yunak	Odabaşı	44	-	+	-
	Yunak	Odabaşı	45	-	+	-
	Yunak	Saray	52	-	+	-
Toplam		4	6	0	4	0
Genel Toplam		10	12	0	8	0
(% Enfeksiyon)				(0)	(66.7)	(0)

TE: Test edilmedi

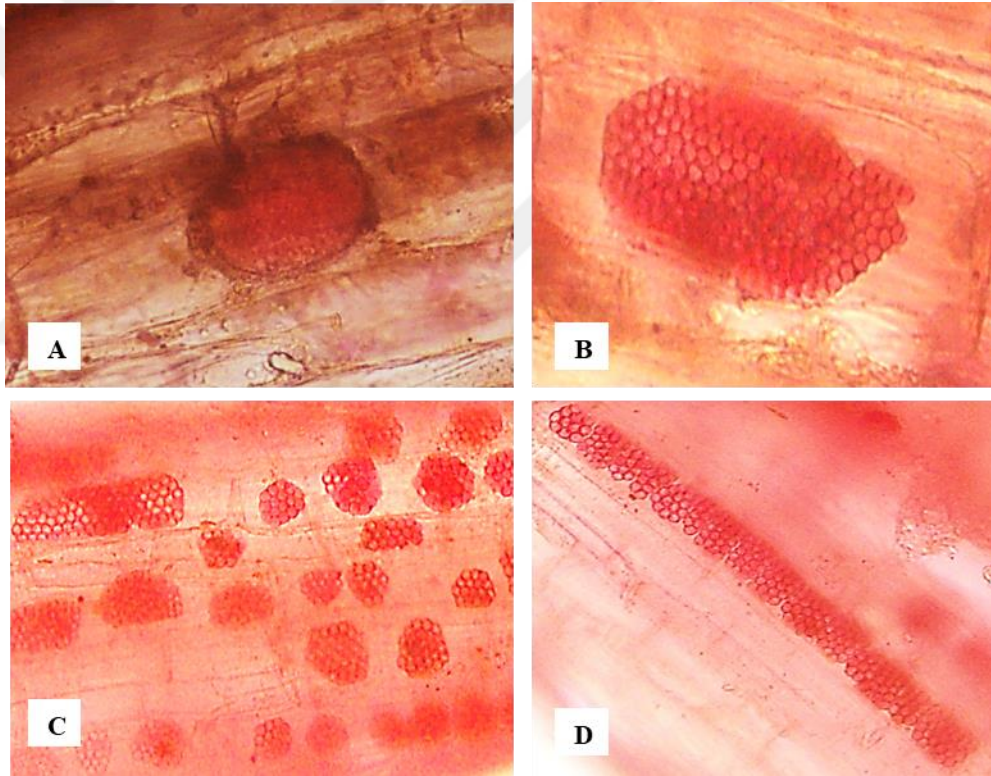
Bu çalışmada şeker pancarı tuzak bitki örneklerinin test edilmesi sonucunda, Ankara ilinde incelenen 29 örneğin 14'ünün BNYVV, 2'sinin TMV, 3'ünün BNYVV+BSBV, 5'inin BNYVV+TMV ve 1'inin ise BNYVV+BSBV+TMV ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. Konya ilinde ise incelenen toplam 23 örneğin 11'inin BNYVV, 2'sinin TMV, 2'sinin BNYVV+BSBV, 4'ünün BNYVV+TMV ve 2'sinin ise BNYVV+BSBV+TMV ile enfekteli oldukları saptanmıştır. Her iki ilde de incelenen örneklerde tek olarak BSBV enfeksiyonuna rastlanılmamıştır (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Ankara ve Konya illerine ait toprak örneklerinin tekli ve karışık virüs ile bulaşıklık durumları

İl	İlçe	İncelenen örnek sayısı	BNYVV	BSBV	TMV	BNYVV+BSBV	BNYVV+TMV	BNYVV+BSBV+TMV
Ankara	Ayaş	5	2	0	0	0	2	1
	Beyşehir	3	2	0	0	0	1	0
	Sincan	5	3	0	0	2	0	0
	Polatlı	11	6	0	1	1	2	0
	Haymana	5	1	0	1	0	0	0
Toplam	5	29	14	0	2	3	5	1
Konya	Meram	1	0	0	0	0	0	1
	Çumra	9	5	0	1	0	3	0
	Yunak	13	6	0	1	2	1	1
Toplam	3	23	11	0	2	2	4	2
Genel toplam (% enfeksiyon oranı)		52	25 (48.08)	0	4 (7.69)	5	9 (17.30)	3

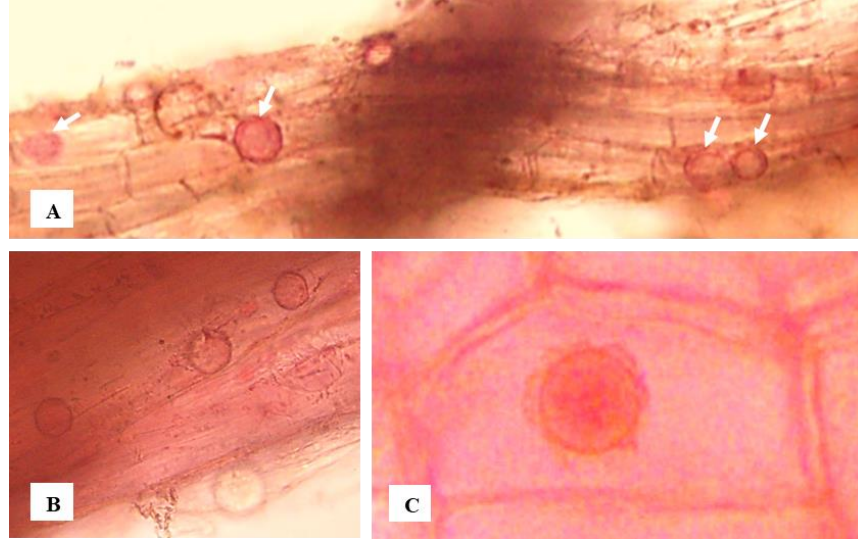
4.1.5. Tuzak Bitki Köklerinde Vektör *Polmyxa betae* ve *Olpidium spp.*'nin Belirlenmesi

Çalışmanın bu parçasında Yöntem 3.2.4'de izah edildiği şekilde ışık mikroskobu altında, şeker pancarı bitkilerinin kılcal köklerinde, bu çalışmada incelenen BNYVV ve BBSV'nin vektörü *P. betae* ile BBSV ve TNV'ün vektörü olan *Olpidium spp.*'nin dinlenme spor yapıları araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda; incelenen toplam 52 adet örneğin tamamının köklerinde bal peteği görünümünde *P. betae*'nin dinlenme spor yapılarının varlığı belirlenmiştir (Şekil 4.10, Şekil 4.12). *P. betae* ile bulaşık örneklerin %78.8 (41 adet)'inin viruliferous (virüs taşıyan) olduğu yapılan ELISA testleri sonucu ortaya konulurken, %21.2 (11 adet)'i ise aviruliferous olarak saptanmıştır (Tablo 4.1, Tablo 4.2).

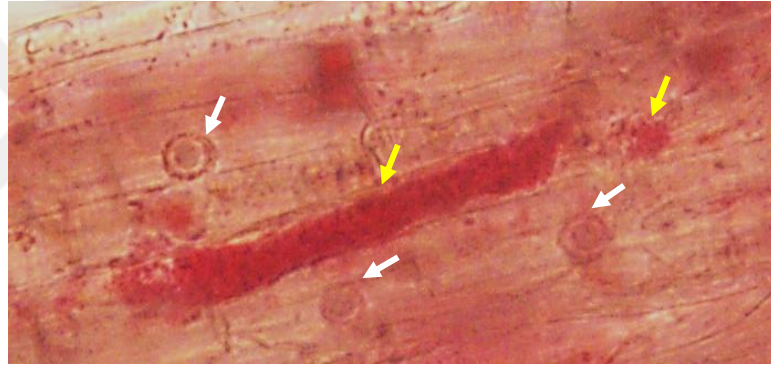


Şekil 4.10. Işık mikroskobu altında şeker pancarı bitkilerinin kılcal kök hücrelerinde belirlenen bal peteği şeklindeki *Polmyxa betae*'nin zoosporangium (A) ve dinlenme spor yapılarının görünümleri (B, C ve D)

Beet black scorch virus ve TNV'nin vektörü olan *Olpidium spp.*'nin dinlenme spor yapıları ise incelenen 52 örneğin 30 (%57.7)'unun köklerinde tespit edilmiştir (Şekil 4.11, Şekil 4.12) (Tablo 4.1, Tablo 4.2).



Şekil 4.11. Işık mikroskobu altında şeker pancarı bitkilerinin kılcal köklerinde belirlenen *Olpidium* spp.'ye ait dinlenme spor yapılarının görünüşleri (A, B ve C)



Şekil 4.12. Işık mikroskobu altında şeker pancarı köklerinde *P. betae* (sarı ok ile işaretli) ve *Olpidium* spp. (beyaz ok ile işaretli)'ye ait dinlenme spor yapılarının birlikte görünüşleri

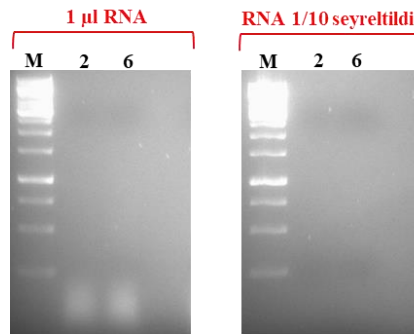
Ayrıca, kök boyaması çalışmalarında Ankara iline (Durutlar/Haymana) ait 27 no'lu örneğin köklerinde *P. betae*'nin dinlenme spor yapılarına ilaveten *Cyanobacteria* spp. (mavi-yeşil alg)'nin de bulunduğu belirlenmiş (Şekil 4.13) olup bu örnekte BNYVV efeksiyonu tespit edilmemiştir. Bu türün teşhisi ise, Giresun Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden Prof. Dr. Elif Neyran Soylu tarafından gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.13. Şeker pancarı bitkilerinin kökünde belirlenen *Cyanobacteria* spp.'nin ışık mikroskobu altında görünümü

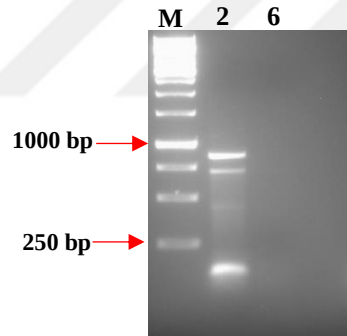
4.1.6. Tuzak Bitki Örneklerinde Tobacco mosaic virus'un RT-PCR Yöntemi ile Araştırılması

Bu tez çalışması ile ilk olarak, ülkemizin önemli şeker pancarı üretim alanlarını içeren Ankara ve Konya illerinde TMV'nin bulunma durumu ELISA yöntemi ile ortaya konulmuştur. Virüsün varlığının RT-PCR yöntemi ile de belirlenmesi amacıyla; BSBV'nin araştırılması için seçilen örnekler içerisinde TMV ile de bulaşık olduğu ELISA ile saptanan Ankara iline ait iki örnekte (2 ve 6 no'lu) Tobamovirüs'lere spesifik primer çifti (Tablo 3.1) kullanılarak tek aşamalı RT-PCR (Qiagen) çalışması yürütülmüştür. Ancak, RT-PCR sonrası incelenen jelde doğrudan ya da 1/10 oranında RNA'nın sulandırılması yolu ile oluşturulan reaksiyonlarda herhangi bir bant oluşumu gözlenmemiştir (Şekil 4.14).



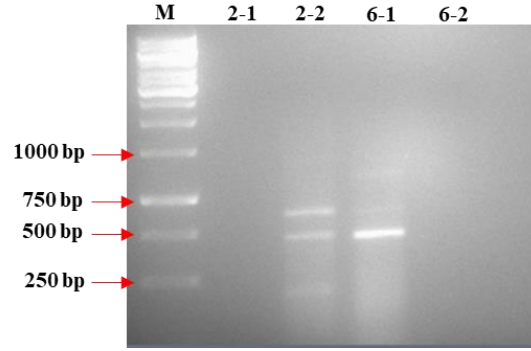
Şekil 4.14. Şeker pancarı bitkileri köklerinden elde edilen toplam RNA'lar kullanılarak TMV'nin RT-PCR yöntemi ile araştırılması [M: 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 2: Ayaş-Ankara, 6: Beypazarı-Ankara iline ait şeker pancarı kök örneklerinden elde edilen RNA]

Ardından, iki aşamalı RT-PCR yönteminin denenmesi ile çalışmalara devam edilmiştir. Bu amaçla; öncelikle Ankara (2 ve 6 no'lu) ve Konya (31 ve 45 no'lu) illerine ait TMV ile bulaşık 2'şer adet örnek seçilmiş, cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Takiben, öncelikle Ankara iline ait örneklerde (2 ve 6 no'lu) Phusion High-Fidelity DNA Polymerase enzimi (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak PCR çalışması yürütülmüştür. Bu çalışmada PCR reaksiyonu; 2 µl 5XGC Buffer, 0.2 µl dNTP mix (10 mM), primerlerin her birinden 0.5 µl (10 µM), 0.3 µl DMSO, 0.1 µl Phusion High-Fidelity DNA Polymerase enzimi, 5.3 µl RNase-free su ve 1 µl cDNA'den oluşmuştur. Amplifikasyonlar Bio-Rad thermocycler'da; 98°C'de 30 s başlangıç denatürasyon aşamasını takiben, 35 döngü olacak şekilde; 98°C'de 10 s, 61°C'de 30 s, 72°C'de 30 s ve 1 döngü 72°C'de 5 dk ile bitirilmiştir. PCR ürünlerinin jel görüntüleme cihazında incelenmesi sonucunda; 2 no'lu örnekte Tobamovirus'ler için beklenen büyüklükte (1.052 bp) bant oluşumu görülmemiş, ancak 1000 bp'in altında çoklu bant oluşumu gözlenirken, 6 no'lu örnekte ise herhangi bir bant oluşumu tespit edilememiştir (Şekil 4.15).



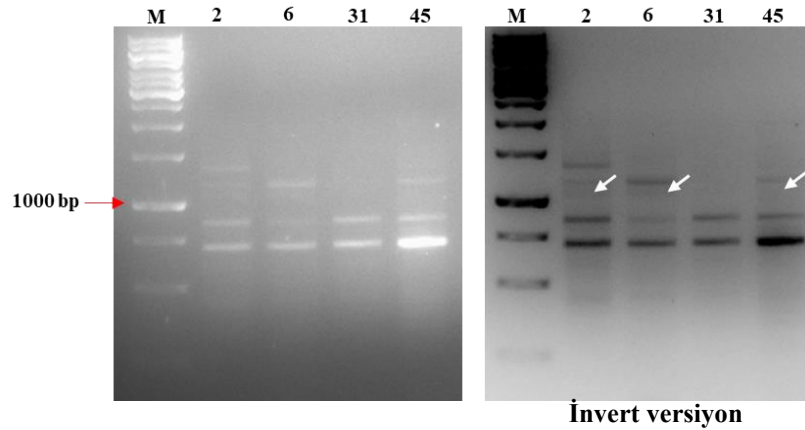
Şekil 4.15. Şeker pancarı bitkileri köklerinde TMV'nin PCR yöntemi ile araştırılması [M: 1 kp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 2: Ayaş-Ankara, 6: Beypazarı-Ankara iline ait şeker pancarı kök örneklerinden elde edilen RNA]

Daha sonra, her iki örnekte (2 ve 6 no'lu) cDNA konsantrasyonu düşürülerek (10 µl'lik PCR reaksiyonu için 0.5 µl cDNA ya da 1/10 seyreltilen cDNA'dan 1 µl alınarak) yukarıda belirtildiği şekilde PCR çalışması tekrar edilmiştir. Bunun sonucunda ise, bir önceki çalışmaya benzer şekilde non-spesifik bant oluşumları görülmesine rağmen (2-2 ve 6-1'de), Tobamovirus'lere spesifik beklenen büyüklükte (1.052 bp) PCR ürünü elde edilememiştir (Şekil 4.16).



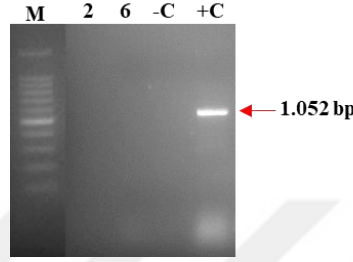
Şekil 4.16. Şeker pancarı köklerinden TMV'nin PCR yöntemi ile araştırılması [M: 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 2-1: 2 no'lu örnek-0.5 µl cDNA, 2-2: 2 no'lu örnek-1/10 seyreltilen cDNA'dan 1 µl, 6-1: 2 no'lu örnek-0.5 µl cDNA, 6-2: 2 no'lu örnek-1/10 seyreltilen cDNA'dan 1 µl]

Sonrasında, PCR şartlarında birtakım değişiklikler yapılarak dört örnekte (2, 6, 31 ve 45 no'lu) Phusion High-Fidelity DNA Polymerase enzimi kullanılarak çalışmalara devam edilmiştir. Bu çalışmada PCR reaksiyonu; 2 µl 5XHF Buffer, 0.2 µl dNTP mix (10 mM), primerlerin her birinden 0.4 µl (10 µM), 0.1 µl Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, 5.9 µl RNase-free su ve 1 µl 1/10 oranında seyreltilmiş cDNA'den oluşmuştur. Amplifikasyonlar Bio-Rad thermocycler'da; 98°C'de 30 s'yi takiben, 30 döngü olacak şekilde; 98°C'de 10 s, 60.9°C'de 10 s, 72°C'de 45 s ve 1 döngü 72°C'de 5 dk ile tamamlanmıştır. Bu uygulama sonucunda ise; incelenen üç örnekte (2, 6 ve 45 no'lu) çoklu oluşan bantların içerisinde Tobamovirus'lere spesifik 1.052 bp büyüklüğünde çok zayıf bant oluşumu dikkat çekmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Şeker pancarı kök örneklerinde TMV'nin PCR yöntemi ile araştırılması [M: 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 2: Ayaş-Ankara, 6: Beypazarı-Ankara, 31: Çumra-Konya, 45: Yunak-Konya iline ait şeker pancar kök örnekleri] (jelin orjinal ve invert görünümü birlikte verilmiştir)

Bu çalışmada elde edilen olumsuz sonuçların ardından, TMV ile bulaşık bitkisel materyel temin edilerek, RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve araştırmaya pozitif kontrol olarak dahil edilmiştir. Yürütülen RT-PCR testi sonucunda, pozitif kontrolde Tobamovirüs'lere spesifik bant oluşumu gözlenmiş, fakat incelenen her iki örnekte de 1.052 bp büyüklüğünde bant elde edilmemiştir (Şekil 4.18). Sonuç olarak; incelenen örneklerde TMV ELISA yöntemi ile tespit edilmesine rağmen, RT-PCR yöntemi ile TMV'nin çoğaltımı sağlanamamıştır.



Şekil 4.18. Şeker pancarı kök örneklerinde TMV'nin RT-PCR yöntemi ile araştırılması [M: 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), 2: Ayaş-Ankara, 6: Beypazarı-Ankara iline ait şeker pancar kök örneklerinden elde edilen RNA, + C: Pozitif kontrol (TMV ile bulaşık bitkiden elde edilen RNA), - C: Negatif kontrol (sağlıklı şeker pancarı kökünden elde edilen RNA)]

4.1.7. Biyolojik Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular

4.1.7.1. TMV ile İlgili Yürütülen Biyolojik Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular

Bu tez çalışmasında, ELISA yöntemi ile incelenen toplam 52 örneğin 16'sında (%30.8) TMV enfeksiyonu tespit edilmiştir. TMV-pozitif örneklerin; dördünde TMV'nin tek olarak enfeksiyon oluşturduğu (19, 25, 36 ve 50 no'lu) saptanmış olup dokuzunda ise TMV+BNYVV ikili virüs enfeksiyonu (3, 5, 6, 20, 23, 31, 32, 34 ve 46 no'lu örnekler) tespit edilmiştir. Öte yandan; TMV+BNYVV+BSBV üçlü enfeksiyonu ise üç örnekte (2, 30 ve 45 no'lu) belirlenmiştir. Bu çalışma ile ülkemiz şeker pancarı üretim alanlarında TMV'nin ilk olarak tespit edilmesi nedeniyle; yürütülen biyolojik çalışmalarla virüsün konukçu çevresinin araştırılması yoluna gidilmiştir. Bu amaçla; öncelikle, 19 ve 25 no'lu toprak örneklerinde yetiştirilen ve sadece TMV ile bulaşık olduğu saptanan şeker pancarı (Şekil 4.13) köklerinden elde edilen bitki özsuvarı altı farklı test bitkisine (*B. vulgaris* cv. Smart Briga, *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana benthamiana*, *N. rustica*, domates ve biber) mekanik olarak inokule edilmiştir. Ardından, bu bitkiler iklim odası şartlarında yetiştirilmiş ve virüs inokülasyonunu takiben üç hafta içerisinde oluşan lokal ve sistemik belirtiler kayıt edilmiştir (Tablo 4.5).



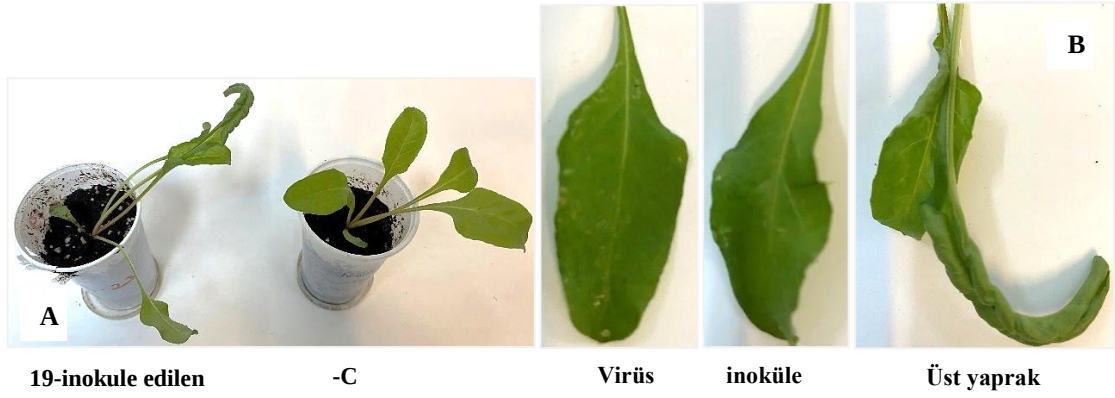
Şekil 4.19. Tobacco mosaic virus'un biyolojik karakterizasyonu için seçilen ve sadece TMV ile enfekteli olarak belirlenen 19 no'lu (ELISA absorbens değeri: 0.856) (A) ve 25 no'lu toprak örneğinde (ELISA absorbens değeri: 0.500) (B) yetiştirilen şeker pancarı bitkilerinde gözlenen hafif kloroz belirtisinin görünümü

Üç haftalık peryot sonunda; herbir test bitkisinin virüs-inokule edilen ve virüs-inokule edilmeyen üst yapraklarından örnekleme yapılmıştır. Ardından, bu örnekler ELISA ile testlenerek TMV enfeksiyonu araştırılmıştır. Her ne kadar, bazı test bitkilerinin hem TMV-inoküle edilen, hem de TMV-inokulasyonu yapılmayan üst yapraklarında virüs benzeri belirtiler gözlenmesine rağmen (Şekil 4.20-Şekil 4.31); TMV'ye spesifik antiserum kullanılarak yürütülen ELISA testlemeleri sonucunda; incelenen test bitkilerinin tamamında TMV enfeksiyonu tespit edilememiştir (Tablo 4.5).

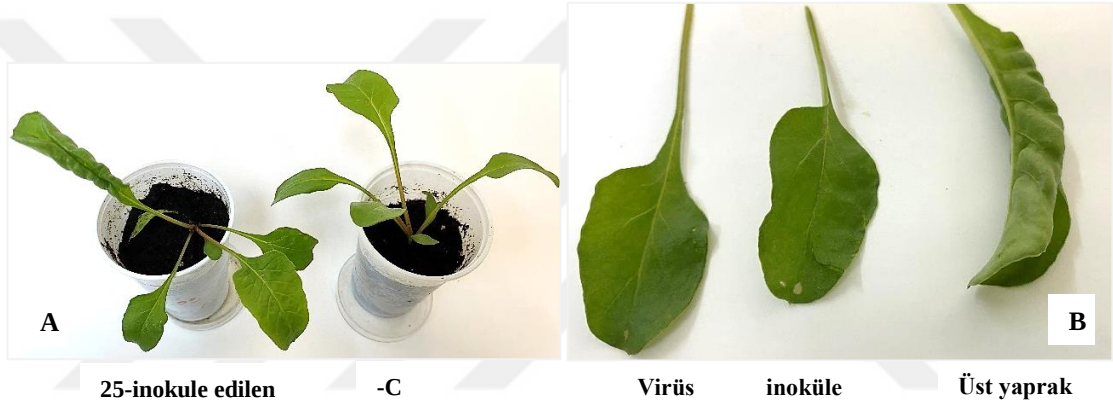
Tablo 4.5. Tobacco mosaic virus'un biyolojik karakterizasyonu için seçilen ve sadece TMV ile enfekteli olarak belirlenen 19 no'lu ve 25 no'lu şeker pancarı kök örneklerinin test bitkilerine aktarımı sonucu bu bitkilerde gözlenen belirtiler ve ELISA testi sonuçları

Test Bitkileri	19 NO'LU ÖRNEK				25 NO'LU ÖRNEK			
	Lokal simptom*	TMV	Sistemik simptom*	TMV	Lokal simptom	TMV	Sistemik simptom	TMV
<i>B. vulgaris</i> cv. Smart Briga	KLL	0.102	YK	0.101	YFB	0.098	YK	0.100
<i>C. quinoa</i>	KLL	0.105	SY	0.107	DA	0.102	SY	0.101
<i>N. benthamiana</i>	KLL	0.111	SY	0.107	KL	0.099	SY	0.103
<i>N. rustica</i>	NLL	0.102	YHB	0.104	NLL	0.104	HKL	0.102
<i>S. lycopersium</i>	NLL, YFB	0.104	SY	0.104	YFB	0.101	SY	0.106
<i>C. annuum</i>	SY	0.101	SY	0.108	SY	0.110	HB	0.110

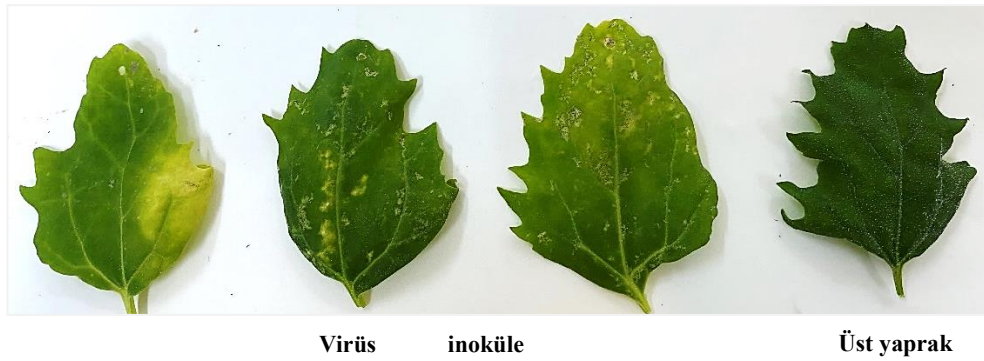
*HKL: Hafif klorotik leke, KLL: Klorotik lokal leke, NLL: Nekrotik lokal leke, YFB: Yapraklarda form bozukluğu, YK: yapraklarda kıvrılma, YDA: Yaprak damarlarında renk açılması, YHB: Yapraklarda hafif bombe, SY: Simptom yok



Şekil 4.20. 19 no'lu kök örneğinin şeker pancarı bitkisine (cv. Smart Briga) mekanik inokulasyonu sonrası sağlıklı kontrol (-C) ve inokule edilen bitkinin genel görünümü (A). Virus-inokule edilen yapraklarda gözlenen klorotik lokal lezyonlar ve üst yapraklarda inokulasyondan üç hafta sonra oluşan kıvrılma görünümü (B)



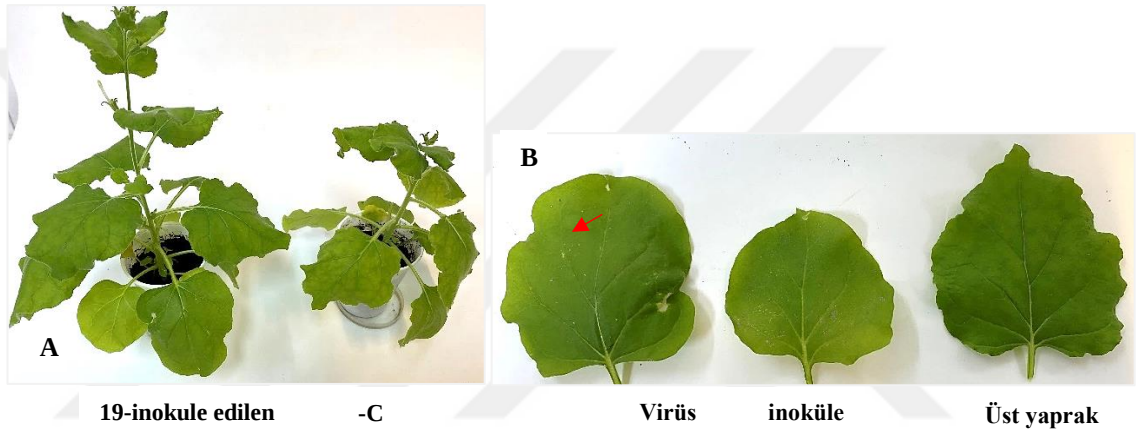
Şekil 4.21. 25 no'lu kök örneğinin şeker pancarı bitkisine (cv. Smart Briga) mekanik inokulasyonu sonrası sağlıklı kontrol (-C) ve inokule edilen bitkinin genel görünümü (A). Virus-inokule edilen yapraklarda gözlenen klorotik lokal lezyonlar ve üst yapraklarda inokulasyondan üç hafta sonra oluşan kıvrılma görünümü (B)



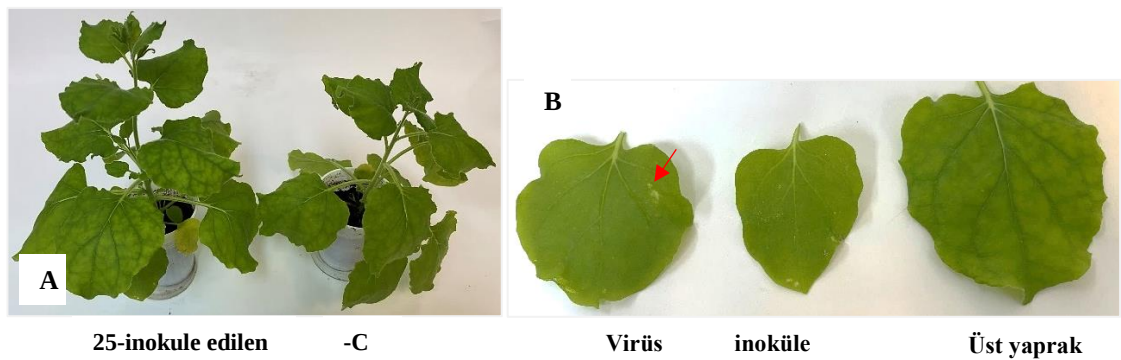
Şekil 4.22. 19 no'lu şeker pancarı kök örneğinin *Chenopodium quinoa* bitkisine mekanik inokulasyonu sonrası virus-inokule edilen yapraklarda gözlenen klorotik lokal lezyonlar



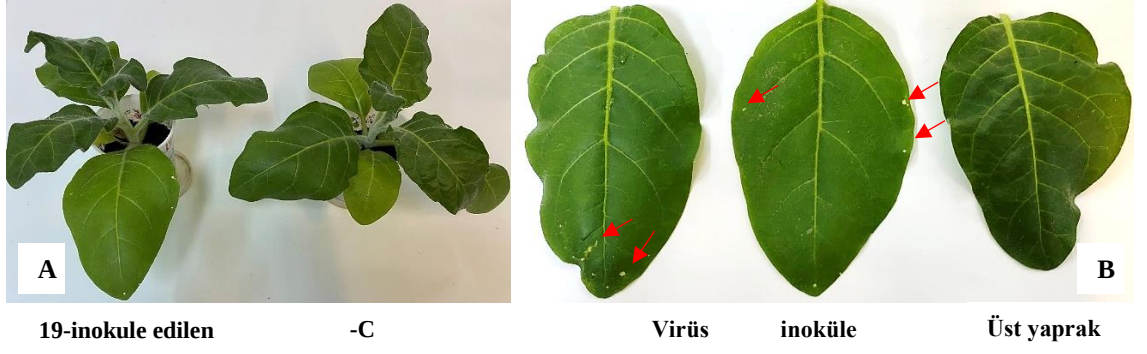
Şekil 4.23. 25 no'lu şeker pancarı kök örneğinin *Chenopodium quinoa* bitkisine mekanik inokulasyonu sonrası virus-inokule edilen yapraklarda gözlenen damar açılmaları



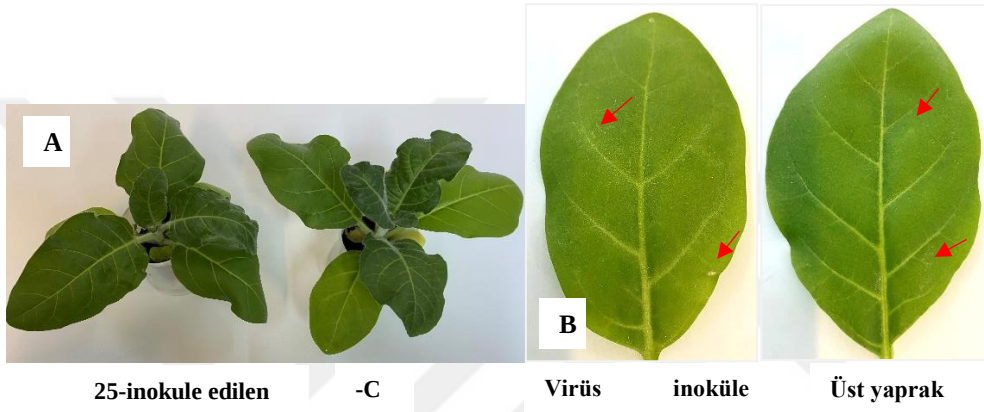
Şekil 4.24. 19 no'lu şeker pancarı kök örneğinin *Nicotiana benthamiana* bitkisine mekanik inokulasyonu sonrası sağlıklı kontrol (-C) ve inokule edilen bitkinin genel görünümü (A) ve virus-inokule edilen bitkilerin yapraklarında gözlenen klorotik lokal lezyonlar (B)



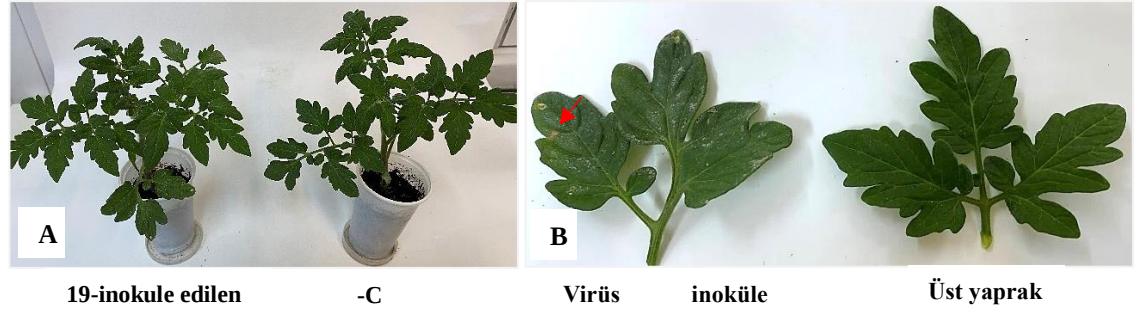
Şekil 4.25. 25 no'lu şeker pancarı kök örneğinin *Nicotiana benthamiana* bitkisine mekanik inokulasyonu. Virus-inokule edilen üst yapraklarda inokulasyondan üç hafta sonra oluşan kıvrılma görünümü (A) ve inokule edilen yapraklarda gözlenen klorotik lokal lezyonlar (B)



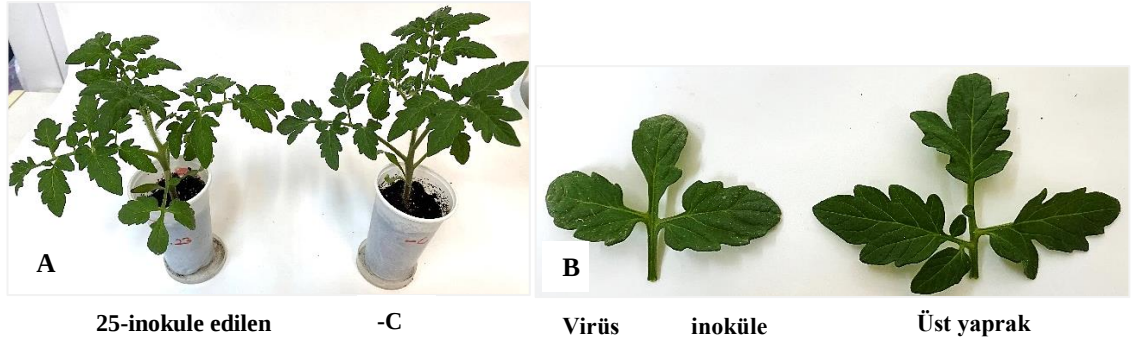
Şekil 4.26. 19 no'lu şeker pancarı kök örneğinin *Nicotiana rustica* bitkisine mekanik inokulasyonu sonrasında sağlıklı kontrol (-C) ve inokule edilen bitkinin genel görünümü (A) ve virus-inokule edilen yapraklarda gözlenen klorotik lokal lezyonlar (B)



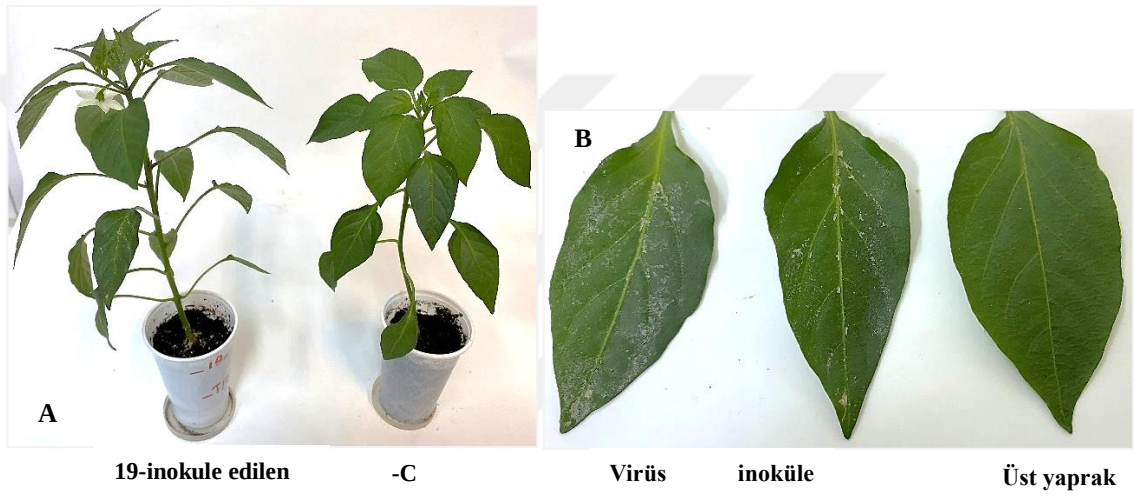
Şekil 4.27. 25 no'lu şeker pancarı kök örneğinin *Nicotiana rustica* bitkisine mekanik inokulasyonu sonrasında sağlıklı kontrol (-C) ve bu bitkinin genel görünümü (A) ve virus-inokule edilen yapraklarda inokulasyondan üç hafta sonra oluşan hafif klorotik lekeler (B)



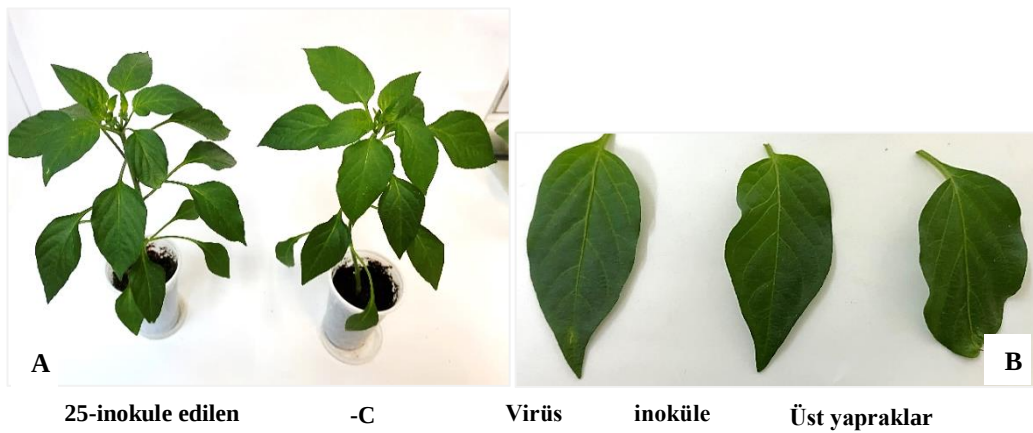
Şekil 4.28. 19 no'lu şeker pancarı kök örneğinin domates bitkisine mekanik inokulasyonu sonrasında bu bitkinin ve kontrol bitkisinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen yapraklarında gözlenen klorotik lokal lezyonlar ve üst yapraklarda inokulasyondan üç hafta sonra oluşan hafif bombeleşme (B)



Şekil 4.29. 25 no'lu şeker pancarı kök örneğinin domates bitkisine mekanik inokulasyonu sonrasında bu bitkinin ve kontrol bitkinin genel görünüşleri (A) ile virus-inokule edilen yapraklarında gözlenen klorotik lokal lezyonlar ile üst yapraklarda inokulasyondan üç hafta sonra oluşan hafif bombenin görünümü (B)

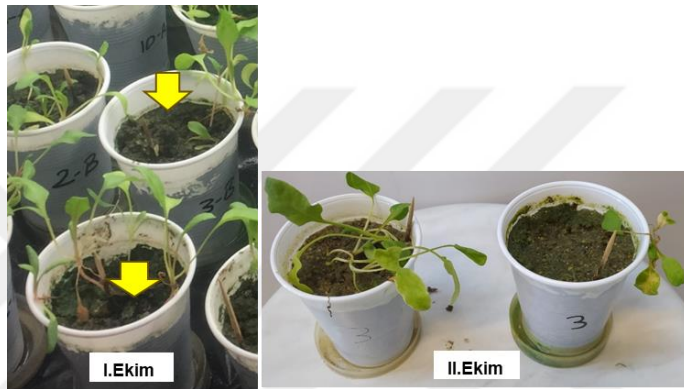


Şekil 4.30. 19 no'lu şeker pancarı kök örneğinin biber bitkisine mekanik inokulasyonu sonrasında sağlıklı kontrol ve bu bitkinin genel görünüşleri (A) ile virus-inokule edilen yapraklarında gözlenen klorotik lokal lezyonlar ile üst yapraklarda inokulasyondan üç hafta sonra oluşan hafif bombe oluşumunun görünümü (B)



Şekil 4.31. 25 no'lu şeker pancarı kök örneğinin biber bitkisine mekanik inokulasyonu sonrasında sağlıklı kontrol ve bu bitkinin genel görünüşleri (A) ile virus-inokule edilen yapraklarında gözlenen klorotik lokal lezyonlar ile üst yapraklarda inokulasyondan üç hafta sonra oluşan hafif bombe oluşumunun görünümü (B)

Daha sonra TMV ile ilgili mekanik inokulasyon çalışmalarına, şeker pancarı köklerinin yüksek oranda inhibitör madde içermesi nedeniyle bu bitkinin kök yerine, yaprak örneklerine ait zsular kullanılarak devam edilmiştir. Bu amaçla, 3 no’lu toprak örneğinde yetiştirilen ve ELISA ile TMV+BNYVV (ELISA absorbans değeri; TMV: 1.106, BNYVV: 2.839) ile enfekteli olduğu belirlenen pancarların (şekil 4.32) yapraklarına ait bitki özsuyu seçilen indikatör bitkilere inoküle edilmiş ve iki haftalık sürecin ardından, test bitkilerinde oluşan simptomlar kayıt edilerek (Tablo 4.6), fotoğrafları çekilmiştir (şekil 4.33-şekil 4.38).



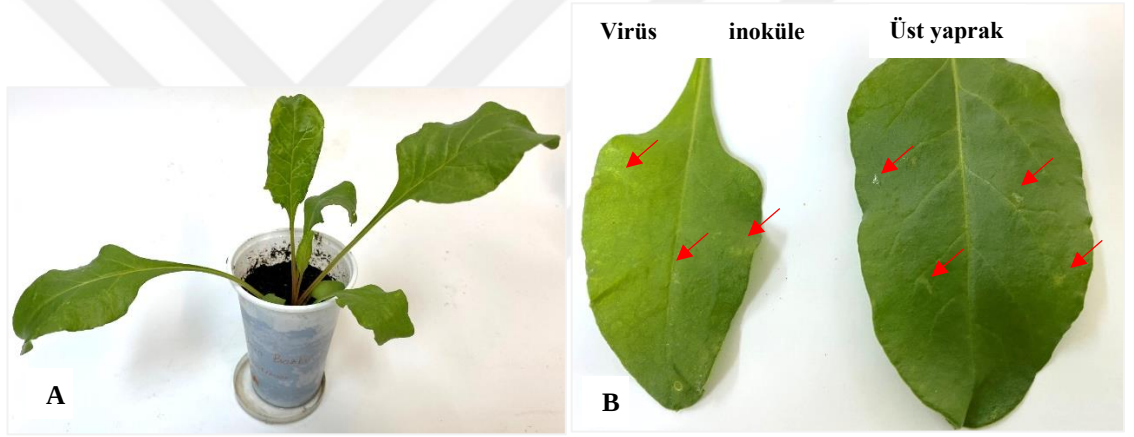
şekil 4.32. Tobacco mosaic virus’un biyolojik karakterizasyonu için seçilen ve TMV+BNYVV ile enfekteli olarak belirlenen 3 no’lu toprak örneğinde yetiştirilen şeker pancarı bitkilerinin genel görünümleri (I. Ekim ve II. Ekim)

Test bitkilerinde gözlenen simptomların TMV ve/ya da BNYVV enfeksiyonundan kaynaklandığını teyit etmek amacıyla; her bir test bitkisinin virüs-inokule edilen ve virüs-inokulasyonu yapılmayan birer yaprağı alınarak hem TMV, hem de BNYVV için ELISA ile test edilmiştir. Ancak, incelenen test bitkilerinin tamamının hem virüs-inoküle edilen, hem de edilmeyen st yapraklarında TMV enfeksiyonu tespit edilememiştir. Bununla birlikte; rnekler BNYVV yönünden irdelendiğinde ise, sadece *C. quinoa* bitkisinin virüs inokülasyonu yapılmayan st yapraklarında BNYVV’nin ELISA absorbans değerinin negatif kontrolün absorbans değerinin iki katını aştığı görülmüş (0.456) ve böylelikle bu bitkide BNYVV’nin sistemik enfeksiyon oluşturduğu ortaya konulmuştur (şekil 4.28; Tablo 4.6). İncelenen diğer test bitkilerinde ise BNYVV enfeksiyonu da belirlenememiştir.

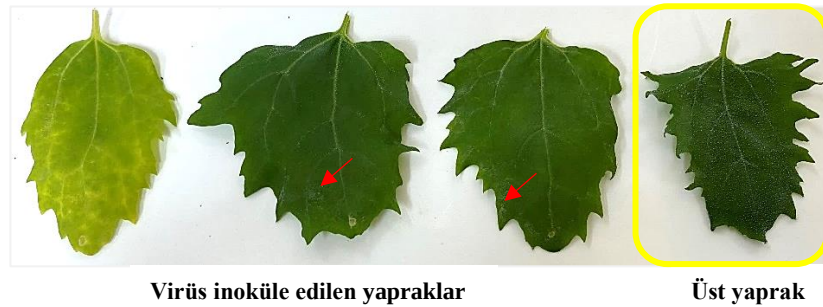
Tablo 4.6. BNYVV ve TMV ile bulaşık 3 no'lu toprak örneğinde tuzak bitki testi yöntemine göre yetiştirilen şeker pancarı yapraklarının test bitkilerine mekanik inokulasyonundan iki hafta sonra bu bitkilerde kayıt edilen semptomlar ile lokal ve sistemik yapraklarında BNYVV ve TMV'nin ELISA sonuçları

3 NO'LU ÖRNEK							Negatif kontrol ELISA absorban değeri	
Test Bitkileri	Lokal semptom	BNYVV	TMV	Sistemik semptom	BNYVV	TMV	BNYVV	TMV
<i>B. vulgaris</i>	HKL	0.319	0.098	HKL	0.311	0.099	0.217	0.093
<i>C. quinoa</i>	DA, UKL	0.316	0.097	YFB	0.456 (+)	0.096	0.227	0.093
<i>N. benthamiana</i>	UKL	0.309	0.105	SY	0.299	0.100	0.244	0.099
<i>N. rustica</i>	YHB	0.468	0.104	YHB	0.348	0.099	0.250	0.103
<i>S. lycopersium</i>	YFB	0.288	0.097	YFB	0.327	0.100	0.258	0.091
<i>C. annuum</i>	YHB	0.251	0.101	YHB	0.298	0.102	0.207	0.106

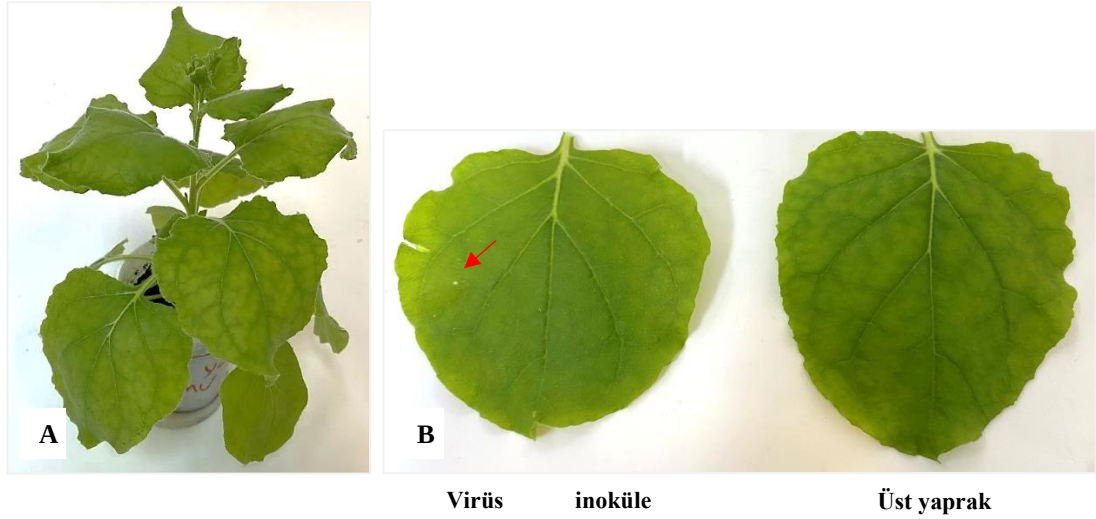
*HKL: Hafif klorotik leke, DA: Damarda açılma, UKL: Ufak klorotik leke, YFB: Yapraklarda form bozukluğu, YHB: Yapraklarda hafif bombe, SY: Semptom yok



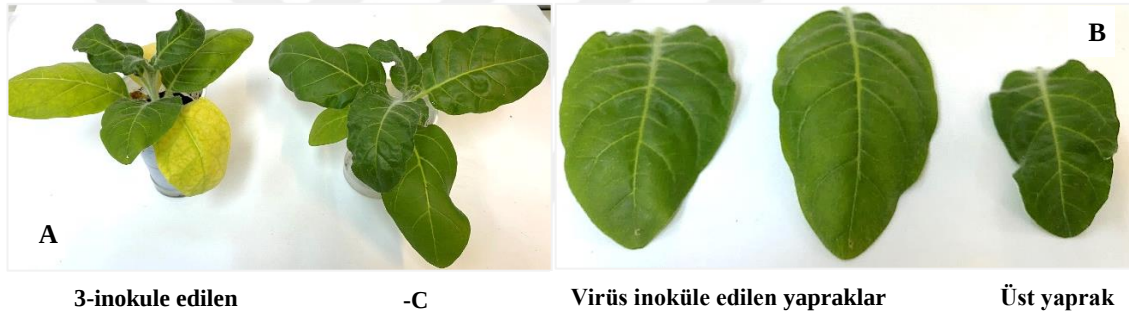
Şekil 4.33. 3 no'lu yaprak örneğinin şeker pancarı bitkisine (cv. Smart Briga) mekanik inokulasyonu sonrasında bu bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inoküle edilen ve edilmeyen yapraklarında gözlenen hafif klorotik lokal lezyonlar (B)



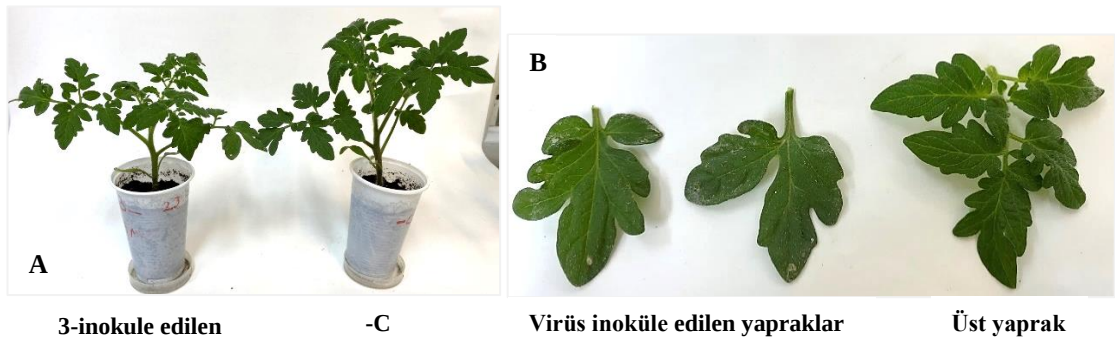
Şekil 4.34. 3 no'lu örneğe ait şeker pancarı yapraklarının *Chenopodium quinoa* bitkisine mekanik inokulasyonu sonrası virus-inoküle edilen yapraklar oluşan damar açılmaları ve/ ya da ufak klorotik lekeler ile ELISA ile BNYVV-pozitif olarak belirlenen virüs-inoküle edilmeyen üst yapraklarında gözlenen şekil bozukluğu



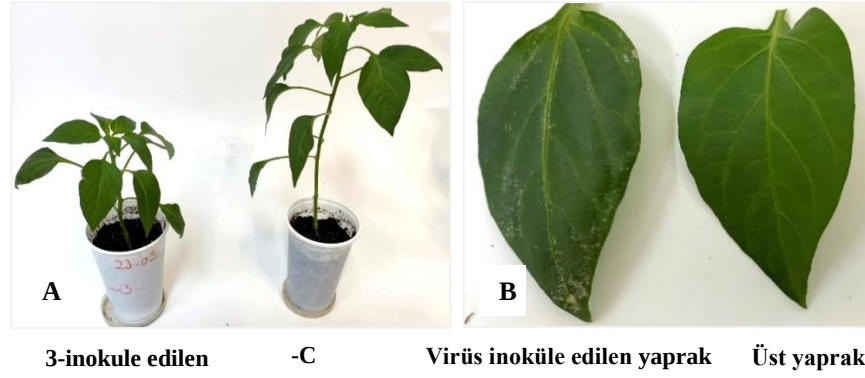
Şekil 4.35. 3 no'lu örneğe ait şeker pancarı yapraklarının *Nicotiana benthamiana* bitkisine mekanik inokulasyonundan iki hafta sonra bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen yaprağında klorotik lokal leke oluşumu (B)



Şekil 4.36. Sağlıklı kontrol ile 3 no'lu örneğe ait şeker pancarı yapraklarının *Nicotiana rustica* bitkisine mekanik inokulasyonundan iki hafta sonrasında genel görünüşleri (A) ile virus-inokule edilen ve edilmeyen yapraklarda gözlenen hafif bombeleşme (B)



Şekil 4.37. Sağlıklı kontrol ile 3 no'lu örneğe ait şeker pancarı yapraklarının domates bitkisine mekanik inokulasyonundan iki hafta sonra genel görünüşleri (A) ile virus-inokule edilen ve edilmeyen yapraklarda gözlenen hafif şekil bozuklukları (B)



Şekil 4.38. Sağlıklı kontrol ile 3 no'lu örneğe ait şeker pancarı yapraklarının domates bitkisine mekanik inokulasyonundan iki hafta bu bitkide oluşan cüceleşme (A) ile virus-inokule edilen ve edilmeyen yapraklarda gözlenen hafif bombe görünümü (B)

TMV ile ilgili olarak yürütülen biyolojik çalışmalarda elde edilen olumsuz sonuçların ardından, ELISA ile TMV+BNYVV ile enfekteli olarak belirlenen iki örnek (20 ve 46 no'lu) daha çalışmalara dahil edilmiştir (Şekil 4.39; Şekil 4.40). Üstelik, daha önceki örneklerde biyolojik çalışmalarda kullanılmayan hıyar bitkisi de test bitkileri arasına eklenmiştir. Ancak, elimizde sınırlı miktarda TMV antiserumu bulunduğundan, test bitkilerinde oluşan belirtiler dikkate alınarak, ELISA testlemeleri için örnek seçimi yoluna gidilmiştir. Seçilen bu test bitkilerinde gözlenen belirtiler ve testleme yapılan bitki kısımları Tablo 4.7 ve Şekil 4.41-Şekil 4.46'da gösterilmiştir.



Şekil 4.39. BNYVV (ELISA absorbans değeri: 0.391) ve TMV (ELISA absorbans değeri: 0.983) ile bulaşık 20 no'lu toprak örneğinde tuzak bitki testi tekniğine göre yetiştirilen şeker pancarı bitkilerinin I. ekim ve II. ekim sonrası genel görünimleri



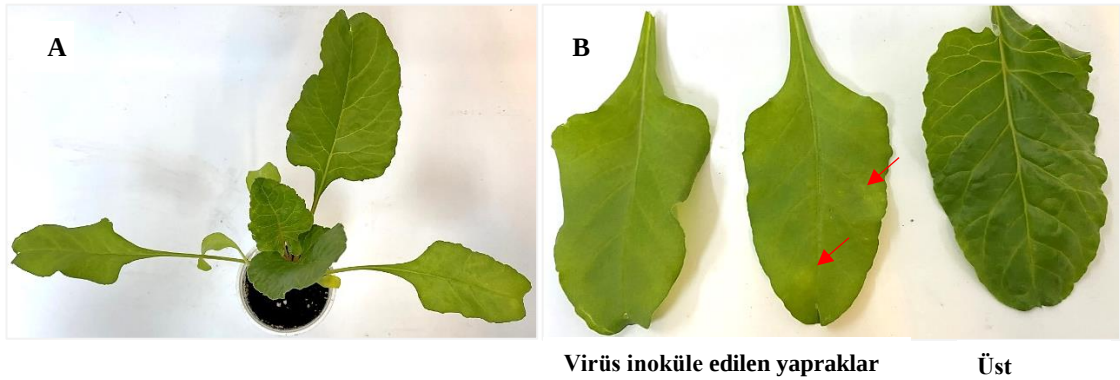
Şekil 4.40. BNYVV (ELISA absorbans değeri: 1.025) ve TMV (ELISA absorbans değeri: 0.776) ile bulaşık 46 no'lu toprak örneğinde tuzak bitki testi tekniğine göre yetiştirilen şeker pancarı bitkilerinin I. ekim ve II. ekim sonrası genel görünüşleri

20 no'lu ve 46 no'lu örneklerle ait şeker pancarı yaprak özsuları ile mekanik olarak inoküle edilen ve bahsedildiği sıraya göre inokülasyondan üç ve iki hafta sonra ELISA ile testlenen test bitkilerinin hiçbirinde TMV enfeksiyonu tespit edilememiştir (Tablo 4.7).

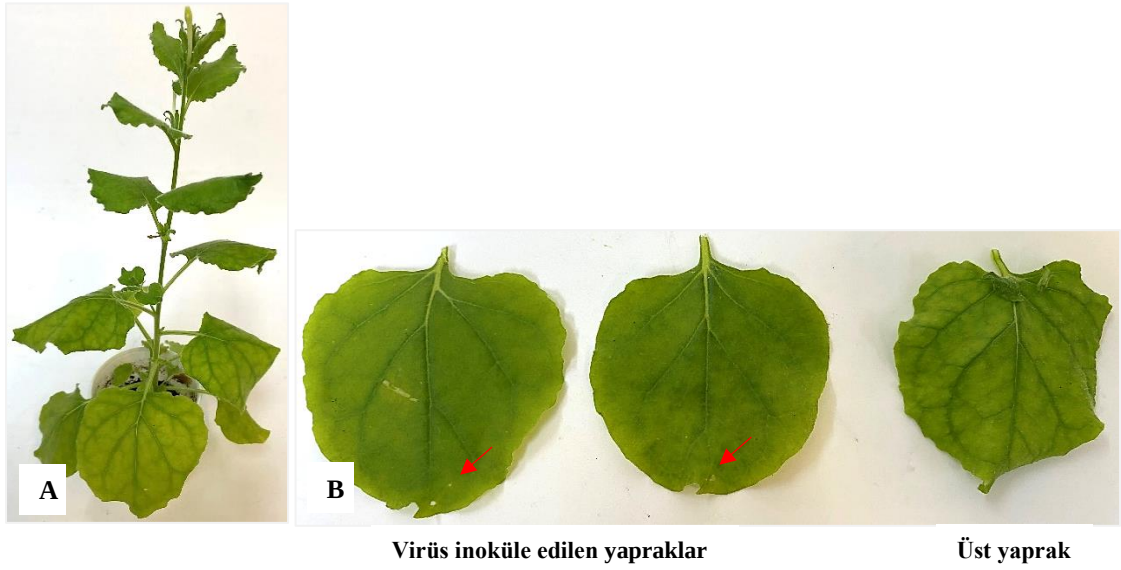
Tablo 4.7. Tuzak bitki testi sonucuna göre seçilen bazı örneklerle ait kök ya da yaprakların test bitkilerine inokülasyonunu takiben bu bitkilerde gözlenen semptomlar ve ELISA sonuçları

Test Bitkileri	20 NO'LU ÖRNEK*				46 NO'LU ÖRNEK*			
	Lokal semptom	TMV	Sistemik semptom	TMV	Lokal semptom	TMV	Sistemik semptom	TMV
<i>B. vulgaris</i>	İKL	TE	SY	TE	İKL	0.478	SY	0.292
<i>N. benthamiana</i>	KLL	TE	YB	0.294	SY	TE	SY	TE
Biber	SY	TE	YFB	0.343	KLL	TE	KLL	0.315
Hıyar	NLL	0.258	NLL,ÜYRA	0.386	NLL	TE	YLRA	0.337
- C (<i>N. rustica</i>)	0.320							
+ C	3.728							

*KLL: Klorotik lokal lezyon, NLL: Nekrotik lokal lezyon, ÜYRA: Üst yapraklarda renk açılımı, YB: yaprakta bombe, YFB: Yapraklarda form bozukluğu, İKL: İri klorotik leke, YLRA: yaprakta lokal renk açılımı, SY: Semptom yok, TE: Test edilmedi



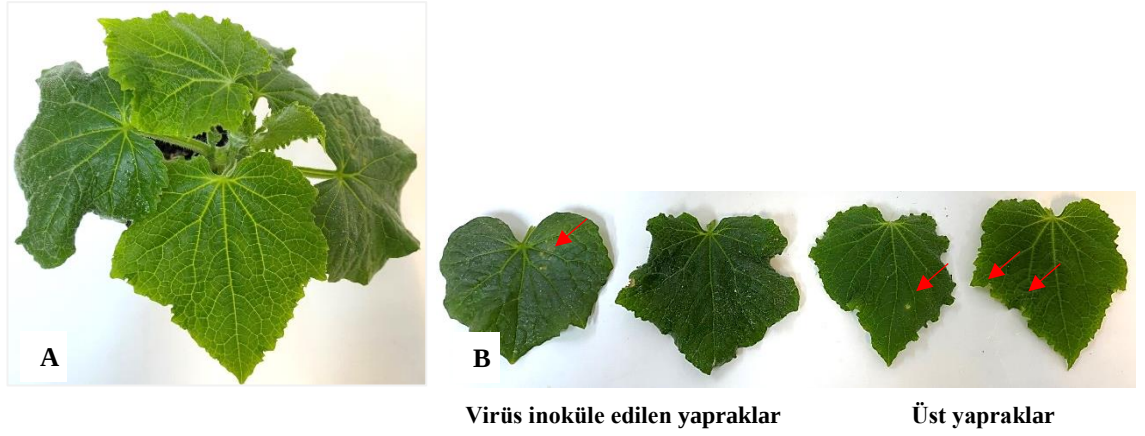
Şekil 4.41. TMV ve BNYVV ile bulaşık 46 no'lu toprak örneğinde yetiştirilen şeker pancarlarına ait yaprak özsuyunun hıyar bitkisine mekanik inokülasyondan üç hafta sonra bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inoküle edilen ve edilmeyen üst yapraklarda oluşan nekrotik lokal lezyonların görünümü (B)



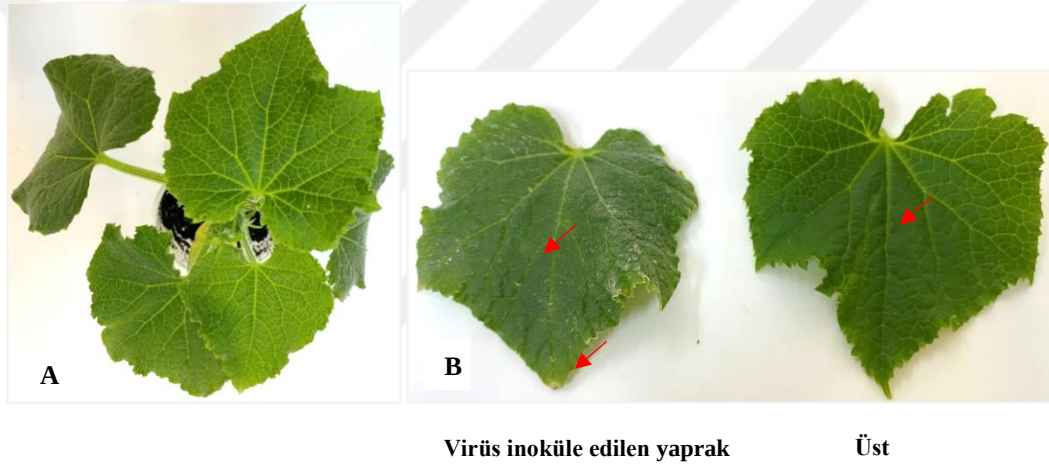
Şekil 4.42. TMV ve BNYVV ile bulaşık 20 no'lu toprak örneğinde yetiştirilen şeker pancarlarına ait yaprak özsuynunun *Nicotiana benthamiana* bitkisine mekanik inokulasyondan üç hafta sonra bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen yapraklarda oluşan klorotik lokal lezyonlar ve üst yapraklarda oluşan kıvrılma (B)



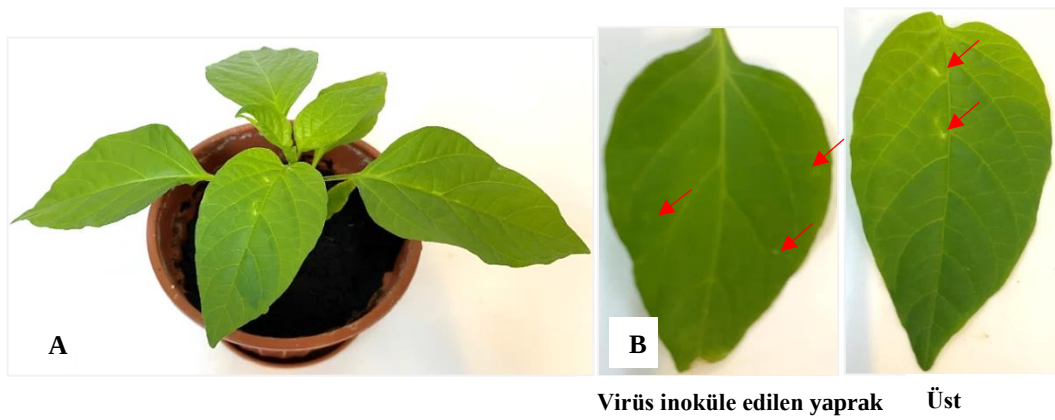
Şekil 4.43. TMV ve BNYVV ile bulaşık 20 no'lu toprak örneğinde yetiştirilen şeker pancarlarına ait yaprak özsuynunun biber bitkisine mekanik inokulasyondan üç hafta sonra bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen yapraklarda oluşan klorotik lokal lezyonlar ve üst yapraklarda oluşan kıvrılma (B)



Şekil 4.44. TMV ve BNYVV ile bulaşık 20 no'lu toprak örneğinde yetiştirilen şeker pancarlarına ait yaprak özsuynun hıyar bitkisine mekanik inokulasyondan üç hafta sonra bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen ve edilmeyen üst yapraklarda oluşan nekrotik lokal lezyonlar (B)



Şekil 4.45. TMV ve BNYVV ile bulaşık 46 no'lu toprak örneğinde yetiştirilen şeker pancarlarına ait yaprak özsuynun hıyar bitkisine mekanik inokulasyondan üç hafta sonra bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen ve edilmeyen üst yapraklarda oluşan nekrotik lokal lezyonlar (B)



Şekil 4.46. TMV ve BNYVV ile bulaşık 46 no'lu toprak örneğinde yetiştirilen şeker pancarlarına ait yaprak özsuynun hıyar bitkisine mekanik inokulasyondan üç hafta sonra bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen ve edilmeyen üst yapraklarda oluşan nekrotik lokal lezyonlar (B)

Tobacco mosaic virus'un biyolojik karakterizasyonunu takiben yürütülen serolojik çalışmalar sonucunda; incelenen test bitkilerinin lokal ve/ya da sistemik yapraklarında virüs-benzeri birtakım belirtiler gözlenmiş olmasına rağmen, bu bitkilerin hiçbirisinde (*B. vulgaris* cv. Smart Briga, *C. quinoa*, *N. benthamiana*, *N. rustica*, domates, biber ve hıyar) DAS-ELISA yöntemi ile TMV enfeksiyonu tespit edilememiştir.

4.1.7.2. Beet black scorch virus, Tobacco necrosis virus ve Tobacco rattle virus ile İlgili Yürütülen Biyolojik Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular

Tuzak bitki testi yöntemine göre yetiştirilen şeker pancarlarından elde edilen köklerin ELISA ile test edilmesi sonucunda; incelenen toplam 52 örneğin tamamının gerek BBSV, gerekse TNV ile bulaşık olmadıkları tespit edilmiştir. Bununla birlikte; yürütülen kök boyaması çalışmaları ile BBSV ve TNV'nin vektörü olan *Olpidium* spp.'nin dinlenme spor yapıları bu örneklerin %57.7 (30 adet)'inde tespit edilmiştir (Tablo 4.1, Tablo 4.2, Şekil 4.11). Ancak, bazı örneklerde vektörün saptanması nedeniyle bahsedilen virüslerin konsantrasyonlarının çok düşük olmasından dolayı mı ELISA ile tespit edilemedikleri sorusunu akla getirmiştir. Bu amaçla; coğrafik lokasyonları, tuzak bitki testinde şeker pancarlarında gözlenen belirtiler ve de köklerde *Olpidium* spp.'nin varlığı göz önüne alınarak her iki ile ait birer örnek (15 ve 42 no'lu) seçilmiş (Şekil 4.47, Şekil 4.48) ve biyolojik çalışmalarda kullanılmıştır. Diğer taraftan, TRV ile yürütülen serolojik testlemelerde de yaşanan olumsuzluk nedeniyle TRV'de bu çalışmaya dahil edilmiştir.



Şekil 4.47. BNYVV ile enfekteli (ELISA absorbans değeri: 3.450) ve *Olpidium* spp. 15 no'lu toprak örneğinde tuzak bitki testi tekniğine göre yetiştirilen şeker pancarı bitkilerinin II. ekim sonrası genel görünimleri



Şekil 4.48. BNYVV (ELISA absorbans değeri: 0.635) ve *Oplidium* spp ile bulaşık Konya iline ait 42 no'lu toprak örneğinde tuzak bitki testi tekniğine göre yetiştirilen şeker pancarı bitkilerinin I. ekim ve II. ekim sonrası genel görünüşleri

15 ve 42 no'lu toprak örneğinde tuzak bitki tekniğine göre yetiştirilen şeker pancarlarının köklerinden elde edilen bitki özsuvarı Tablo 4.8 ve Tablo 4.9'de verilen test bitkilerine mekanik olarak inoküle edilmiştir. Sonrasında, bu bitkiler üç hafta süre ile iklim odasında yetiştirilerek, bu süre içerisinde bitkilerde gelişen lokal ve sistemik belirtiler kayıt edilmiştir (Tablo 4.8; Tablo 4.9). Daha sonra, inokülasyon yapılan ve inokülasyon yapılmayan yapraklardan örnekler alınmış ve BNYVV, BBSV ve TRV'ye spesifik antiserumlar kullanılarak ELISA ile test edilmiştir. Her iki örneğin inokülasyonu sonucu test bitkilerinin büyük bir kısmında virüs benzeri belirtiler görülmesine rağmen (Şekil 4.49-Şekil 4.60), ELISA testlemelerinde üç virüs içinde pozitif örnek tespit edilememiştir (Tablo 4.8; Tablo 4.9).

Tablo 4.8. Tuzak bitki testi sonucu seçilen bazı örneklere ait kök ya da yaprakların test bitkilerine inokulasyonunu takiben bu bitkilerde gözlenen semptomlar (*) ve ELISA testi sonuçları

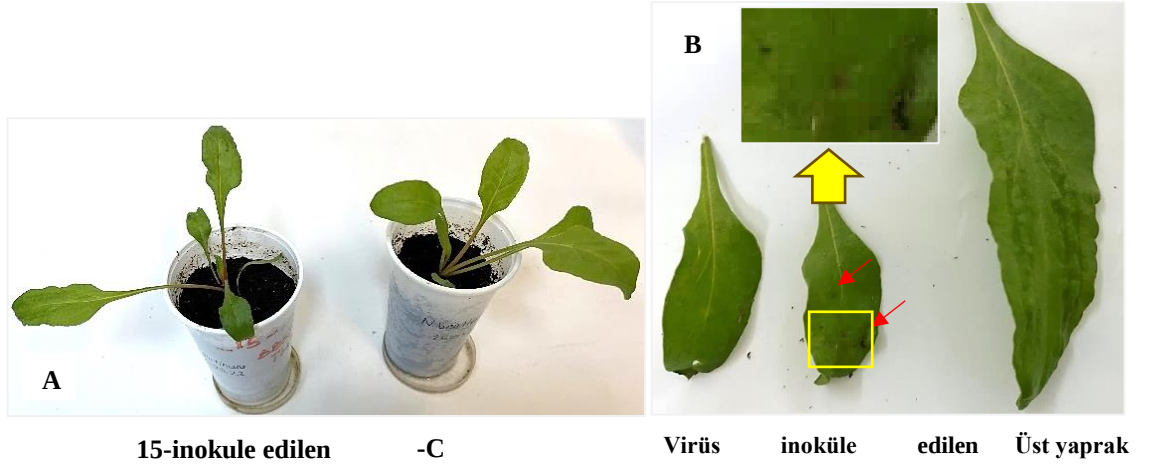
Test Bitkileri	15 no'lu örnek								Negatif kontrollerin ELISA absorbands değeri		
	Lokal semptom	BNYVV	BBSV	TNV	Sistemik semptom	BNYVV	BBSV	TNV	BNYVV	BBSV	TNV
<i>B. vulgaris</i>	YFB, USL	0.236 (-)	0.146 (-)	0.096 (-)	YFB	0.216 (-)	0.129 (-)	0.096 (-)	0.204	0.123	0.136
<i>C. quinoa</i>	YDA	0.227 (-)	0.116 (-)	0.099 (-)	SY	0.216 (-)	0.156 (-)	0.111 (-)	0.197	0.125	0.094
<i>N. benthamiana</i>	NLL, YDA	0.264 (-)	0.151 (-)	0.098 (-)	YHB	0.241 (-)	0.157 (-)	0.095 (-)	0.191	0.131	0.101
<i>N. rustica</i>	SDL, KLL	0.196 (-)	0.134 (-)	0.094 (-)	İKL	0.202 (-)	0.132 (-)	0.094 (-)	0.184	0.114	0.093
<i>S. lycopersium</i>	YFB	0.230 (-)	0.191 (-)	0.098 (-)	YFB	0.370 (-)	0.182 (-)	0.093 (-)	0.204	0.122	0.092
<i>C. annuum</i>	NLL	0.245 (-)	0.134 (-)	0.094 (-)	SY	0.398 (-)	0.160 (-)	0.105 (-)	0.218	0.143	0.099

*YFB: Yapraklarda form bozukluğu, USL: Ufak siyah leke, SDL: Siyah dairesel leke, YDA: yaprak damarlarında renk açılması, NLL: Nekrotik lokal lezyon, KLL: Klorotik lokal lezyon, YHB: Yapraklarda hafif bombe, İKL: İri klorotik leke, SY: Semptom yok

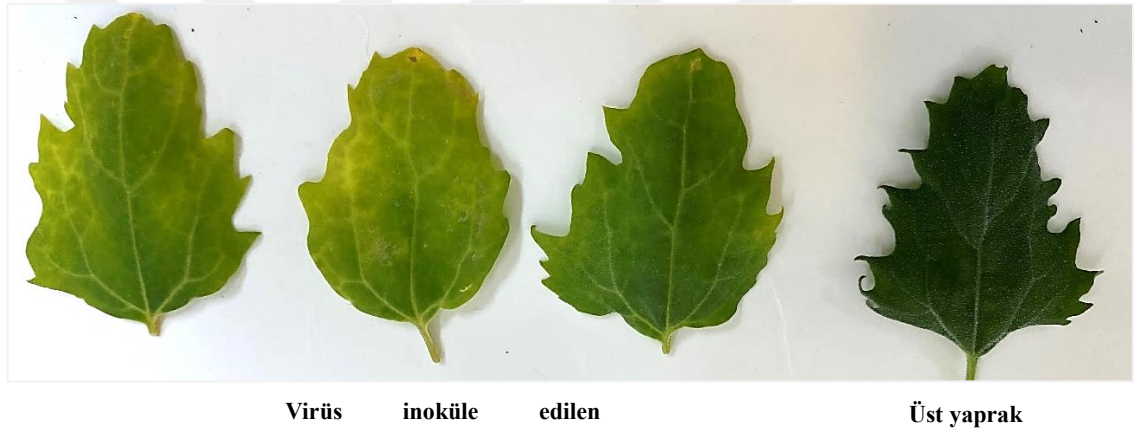
Tablo 4.9. Tuzak bitki testi sonucu seçilen bazı örneklere ait kök ya da yaprakların test bitkilerine inokulasyonunu takiben bu bitkilerde gözlenen semptomlar (*) ve ELISA testi sonuçları

Test Bitkileri	42 no'lu örnek								Negatif kontrollerin ELISA absorbands değeri		
	Lokal semptom	BNYVV	BBSV	TNV	Sistemik semptom	BNYVV	BBSV	TNV	BNYVV	BBSV	TNV
<i>B. vulgaris</i>	SY	0.175 (-)	0.117 (-)	0.091 (-)	SY	0.221 (-)	0.197 (-)	0.122 (-)	0.204	0.123	0.136
<i>C. quinoa</i>	NLL,YDA	0.190 (-)	0.128 (-)	0.096 (-)	YFB	0.215 (-)	0.126 (-)	0.102 (-)	0.197	0.125	0.094
<i>N. benthamiana</i>	İNL	0.223 (-)	0.127 (-)	0.100 (-)	YHB	0.205 (-)	0.164 (-)	0.092 (-)	0.191	0.131	0.101
<i>N. rustica</i>	İKL	0.198 (-)	0.118 (-)	0.095 (-)	KLL, YHB	0.215 (-)	0.142 (-)	0.096 (-)	0.184	0.114	0.093
<i>S. lycopersium</i>	YFB	0.229 (-)	0.139 (-)	0.095 (-)	SY	0.219 (-)	0.123 (-)	0.090 (-)	0.204	0.122	0.092
<i>C. annuum</i>	SY	0.269 (-)	0.135 (-)	0.097 (-)	YFB	0.284 (-)	0.143 (-)	0.098 (-)	0.218	0.143	0.099

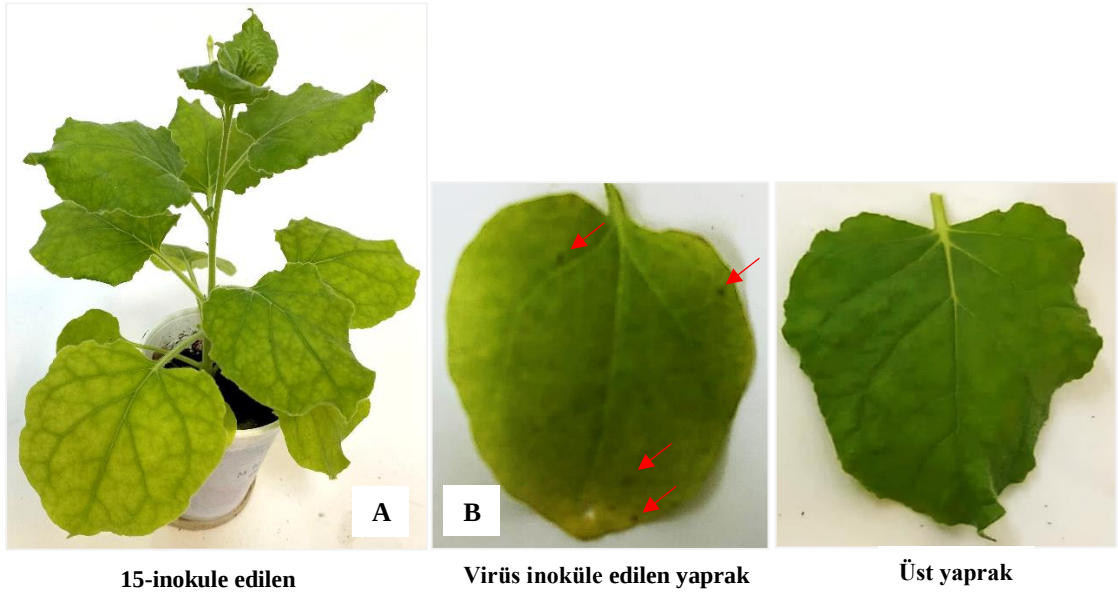
*YFB: Yapraklarda form bozukluğu, YDA: yaprak damarlarında renk açılması, NLL: Nekrotik lokal lezyon, KLL: Klorotik lokal lezyon, YHB: Yapraklarda hafif bombe, İKL: İri klorotik leke, SY: Semptom yok



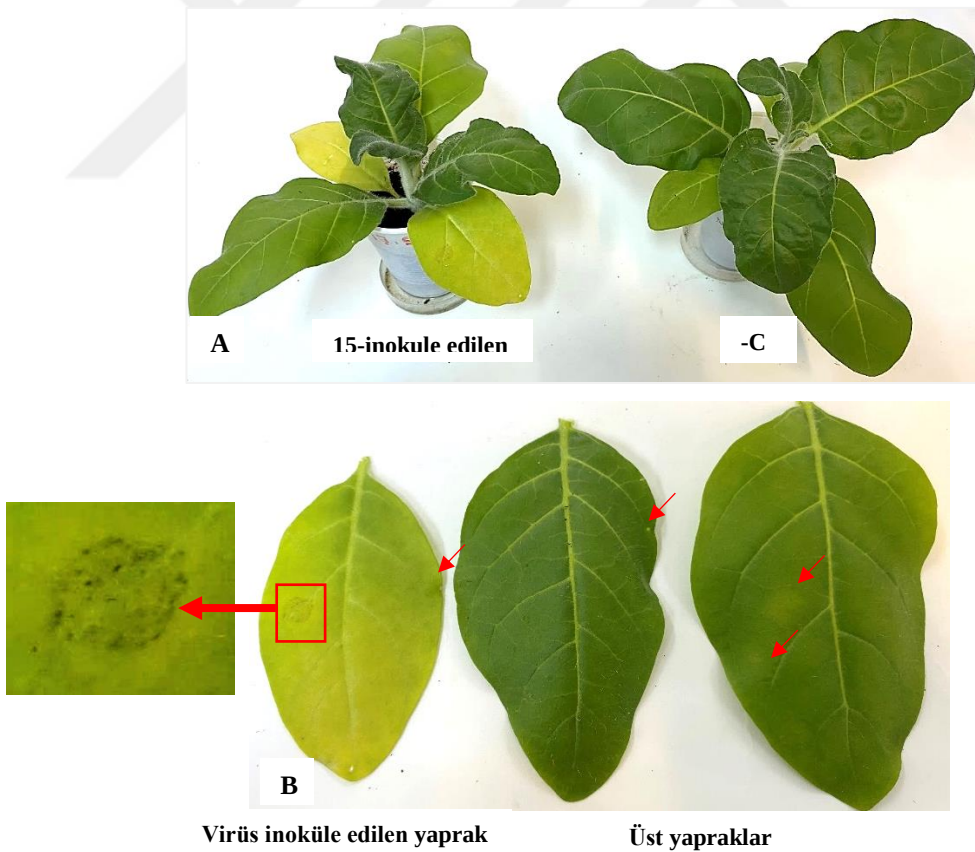
Şekil 4.49. Sağlıklı kontrol ile 15 no'lu örneğin şeker pancarı bitkisine (cv. Smart Briga) mekanik inokulasyondan üç hafta sonra bitkinin genel görünümü (A) ve virus-inokule edilen yapraklarında gözlenen form bozukluğu, ufak siyah lekelerin oluşumu ile üst yapraklarda gözlenen şekil değişiklikleri (B)



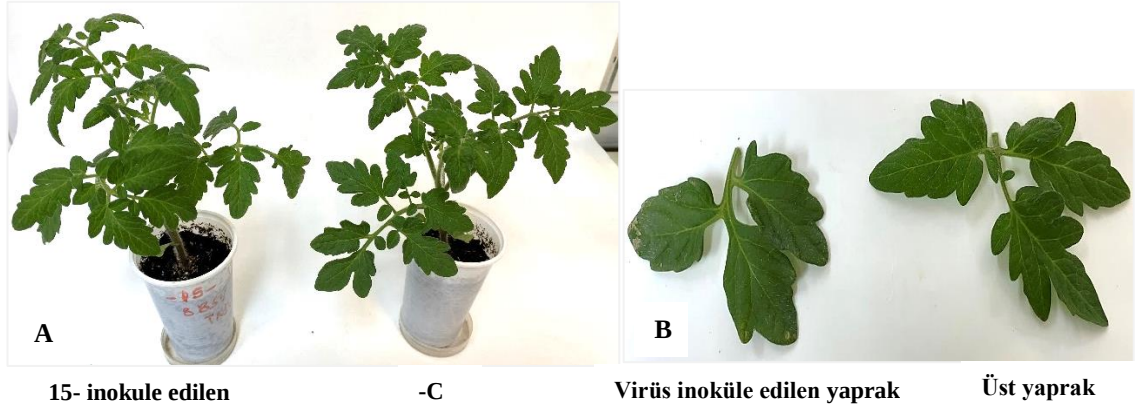
Şekil 4.50. *Chenopodium quinoa* bitkisine 15 no'lu örneğin mekanik inokulasyonu sonrası virus-inokule edilen yapraklarda oluşan damar açılmaları ve/ ya da ufak klorotik lekeler ile virüs-inoküle edilmeyen üst yaprakların genel görünümü



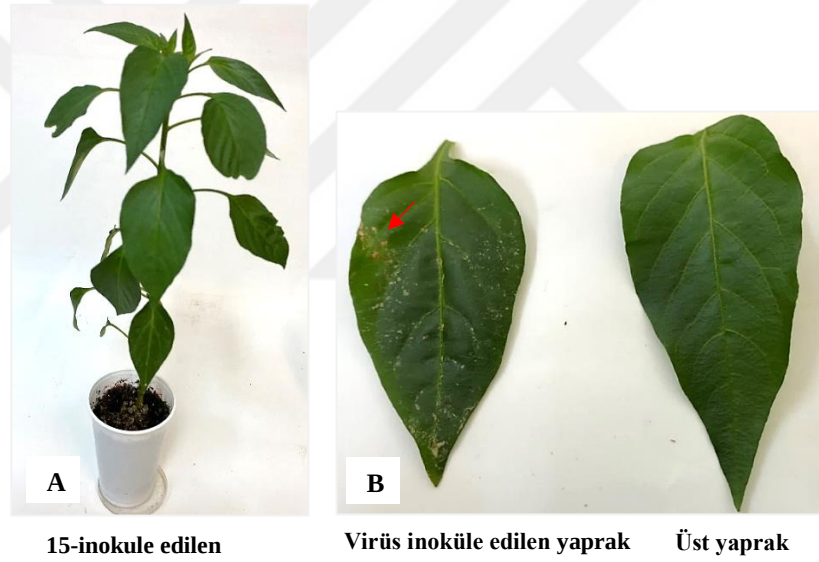
Şekil 4.51. *Nicotiana benthamiana* bitkisine 15 no'lu örneğin mekanik inokulasyondan üç hafta sonra bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inoküle edilen yapraklarında gözlenen ufak siyah lekeler ve üst yapraklarda oluşan hafif kıvrılma belirtilerinin görünümü (B)



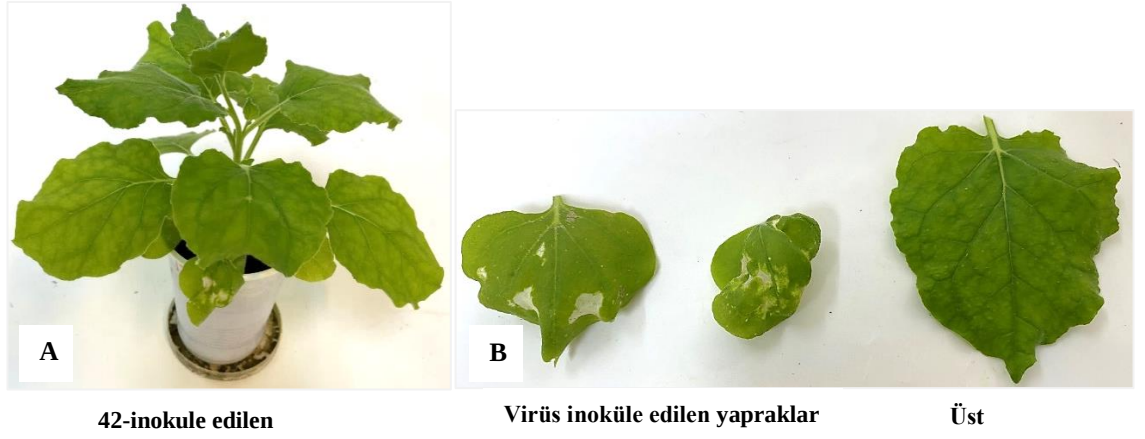
Şekil 4.52. Sağlıklı kontrol ile 15 no'lu örneğin *Nicotiana rustica* bitkisine mekanik inokulasyondan üç hafta sonra genel görünüşleri (A) ve virus-inoküle edilen yapraklarında gözlenen siyah dairesel leke ile klorotik lokal lezyonun görünümü ve üst yapraklarda oluşan iri klorotik lekeler (B)



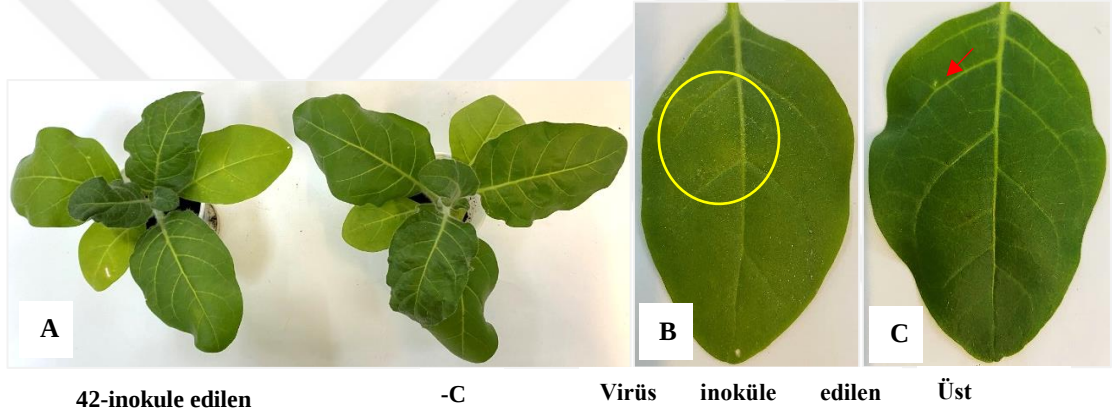
Şekil 4.53. Sağlıklı kontrol ile 15 no'lu örneğin domates bitkisine mekanik inokulasyondan üç hafta sonraki genel görünüşleri (A) ve virus-inokule edilen ve edilmeyen üst yapraklarda oluşan şekil bozuklukları (B)



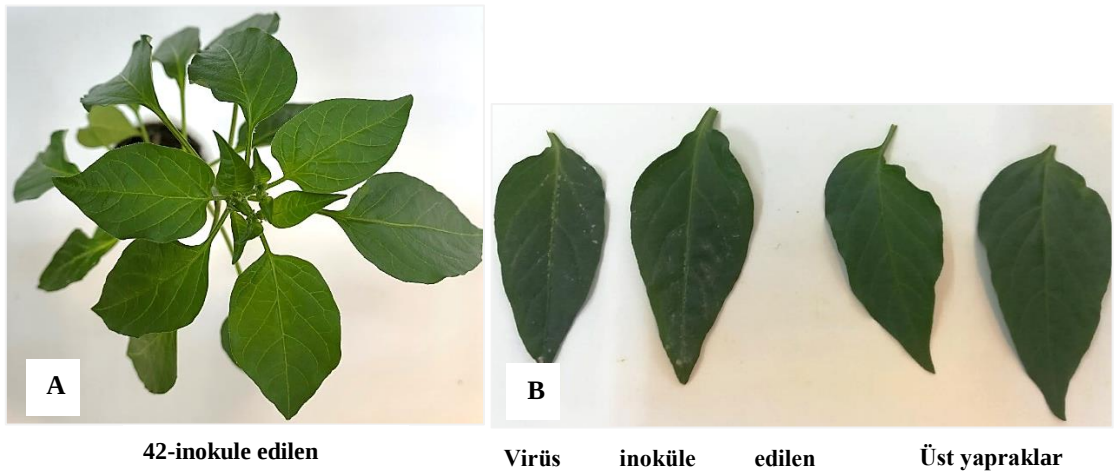
Şekil 4.54. Biber bitkisine 15 no'lu örneğin mekanik inokulasyonu sonrasında bu bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen yapraklarda oluşan nekrotik lekeler ve virüs-inokule edilmeyen üst yaprakların görünüşleri (B)



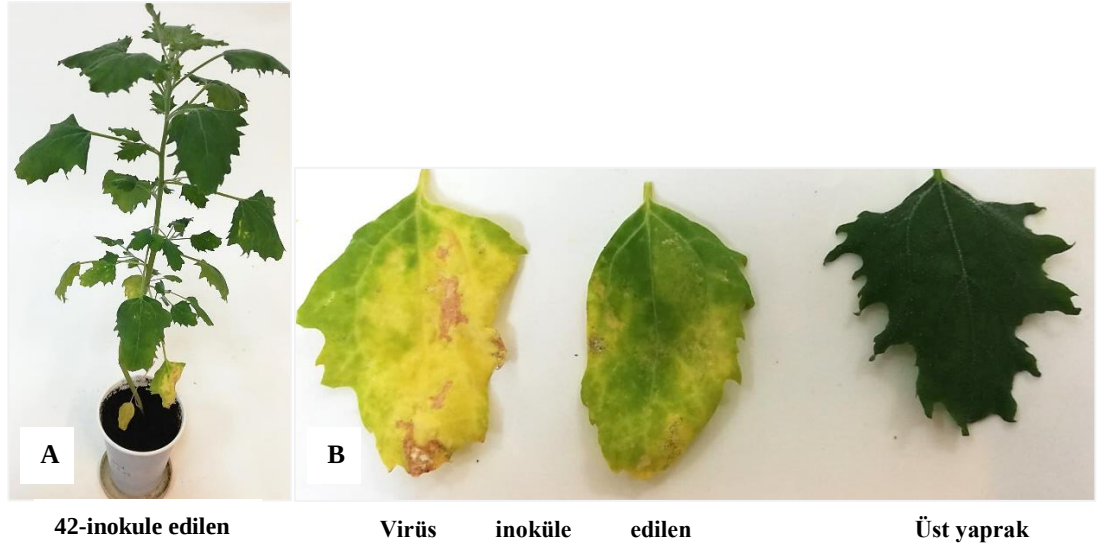
Şekil 4.55. *Nicotiana benthamiana* bitkisine 42 no'lu örneğin mekanik inokulasyonundan üç hafta sonra bitkinin genel görünümü (A) ve virus-inokule edilen yapraklarında gözlenen iri nekrotik ve klorotik lekeler ile üst yapraklarda oluşan bombeleşme (B)



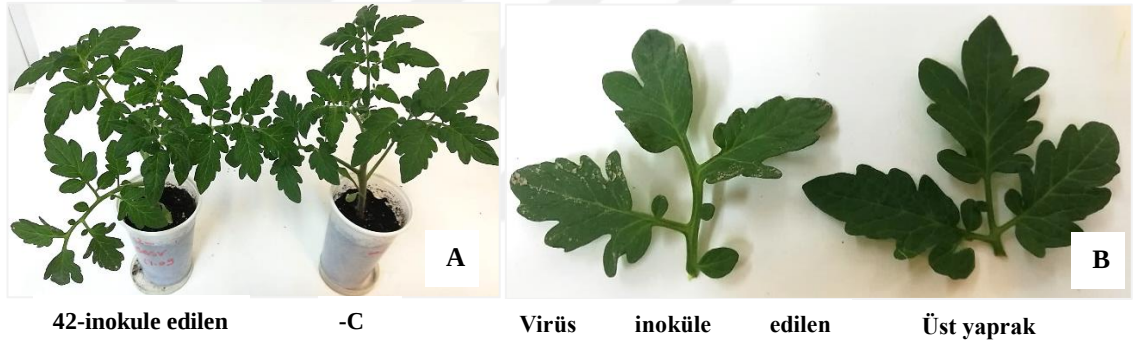
Şekil 4.56. Sağlıklı kontrol ile 42 no'lu örneğin *Nicotiana rustica* bitkisine mekanik inokulasyondan üç hafta sonra bu bitkilerin genel görünüşleri (A) ile virus-inokule edilen yapraklarında gözlenen iri klorotik lokal lezyonlar ve üst yapraklarda oluşan küçük klorotik lekeler (B)



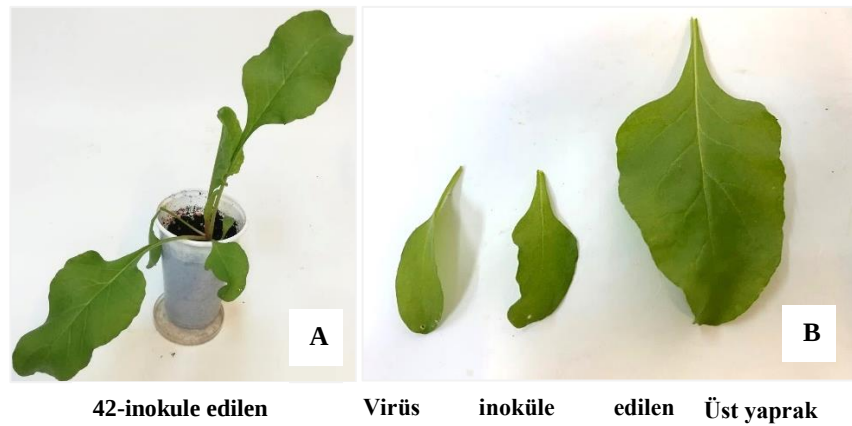
Şekil 4.57. Biber bitkisine 42 no'lu örneğin mekanik inokulasyonu sonrasında bu bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen ve virüs-inokule edilmeyen üst yaprakların görünüşleri (B)



Şekil 4.58. *Chenopodium quinoa* bitkisine 42 no'lu örneğin mekanik inokulasyondan sonrası virus-inokule edilen yapraklar oluşan klorotik ve nekrotik lekeler ile virüs-inoküle edilmeyen üst yapraklar gözlenen form bozukluğu



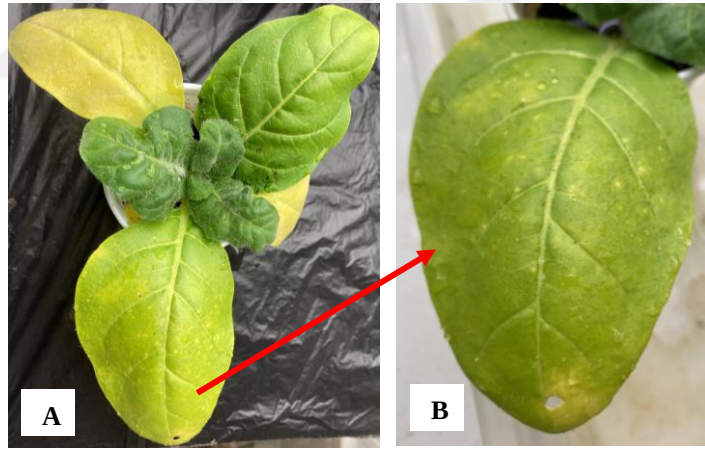
Şekil 4.59. Sağlıklı kontrol ile 42 no'lu örneğin domates bitkisine mekanik inokulasyondan üç hafta sonraki genel görünüşleri (A) ve virus-inokule edilen yapraklarda oluşan şekil bozuklukları ile symptom sergilemeyen üst yaprakların görünüşleri (B)



Şekil 4.60. Şeker pancarı bitkisine 42 no'lu örneğin mekanik inokulasyonu sonrasında bu bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen ve virüs-inokule edilmeyen üst yaprakların görünüşleri (B)

4.1.7.3. Test Bitkilerinde Yürütülen Moleküler Çalışmalardan Elde Edilen Bulgular

Bu tez çalışmasının proje metninde yer almamasına rağmen; seçilen bazı test bitkilerinin inokulasyon yapılan ve inokulasyon yapılmayan üst yapraklarından örnekleme yapılmış ve total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, biyolojik çalışmalar kapsamında 22 no'lu örneğin sadece *N. rustica* bitkisine mekanik olarak aktarımı yapılmış ve sonrasında bu bitkinin yapraklarında virüs benzeri belirtiler gözlenmesi sebebiyle, bu örnekte moleküler çalışmalara dahil edilmiştir (Şekil 4.61). Moleküler çalışmalar için seçilen örneklerin tamamında, test bitkilerinde oluşan belirtiler göz önüne alınmıştır (Tablo 4.10). Böylelikle, muhtemelen inokulum kaynağı olan şeker pancarında çok düşük konsantrasyonda bulunan ve bu nedenle gerek ELISA testi, gerekse RT-PCR yöntemi ile saptanamayan bazı virüslerin (TRV, TNV gibi), bu test bitkilerinde zaman içerisinde çoğalarak tespitinin mümkün olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 4.61. 22 no'lu toprakta yetişen şeker pancarlarına ait kök örneklerinin *Nicotiana rustica* bitkisine mekanik aktarımını takiben üç hafta sonra bitkinin genel görünümü (A) ile virus-inokule edilen yaprakta oluşan klorotik lekeler (B)

Tablo 4.10. Test bitkilerinde yürütülen moleküler çalışmalar için seçilen örneklerin numaraları ve bu bitkilerde gözlenen lokal ve sistemik belirtiler ile RNA izolasyonu yapılan bitki yaprakları

Örnek no	Test bitkisi	Belirti*	
		Lokal	Sistemik
15	<i>N. benthamiana</i>	NLL, YDA**	YHB
15	<i>N. rustica</i>	SDL, NLL	İKL
15	<i>B. vulgaris</i> cv. Smart Briga	USL, YFB	YFB
15	Domates	YFB	YFB
19	<i>N. rustica</i>	NLL	YHB
22	<i>N. rustica</i>	KLL	YFB
42	<i>N. rustica</i>	İKL	KLL, YHB

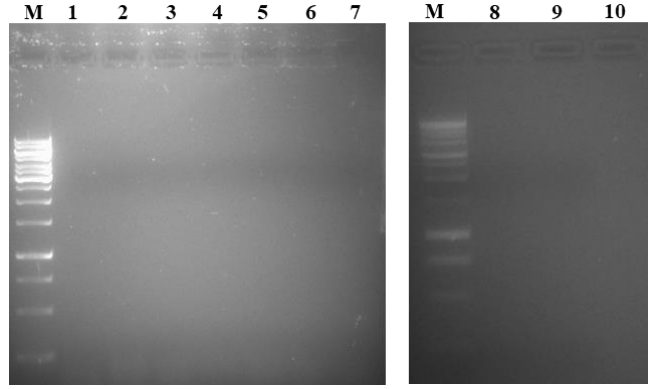
*YFB: Yapraklarda form bozukluğu, USL: Ufak siyah leke, SDL: Siyah dairesel leke, YDA: Yaprak damarlarında renk açılması, NLL: Nekrotik lokal lezyon, KLL: Klorotik lokal lezyon, YHB: Yapraklarda hafif bombe, İKL: İri klorotik leke, SY: Belirti yok

**RNA izolasyonu yapılan örnekler sarı renk ile belirtilmiştir

Tablo 4.11. Mekanik inokulasyon yapılan test bitkilerinden RNA saflaştırılması yapılan örneklerin kodları, numaraları, örnek alınan bitki parçaları ve bu örneklerle ait RNA konsantrasyonları

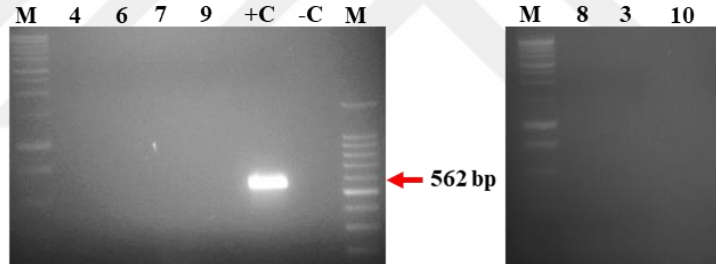
Örnek kodu	Örnek no	RNA izole edilen test bitkisi	Örnek alınan yaprak	Total RNA	
				Konsantrasyon (ng/μl)	260/280
1	15	<i>N. benthamiana</i>	sistemik	40.8	0
2	15	<i>N. benthamiana</i>	Lokal	87.2	2.295
3	15	Şeker pancarı	sistemik	356	2.011
4	15	<i>N. rustica</i>	Lokal	15.6	1.857
5	15	<i>N. rustica</i>	sistemik	51.8	2.123
6	42	<i>N. rustica</i>	Lokal	38	2.111
7	19	<i>N. rustica</i>	Lokal	182	2.236
8	22	<i>N. rustica</i>	sistemik	25.2	2.032
9	22	<i>N. rustica</i>	Lokal	19.8	1.650
10	15	Domates	sistemik	282	0

Bu çalışmada öncelikle seçilen örneklerin nanodrop spektrofotometre (Implen) yardımı ile RNA konsantrasyonları belirlenmiştir (Tablo 4.11). Ardından, öncelikle test bitkilerinde TRV'nin varlığı tek aşamalı RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Ancak, incelenen örneklerin hiçbirisinde TRV enfeksiyonu tespit edilememiştir (Şekil 4.62).

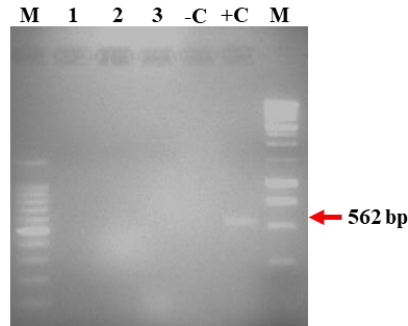


Şekil 4.62. Test bitkilerinde Tobacco rattle virus'un RT-PCR yöntemi ile araştırılması [M: 1 Kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific) (Jel üzerinde belirtilen numaralar Tablo 4.11'de verilen örneklere ait kod numaralarını ifade etmektedir)]

Daha sonra, farklı RNA konsantasyonları denenerek TRV ile ilgili RT-PCR testlemelerine devam edilmiştir. Bu çalışma sonucunda; sadece pozitif kontrolde 562 bp büyüklüğünde TRV'nin hareket protein bölgesine spesifik bant oluşumu gözlenmiş olup (Şekil 4.63, Şekil 4.64) incelenen örneklerin hiçbirinde TRV enfeksiyonu tespit edilememiştir.

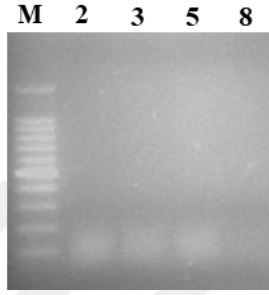


Şekil 4.63. Test bitkilerinde Tobacco rattle virus'un RT-PCR yöntemi ile araştırılması [M: 1 Kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific), +C: TRV ile enfekteli patates bitki örneği, -C: Negatif kontrol (sağlıklı şeker pancarı kökünden elde edilen RNA) ((Jel üzerinde belirtilen numaralar Tablo 4.11'de verilen örneklere ait kod numaralarını ifade etmektedir)]



Şekil 4.64. Test bitkilerinde Tobacco rattle virus'un RT-PCR yöntemi ile araştırılması [M: 1 Kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific), +C: TRV ile enfekteli patates bitki örneği, -C: Negatif kontrol (sağlıklı şeker pancarı kökünden elde edilen RNA) (Jel üzerinde belirtilen numaralar Tablo 4.11'de verilen örneklere ait kod numaralarını ifade etmektedir)]

Ayrıca, bu çalışmada incelenen bir diğer virüs olan TNV'ün bulunma durumu da mekanik inokülasyon yapılan bazı test bitkilerine (*N. benthamiana*, *N. rustica* ve şeker pancarı) ait örneklerde RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Ancak, testlenen bu örneklerde TNV belirlenememiştir (Şekil 4.65). Böylelikle, bu çalışma ile incelenen test bitkilerinde gözlenen virüs benzeri semptomların TRV ve TNV enfeksiyonundan kaynaklanmadığı moleküler testlemeler ile de ortaya konulmuştur.



Şekil 4.65. Test bitkilerinde Tobacco necrosis virus'un RT-PCR yöntemi ile araştırılması [M: 100 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific), (Jel üzerinde belirtilen numaralar Tablo 4.11'de verilen örneklere ait kod numaralarını ifade etmektedir)]

4.2. Tartışma

Bu yüksek lisans tez çalışmasında; Konya ve Ankara illeri şeker pancarı üretim alanlarından toplanan 52 toprak örneği kullanılarak yürütülen tuzak bitki testi çalışmaları sonucu elde edilen pancar bitkilerinin (cv. Ansa-BNYVV'ye hassas) köklerinde BNYVV, BBSV, TNV, TRV ve TMV'nin varlığı DAS-ELISA yöntemi ile araştırılmıştır. Testlemeler sonucunda; incelenen toplam 52 örneğin %78.8 (41 adet)'inin BNYVV, %30.8 (16 adet)'inin ise TMV ile enfekteli olduğu görülmüştür. Bu çalışmada BBSV, TNV ve TRV ile bulaşık örneğe rastlanılmamıştır. Diğer taraftan; bu örneklerde BSBV'nin bulunma durumu ise virüsün CP gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Bunun sonucunda, her iki ile ait seçilen 12 örneğin sekizinin (%66.7) BSBV ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir.

Türkiye şeker pancarı üretim alanlarında BNYVV'nin varlığı ilk olarak 1987 yılında kayıt edilmiş olup (Koch, 1987), günümüzde bu alanların büyük bir kısmının virüs ile bulaşık olduğu bilinmektedir. Nitekim; Amasya Şeker Fabrikası üretim alanlarında yürütülen bir araştırmada; bitki örneklerinin %10.9'unun ve toprak örneklerinin ise %26'sının BNYVV ile bulaşık olduğu ELISA yöntemi ile saptanmıştır (Özer ve Ertunç, 2005). Kutluk Yılmaz ve Arlı Sökmen (2010) ise, Samsun, Amasya, Tokat, Çorum, Kastamonu, Çankırı ve Yozgat illerine ait 2004-2005 yıllarında alınan 510 toprak örneğinde tuzak bitki tekniğine göre yetiştirilen şeker pancarlarının ELISA ile testlenmesi sonucu; %7.5'inin BNYVV, %24.1'inin BSBV, %22.9'unun ise BNYVV+BSBV ile enfekteli olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer taraftan; Kaya (2009) üç yıllık münavebe uygulamasına göre üçer yıllık üç dönem şeklinde (1996-1998, 1999-2001 ve 2002-2004 yılları) toplam 17 şeker fabrikasının pancar üretim alanlarında yürüttüğü sürveyler sonucu ELISA ile BNYVV'nin yaygınlığını araştırmış ve 1996-1998 yıllarında Ağrı, Ankara, Eskişehir ve Iğın fabrika üretim alanlarının %19.30 (46.200 ha)'unun, 1999-2001 yıllarında bu fabrika alanlarına ilaveten Uşak, Malatya, Kırşehir, Ereğli ve Susurluk'ta %31.4 (94.140 ha)'ünün ve 2002-2004 yıllarında ise daha önce incelenen alanlara ek olarak Bor, Çarşamba, Afyonkarahisar, Burdur, Elbistan, Elazığ, Yozgat, Kütahya fabrika alanlarının ise %48.7 (203.640 ha)'sinin BNYVV ile bulaşık olduğunu ortaya koymuştur. 2006-2007 yıllarında göller bölgesinde yürütülen bir diğer araştırmada ise, 203 toprak örneğinde gerçekleştirilen tuzak bitki testinin ardından, ELISA yöntemine göre şeker pancarı bitkilerinin test edilmesi sonucu %41.9'unun BNYVV ile enfekteli olduğu saptanmıştır (Yardımcı ve Kılıç, 2011). 2010

yılında ise, Eskişehir ili pancar ekim alanlarından solgunluk, mozayik, sararma ve nekroz gibi belirti sergileyen şeker pancarlarından toplam 94 adet yaprak örneği alınmış ve ELISA testi ile %4.3'ünün sadece BNYVV, %12.8'inin BNYVV + Beet mosaic virus (BtMV) ve %1.1'inin ise BNYVV + Beet yellows virus (BYV) ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir (Yardımcı vd, 2012). Öte yandan, Özdemir (2014) Trakya Bölgesi'ne ait Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ illeri pancar alanlarından topladığı 126 yaprak örneğinin %19.9'unun tek olarak BNYVV ile enfekteli olduğunu bildirmiş, BNYVV'nin karışık enfeksiyon halinde diğer virüsler ile [Beet western yellows virus (BWYV) ve BYV] bulunma oranının ise %38.1 olduğunu belirtmiştir. Kutluk Yılmaz vd. (2016), Türkiye'de 32 ile ait pancar alanlarından topladıkları 632 toprak örneğinin tuzak bitki testini takiben ELISA ile testleyerek; bu örneklerin %12'sinde BNYVV (76 adet), %23.7'sinde BSBV (149 adet) ve %26.1'inde ise BNYVV+BSBV enfeksiyonu belirlemişlerdir. Kutluk Yılmaz vd. (2019) ise, 2016-2017 yıllarında İç Anadolu Bölgesi'nde altı ilden (Konya, Ankara, Afyonkarahisar, Aksaray, Karaman ve Niğde) 397 toprak örneği almış ve örneklerin tuzak bitki testi ve ELISA yöntemi ile test edilmesi sonucunda, %54.9'unun BNYVV ile enfekteli olduğunu saptamışlardır. Bu sonuçlar; ülkemizde zaman içerisinde BNYVV'nin hızla şeker pancarı üretim alanlarında yayıldığını göstermektedir. Nitekim; yürütülen bu çalışma sonucunda ise; iller bazında BNYVV'nin bulaşıklık durumu irdelendiğinde; Ankara ilinde %79.3, Konya ilinde ise bu oranının %78.3 olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.1, Tablo 4.2). Ayrıca, bu bölgedeki hastalık yoğunluğunun komşu ülkelerden İran (%52.4) (Farzadfar et al., 2007) ve Suriye (%47.8) (Mouhanna et al., 2002) ile kıyaslandığında çok daha yüksek olması da (%78.8) dikkat çekmiştir. Öte yandan, Pavli vd. (2010) ise, Yunanistan'da önemli pancar ekim alanlarından elde ettikleri toplam 40 adet örneği mRT-PCR ile test etmişler ve 38'inin BNYVV (%95), 9'unun BSBV (%22.5) ve 23'ünün ise BVQ (%57.5) ile bulaşık olduğunu belirtmişlerdir.

Karışık virüs enfeksiyonları, doğada oldukça yaygın olarak görülmektedir. Özellikle bir alanda tek bir vektör farklı virüsleri taşıyabilmektedir. Nitekim, çeşitli araştırmacılar da genellikle BNYVV ve BSBV'nin aynı alanda bulunduğunu ve aynı şeker pancarını enfekte edebileceğini vurgulamışlardır (Heidel and Rush, 1994; Prillwitz and Schlösser, 1993; Meunier et al., 2003). Bu sebeple, bu çalışmada iki farklı ilden 11'i BNYVV ile bulaşık toplam 12 adet örnek seçilmiş ve bu örneklerde aynı vektör tarafından taşınan bir diğer toprak kökenli virüs olan BSBV'nin RT-PCR yöntemi ile araştırılması yoluna gidilmiştir. Bunun sonucunda, incelenen 12 örneğin, %66.7'sinin

BSBV ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.4).

Şeker pancarı, TMV'nin bilinen doğal konukçuları arasında yer almaktadır (Krstic et al., 1997). Bu yüksek lisans tez çalışmasında, Türkiye şeker pancarı üretim alanlarında tuzak bitki testi ve ELISA yöntemi ile TMV ilk kez saptanmıştır. Ancak, daha önce ülkemizde diğer kültür birçok bitkisinde TMV'nin enfeksiyon oluşturduğuna dair kayıtlar bulunmaktadır (Pişkin ve Yorgancı, 1998; Çiçek ve Yorgancı, 1991; Erdem, 2010; Karanfil ve Korkmaz, 2021). Wang vd. (2008) tarafından Çin'in İç Moğolistan eyaletindeki bir tarladan belirti göstermeyen şeker pancarlarından örnek alınmış ve RT-PCR ile bu örneklerde TMV'nin varlığı araştırılmıştır. Test edilen 18 bitki örneğinin sekizinde TMV'nin RdRp genine spesifik beklenen büyüklükte (821 bp) amplikon elde edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, aynı tarlada TMV'nin genellikle BNYVV ve BSBV ile birlikte enfeksiyon oluşturduğu rapor edilmiştir (Wang et al., 2008). Yürütülen bu çalışmada da benzer şekilde, TMV ile bulaşık olarak saptanan 18 örneğin sadece 4'ünde TMV'nin tek olarak enfeksiyona sebep olduğu saptanmasına rağmen; diğer 14'ünde ise BNYVV ve/ya da BSBV ile birlikte ortak enfeksiyon oluşturduğu belirlenmiştir (Tablo 4.4).

Ayrıca, bu çalışmada ELISA sonucu pozitif olan iki TMV izolatu seçilerek (2 ve 6 no'lu), bu örneklerde virüsün buunma durumu RT-PCR yöntemi ile de araştırılmıştır. Ancak, Tobamovirüslere spesifik primerler (Lurina et al., 2017) ile yürütülen RT-PCR çalışması sonucu virüsün çoğaltımı sağlanamamıştır.

Diğer taraftan, bu çalışmada gerek ELISA, gerekse RT-PCR çalışmaları ile Chytrid vektör *Olpidium* spp. tarafından non-persistent olarak taşınan BBSV ve TNV (Koenig ve Valizadeh, 2008) ile tohum ve *Trichodoridae* familyası üyesi nematodlar (*Paratrichodorus pachydermus* ve *P. minor*) tarafından taşınabilen TRV (Sol et al., 1960; Walkinshaw et al., 1961) ile bulaşık hiçbir örnek tespit edilmemiştir. Nitekim; bahsedilen bu virüsler, ülkemizde kayıtlı virüs türleri arasında yer almamaktadır. Bununla birlikte; bu virüslerden BBSV, 2008 yılında komşu ülke İran'da şeker pancarı üretim alanlarında rapor edilmiştir (Koenig and Valizadeh, 2008). Ayrıca, Avrupa'da da pancar alanlarında kayıtlı toprak kökenli virüsler arasında yer almaktadır (Gonzalez-Vazquez et al., 2009). TNV'nin ülkemizde varlığı ise; Eskişehir marul üretim alanlarında henüz rapor edilmiştir (Akbaş vd., 2021). Bununla birlikte, TNV ABD'de Kalifornia şeker pancarı üretim alanlarında kayıtlı toprak kökenli virüsler içerisinde yer almaktadır (Liu et al., 1996). İncelenen bir diğer virüs olan TRV ise, komşu ülke Bulgaristan şeker pancarı üretim alanlarında yaygın olarak görülmekle birlikte (Dikova,

2006); şu ana kadar, ülkemizde hiçbir kültür bitkisinde enfeksiyon oluşturduğuna dair bir kayıt bulunmamaktadır.

Doğada BBSV'nin taşınması sadece vektör *O. virulentus* tarafından gerçekleştirilmekte ve viruliferous *O. virulentus*'un dinlenme sporları ise toprak materyali ile bir yerden bir yere transfer olmaktadır. Komşu lke İran ve Avrupa'dan bitki materyali alış-verişi, araba lastikleri vs. bulaşarak ya da iklimsel olaylar vasıtası ile kolaylıkla ülkeye bulaşabileceği düşünülse de, bu çalışmada incelenen örneklerde BBSV'n varlığı tespit edilememiştir.

Öte yandan, TNV-D ve diğer Necrovirs'ler arasında, rekombinasyonun varlığını gösteren gen değişimleri tespit edilmiştir. Bu nedenle, serolojik özellikler ve kısmi nükleotit dizisinin bir Necrovirus' tanımlamak için yeterli olmadığı bildirilmektedir (Cardoso et al., 2005). Ayrıca, yakın zamanda Weiland vd. (2020) ABD'de şeker pancarlarında yürüttükleri RNAseq analizi çalışmalar ile, Tobacco necrosis virus A (TNV-A)'nın bir varyantını belirlemişlerdir. Muhtemel virüs dizisinin, P8 ve P6 genlerinin Olive mild mosaic virus (OMMV) ya da Olive latent virus-1 (OLV-1)'e; CP ve 3'UTR bölgelerinin ise TNV-A'ya benzer olduğunu bildirmişlerdir. Böylece, bu virüsün toplam 3682 nt uzunluğunda yeni hibrit bir virüs olabileceğini belirtmişler ve BvANV-1 olarak isimlendirmişlerdir [*Alphanecrovirus cinsi* (familya; *Tombusviridae*)]. Üstelik, yakın zamanda ABD (Weiland vd., 2020) ve Avrupa (Liebe ve Varrelmann, 2022) pancar üretim alanlarında Necrovirus ile ilişkili Beta vulgaris satellite virus 1A ve Beta vulgaris satellite virus 1B'nin de varlığı belirlenmiştir.

Ayrıca, bu çalışmada; tuzak bitki testi tekniğine göre yetiştirilen şeker pancarı bitkilerden elde edilen kök örneklerinin mikroskopik olarak incelenmesi sonucunda, incelenen 52 örneğin tamamında *P. betae*'ya ait kışlama spor yapıları tespit edilmiştir (şekil 4.10). *P. betae*, bitki köklerinde obligat bir parazit olarak bulunmakta olup etmenin kışlama spor yapıları yıllarca toprakta kalabilmekte ve böylelikle vektörü olduğu BNYVV, BSBV, BVQ ve BSBMV'nin toprakta uzun yıllar varlığını sürdürmesine imkan sağlamaktadır (Heidel et al., 1997; Crutzen et al., 2009; Tamada, 2016; Mahillon et al., 2021). Diğer taraftan; bu çalışmada *P. betae* ile bulaşık örneklerin %78.8 (41 adet)'inin viruliferous (virüs taşıyan) olduğu yapılan ELISA testlemeleri sonucu ortaya konulmuş olup, %21.2 (11 adet)'sinin ise aviruliferous (virüs taşımayan) olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan; BBSV ve TNV'n vektörü olan *Olpidium spp.*'nin dinlenme spor yapıları ise incelenen 52 örneğin 30 (%57.7)'unun köklerinde belirlenmiş (şekil 4.11), ancak yürütülen ELISA ve RT-PCR alışmaları sonucu tamamının

aviruliferous oldukları anlaşılmıştır. Kök boyaması çalışmalarında, ayrıca Ankara iline ait bir örnekte *Cyanobacteria* spp.'nin varlığı belirlenmiştir (Şekil 4.13). Enteresan olarak, bu örnekte BNYVV efeksiyonu tespit edilmemiştir. Nitekim; siyanobakteriler (mavi-yeşil algler), 16S rRNA ve klorofil-a içeren, karbondioksit ve atmosferik azotu fiske edebilen, fotosentez yapma yeteneği olan, organik karbon ve oksijen üretebilen tek prokaryot organizma grubudur (Mejean et al., 2010). Öte yandan, bazı siyanobakterilerin, bitki patojenlerinin hastalık oluşumunu azalttığı tespit edilmiştir. Örneğin; *Calothrix elenkinii*'nin kültür filtratı ve etil asetat ekstresinin; saksı denemelerinde, *Pythium aphanidermatum* ile enfekteli soya fasulyesi, domates, biber tohumları üzerinde hastalık şiddetini azalttığı belirlenmiştir (Manjunath et al., 2010). Ayrıca, *Pythium debaryanum*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Gibberella fujikuroi* ve *Rhizoctonia solani*'yi içeren bir grup fungal patojen ile inokule edilmiş domates fidelerinde çökerten hastalığının *Trichormus variabilis* ve *Anabaena oscillarioides* uygulamaları ile azaldığı görülmüştür (Chaudhary et al., 2012).

Mekanik inokulasyon yöntemi virüslerin çoğaltılması ve teşhisinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada, tuzak bitki testini takiben şeker pancarı örneklerinin ELISA ile testlenmesi sonucu, gerek tek olarak TMV ile bulaşık (19 ve 25 no'lu), gerekse TMV+BNYVV ile enfekteli (3, 20 ve 46 no'lu) absorbans değeri yüksek olan örnekler seçilmiş ve TMV izolatlarının konukçu çevresine göre farklılıklarını belirleyebilmek için biyolojik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ancak, bu örneklerin aktarıldığı test bitkilerinde virüs benzeri birtakım belirtiler görülmesine rağmen, ELISA testlemeleri ile test bitkilerinin hiçbirinde TVM'nin varlığı tespit edilememiştir. Erdem (2010) Samsun ili tütün üretim alanına ait TMV izolatı ile yürüttüğü mekanik inokülasyon çalışmaları sonucu; bu izolatın *N. benthamiana*'da inokülasyondan 5-7 gün sonra hızlı bir şekilde çoğalarak üst yapraklarda hafif mozayik, kıvrıcıklık ve şekil bozukluğu oluşturduğunu ve hatta ilerleyen dönemlerde bitkide geriye doğru ölümün oluştuğunu bildirmiştir. *N. rustica*'da ise virüs-inokule edilen yapraklarda nekrotik lekeler; ilerleyen dönemlerde yapraklarda deformasyon ve geriye doğru ölümün görüldüğünü belirtmiştir. Diğer taraftan, aynı izolatın *C. quinoa*'da bitkilerinde ne lokal, ne de sistemik hiçbir belirti oluşturmadığını rapor etmiştir. Bu çalışmada ise, TMV ile tek olarak enfekteli olarak belirlenen 19 ve 25 no'lu örneklerin *N. benthamiana* ve *N. rustica* bitkilerine aktarımı sonucu bu bitkilerin üst yapraklarında herhangi bir simptom oluşumu gözlenmemiştir (Tablo 4.5). Öte yandan, *C. quinoa*'da 19 no'lu örneğin aktarımı sonrasında virüs inokule edilen yapraklarda klorotik lokal lezyon, 25 no'lu

örneğin aktarımı sonrası ise, yaprak damarlarında açılmanın olduğu görülmüş, sistemik belirti ise Erdem (2010)'un bulgularına benzer şekilde her iki izolatta da kayıt edilmemiştir. Öte yandan, Listihani vd. (2019) Endonozya'da hıyar ve tütünden izole ettikleri iki TMV izolatu ile yürüttükleri biyolojik çalışmalar sonucunda; her iki izolatında *Solanaceae* (*L. esculentum*, *N. tabacum*, *N. glutinosa*, *N. benthamiana*, *C. annuum*), *Cucurbitaceae* (*C. sativus*, *C. melo*, *C. moschata*, *C. lanatus*), *Fabaceae* (*P. vulgaris*, *V. sesquipedalis*, *G. max*) üyelerini sistemik olarak enfekte ettiğini saptamışlardır. Bununla birlikte, bu izolatlarının her ikisinin de *G. globosa*, *C. amaranticolor*, *O. barrelieri* ve *A. Conyzoides*'te nekrotik lokal lezyon oluşturduğunu bildirmişlerdir (Listihani et al., 2019). Çalışmalarda benzer test bitkilerinde gözlenen simptom farklılıkları, TMV izolatlarındaki genetik varyasyondan kaynaklanmış olabilir. Nitekim; TMV'nin doğada biyolojik özellikleri farklı olan birçok streyni bulunmaktadır (Nassar et al., 2012). Diğer taraftan; bu çalışmada, test bitkilerinde TMV'nin tespit edilememe sebebinin, test bitkilerinin ELISA ile testinde kullanılan antiserumun kullanım süresinin dolmuş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim, daha önce elimizde sınırlı miktarda bulunan, raf ömrü dolmamış TMV antiserumu ile bu çalışmada şeker pancarları testlemiş ve TMV için incelenen 52 örneğin 16'sında pozitif sonuç alınmıştır.

Ayrıca, bu çalışmada TMV+BNYVV ile bulaşık üç örneğin (3, 20 ve 46 no'lu) test bitkilerine mekanik inokulasyonu yapılmıştır. Ancak, 3 no'lu örneğin aktarıldığı, test bitkilerinin hem lokal, hem de sistemik üst yaprakları BNYVV ve TMV için ELISA ile test edilmiş (Tablo 4.6) ve sadece *C. quinoa*'nın üst yapraklarında BNYVV enfeksiyonu tespit edilmiştir. BNYVV, enfekteli bitki özsuyunun mekanik inokulasyonu yolu ile *Chenopodiaceae* familyasından birçok bitki türüne ilaveten, *Aizoaceae*, *Amaranthaceae*, *Caryophyllaceae* ve *Solanaceae* familyalarına ait bazı bitki türlerine de taşınabilmektedir (Tamada and Baba, 1973; Tamada, 1975, 2002; Kuszala and Putz, 1977; Hugo et al., 1996). Bu virüsün *C. quinoa* ve *T. expansa* gibi konukçularda yayılımı, inokulasyon yapılan yapraklarla sınırlı kalmakta birlikte; *Beta macrocarpa*, *B. vulgaris* subsp. *maritima*, *S. oleracea*, ve *N. benthamiana*'da ise sistemik enfeksiyon oluşturmaktadır (Tamada, 1975). Benzer şekilde; Uzunbacak (2019)'da incelediği 10 BNYVV izolatından sadece Konya ilinden elde ettiği KNYA-386 izolatının; *C. quinoa*'a mekanik inokulasyonu sonrası 13 tekerrürün yalnızca birinde simptom oluşturmaksızın, sistemik enfeksiyona neden olduğunu ELISA testi ile saptamıştır. Elde edilen bu sonuçlar, literatürde *C. quinoa*'nın BNYVV'nin lokal lezyon

konukçusu olduğu bildirilmesine rağmen; ülkemize ait bazı BNYVV izolatlarının bu bitkide sistemik enfeksiyon da oluşturabildiğini göstermiştir. Nitekim; Gilmer (2016), *C. quinoa* bitkisinin BNYVV'nin lokal lezyon konukçusu olduğunu ve bu lokal simptomların oluşması için BNYVV'nin genom segmentlerinden RNA-1 ve RNA-2'nin gerekli ve yeterli olduğunu bildirmiştir. Sistemik enfeksiyon oluşumuna sebep olan bu BNYVV izolatlarının, ileride yürütülecek çalışmalarla RNA-1 ve RNA-2 genom segmentlerine ait sekans analizlerinin elde edilerek *C. quinoa*'da lokal lezyon oluşturan izolatlarla kıyaslanması yerinde olacaktır.



5. SONUÇ

Dünya’da ve ülkemizde toprak kökenli viral hastalıklar şeker pancarı üretimini büyük ölçüde tehdit etmektedir. Bu tez çalışmasında, Konya ve Ankara illeri şeker pancarı üretim alanlarında bulunan toprak kökenli virüsler serolojik, moleküler ve/ya da biyolojik yöntemlerle araştırılmıştır. Yürütülen DAS-ELISA testlemeleri sonucunda; incelenen örneklerin %78.8’inin BNYVV, %30.8’inin ise TMV ile enfekteli olduğu görülmüştür. Bu çalışmada BBSV, TNV ve TRV ile bulaşık örneğe rastlanılmamıştır. Diğer taraftan; bu örneklerde BBSV’nin bulunma durumu ise, virüsün CP gen bölgesine spesifik primerler kullanılarak RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Bunun sonucunda, her iki ile ait seçilen toplam 12 örneğin sekizinin (%66.7) BBSV ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, 52 örnekte kök boyaması çalışmaları yapılarak *P. betae*’nin dinlenme spor yapıları ışık mikroskop altında incelenmiş ve bu örneklerin tamamında etmenin varlığı tespit edilmiştir. BBSV ve TNV’ün vektörü olan *Olpidium spp.*’nin dinlenme spor yapıları ise incelenen örneklerin %57.7’sinin köklerinde belirlenmiştir.

Öte yandan, tuzak bitki testi ile elde edilen şeker pancarı kök ya da yaprak örneklerinin (toplam yedi adet) mekaniksel inokülasyon yöntemi ile farklı test bitkilerine aktarımı sonucu, bu bitkilerde virüs benzeri bir takım belirtiler gözlenmiş ancak yürütülen serolojik ve/ya da moleküler çalışmalar ile TNV, TMV ve BBSV enfeksiyonu tespit edilememiştir. Bu nedenle, gözlenen bu belirtilerin başka toprak kökenli şeker pancarı virüs hastalıklarından da kaynaklanması mümkün olduğundan, benzer çalışmalara devam edilerek bu virüs/virüslerin tespitinin yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abe, H. and Tamada, T. (1986). Association of Beet necrotic yellow vein virus with isolates of *Polymyxa betae* Keskin. *Annls. Phytopath. Soc. Jap.* 52: 235-247.
- Adams, M.J., Antoniow, J.F. and Kreuze, J. (2009). Virgaviridae: a new family of rod-shaped plant viruses. *Archives of Virology*, 154: 1967-1972.
- Agrios, G.N. (1988). Plant Pathology. Virus diseases of tobacco. Third Edition. Academic, pp. 803.
- Akbaş, B., Morca, A.F. ve Coşkan, S. (2021). Ankara, Eskişehir ve Konya illeri marul üretim alanlarında görülen viral hastalık etmenlerinin tespiti. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 31 (2): 387-395.
- Akınerdem, F. (2022). Şeker Pancarı Tarımı. Nobel Yayınevi, İzmir, ss.59-69.
- Andika, I. B., Kondo, H., Nishiguchi, M. And Tamada, T. (2012). The cysteine-rich proteins of beet necrotic yellow vein virus and tobacco rattle virus contribute to efficient suppression of silencing in roots. *Journal of General Virology*, 93: 1841-1850.
- Anonim, (2005). <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/viral/pdlessons/Pages/TobaccoMosaic.aspx>. (Erişim tarihi: 01.06.2023).
- Anonim, (2020), <https://www.atlasbig.com/en-in/countries-by-sugarbeet-production>. (Son erişim tarihi: 07.06.2023).
- Anonim, (2022). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/42775#toDistributionMaps>; (Erişim Tarihi: 12.07.2022).
- Anonim, (2022). TÜİK Bitkisel Üretim İstatistikleri. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?locale=tr>. (Erişim Tarihi: 12.05.2023).
- Anonim, (2013). <http://ephytia.inra.fr/en/C/10905/Tobacco-Tobacco-necrosis-virus-TNV> (Erişim tarihi: 16.05.2023).
- Anonim, (2008). Zirai Mücadele Teknik Talimatları (Cilt 2). Ankara: Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü. Sayfa: 53-57.
- Asher, M.J.C. and Blunt, S.J. (1987). The ecological requirements of *Polymyxa betae*. Proceeding of the 50th Winter Congress of the Int. Inst. Sugar Beet Res., Brussels, 45-55.
- Barbarossa, L., Vetten, H.J., Kaufmann, A., Lesemann, D.E. and Koenig, R. (1992). Monoclonal antibodies to Beet soil-borne virus. *Ann. Appl. Biol.*, 121: 143-150.
- Barr, K.J. and Asher, M.J.C. (1992). The host range of *Polymyxa betae* in Britain. *Plant Pathology*, 41 (1): 64-68.
- Biancardi, E. and Lewellen, R.T. (2016). "Introduction". Rhizomania. Editörler: Biancardi, E., Tamada, T. Switzerland: Springer.
- Blunt, S.J., Asher, M.J.C. and Gilligan, C.A. (1991). Infection of sugar beet by *Polymyxa betae* in relation to soil temperature. *Plant Pathology*, 40: 257-267.
- Bonkowski, J. 2021. Tobacco Rattle Virus (TRV). Purdue University Landscape Report, Issue 21-07.
- Cai, Z.N., Chen, D.H., Wu, M.S., Cui, X.M., Yu, J.L. and Liu, Y. (1993). Identification of pathogenic virus of beet black scorch disease and detection by synthesized cDNA probes. *Journal of Beijing Agriculture University*, 19:112.
- Campbell, R.N. (1985). Longevity of *Olpidium brassicae* in air-dried soil and the persistence of the lettuce big-vein agent. *Can. J. Bot.* 63: 2288-2289.

- Campbell, R.N. (1996). Fungal transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 87-108.
- Canova, A. (1959). On the pathology of sugar beet. *Inf. Fitopatol.*, 9: 390-396.
- Canova, A. (1966). Ricerche Virologiche Della Bietola. *Annali Accademia Nazionale de Agricoltura*, 72: 37-46.
- Cao, Y.H., Cai, Z.N., Ding, Q., Li, D.W., Han, C.G., Yu, J.L. and Liu, Y. (2002). The complete nucleotide sequence of Beet black scorch virus (BBSV), a new member of the genus *Necrovirus*. *Archive of Virology*, 147: 2431-2435.
- Cardoso, J.M.S., Felix, M.R., Clara, M.I.E. and Oliveira, S. (2005). The complete genome sequence of a new necrovirus isolated from *Olea europaea* L. *Arch. Virol.*, 150 (4): 815-823.
- Chaudhary, V., Prasanna, R., Nain, L., Dubey, S.C., Gupta, V., Singh, R., ... Bhatnagar, A.K. (2012). Bioefficacy of novel cyanobacteria-amended formulations in suppressing damping off disease in tomato seedlings. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 3301-3310.
- Collmer, C.W. and Howell, S.H. (1992). Role of satellite RNA in the expression of symptoms caused by plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 419-442.
- Crutzen, F., Mehrvar, M., Gilmer, D. and Bragard, C. (2009). A fulllength infectious clone of Beet soil-borne virus indicates the dispensability of the RNA-2 for virus survival in planta and symptom expression on *Chenopodium quinoa* leaves. *J Gen Virol*, 90: 3051-3056.
- Crutzen, F. (2010). Pomoviruses associated with the rhizomania syndrome: a reverse genetic approach of the genome organization and multiplication requirements in planta. Prom.: Bragard, Claude <http://hdl.handle.net/2078.1/33358>
- Çiçek, Y. ve Yorgancı, Ü. (1991). Studies on the incidence of tobacco mosaic virus on certified seed of tomato, pepper and eggplant in Aegean region. *Journal of Turkish Phytopathology*, 20 (2-3): 57-68.
- D'ambra, V., and Mutto, S. (1977). The ultrastructure of *Polymyxra betae* zoospore exit-tube differentiation. *Can. J. Bot.* 55: 831-839.
- Dawson, W.O. (1992). Tobamovirus-Plant Interactions. *Virology*, 186: 359-367.
- De Biaggi, M., Giuncitiedi, L., Poijni, C., Dradi, D. and Poggi Pollini, C. (1986). Im-piego Dela Tecnica Elisa Per Determinare il Livello di Tolleranze al Virus Dela Rhizomania in Genotipi di Bietole Allevate in Serra. *Sementi Elette*, 32: 11-13.
- Dijkstra, J. and Khan, A. J. (2002). "Characteristic features of virus transmission by nematodes". Jawaid A. Khan and Jeanne Dijkstra (eds.). in: Plant Viruses as Molecular Pathogens (s. 63-75). Binghamton: The Haworth Press, Inc.
- Dikova, B. (2006). Identification of Tobacco rattle virus (TRV) in sugar beet in Bulgaria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 20 (3): 49-59.
- Dunne, C.P., Glen, M., Tommerup, I.C., Shearer, B.L., Hardy, G. (2002). Sequence variation in the rDNA ITS of Australian *Armillaria* species and intra-specific variation in *A. Luteobubalina*. *Australasian Plant Pathology*, 31: 241-251.
- Dunoyer, P., Ritzenthaler, C., Hemmer, O., Michler, P. and Fritsch, C. (2002). Intracellular localization of the Peanut clump virus replication complex in tobacco BY-2 protoplasts containing green fluorescent protein-labeled endoplasmic reticulum or golgi apparatus. *Journal of Virology*, 76: 865-874.
- Elçi, Ş., Geçit, H. H. ve Kolsarıcı, Ö. (1994). Tarla Bitkileri, Ankara Üniversitesi Yayınları, Ankara, 1, 55-161.

- Erdem, N. (2010). Samsun ilinde tütün (*Nicotiana tabacum* L.) yetiştirilen alanlarda enfeksiyon oluşturan virüslerin belirlenmesi. OMU Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 63s.
- Erkan, S. and Yorgancı, Ü. (1983). A strain of Tobacco mosaic virus (TMV) affecting pepper plants. *J. Turkish Phytopath.*, 12 (2-3): 83-101.
- Falk, B.W. and Duffus, J.E. (1977). The first report of *Polymyxa betae* in the Western Hemisphere. *Plant Disease*, 61: 492-494.
- Fang, L. and Coutts, R.H. (2013). Investigations on the tobacco necrosis virus D p60 replicase protein. *PLoS One*. 8, e80912.
- FAO. (2022). <http://www.fao.org/faostat>. Erişim tarihi: 12.05.2023.
- Farzadfar, S., Pourrahim, R., Golnaraghi, A.R. and Ahoonmanesh, A. (2005). First report of Beet virus Q on sugar beet in Iran. *Plant Disease*, 89: 1359.
- Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Deselberger, U. and Ball, L.A. (2005). Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, 1162.
- Felix, M.R.F. and Clara, M.I.E. (2002). Two necrovirus isolates with properties of Olive latent virüs 1 and of Tobacco necrosis virus from olive in Portugal. Proceedings of 4. International Symposium on Olive Growing. *Acta Horticulturae*, 586 (2): 725-727.
- Garfinkel, A., Steinlage, T., Chumley, J. and Chastagner, G. (2017). Tobacco rattle virus in peonies: A reference guide for cut flower and rootstock producers. Washington State University.
- Gibbs, A.J. (1977). Tobamovirus group, CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No. 184.
- Gilmer, D. (2016). "*Molecular biology and replication of Beet necrotic yellow vein virus*". Rhizomania. Editörler: Biancardi, E., Tamada, T. Switzerland: Springer.
- Gilmer, D. (2017). Virus Taxonomy Profile: Benyviridae. *Journal of General Virology*, 98 (7): 1571-1572.
- Gilmer, D. and Ratti, C. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Benyviridae. *Journal of General Virology*, 98:1571-1572.
- Gonzalez-Vazquez, M., Ayala, J., Garcia-Arenal, F. and Fraile, A. (2009). Occurrence of Beet black scorch virus infecting sugar beet in Europe. *Plant Disease*, 93: 21-24.
- Grimmer, M.K., Kraft, T., Francis, S.A. and Asher, M.J.C. (2008). QTL mapping of BNYSV resistance from the WB258 source in sugar beet. *Plant Breeding*, 127: 650-652.
- Guo, L.H., Cao, Y.H., Li, D.W., Niu, S.N., Cai, Z.N., Han, C.G., Zhai, Y.F. and Yu, J.L. (2005). Analysis of nucleotide sequences and multimeric forms of a novel satellite RNA associated with Beet black scorch virus. *J. Virol.*, 79: 3664-3674.
- Hartwright, L.M., Hunter, P.J. and Walsh, J.A. (2010). A comparison of *Olpidium* isolates from a range of host plants using internal transcribed spacer sequence analysis and host range studies. *Fungal Biol.*, 114: 26-33.
- Heidel, G.B., Rush, C.M., Kendall, T.L., Lommel, S.A. and French, R.C. (1997). Characteristics of Beet soilborne mosaic virus, a furo-like virus infecting sugar beet. *Plant Disease*, 81: 1070-1076.
- Herrera-Vasquez, J. A., Cebrian, M. C., Alfero-Fernandez, A., Cordoba-Selles, M. C. and Jorda, C. (2009). Multiplex-PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Olpidium bornovanus*, *O. brassicae*, and *O. virulentus*. *Mycological Reserach*, 113: 602-610.
- Hoffmann, G.M., Nienhaus, F., Schonback, F., Weltzien, H.C. and Wilbert, H. (1985). Lehrbuch der Phytomedizin. Z. Auflage, Verlag Paul Parey (Berlin and Hamburg), 488p.

- Hugo, S.A., Henry, C.M. and Harju, V. (1996). The role of alternative hosts of *Polymyxa betae* in transmission of Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in England. *Plant Pathology*, 45: 662-666.
- Hull, R. (2002). *Matthew's Plant Virology*, 4th ed. Bath Press, Great Britain.
- Islam, W., Qasim, M., Ali, N., Tayyab, M., Chen, S. and Wang L. (2018). Management of Tobacco mosaic virus through natural metabolites. *Records Nat. Prod.*, 12 (5): 403.
- Ivanovic, M. and McFarlane, I. (1982). A tubular virus associated with infection of sugar beet by *Polymyxa betae*. *Rothamsted Exp. Stn. Rep.* 1981: 190-191.
- Ivanovic, M., Macfarlane, I. and Woods, R.D. (1983). Viruses of sugar beet associated with *Polymyxa betae*. *Ann. Rep. Rothamstead Exp. Stn.*, 189-190.
- Jackson, A.O., Heinze, C., Torrance, L., Adams, M.J. and MacFarlane, S.A. (2011). "Virgaviridae". King, A.M.Q., Adams, M. J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (eds.), in: *Virus Taxonomy* (s. 1139-1162). Oxford: Elsevier.
- Jiang, J.X., Zhang, J.F., Che, S.C., Yang, D.J., Yu, J.L., Cai, Z.N. and Liu, Y. (1999). Transmission of beet black scorch virus by *Olpidium brassicae*. *J. Jiangxi Agric. Univ.* 21: 525-528.
- Jiang, L., Min, L., Cui, L., Yang, G., DaWei, L., Chen Gui, H., and JiaLin, Y. (2008). Effects on the local symptoms of subgenomic RNAs expressions and their translational products of Tobacco necrosis virus A Chinese isolate. *Sci. Bull. (Beijing)*, 53:1682-1690.
- Kajiyama, T., Yoshizawa, A., Yoshida, T., Yanagisawa, A., Yoshimura, Y., Ohtsuchi, K., Abe, H. and Niura, T. (1990). Response of sugar beet varieties to rhizomania disease of sugar beet. I. The yield and quality of sugar beet. *Japanese Society of Sugar Beet Technologists*, 32: 53-58.
- Karanfil, A. ve Korkmaz, S. (2021). Güney Marmara Bölgesi kabakgıl üretim alanlarında Cucumber mosaic virus enfeksiyonunun tespiti ve genetik çeşitliliği. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 58 (2): 31-40.
- Kaufmann, A., Koenig, R. and Lesemann, D.E. (1992). Tissue print-immunoblotting reveals an uneven distribution of Beet necrotic yellow vein virus and Beet soil-borne viruses in sugarbeets. *Arch. Virol.* 126: 329-335.
- Kaya, R. (2009). Türkiye’de şeker pancarı ekim alanlarında rhizomania hastalığının yayılma durumu. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 15 (4): 332-340.
- Keskin, B. (1964). *Polymyxa betae* n.sp., ein Parasit in den Wurzeln von Beta vulgaris Tournefort, Besonders Während der Jugendent Wicklung der Zuckerrübe. *Archiv für Mikrobiologie*, 49: 348-374.
- King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. (eds.) (2011). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, CA: Elsevier Inc.
- Koch, F. (1987). Bericht über eine in verschiedene zuckerrübenanbauggebiete der Turkseker in Anatolien und Thrazien zum stadium von wurzelerkrankungen. KWS Kleinwanzlebener Saatzucht, AG, Einbeck, Germany.
- Koenig, R., Pleij, C.W.A., Beier, C. and Commandeur, U. (1998). Genome Properties of Beet Virus Q, A New Furo-like Virus from Sugarbeet, Determined from Unpurified Virus. *Journal of General Virology*, 79: 2027-2036.
- Koenig, R., and Lennefors, B.L. (2000). Molecular analyses of European A, B and P type sources of Beet necrotic yellow vein virus and detection of the rare P type in Kazakhstan. *Archives of Virology*, 145: 1561-1570.

- Koenig, R., Haeberlé, A.M. and Commandeur, U. (1997). Detection and characterization of a distinct type of beet necrotic yellow vein virus RNA 5 in a sugarbeet growing area in Europe. *Archives of Virology*, 142:1499-1504.
- Koenig, R., Jarausch, W., Li, Y., Commandeur, U., Burgermeister, W., Gehrke M. and Lüddecke, P. (1991). Effect of recombinant beet necrotic yellow vein virus with different RNA compositions on mechanically inoculated sugarbeets. *Journal of General Virology*, 72: 2243-2246.
- Koenig, R., Lüddecke, P. and Haeberle, A.M. (1995). Detection of beet necrotic yellow vein virus strains, variants and mixed infections by examining single-strand conformation polymorphisms of immunocapture RT-PCR products. *Journal of General Virology*, 76 (8): 2051-2055.
- Koenig, R. and Valizadeh, J. (2008). Molecular and serological characterization of an Iranian isolate of Beet black scorch virus. *Archives of Virology*, 153: 1397-1400.
- Koganezawa, H., Takayama, T. and Sasaya, T. (2004). Difference in resting-spore formation between crucifer and non crucifer strains of *Olpidium brassicae* sensu lato. *Jpn. J. Phytopathol.*, 70: 307-313.
- Koganezawa, H., Inoue, H. and Sasaya, T. (2005). Host specificity and multiplication of eight isolates of *Olpidium brassicae* sensu lato and its related *Olpidium* sp. *Bulletin of the National Agricultural Research Center for Western Region*, 4: 39-59.
- Krstic, B., Stojanovic, G., Vico, I., Barac, M. and Malinaric, B. (1997). Comparative investigations of some Tobacco mosaic virus isolates from different host plants. *Acta Horticulturae*, 462: 483-490.
- Kruse, M., Koenig, R., Hoffman, A., Kaufmann, A., Commandeur, U., Solevye, A.G., Savenkov, I. and Burgermeister, W. (1994). Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription-PCR products reveals the existence of two major strain groups of Beet necrotic yellow vein virus. *J. General Virol.* 75: 1835-1842.
- Kurstak, E. (1981). Handbook of Plant Virus Infections: Comparative Diagnosis. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Kutluk Yılmaz, N.D., Sokmen, M., Gulser, C., Saracoglu, S. and Yılmaz, D. (2010). Relationships between soil properties and soilborne viruses transmitted by *Polymyxa betae* Keskin in sugar beet fields. *Spanish Journal Agricultural Research*, 8 (3): 766-769.
- Kutluk Yılmaz, N.D., Arli-Sokmen, M., Kaya, R., Sevik, M.A., Tunali, B. and Demirtas, S. (2016). The widespread occurrences of Beet soil-borne virus and RNA-5 containing Beet necrotic yellow vein virus isolates in sugar beet production areas in Turkey. *European Journal of Plant Pathology*, 144: 443-455.
- Kutluk Yılmaz, N.D., Kaya, R. and Değer, T. (2019). *Beet necrotic yellow virus* 'ün patojenite ile ilişkili P25 proteininde delesyon belirlenen yeni varyantları üzerinde araştırmalar. TÜBİTAK-TOVAG 2150495 no'lu proje kesin sonuç raporu.
- Lange, L. and Insunza, V. (1977). Root-inhabiting *Olpidium* species: the *O. radicale* complex, *Transactions of the British Mycological Society*, 69: 377-384.
- Legreve, A., Delfosse, P. and Maraite, H. (2002). Phylogenetic analysis of *Polymyxa* species based on nuclear 5.8S and internal transcribed spacers ribosomal DNA sequences. *Mycol. Res.* 106: 138-147.
- Lennefors, B.L. (2006). Molecular breeding for resistance to rhizomania in sugar beets. Swedish University of Agricultural Sciences, Doctoral Thesis, 41p. Uppsala.
- Lesemann, D.E., Koenig, R., Lindsten, K. and Henry, C. (1989). Serotypes of beet soil-borne furovirus from FRG and Sweden. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 19: 539-540.

- Li, J., Li, M., Li, C., Gao, Y., Li, D., Han, C. and Yu, J. (2008). Effects on the local symptoms of subgenomic RNAs expressions and their translational products of Tobacco necrosis virus A Chinese isolate. *Chinese Science Bulletin*, 53: 1682-1690.
- Li, M., Liu, T., Wang, B., Han, C.G., Li, D.W. and Yu, J.L. (2008). Phylogenetic analysis of Beet necrotic yellow vein virus isolates from China. *Virus Genes*, 36: 429-432.
- Liebe, S. and Varrelmann, M. (2022). Ongoing evolution of Beet necrotic yellow vein virus towards *Rz1*-resistance breaking in Europe. *Plant Pathology*, 71 (8): 1647-1659.
- Listihani, S.H.H., Wiyoni, S. and Damayanti, T.A. (2019). Characteristic of Tobacco mosaic virus isolated from cucumber and tobacco collected from East Java, Indonesia. *Biodiversitas*, 20 (10): 2937-2942.
- Liu, J. and Xian, H. (1995). Preliminary report on Beet black scorch virus. *China Sugar Beet*, 3: 30-31.
- Liu, H., Gulati Sakhuja, A.N. (2011). Biological and molecular characterization of Beet oak-leaf virus. American Society of Sugarbeet Technologists
- Lommel, S.A., Martelli, G.P. and Russo, M. (2000). Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, ed. by M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, R.B. Wickner (Academic Press, San Diego), pp. 791-825.
- Luria, N., Smith, E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M. and Levin, I. (2017). A new Israeli Tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm-2² resistance genes. *PloS One*. 12 (1): e0170429.
- Maccarone, L.D., Barbetti, M.J., Sivasithamparam, K. and Jones, R.A.C. (2010). Molecular genetic characterization of *Olpidium virulentus* isolates associated with big-vein diseased lettuce plants. *Plant Disease*, 94 (5): 563-569.
- MacFarlane, S.A. (2003). Molecular determinants of the transmission of plant viruses by nematodes. *Molecular Plant Pathology*, 4: 211-215.
- Mahillon, M., Decroes, A., Peduzzi, C., Romay, G., Legrève, A. and Bragard, C. (2021). RNA silencing machinery contributes to inability of BSBV to establish infection in *Nicotiana benthamiana*: Evidence from characterization of agroinfectious clones of Beet soil-borne virus. *J. Gen. Virol.*, 102:001530.
- Manjunath, M., Prasanna, R., Nain, L., Dureja, P., Singh, R., Kumar, A., and Kaushik, B.D. (2010). Biocontrol potential of cyanobacterial metabolites against damping off disease caused by *Pythium aphanidermatum* in solanaceous vegetables. *Archieve Phytopathology and Plant Protection*. 43: 666-677.
- McGrann, G.R.D., Grimmer, M.K., Mutasa-Göttgens, E.S. and Stevens, M. (2009). Progress towards the understanding and control of sugar beet rhizomania disease. *Molecular Plant Pathology*, 10 (1): 129-141.
- Mehrvar, M. (2009). Diversity of soil-borne sugar beet viruses in Iran: a comprehensive study of Beet necrotic yellow vein virus, Beet black scorch virus and other pomoviruses in Iran. Ph.D. Thesis. Universite Catholique de Louvain, Belgium, 160 pp.
- Mejean, A., Mann, S., Vassiliadis, G., Lombard, B., Loew, D. and Ploux, O. (2010). In Vitro Reconstitution of the First Steps of Anatoxin-a Biosynthesis in *Oscillatoria* PCC 6506: From Free L-Proline to Acyl Carrier Protein Bound Dehydropoline. *Biochemistry*. 49: 103-113.
- Meunier, A., Schmit, J.F., Stas, A., Kutluk, N. and Bragard, C. (2003). Multiplex reverse transcription for simultaneous detection of Beet Necrotic Yellow Vein Virus, Beet

- Soilborne Virus, and Beet Virus Q and their vector *Polymyxa betae* KESKIN on sugar beet. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (4): 2356-2360.
- Miyanishi, M., Kusume, T., Saito, M. and Tamada, T. (1999). Evidence for three groups of sequence variants of beet necrotic yellow vein virus RNA 5. *Archives of Virology*, 144: 879-892.
- Molnar, A., Havelda, Z., Dalmay, T., Szutorisz, H. and Burgyán, J. (1997). Complete nucleotide sequence of tobacco necrosis virus strain DH and genes required for RNA replication and virus movement. *Journal of General Virology*, 78: 1235-1239.
- Monteiro, F., Romeiras, M.M., Batista, D., and Duarte, M.C. (2013). Biodiversity assessment of sugar beet species and its wild relatives: linking ecological data with new genetic approaches. *Am. J. Plant Sci.*, 4: 21-34.
- Mouhanna, A.M., Nasrallah, A., Langen, G. and Schlösser, E. (2002). Surveys for Beet Necrotic Yellow Vein Virus (the Cause of Rhizomania) Other Viruses, and Soil Borne Fungi Infecting Sugar Beet in Syria. *Journal of Phytopathology*, 150: 657-662.
- Murant A.F. and Mayo M.A. (1982). Satellites of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 20: 49-68.
- Nassaj-Hosseini, S.M., Shams-bakhsh, M., Mehrvar, M. and Salmanian, A.H. (2013). Evolutionary characterization and genetic structure of Iranian isolates of Beet necrotic yellow vein virus population based on p25 protein. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15: 829-842.
- Nassar, E.A., El-DougDoug, K.A., Osman, M.E., Dawoud, R.A. and Kinawy, A.H. (2012). Characterization and elimination of a TMV isolate infecting chrysanthemum plants in Egypt. *Int. J. Virol.*, 8: 14-26.
- Navarro, J.A., Botella, F., Maruhenda, A., Sastre, P., Sánchez-Pina, M.A. and Pallas, V. (2004). Comparative infection progress analysis of lettuce big-vein virus and mirafiori lettuce virus in lettuce crops by developed molecular diagnosis techniques. *Phytopathology*, 94: 470-477.
- Navarro, J.A., Torok, V.A., Vetten, H.J. and Pallas V. (2005), Genetic variability in the coat protein genes of Lettuce big vein associated virus and Mirafiori lettuce big-vein virus. *Arch. Virol.*, 150: 681-694.
- Newburn, L.R., Nicholson, B.L., Yosefi, M., Cimino, P.A. and White, K.A. (2014). Translational readthrough in tobacco necrosis virus-D. *Virology*, 450: 258-265.
- Özdemir, H. (2014). Trakya Bölgesi şeker pancarı üretim alanlarında Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), Beet western yellows virus (BWYV) ve Beet yellows virus (BYV) hastalıklarının saptanması üzerine araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 42s.
- Özer, G. ve Ertunç, F. (2005). Amasya Şeker Fabrikası şeker pancarı ekim alanlarında rhizomania hastalığının belirlenmesi. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 11 (3): 339-343.
- Özgür, O.E. (1995). Türkiye Şeker Pancarı Hastalıkları. Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş. Genel Müdürlüğü, Yayın No: 218: 33-47.
- Özgür, O.E. (2003). Türkiye Şeker Pancarı Hastalıkları. Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş. Genel Müdürlüğü, Yayın No: 219: 52-55.
- Pavli, O., Prins, M. and Skaracis, G.N. (2010). Detection of Beet soil-borne virus and Beet virus Q in sugar beet in Greece. *Journal of Plant Pathology*, 92 (3): 793-796.
- Pferdmenges, F. (2007). Occurrence, Spread and Pathogenicity of Different Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) Isolates. Der GeorgAugust-Universität Göttingen, Doctoral Thesis, 110pp.

- Piskin, Ü. ve Yorgancı, Ü. (1998). "Düzce ve Adapazarında Yetistirilen Yabancı Tütün Çesitlerinde Görülen Virütik Belirtilerin Etmenlerinin Belirlenmesi Üzerinde Araştırmalar". VIII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 340-344.
- Prillwitz, H. and Schlösser, E. (1992). Beet soil-borne virus: Occurrence, Symptoms and effect on plant development. *Med. Fac. Landbou. Üniv. Gent*, 57/2a: 295-302.
- Prillwitz, H. and Schlösser, E. (1993). Temperature requirements of Beet necrotic yellow vein and Beet soil-borne virüs. *Journal of Plant Disease and Protection*, 100 (6): 665-669.
- Putz, C., Merdinoğlu, D., Lemaire, O., Stocky, B., Valentin, P. and Wiedemann, S. (1990). Beet Necrotic Yellow Vein Benyvirus causal agent of Rhizomania. *R. P. P.*, 69 (5): 247-254.
- Rahim, M.D., Andika, I.B., Han, C., Kondo, H. and Tamada, T. (2007). RNA 4-encoded p31 of Beet necrotic yellow vein virus is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots. *Journal of General Virology*, 88 (5): 1611-1619.
- Rezaei, J., Bannayan, M., Nezami, A., Mehrvar, M. and Mahmoodi, B. (2014). Growth analysis of rhizomania infected and healthy sugar beet. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 17: 59-69.
- Richards, K.E. and Tamada, T. (1992). Mapping functions on the multipartite genome of Beet necrotic yellow vein virus. *Annual Review of Phytopathology*, 30: 291-313.
- Roberts, R., Botha, W.J., Wolfaardt, J.P., Jooste, A.E.C. (2015). First report of beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) on red table beet in South Africa. *Plant Disease*, 100 (5):1025- 1026.
- Rochon, D.A., Kakani, K., Robbins, M. and Reade, R. (2004). Molecular aspects of plant virus transmission by *Olpidium* and *Plasmodiophorid* vectors. *Annual Review of Phytopathology*, 42: 211-241.
- Roossinck, M.J., Sleat, D. and Palukaitis, P. (1992). Satellite RNAs of plant viruses: structures and biological effects. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 56: 265-279.
- Rosso, F., Bimbatti, M. and Meriggi, P. (1988). Effetti della rhizomania sulla evoluzione dei paramenti tecnici della produzione. *Sementi Elette*, 34: 41-49.
- Rubino, L. and Martelli, G.P. (2010). Necrovirus. In: Mahy BWJ, van Regenmortel MHV (eds) Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology, Academic Press, pp 233-235.
- Rush, C.M. (2003). Ecology and epidemiology of Benyviruses and plasmodiophorid vectors. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 41: 567-592.
- Rush, C.M. and Heidel, G. (1995). Furovirus Diseases of Sugar Beets in the United States. *Plant Disease*, 79: 868-875.
- Russo, M., Burgyan, J. and Martelli, G.P. (1994). Molecular biology of *Tombusviridae*. *Adv. Virus Res.*, 44: 321-428.
- Rysanek, P., Homa, I. and Zouhar, M. (2006). Study of sugar beet viruses transmitted by *Polymyxa betae* in the Czech Republic. *Proc. Nat. Sci. Matica Srpska Novi Sad*, 110: 47-54.
- Sahtiyanci, S. (1962). Studien über einige wur-zelparasitäre Olpidiaceen. *Arch. Microbiol.*, 41:187-228.
- Samiei, A., Mehrvar, M. and Zakiaghi, M. (2018). Genetic diversity and distribution of Beet black scorch virus in Iran. *Journal of Plant Protection*, 1 (3): 540-547.
- Schirmer, A., Link, D., Cognat, V., Moury, B., Beuve, M., Meunier, A., Bragard, C., Gilmer, D. and Lemaire, O. (2005). Phylogenetic analysis of isolates of Beet necrotic yellow vein virus collected worldwide. *Journal of General Virology*, 86: 2897-2911.

- Shew, D. and Lucas, G.B. (1991). Compendium of Tobacco Diseases. APS Press, St Paul, USA.
- Simon, A.E., Roossinck, M.J. and Havelda, Z. (2004). Plant virus satellite and defective interfering RNAs: new paradigms for a new century. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 42: 415-437.
- Skribic, K. (1995). Influence of additional crop space and nitrogen on yields and quality of sugarbeet cultivars under conditions of rhizomania infection. *Review of Research Work at the Faculty of Agriculture*, Belgrade, 40: 7-23.
- Smith, K. M., and Bald, J. G. (1935). A description of a necrotic virus disease affecting tobacco and other plants. *Parasitology*, 27: 231.
- Sol, H.H., Van Heuven J.C. and Seinhorst, J.W. (1960). Transmission of tobacco rattle virus and *Atropa belladonna* mosaic virus by nematodes. *Tijdschr. PZiekt.*, 66: 228-231.
- Strausbaugh, C.A, and Eujayl I.A. (2018). Influence of Beet necrotic yellow vein virus and freezing temperatures on sugar beet roots in storage. *Plant Disease*, 102 (5): 932-937.
- Suarez, M.B., Grondona, I., Garcia Benavides, P., Monte, E. and Garcia Acha, I. (1999). Characterization of Beet Necrotic Yellow Vein Furovirus from Spanish Sugar Beet. *International Microbiology*, 2: 87-92.
- Sunulu, S. ve Sunulu, A. (2016). Şeker pancarında cercospora yaprak lekesi hastalığı. *Pankobirlik*, 27 (108): 34.
- Şentürk, Ö. (2020). Tarımsal ekonomi ve politika geliştirme enstitüsü tepge.
- Şevik, M.A. ve Akyazı, F. (2008). Bitki patojeni virüslerin bitki paraziti nematodlarla taşınması. *Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi*, 25 (2): 1-12.
- Şiray, A. (1990). Şeker pancarı tarımı. Pankobirlik Yayınları, No: 2, Ankara, 128.
- Tamada, T. and Baba, T. (1973). Beet necrotic yellow vein virus from rizomania-affected sugar beet in Japan. *Japanese Journal of Phytopathology*, 39 (4): 325-332.
- Tamada, T. (1975). Beet necrotic yellow vein virus. CMI/ABB. Descriptions of Plant Viruses. No: 144.
- Tamada, T., Shirako, Y., Abe, H., Saito, M., Kiguchi, T. and Harada, T. (1989). Production and pathogenicity of isolates of beet necrotic yellow vein virus with different numbers of RNA components. *Journal of General Virology*, 70: 3399-3409.
- Tamada, T., Schmitt, C., Saito M., Guilley, H., Richards, K. and Jonard, G. (1996). High resolution analysis of the readthrough domain of beet necrotic yellow vein virus readthrough protein: a KTER motif is important for efficient transmission of the virus by *Polymyxa betae*. *Journal of General Virology*, 77: 1359-1367.
- Tamada, T., Miyanishi, M., Kondo, H., Chiba, S. and Han, C.G. (2002). Pathogenicity and molecular variability of Beet necrotic yellow vein virus isolates from Europe, Japan, China, and the United States. In Proceedings of the 5th Symposium of the International Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors. Denver, American Society of Sugar Beet Technologists, Zurich, Switzerland (pp. 13-16).
- Tamada, T. (2016). "General features of Beet necrotic yellow vein virus". Rhizomania. Editörler: Biancardi, E., Tamada, T. Switzerland: Springer.
- Taylor, C.E. and Robertson, W.M. (1970). Location of tobacco rattle virus in the nematode vector, *Trichodorus pachydermus* Seinhorst. *Journal of General Virology*, 6: 179-182.
- Teakle, D.S. (1960). Association of *Olpidium brassicae* and tobacco necrosis virus. *Nature*, 188: 431-432.

- Temmink, J.H.M., Campbelland, R.N. and Smith, P.R. (1970). Specificity and site of in vitro acquisition of tobacco necrosis virus by zoospores of *Olpidium brassicae*. *J. Gen. Virol.*, 9: 210-213.
- Temmink, J.H.M. (1971). An ultrastructural study of *Olpidium brassicae* and its transmission of Tobacco necrosis virus. *Meded. Landbouwhogeschool Wageningen*, 71:1-135.
- Torrance, L. (2008). Pomovirus. In: Mahy B. W. J., Van Regenmortel M. H. V., editors. *Encyclopedia of virology*. 3rd ed. Academic Press; London. pp. 282–287.
- Torrance, L., Lukhovitskaya, N. I., Schepetilnikov, M. V., Cowan, G. H., Ziegler, A., and Savenkov, E. I. (2009). Unusual long-distance movement strategies of potato mop-top virus RNAs in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 22: 381-390.
- TUİK. (2022). <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?locale=tr>. Erişim Tarihi: 12.05.2023
- Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Introduction to the species concept in virus taxonomy. In: *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 3-16.
- Varanda, C.M.R., Santos, S., Clara, M.I.E. and Felix, M.R. (2015). Olive mild mosaic virus transmission by *Olpidium virulentus*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 142: 197-201.
- Walkey, D.G.A. (1991). *Applied Plant Virology*. Great Britain by St Edmundsbury Press, 338 p.
- Walkinshaw, C.H., Griffin, G.D. and Lawson, R.H. (1961). *Trichodorus christei* as a vector of potato corky ringspot (tobacco rattle) virus. *Phytopathology*, 51: 806-808.
- Wang, B., Pu, H., Han, C.G., Li, D. and Yu, J. (2008). First Report of Tobacco Mosaic Virus on Sugar Beet in China. *Journal of Plant Pathology*, 90 (1): 143-149.
- Ward, L., Fenn, M. and Henry, C. (2003). Development of a direct detection method for *Polymyxa* sp. in soil. *American Society of Sugar Beet Technologists*, 111-114.
- Ward, L., Koenig, R., Budge, G., Garrido, C., McGrath, C., Stubbey, H. and Boonham, N. (2007). Occurrence of two different types of RNA-5 containing beet necrotic yellow vein virus in the UK. *Archives of Virology*, 152: 59-73.
- Weiland, J.J., Larson, R.L., Freeman, T.P. and Edwards, M.C. (2006). First report of Beet black scorch virus in the United States. *Plant Disease*, 90 (6): 828.
- Weiland, J.J., Van Winkle, D., Edwards, M.C., Larson, R.L., Shelver, W.L., Freeman, T.P. and Liu, H.-Y. (2007). Characterization of a U.S. isolate of Beet black scorch virus. *Phytopathology*, 97:1245-1254.
- Weiland J.J., Sharma-Poudel, R., Flobinus, A., Cook, D.E., Secor, G.A. and Bolton, M.D. (2020). RNAseq analysis of rhizomania-infected sugar beet provides the first genome sequence of beet necrotic yellow vein virus from the USA and identifies a novel alphaneovirus and putative satellite viruses. *Viruses*, 12 (20): 626.
- Wetzel, V., Willems, G., Darracq, A., Galein, Y., Liebe, S. and Varrelmann, M. (2021). The *Beta vulgaris*-derived resistance gene Rz2 confers broad-spectrum resistance against soilborne sugar beet-infecting viruses from different families by recognizing triple gene block protein 1. *Mol. Plant Pathol.*, 22: 829-842.
- Xi, D., Lan, L., Wang, J., Xu, W., Xiang, B. and Lin, H. (2006). Variation analysis of two cucumber mosaic viruses and their associated satellite RNAs from sugar beet in China. *Virus Genes*, 33 (3): 293-298.
- Xi, D.H., Li, J., Han, C.G., Li, D.W., Yu, J.L., Zhou, X.P. (2008). Complete nucleotide sequence of a new strain of Tobacco necrosis virus A infecting soybean in China and infectivity of its full-length cDNA clone. *Virus Genes*, 36: 259-266.

- Xu, J. vd. (2012). Two different regions are required for support of variant satellite RNA replication in virulent infection and spontaneous Beet black scorch virus variants. *J. Gen. Virol.*, 93: 2718-2728.
- Yardımcı, N. ve H. Çulal Kılıç. (2011). “Identification of Beet necrotic yellow vein virus in lakes district: A major beet growing area in Turkey“, *Indian Journal of Virology*, 22 (2), 127- 130.
- Yardımcı, N., Çulal Kılıç, H. ve Ürgen, G. (2012). Eskişehir ili şeker pancarı üretim alanlarında görülen bazı virüs hastalıklarının DAS-ELISA yöntemiyle belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 7 (1): 42-50.
- Yu, G., Bu, Q., Cao, Z., Du, X., Xia, J., Wu, M. and Huang, J. (2016). Brominated flame retardants (BFRs): a review on environmental contamination in China. *Chemosphere*, 150: 479-490.
- Yuan, X., Cao, Y., Xi, D., Guo, L., Han, C., Li, D., Zhai, Y. and Yu, J. (2006). Analysis of the subgenomic RNAs and the small open reading frames of Beet black scorch virus. *J. Gen. Virol.*, 87:3077-3086.
- Zhang, K.W., Wang, S.L., Cai, Z.N. and Zhang, H.S. (1996). Preliminary study on beet black scorch disease in Ningxia Province. *China Sugar Beet*, 2: 3-8.
- Zitikaite, I. and Staniulus, J. (2009). Isolation and characterization of tobacco necrosis virus detected on some vegetable species. *Biologija*, 55 (1-2): 35-39.

EKLER

(Ek 1) Hoagland Solüsyonu

Tuzak bitki testi sırasında şeker pancarı bitkilerinin sulanması amacıyla kullanılan Hoagland besin solüsyonu A, B ve C olmak üzere üç stok solüsyondan oluşmaktadır (Dijkstra and De Jager, 1998).

A Solüsyonu

5.06 g KNO_3 , 1.36 g KH_2PO_4 , 4.93 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 12.40 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5.85 g NaCl maddeleri 1000 ml saf suya konularak çözölmüştür.

B Solüsyonu

1 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.04 g EDTA maddeleri ayrı ayrı 50 şer ml'lik saf suda çözdüröldükten sonra bir arada karıştırmıştır.

C Solüsyonu

0.110 g H_3BO_3 , 0.015 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.010 g ZnCl_2 , 0.015 g $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g MoO_3 maddeleri 100 ml saf suda eritilmiştir.

Hoagland besin solüsyonunun hazırlanması için A solüsyonundan 600 ml, B ve C solusyonlarından 15'er ml alınmış ve bu üç solüsyonunu karışımı saf su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

(Ek 2) ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler (g/l)

Fosfat Tamponu Salin (PBS) (pH=7.4)

8.0 g NaCl, 0.2 g KH₂PO₄, 0.2 g KCl, 0.2 g NaN₃, 2.9 g Na₂ HPO₄ .12H₂O

Yukarıdaki kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH'sı 0.1 M NaOH veya 0.1 M HCl ile ayarlanmış ve 4°C'de saklanmıştır.

Kaplama Tampon Çözeltisi (pH=9.6)

1.59 g Na₂CO₃, 2.93 g NaHCO₃, 0.2 g NaN₃

Yukarıdaki kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH'sı ayarlanmış ve 4°C'de saklanmıştır. Her kullanımdan önce pH kontrolü yapılmıştır.

Yıkama Tampon Çözeltisi

1 lt PBS'ye 0.5 ml Tween-20 eklenerek hazırlanmıştır.

Ekstraksiyon Tampon Çözeltisi

1 lt yıkama tampon çözeltisi + 20 g (%2) Polyvinylpyrrolidone 40.000 (PVP-40) + 1g yağsız süt tozu ilave edilerek hazırlanmıştır.

Konjugat Tampon Çözeltisi

Ekstraksiyon tampon çözeltisi, konjugat tampon çözeltisi olarak da kullanılmıştır.

Substrat Tampon Çözeltisi

80 ml saf su içerisine 9.7 ml Diethanolamin ilave edildikten sonra 20 mg NaN₃ eklenmiş ve HCl ile pH 9.8'e ayarlanarak 100 ml'ye tamamlanmıştır.

ÖZ GEÇMİŞ

Vedat CEYLAN, Okay Yaşar Anadolu Lisesi’ni bitirdikten sonra 2015 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünde lisans öğrenimine başladı. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünden 2019 yılında mezun oldu. 2020 yılında aynı üniversitede Fen Bilimleri Enstitüsünde Yüksek Lisansa başladı. Orta seviyede İngilizce bilmektedir. (03.08.2023).

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0002-5759-0318

Yayınlar:

1. Ceylan, V., Kutluk Yılmaz, N.D. (2022). Investigations on soil-borne viruses and their vectors in sugar beet production areas of Ankara and Konya Provinces. *International Soil Science Symposium on Soil Science and Plant Nutrition*, 180-183.