

İsmail Can PAYLAN  
Semih ERKAN

## **Bazı Sebze Tohumlarındaki Viral Etmenlerin Saptanması ve Yaygınlık Oranlarının Belirlenmesi**

Detection of some viral agents in vegetable seeds and  
determination of their prevalence

Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma  
Bölümü, 35100 İzmir/Türkiye,  
ismail.paylan@ege.edu.tr

Alınış (Received): 30.04.2013

Kabul tarihi (Accepted): 17.05.2013

### **Anahtar Sözcükler:**

Sebze tohumu, tohum kaynaklı virüsler,  
virüslerin saptanması, bulunma durumu

### **Key Words:**

Vegetable seed, seed-borne viruses,  
detection of viruses, prevalence

### **ÖZET**

**B**u çalışma, ülkemiz bitkisel üretiminde önemli düzeyde kullanılan sebze tohumlarında bulunan virüslerin saptanması ve bu virüslerin yaygınlık oranlarının belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Çeşitli kuruluş ve üreticilerden toplanan 325 tohum örneği araştırmanın materyalini oluşturmuştur. Sözü edilen tohum örneklerine biyolojik, serolojik ve moleküler testler uygulanmıştır. Testler sonucunda elde edilen bulgulara göre; toplanan sebze tohumu örneklerinde virüslerin tek başına mevcut olmalarının yanında, bazı örneklerde ise birden fazla virüsün bir arada bulunarak karışık enfeksiyonlar oluşturduğu gözlenmiştir. Sebze türlerine göre tohum örneklerindeki viral etmenlerin bulunma durumları %0 ile %69 arasında değişmektedir. En yüksek enfeksiyon oranı % 69 ile biber tohumlarında belirlenirken, çalışmada test edilen patlıcan, bakla ve ıspanak tohumlarında viral etmen olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, testlenen toplam 325 tohum örneğinde %28 oranında viral enfeksiyonlar olduğu saptanmıştır.

### **ABSTRACT**

**T**his study was carried out to detect the viruses in most commonly used vegetable seeds for plant production in our country and to determine the prevalence of these viruses. A total of 325 seed samples were collected from various foundations and farmers. The collected seeds were constituted the study material. Seed samples in question, were tested by biological, serological and molecular methods. According to test results it was found that there are both singular and mix infections in tested seed samples. Prevalence of viral agents in seed samples according to vegetable species, varied from 0% to 69%. While the highest infection rate was determined in pepper seeds, no viral agent was detected in seeds of eggplant, broad bean and spinach. The viral infection rate of 325 tested seed samples was determined as 28%.

### **GİRİŞ**

Hızla artan dünya nüfusunun gıda ihtiyacının karşılanmasının yanında ülkemiz ekonomisine olan katkıları nedeniyle bitkisel üretim önemli bir sektör durumundadır. Bitkisel üretimde birim alandan alınan ürünün arttırılması ve kaliteli ürün elde edilmesini sağlayan önemli faktörlerden birisi de tohumdur. Ülkeler arasındaki işbirliğinin artması ve ulaşım olanaklarının kolaylaşması sonucunda dünya tohum endüstrisi ve

ticareti büyük gelişme göstermiştir (Erkan, 1998; Paylan, 2011).

Ülkemizde tohumluk ihracatı yıllara göre büyük artışlar göstermiştir ve 2004 yılında toplam 126 ton sebze tohumu ihracatı yapılırken, 2007 yılında bu rakam yaklaşık 15 kat artarak 1.485 tona ulaşmıştır. 2008 yılı ve 2009 yıllarında sebze tohumu ihracatında düşüş olduğu görülmüştür (TSÜAB, 2010). Önemli sebze türlerinde 2008 ve 2009 yıllarında en fazla standart

tohum biber ve kavunda üretilmiştir. Hibrit sebze tohumu rakamları incelendiğinde ise, her iki yılda en fazla hibrit tohum üretimi patlıcangiller grubunda domateste ve kabakgiller grubunda ise hıyarda gerçekleştirildiği görülmektedir (TKB, 2011).

Ülkeler arasında tohum ticaretinin artması tohumla taşınan hastalıkların farklı ülkelere nakledilmesine ve doğal olarak da sözü edilen hastalıkların yaygınlığının artmasına neden olmuştur. Çünkü, tohumlar bünyelerinde bulundukları hastalık etmenlerinden zarar görebildikleri gibi bu patojenlerin yayılmalarında ve taşınmalarında aracılık görevi de yapabilmektedir (Paylan, 2011). Tohumlarda bahsedilen hastalık etmenlerinin en önemlilerinden biri de virüslerdir. Özellikle dar konukçu dizisine sahip virüsler için tohumla taşınmanın yaşamı devam ettirme ve mevsimler arası geçişte bir araç olarak düşünülmektedir. Tohumla taşınım, viral hastalıkların böcek vektörler ile yayılabilmesi için ilk enfeksiyon kaynağını oluşturmaları açısından da önemlidir. Tohumla taşınan viral etmenler ayrıca ticari yolla uzun mesafelere ulaşabildiği gibi, tohumun doğal özelliği nedeniyle kısa alanlarda da taşınabilmektedir (Erkan, 1998).

Viral hastalık etmenlerinin tohumla taşınmaları türlere bağlı olarak yüksek oranlarda gerçekleşebilmektedir. Virüsler ile enfekteli tohum ekildiğinde, vektörlerin aracılığı ile epidemiy kolaylıkla yayılabilmekte ve sonuçta üründe %100'e kadar varan oranlarda enfeksiyon ortaya çıkabilmektedir (Carroll, 1983; Riedle-Bauer ve ark., 2002). Öte yandan, bir virüsün tohumla taşınması düşük oranda bile olsa, bu tohumların üretimin başlangıcında hastalık kaynağı oluşturması yönünden önemi fazladır (Nienhaus, 1976).

Virüs hastalıklarından korunmada en önemli yol sağlıklı ve temiz üretim materyali kullanılmasıdır. Tohumlarda bulunan virüslerin belirlenmesi bu hastalıklara karşı alınabilecek önlemlerin temelini oluşturmaktadır. Yüzden fazla sayıda virüs hastalığı tohumla taşınmaktadır ve daha önce yapılan bazı araştırmalarda kullanılan sertifikalı tohumların bile viral etmenlerle enfekteli oldukları belirlenmiştir (Çiçek, 1988; Çiçek ve Yorgancı, 1991; Erkan ve ark., 1991; Gümüş ve ark., 2001; Albrechtsen, 2006).

Bu çalışma ülkemiz sebze yetiştiriciliği ve tohumluk üretimi için öneme sahip olan bazı sebze tohumlarındaki viral hastalık etmenlerinin tanınması, tanınan viral etmenlerin bulunma durumlarının ve konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Araştırmada, üreticilerden ve çeşitli kuruluşlardan

toplanan sebze tohumlarına serolojik, biyolojik ve moleküler testler uygulanmıştır.

## MATERYAL ve YÖNTEM

### Çalışmada Kullanılan Tohum Örnekleri

Bu çalışma için öncelikle ülkemizde üretilen ve ekonomik öneme sahip olan sebze türleri belirlenmiş, çeşitli kuruluşlardan, firma ve üreticilerden belirlenen sebze türlerinin tohumları temin edilmiştir. Tohum örneklerinin çeşit adları, temin edildikleri yer ve özellikleri kayıt edilmiştir. Araştırmalarda 102 domates, 32 biber, 22 patlıcan, 30 hıyar, 30 karpuz, 32 kavun, 15 kabak, 12 fasulye, 10 bakla, 10 börülce, 20 ıspanak ve 10 marul olmak üzere toplam 325 tohum örneği kullanılmıştır.

### Tohumlardaki Belirtilerin İncelenmesi

Tohumlardaki belirtileri belirlemek amacı ile tohum örnekleri tohum renginde ve şeklinde değişme, tohum büyüklüğünde azalma, tohum kabuğunda buruşma, beneklenme, leke, çizgi, bant, nekroz vb. belirtilerin varlığı yönünden görsel olarak incelenmiştir (Erkan, 1998).

### Biyolojik Testler

Biyolojik endeksleme çalışmaları, *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn. (6 yapraklı devre), *Chenopodium quinoa* Quin. (6 yapraklı devre), *Datura stramonium* L. (2 yapraklı devre), *Gomphrena globosa* L. (4-8 yapraklı devre), *Nicotiana glutinosa* L. (4 yapraklı devre), *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun (4 yapraklı devre), *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi (4 yapraklı devre) ve *Nicotiana tabacum* L. cv. Maden (4 yapraklı devre) gibi otsu bitkiler ile yürütülmüştür (Noordam, 1973; Gümüş, 1998). Sözü edilen bitkilerin yetiştirme ortamında 1:1:1 toprak, gübre ve kum karışımından oluşan bir harç kullanılmıştır. Test bitkilerinin tohumları küvetlere ekilmiş ve tohum ekimi yapılan test bitkileri 4000-6000 lüks ışık şiddeti, 16 saat/gün aydınlanma periyodu ve 20-24 °C sıcaklığa sahip olan iklim odası koşullarında yetiştirilmiştir (Nogay, 1983; Matthews, 1991).

Test bitkileri uygun gelişme dönemlerine ulaştıkları zaman tohum büyüklüğüne göre 50-500 adet tohum içeren sebze tohum örneklerinden %0.1 sodyum sülfid içeren 0,01 M fosfat tamponu (pH=7.0) kullanılarak (1/5; g/v) hazırlanan ekstraktlar, belirlenmiş test bitkilerine mekanik inokulasyon yöntemi kullanılarak inokule edilmiştir. İnokulumun içine enfeksiyon oluşumunu kolaylaştırmak amacı ile celite ilave edilmiştir ve cam spatül aracılığı ile test bitkilerine inokulasyon yapılmıştır. İnokulasyondan 1-2 dakika sonra test

bitkilerinin yaprakları çeşme suyu ile yıkanmıştır. Bu bitkilerde belirti oluşup oluşmadığı inokulasyon sonrasında gözlemlenmiş ve oluşan belirti tipleri değerlendirilerek, fotoğrafları çekilmiş ve kaydedilmiştir (Yorgancı, 1975; Nogay, 1983; Matthews, 1991).

### Serolojik Test Yöntemi (DAS-ELISA)

Tohumlardaki viral etmenlerin belirlenmesi amacı ile toplanan 325 adet tohum örneğine Çizelge 1' de gösterilen viral etmenler için DAS-ELISA testleri uygulanmıştır (Clark ve Adams, 1977; Erkan ve ark., 1995).

Çizelge 1. Sebze tohumlarında serolojik ve moleküler yöntemler ile testlenen viral etmenler  
Table 1. Viral agents tested by serological and molecular methods on vegetable seeds

Viral Etmen	Akronim	Test Yöntemi	
		Serolojik	Moleküler
<i>Alfalfa mosaic alfamovirus</i>	AMV	+	+
<i>Arabis mosaic nepovirus</i>	ArMV	+	+
<i>Bean common mosaic potyvirus</i>	BCMV	+	+
<i>Cucumber green mottle mosaic tobamovirus</i>	CGMMV	+	+
<i>Cucumber mosaic cucumovirus</i>	CMV	+	+
<i>Eggplant mosaic tymovirus</i>	EMV	-	+
<i>Lettuce mosaic potyvirus</i>	LMV	+	+
<i>Pea seed-borne mosaic potyvirus</i>	PSbMV	-	+
<i>Potato Y potyvirus</i>	PVY	+	+
<i>Soybean mosaic potyvirus</i>	SMV	-	+
<i>Spinach latent ilarvirus</i>	SpLV	-	+
<i>Squash mosaic comovirus</i>	SqMV	+	+
<i>Tobacco mosaic tobamovirus</i>	TMV	+	+
<i>Tobacco ringspot nepovirus</i>	TRSV	+	+
<i>Tobacco streak ilarvirus</i>	TSV	+	+
<i>Tomato black ring nepovirus</i>	TBRV	+	+
<i>Tomato mosaic tobamovirus</i>	ToMV	+	+
<i>Tomato ringspot nepovirus</i>	ToRSV	+	+
<i>Tomato spotted wilt tospovirus</i>	TSWV	+	+
<i>Zucchini yellow mosaic potyvirus</i>	ZYMV	+	+
<i>Watermelon mosaic potyvirus</i>	WMV	+	+

### Moleküler Testler (RT-PCR)

Sebze tohumu örnekleri total nükleik asit ekstraksiyonu yapılmak üzere tohum büyüklüğüne göre 50-500 adet tohum naylon torbalar içerisine konulmuştur. Bu torbalar üzerine temin edildiği yer, tarih ve çeşit isimleri yazılmıştır. Tohum örneklerine karşı moleküler testler ISTA standartları çerçevesinde uygulanmıştır (ISTA, 2007). Örnekler TNA (total nükleik asiti) ekstraksiyon işlemi için kullanılmaya kadar laboratuvar da sıcaklığında saklanmıştır.

Örnek hazırlığından sonra, TNA ekstraksiyon aşamasına geçilmiştir. Bunun için her bir örnekten 1 g tohum alınarak 10 ml %1 mercapto-ethanol içeren ekstraksiyon tampon çözeltisi varlığında steril örnek poşetleri içinde homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler ardından tüplere aktarılmıştır. Tüpler ısıtıcıda 70°C 10 dakika inkübe edildikten sonra

5 dakika süre ile buzda bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 14000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiş, üst sıvıdan 300 µl alınarak yeni tüplere aktarılmıştır. Tüplere 150 µl etanol, 300 µl 6M NaI, 25 µl silika süspansiyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Tüpler 6000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılmış tüpün içinde kalan silika partiküllerinin yıkanması için 500 µl yıkama tampon çözeltisi eklenmiştir. Bu işlemden sonra tüpler 6000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi iki kere yapılmıştır. Yıkama sonrası silika partikülleri içeren tüplere 150 µl RNase'dan arı steril su eklenmiştir. 70°C'de 4 dakika ısıtıcıda inkübe edilen tüpler 13000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün üst kısmında kalan sıvıdan 145µl alınarak yeni tüplere aktarılmış ve TNA ekstraksiyonu tamamlanmıştır. Örnekler cDNA sentez ve PCR

uygulamaları yapıncaya kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de derin dondurucuda saklanmıştır (Foissac ve ark., 2001).

Bu şekilde TNA ekstraksiyonu yapılmış olan örneklerle komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Fermentas firmasından temin edilen cDNA sentez kitleri kullanılmış ve firmanın belirttiği prosedür doğrultusunda cDNA sentezleri gerçekleştirilmiştir (Fermentas, USA). PCR işlemi Fermentas firmasının önerdiği prosedüre göre 50  $\mu\text{l}$  hacimde yapılmıştır. RT-PCR testlerinde kullanılan primerler, baz uzunlukları ve kullanılan sıcaklık döngüleri Paylan (2011) tarafından belirtildiği şekilde uygulanmıştır.

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

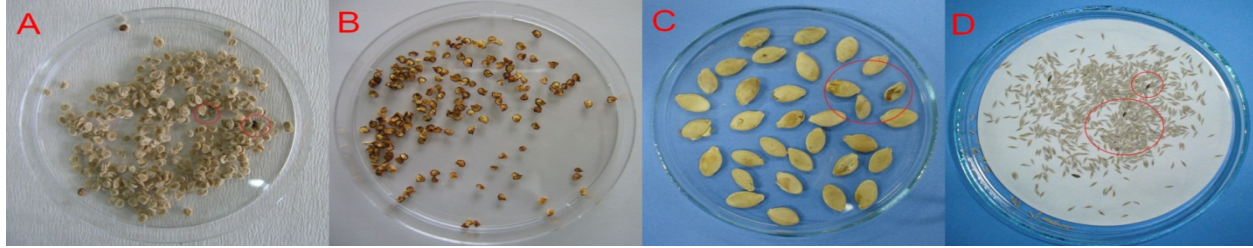
Son olarak, PCR cihazında çoğaltılan ürünler 100 V'da 60 dk süreyle elektroforeze tabi tutulmuş ve

ethidium bromid ile boyanarak DNR Bio-Imaging marka Jel Dokümantasyon ve Analiz Sistemi ile fotoğrafı çekilerek görüntülenmiştir.

## ARAŞTIRMA BULGULARI

### Tohum Örneklerinde Gözlenen Belirtiler

Araştırma kapsamında yer alan değişik sebzelerin tohumlarında yapılan görsel incelemelerde, tohum renginde değişme, tohum büyüklüğünde azalma, şekil bozuklukları, buruşma, beneklenme ve tohum kabuğunda nekroz gibi anormallikler bulunduğu belirlenmiştir. Tohumların semptomatolojik açıdan incelenmesi diğer tanılama yöntemleri için sadece bir ön basamak oluşturmasının yanında, tohumlardaki anormalliklerin viral etmenlerden kaynaklı olabileceği sonucunun yanı sıra diğer patojenler ya da etkenler tarafından oluşturulabileceği bilinmektedir. Bununla beraber, hiç belirti göstermeyen ve görünüm olarak sağlıklı olan tohumlarda da virüs enfeksiyonu olabildiği daha sonra yapılan testler sonucunda gözlemlenmiştir. Bazı sebze tohumu örneklerinde gözlenen belirtiler Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Çeşitli sebze tohumu örneklerinde gözlenen belirtiler, (A) Domates tohumlarında gözlemlenen renk değişiklikleri, (B) Biber tohumlarının büyüklüklerinde azalma ve tohum kabuğunda nekroz belirtileri, (C) Kabak tohumlarında gözlemlenen renk değişiklikleri ve şekil bozukluğu belirtisi, (D) Marul tohumlarında gözlemlenen renk değişiklikleri ve şekil bozukluğu belirtisi

Figure 1. Symptoms observed on various vegetable seeds, (A) Color changes observed on tomato seeds, (B) Reduction in pepper seeds size and necrosis on testa, (C) Color changes and distortions observed on squash seeds, (D) Color changes and distortions observed on lettuce seeds

### Serolojik Testlerden Elde Edilen Bulgular

Çalışmada kullanılan tohum örneklerindeki virüslerin saptanmasında DAS-ELISA yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem; domates tohumlarında 102, biber tohumlarında 32, kavun tohumlarında 32, karpuz tohumlarında 30, hıyar tohumlarında 30, patlıcan tohumlarında 22, ıspanak tohumlarında 20, kabak tohumlarında 15, fasulye tohumlarında 12, bakla tohumlarında 10, börülce tohumlarında 10 ve marul tohumlarında 10 olmak üzere toplam 325 tohum örneğine uygulanmıştır.

Domates çeşitlerine ait tohum örnekleri ToMV, TMV, CMV, ArMV, TBRV, TSWV, PVY, ToRSV ve TRSV etmenlerinin varlığını belirlemek amacıyla serolojik olarak testlenmiştir. Yapılan testler sonucunda; 8 örnekte TMV, 5 örnekte ToMV, 6 örnekte CMV ve 12 örnekte karışık enfeksiyon olmak üzere toplam 31 örnekte 1 ya da daha fazla sayıda viral etmen bulunduğu saptanmıştır. Karışık enfeksiyon olduğu belirlenen 12 tohum örneğinin 2'sinde TMV, CMV ve ToMV etmenleri birlikte bulunurken, 1 örnekte TMV ve CMV, 3 örnekte ToMV ve CMV, 6 örnekte de TMV ve ToMV etmenlerinin birlikte oldukları belirlenmiştir.

CMV, TMV, ToMV ve AMV etmenlerinin varlığını araştırmak amacıyla 32 biber tohumu ile yürütülen testler sonucunda 5 örnekte TMV, 3 örnekte ToMV, 11 örnekte CMV ve 2 örnekte ise karışık enfeksiyon olmak üzere testlenen 32 biber tohumu örneğinin 21'inde viral etmenler belirlenmiştir.

Kabakgil türlerine ait tohum örnekleri CMV, SqMV, ZYMV, CGMMV, WMV ve TRSV etmenlerinin varlığı açısından testlenmiştir. Bulgulara göre; kullanılan 30 karpuz örneğinin 5'inde CMV enfeksiyonu olduğu saptanırken, SqMV, ZYMV, CGMMV, WMV ve TRSV adlı viral etmenler karpuz tohumlarında tespit edilmiştir. Diğer yandan, testlenen 32 kavun tohum örneği arasında 11 örnekte CMV, 1 örnekte SqMV ve 1 örnekte de karışık enfeksiyon olduğu belirlenmiştir. ZYMV, CGMMV, WMV ve TRSV adlı etmenlerin kavun tohum örneklerinde bulunmadığı göze çarpmıştır. Ayrıca, kullanılan 30 hıyar tohumu örneğinin 4'ünde CMV belirlenirken, bu örneklerde SqMV, ZYMV, CGMMV, WMV ve TRSV enfeksiyonu olmadığı saptanmıştır. Çalışmada yer alan 15 kabak tohumu örneğinin 3'ünün CMV ve 2'sinin ZYMV ile enfekteli olduğu ve 1 örneğin ise bu iki virüsü birlikte bulundurduğu belirlenmiştir.

CMV'nün varlığı için testlenen 20 ıspanak tohumu örneğinde ve 22 patlıcan tohumu örneğinde bu virüsün enfeksiyonunun olmadığı saptanmıştır. Fasulye, bakla ve börülce bitkilerine ait tohum örnekleri ise; AMV, CMV, BCMV, TMV, ToRSV, TSWV, TBRV ve TSV adlı etmenlerin bulunma durumları açısından incelenmiştir. Kullanılan 12 fasulye tohum örneğinin 2'sinde ve 10 börülce tohum örneğinin 1'inde CMV enfeksiyonu bulunduğu ve fasulye ile börülce tohum örneklerinde diğer virüslerin var olmadığı saptanmıştır. Testlenen 10 bakla tohumu örneğinde ise yukarıda belirtilen viral etmenlerin olmadığı belirlenmiştir. Son olarak, toplanan 10 marul tohum örneğinde ArMV, LMV, ToRSV ve TBRV adlı viral etmenlerin varlığı araştırılmış ve 2 örnekte LMV enfeksiyonu olduğu belirlenmiştir.

Yürütülen DAS-ELISA testleri neticesinde; denemelerde kullanılan domates tohum örneklerinde %30, biber tohum örneklerinde %66, kavun tohum örneklerinde %40, karpuz tohumu örneklerinde %17, hıyar tohumu örneklerinde %13, kabak tohumu örneklerinde %40, patlıcan ve ıspanak tohumu örneklerinde %0, fasulye tohumu örneklerinde %17, bakla tohumu örneklerinde %0, börülce tohumu örneklerinde %10 ve marul tohumu örneklerinde %20 oranlarında virüs enfeksiyonu olduğu belirlenmiştir.

### Biyolojik Testlerden Elde Edilen Bulgular

Yapılan DAS-ELISA testi sonuçlarına göre virüsler ile enfekteli oldukları belirlenen tohum örnekleri grup olarak sınıflandırılmış ve her grubu temsil edecek sayıda örnekler seçilerek bu tohum örnekleri ile biyolojik testler yürütülmüştür. Tohum örneklerinden yapılan mekanik inokulasyonlar sonucunda test bitkilerinde genel olarak gözlemlenen yaygın tipteki belirtiler arasında yapraklarda klorotik lokal lekeler, mozaik, beneklenme, kabarcıklar, nekrotik lekeler, renk açılmaları, deformasyonlar, şekil bozuklukları vb. belirtiler yer almaktadır.

ToMV enfekteli tohumlardan yapılan mekanik inokulasyonlar sonucunda; *N. glutinosa* bitkilerinde başlangıçta 0.5 mm çapında, sonradan 4 mm'ye kadar genişleyen koyu kahverengi-siyah renkte nekrotik lokal lezyonlar gözlemlenmiştir. Ayrıca, nekrotik benekler, gelişmede yavaşlama, yayılan nekrozlar ve yapraklarda şekil bozuklukları da kayıt edilmiştir. *N. tabacum* cv. White Burley bitkilerinde sistemik lezyonlar, *N. tabacum* cv. Xanthi bitkilerinde nekrotik lokal lekeler, *N. tabacum* cv. Maden bitkilerinde ise sistemik mozaik belirtileri gözlemlenmiştir. *D. stramonium* bitkilerinde 2-3 gün sonunda nekrotik lokal lezyonlar belirlenirken, *C. amaranticolor* ve *C. quinoa* bitkilerinde inokulasyonlar sonucunda klorotik veya nekrotik lokal lezyonlar meydana gelmiştir. *G. globosa* bitkilerinde ise inokulasyondan sonra 1 hafta içerisinde nekrotik veya yarı nekrotik lokal lezyonlar oluşmuş ve sistemik klorotik beneklenmeler gözlemlenmiştir.

TMV ile enfekteli tohumların test bitkilerine mekanik olarak inokule edilmesi sonucunda; *N. tabacum* cvs. Samsun, White Burley ve Xanthi bitkilerinde inokulasyondan 3-4 gün sonra genç yapraklarda damarlarda renk açılmaları oluşmuş ve daha sonra bunu açık-koyu yeşil mozaik belirtilerinin ortaya çıkması izlemiştir. *C. amaranticolor* ve *C. quinoa* bitkilerinde nekrotik lokal lezyonlar olduğu kayıt edilmiştir.

CMV ile enfekteli tohumlar kullanılarak yapılan mekanik inokulasyonlar sonucunda; *C. amaranticolor* ve *C. quinoa* bitkilerinde nekrotik ve klorotik lokal lezyonlar oluşmuştur. *N. glutinosa* bitkilerinde damarlarda sararma ve mozaik belirtileri görülürken, *N. tabacum* bitkilerinde ise inokulasyonlar sonucunda sistemik sarı yeşil mozaik belirtilerinin ortaya çıktığı göze çarpmıştır.

LMV ile enfekteli tohumların test bitkilerine mekanik inokulasyonları sonucunda; *C. amaranticolor* bitkilerinde inokulasyonlardan 8-10 gün sonra soluk yeşil ve klorotik lokal lezyonların olduğu, *C. quinoa* bitkilerinde ise soluk yeşil lokal lezyonlar dışında uç yapraklarda kıvrılmaların bulunduğu kayıt edilmiştir. *G. globosa* bitkilerinde inokulasyondan 4-7 gün sonra lokal nekrotik beneklerin ve genişleyen lezyonların olduğu gözlemlenmiştir. ZYMV ile enfekteli tohumlardan gerçekleştirilen mekanik inokulasyonlar

sonucunda; *C. amaranticolor* ve *C. quinoa* bitkilerinde klorotik lokal lezyonların meydana geldiği görülmüştür. *G. globosa* bitkilerinde ise belirgin lokal lezyonların olduğu tespit edilmiştir.

SMV ile enfekteli tohumların ekstraktlarının mekanik inokulasyonları sonucunda; *C. quinoa* bitkilerinde zayıf ve yayılmış biçimde klorotik lokal lezyonlar meydana gelmiştir. Mekanik inokulasyonlar sonucunda bazı test bitkilerinde oluşan belirtilere ait kayıt edilmiş fotoğraf örnekleri ise Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Mekanik inokulasyonlar sonucunda bazı test bitkilerinde gözlenen belirtiler, (A) *N. tabacum* cv. W. Burley bitkisinde ToMV ile enfekteli tohumlardan gerçekleştirilen mekanik inokulasyonlar sonucunda oluşan sistemik belirtiler, (B) *Nicotiana glutinosa* bitkisinde ToMV ile enfekteli tohumlardan gerçekleştirilen mekanik inokulasyonlardan 2 gün sonra oluşan nekrotik lokal lekeler, (C) *Gomphrena globosa* bitkisi yapraklarında LMV ile enfekteli tohumlardan gerçekleştirilen mekanik inokulasyonlar sonucunda oluşan nekrotik lokal lekeler

Figure 2. Symptoms observed on some indicator plants as a result of mechanical inoculation, (A) Systemic symptoms on *N. tabacum* cv. W. Burley infected with ToMV, (B) Local lesions on *Nicotiana glutinosa* after two days of mechanical inoculation, (C) Necrotic local lesions on *Gomphrena globosa* infected with LMV

### Moleküler Testlerden Elde Edilen Bulgular

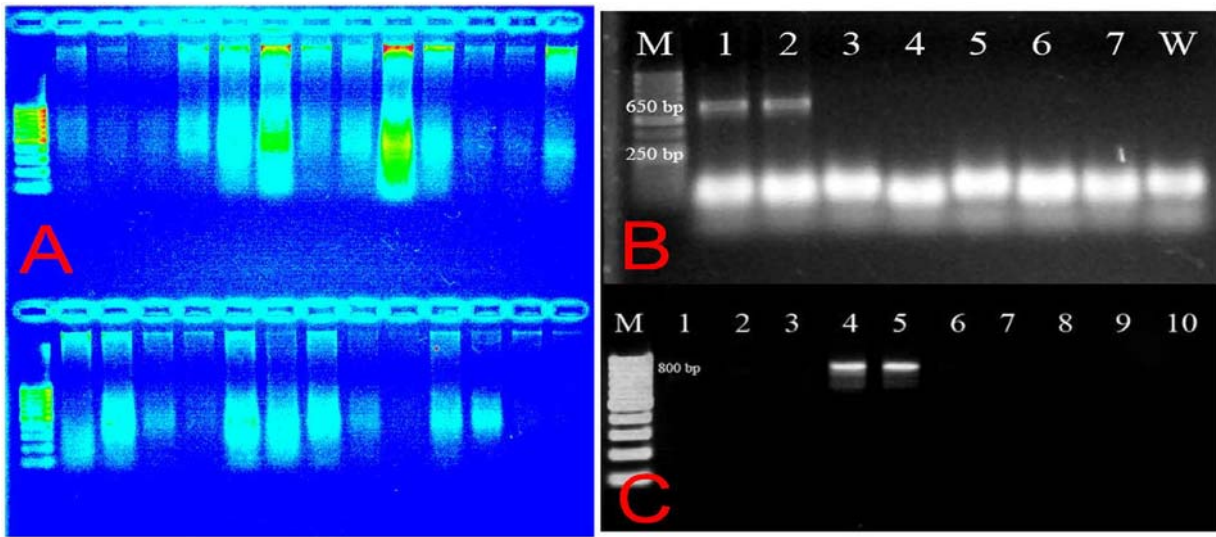
DAS-ELISA testlerinde virüs enfeksiyonu olduğu saptanan ve biyolojik testlerde kullanılan test bitkilerinde belirti oluşturan tohum örnekleri belirli bir oran dahilinde seçilmiş ve RT-PCR testleri bu örneklerle yürütülmüştür. Ayrıca, bu çalışmalarda virüs enfeksiyonu saptanmayan tohum örnekleri de yer almıştır.

RT-PCR yöntemi ile gerçekleştirilen moleküler testlerde 36 domates tohumu örneği ToMV, TMV, CMV, ArMV, TBRV, TSWV, PVY, ToRSV ve TRSV etmenlerine karşı test edilmiştir. Domates tohum örnekleri ile yapılan moleküler çalışmalarda, serolojik testlerin sonuçlarından farklı olarak DAS-ELISA çalışmalarında viral etmen içerdiği belirlenemeyen 2 örnekte CMV, 1 örnekte de TMV (Şekil 3) adlı viral etmen tespit edilmiştir. DAS-ELISA testlerinde virüsler ile enfekteli çıkan örneklerin tamamı RT-PCR testlerinde de enfekteli olarak bulunmuştur. Testlenen 36 domates tohumu örneğinde serolojik testlerde olduğu gibi, ArMV, TBRV, TSWV, PVY, ToRSV ve TRSV etmenlerinin varlığı saptanamamıştır.

Oniki biber tohumu örneği CMV, TMV, ToMV ve AMV adlı etmenleri saptamak üzere moleküler olarak test edilmiştir. DAS-ELISA testi sonuçlarından farklı olarak 1 tohum örneğinde TMV etmeninin olduğu ek olarak belirlenirken, diğer örnekler DAS-ELISA testi sonuçları ile paralel veriler vermiştir.

Kavun, karpuz, hıyar ve kabak bitkilerine ait 12'şer tohum örneği CMV, SqMV, ZYMV, CGMMV, WMV ve TRSV adlı etmenlerin durumunu incelemek için RT-PCR ile testlenmiştir. Bu tohum örneklerine gerçekleştirilen moleküler testlerde DAS-ELISA testleri ile paralel sonuçlar elde edilmiş ve ek olarak herhangi bir virüs olmadığı belirlenmiştir. DAS-ELISA testlerinde belirlendiği gibi karpuz tohumu örneklerinin 5'inde, hıyar tohumu örneklerinin 4'ünde, kavun tohumu örneklerinin 12'sinde ve kabak tohumu örneklerinin 4'ünde CMV etmeni; kavun tohumu örneklerinin 2'sinde SqMV ve kabak tohum örneklerinin 3'ünde ZYMV etmeni moleküler olarak belirlenmiştir. Moleküler olarak araştırılan diğer etmenlerin bu tohum örneklerinde bulunmadığı belirlenmiştir.





Şekil 3. RT-PCR testlerinin jel görüntüleri, (A) Kabakgil tohumlarından elde edilen nükleik asitlerin (TNA) jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü, (B) Karpuz tohumlarında CMV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü (C) Marul tohumlarında LMV (sıra 1-5) ve ArMV (sıra 6-10) için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümü

Figure 3. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products (A) TNA images obtained from cucurbit seeds, (B) CMV bands, detected in watermelon seeds, (C) LMV bands, detected in lettuce seeds

20 ıspanak tohum örneği SpLV etmenine karşı moleküler olarak testlenmiş ve bu testler sonucunda adı geçen örneklerde SpLV etmeninin bulunmadığı görülmüştür. SpLV etmeni serolojik olarak testlenmediği için ıspanak tohumu örneklerinin tamamı bu etmene karşı RT-PCR yöntemi ile test edilmiştir. CMV açısından moleküler olarak test edilen 10 ıspanak tohumu örneğinde ise DAS-ELISA testlerinde olduğu gibi herhangi bir enfeksiyonun bulunmadığı belirlenmiştir.

DAS-ELISA testleri ile EMV etmeni için testlenmeyen patlıcan tohumu örnekleri bu etmenin varlığını belirlemek için moleküler olarak testlenmiş ve testte kullanılan 22 örneğin tamamı virüssüz olarak bulunmuştur. CMV etmenine karşı moleküler olarak testlenen 12 tohum örneğinde ise serolojik testlerde olduğu gibi enfeksiyon olmadığı saptanmıştır.

Fasulye bitkilerine ait 12, bakla ve börülce bitkilerine ait 10'ar tohum örneği BCMV, PSbMV ve SMV adlı etmenlere karşı moleküler olarak test edilmiştir. Fasulye tohumlarında 3 örnekte SMV adlı etmen RT-PCR testleri ile saptanırken, diğer örneklerde herhangi bir enfeksiyon olduğu belirlenmemiştir. Aynı bitkilere ait 6'şar tohum örneği de AMV, CMV, TMV, ToRSV, TSWV, TBRV ve TSV etmenleri için moleküler

olarak testlenmiştir ve DAS-ELISA testlerinde olduğu gibi tohum örneklerinde herhangi bir enfeksiyon olmadığı saptanmıştır.

Marul bitkilerine ait 5 tohum örneği de ArMV, LMV, ToRSV ve TBRV etmenlerine karşı moleküler olarak testlenmiştir ve serolojik testlerle paralel olarak 2 örnekte CMV enfeksiyonu saptanmıştır.

#### Kullanılan Tanılama Yöntemlerinin Genel Değerlendirmesi

Tohumlarda görsel olarak yapılan symptom incelemesinin bulguları ile biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemlerin sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; araştırma kapsamında testlenen toplam 325 tohum örneğinde % 28 oranında viral enfeksiyonlar olduğu belirlenmiştir.

Domates tohum örnekleri için test edilen toplam 102 örneğin 34'ünün en az bir viral etmenle etkili olduğu belirlenirken, biber tohumlarında test edilen toplam 32 örneğin 22'sinin en az bir viral etmen içerdiği saptanmıştır. Domates tohumlarında TMV, CMV, TMV+ToMV, ToMV, ToMV+CMV, TMV+ToMV+CMV ve TMV+CMV enfeksiyonları görülürken, biber tohumlarında CMV, TMV, ToMV enfeksiyonları öne çıkmıştır (Çizelge 2).

Çizelge 2. Domates ve biber tohumlarında belirlenen viral etmenler ve bulunma durumları

Table 2. Viral agents determined in tomato and pepper seeds and their prevalence rates

Tohum Örneği Türü	Tohum Örneği Sayısı				Araştırılan Viral Etmenler (Mekanik İnokulasyon, Elisa, RT-PCR)													
	Toplam Örnek Sayısı	Sağlıklı Örnek Sayısı	Enfekteli Örnek Sayısı	Enfekteli Örnek (%)	AMV	ArMV	CMV	PVY	TMV	TRSV	TBRV	ToMV	ToRSV	TSWV	TMV+ToMV+CMV	TMV+CMV	ToMV+CMV	TMV+ToMV
<b>Domates</b>	102	68	34	% 33	---	0	8	0	9	0	0	5	0	0	2	1	3	6
<b>Biber</b>	32	10	22	% 69	0	---	11	---	6	---	---	3	---	---	1	---	---	1

Karpuz tohumu örneklerinde test edilen toplam 30 örneğin 5 adedinde, kavun tohumu örneklerinde 32 tohum örneğinin 13'ünde, 30 hıyar tohumu örneğinin 4'ünde ve 15 kabak tohum örneğinin de 6'sında en az

bir viral etmenin enfeksiyonun bulunduğu belirlenmiştir. Karpuz, kavun ve hıyar ve kabak olmak üzere dört tohum çeşidinde de CMV enfeksiyonları öne çıkmıştır (Çizelge 3).

Çizelge 3. Karpuz, kavun, hıyar ve kabak tohumlarında belirlenen viral etmenler ve bulunma durumları

Table 3. Viral agents determined in watermelon, melon, cucumber and squash seeds and their prevalence rates

Tohum Örneği Türü	Tohum Örneği Sayısı				Araştırılan Viral Etmenler (Mekanik İnokulasyon, Elisa, RT-PCR)							
	Toplam Örnek Sayısı	Sağlıklı Örnek Sayısı	Enfekteli Örnek Sayısı	Enfekteli Örnek (%)	CMV	SqMV	ZYMV	CGMMV	WMV	TRSV	CMV+SqMV	CMV+ZYMV
<b>Karpuz</b>	30	25	5	% 17	5	0	0	0	0	0	0	0
<b>Kavun</b>	32	19	13	% 40	11	1	0	0	0	0	1	0
<b>Hıyar</b>	30	26	4	% 13	4	0	0	0	0	0	0	0
<b>Kabak</b>	15	9	6	% 40	3	0	2	0	0	0	0	1

Yapılan testler sonucunda; 12 fasulye tohum örneğinde 5, 10 börülce tohum örneğinde 1 ve 10 marul tohumu örneğinde de 2 örneğin viral etmenler ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Bakla, ıspanak ve

patlıcan tohumlarına ait örneklerde ise herhangi bir viral etmenin bulunmadığı saptanmıştır. Bu tohumlar-da öne çıkan virüsler ise fasulye için SMV ve CMV, börülce için CMV ve marul için LMV şeklindedir (Çizelge 4).



Çizelge 4. Fasulye, bakla, börülce, marul, ıspanak ve patlıcan tohumlarında belirlenen viral etmenler ve bulunma durumları

Table 4. Viral agents determined in bean, broad bean, cowpea, lettuce, spinach and eggplant seeds and their prevalence rates

Tohum Örneği Türü	Tohum Örneği Sayısı				Araştırılan Viral Etmenler (Mekanik İnokulasyon, Elisa, RT-PCR)												
	Toplam Örnek Sayısı	Sağlıklı Örnek Sayısı	Enfekteli Örnek Sayısı	Enfekteli Örnek (%)	BCMV	PSbMV	SMV	AMV	CMV	TMV	ToRSV	TBRV	TSV	LMV	AMV	EMV	SpLV
Fasulye	12	7	5	% 40	0	0	3	0	2	0	0	0	0	---	---	---	---
Bakla	10	10	0	% 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---	---	---	---
Börülce	10	9	1	% 10	0	0	0	0	1	0	0	0	0	---	---	---	---
Marul	10	8	2	% 20	---	---	---	---	---	---	0	0	---	2	0	---	---
İspanak	20	20	0	% 0	---	---	---	---	0	---	---	---	---	---	---	---	0
Patlıcan	22	22	0	% 0	---	---	---	---	0	---	---	---	---	---	---	0	---

Sonuç olarak, araştırmada çalışılan farklı sebze türlerine göre tohum örneklerindeki viral etmenlerin bulunma durumu % 0-69 arasında değişmektedir. Çalışılan domates tohumu örneklerinde %33, biber tohumu örneklerinde % 69 (Çizege 2), kavun tohumu örneklerinde % 40, karpuz tohumu örneklerinde % 17, hıyar tohumu örneklerinde % 13, kabak ve fasulye tohumu örneklerinde % 40, börülce tohumu örneklerinde %10 ve marul tohumu örneklerinde % 20 oranında viral enfeksiyon belirlenirken patlıcan, ıspanak ve bakla tohumu örneklerinde viral enfeksiyon olmadığı belirlenmiştir (Çizelge 3-4).

### SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan araştırmadan elde edilen sonuçlar neticesinde; ülkemiz için ekonomik olarak önemli olan bazı sebze tohumu örneklerinde virüslerin tek başlarına mevcut olmalarının yanında, bazı örneklerde birden fazla virüsün bir arada bulunarak karışık enfeksiyonlar oluşturduğu tespit edilmiştir. Sebze türlerine göre tohum örneklerindeki viral etmenlerin bulunma durumları %0 ile %69 arasında değişmektedir. Araştırma süresince biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler ile test edilen 325 tohum

örneğinde %28 oranında viral enfeksiyonlar olduğu belirlenmiştir.

Sebze tohumlarındaki viral etmenlerin varlığını belirlemek ve enfeksiyon seviyelerini değerlendirmek gerekli koruma önlemlerini alma ve virüsten ari tohum alışverişini sağlama açısından çok önemlidir (Albrechtsen, 2006).

Özel kuruluşlarda temiz tohum elde etmeye yönelik programlarda özellikle sağlık testlerini gerçekleştirecek laboratuvarların kurulması teşvik edilmelidir. Ülkeye girecek olan tohum gibi üretim materyallerinin özellikle hastalıklar açısından kontrolünün yapılması, sertifikasyon ve karantina programlarında RT-PCR gibi gelişmiş yöntem (Jacobi ve ark.,1998)'lerin kullanılarak temiz üretim materyallerinin elde edilmesi, resmi kuruluşlarda bulunan cihazların ve konu ile çalışan kişilerin eğitim çalışmaları ile aktif duruma gelmelerinin sağlanması ve gelişen teknikleri uygulayacak elemanların yetiştirilmesine hız verilmesi gibi sonuçlar konunun önemi açısından gereklidir.

Virüsten ari tohum kullanımının sağlanmasıyla kalite ve kantite açısından daha verimli bir yetiştiricilik yapılması sağlanacaktır. Tohumların duyarlı bir

yöntemle testlenmesi ile viral etmenlerin yeni bölgelere girmesi önlenecek ve başlangıçta kontrol sağlanacaktır.

Çalışma sonuçları ve literatür bilgileri doğrultusunda, tohumluk kontrol ve sertifikasyon hizmetlerinde tohum sağlık testleri ile ilgili düzenlemelerin yapılması ayrıca zirai karantina çalışmalarında gerekli olan büyüklük ve sayıda örnek alınması ve örnekleme nin homojen yapılması laboratuvar testlerinde daha

dikkatli olunması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Çok düşük orandaki enfeksiyonların hızlı ve güvenilir bir şekilde saptanabilmesi için RT-PCR gibi duyarlı yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. Böylece sebze tohumlarının üretiminde ve ithalatında alınacak önlemler ile virüsten ari tohumların üreticiler tarafından kullanılması sağlanacak ve bunun sonucunda da sebze üretiminde verim ve kaliteyi artırmak mümkün olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Albrechtsen, S.E. 2006. Testing Methods for Seed-transmitted Viruses: Principles and Protocols. CABI Publishing, 268p.
- Candresse, T., T. Lanneau, F. Revers, N. Grasseau, G. Macquaire, S. German, T. Malinowsky, and J. Dunez. 1995. An Immunocapture PCR Assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of *Apple chlorotic leaf spot virus*. Acta Horticulture, 386: 136-147.
- Carroll, T.W. 1983. Certification schemes against barley stripe mosaic. Seed Science and Technology, 11: 1033-1042.
- Clark, M.F. and A.N. Adams. 1977. Characteristic of microplate method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of plant viruses. Journal of General Virology, 34: 475-483.
- Çiçek, Y. 1988. Ege bölgesinde sertifikalı domates, biber, patlıcan ve marul tohumlarında bulunan virüslerin saptanması üzerinde araştırmalar, Doktora Tezi, E.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, Bornova, İzmir. 136s.
- Çiçek, Y. and Ü. Yorgancı. 1991. Studies on the incidence of tobacco mosaic virus on certified seed of tomato, pepper and eggplant in agean region. Journal of Turkish Phytopathology, 20 (2-3): 57-68.
- Erkan S., H. Özaktan, ve Ü. Yorgancı. 1991. Domates tohumlarında Domates Mozayığı ve Bakteriyel Solgunluk etmenlerinin varlığının belirlenmesi üzerinde araştırmalar. VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi (7-11 Ekim 1991, İzmir) Bildirileri, Türkiye Fitopatoloji Dern. Yayın No: 6. s. 347-352.
- Erkan, S., M. Gümüş, H. Türküsay, ve İ. Duman. 1995. Sanayi domatesi çeşitlerine ait tohum örneklerinde tohum kaynaklı bazı hastalık etmenlerinin bulunma durumunun saptanması üzerinde araştırmalar. Sandom Yayın No: 9, s. 70-75.
- Erkan, S. 1998. Tohum Patolojisi. E. Ü. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Bornova, İzmir. Gözdem Ofis, 275 s.
- Foissac X, L. Svanella-Dumas, M.J. Dulucq, P. Gentit, and T. Candresse. 2001. Polyvalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). Acta Hort, 550: 37-43.
- Gümüş, M. 1998. İzmir ilinde biberlerdeki viral hastalık etmenlerinin ve oranlarının saptanması ve bazı biber çeşitlerinin bu virüslere reaksiyonların belirlenmesi üzerine araştırmalar, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bil. Enst. Bitki Koruma ABD., Bornova, İzmir. 118 s.
- Gümüş, M., S. Erkan, Ü. Yorgancı ve İ. Duman. 2001. Bazı sebze tohumlarında bulunan viral etmenlerin saptanması üzerine araştırmalar. Türkiye IX. Fitopatoloji kongresi (3-8 Eylül, 2001, Tekirdağ) Bildirileri, Trakya Üniversitesi Yayınları No:45. s. 191-197.
- ISTA, 2007. <http://www.seedtest.org/en/home.html>. Erişim: Aralık 2007).
- Jacobi, V., G.D. Bachand, R.C. Hamelin, and J.D. Castello. 1998. Development of a multiplex immunocapture RT-PCR assay for detection and differentiation of *Tomato* and *Tobacco mosaic tobamoviruses*. Journal of Virological Methods, 74: 164-178.
- Matthews, R.E.F. 1991. Plant Virology. 3rd Ed. Academic Press, New York, 897p.
- Nienhaus, F., 1976. Lehrbuch der Phytomedizin. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, 490p.
- Nogay, A. 1983. Marmara bölgesi *Cucurbitaceae* familyası kültür bitkilerinde görülen virüs hastalıklarının tanılanması, tohumla geçiş durumlarının ve konukçu dizilerinin saptanması üzerinde araştırmalar, Doktora tezi, Erenköy- İstanbul. 120s.
- Noordam, D. 1973. Identification of Plant Viruses, Methods and Experiments. PUDOC, Wageningen, the Netherlands, 208p.
- Paylan, İ. 2011. Bazı sebze tohumlarındaki viral etmenlerin saptanması ve tohumlarda viral enfeksiyonların önlenmesi üzerinde araştırmalar, Doktora Tezi, E.Ü. Fen Bil. Enst. Bitki Koruma ABD., Bornova, İzmir. 146 s.
- Riedle-Bauer, M., B. Suarez, and H.J. Reinprecht. 2002. Seed transmission and natural reservoirs of patojen *Zucchini yellow mosaic virus* in *Cucurbita pepo* var. *styriaca*. Journal of Plant Diseases and Protection, 109: 200-206.
- TKB, 2011, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. <http://www.tarim.gov.tr/>. Erişim: Haziran 2011.
- TSÜAB, 2010. TSÜAB-TÜRKTED Ortak Çalışma Grupları Grup Raporları, Ankara, 112s.
- Yorgancı, Ü. 1975. İzmir ilinde domateslerdeki virüs hastalıkları, yayılma ve zarar durumları, elde edilen izolatlarla biyolojik ve serolojik araştırmalar, Doçentlik Tezi, TOAG/127 No'lu Proje Nihai Raporu. Ege Üniv. Ziraat Fak. Bornov-İzmir. 102 s.