*Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 6 (1): 52-64, 2011*
ISSN 1304-9984, *Derleme*

# Şeker Pancarında *Polymyxa betae* Keskin ile Taşınan Virüsler ve Moleküler Tanılama Yöntemleri

**Handan ÇULAL KILIÇ*** **Nejla YARDIMCI**

Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 32260, Isparta
*Yazışma yazarı: handane@ziraat.sdu.edu.tr

Geliş tarihi:28.12.2010, Yayına kabul tarihi:31.03.2011

**Özet:** *Beet necrotic yellow vein virus* (*Şeker pancarı nekrotik sarı damar virüsü*), *Beet soil borne virus* (*Şeker pancarı toprakla taşınan virüs), Beet virus Q* (*Şeker pancarı Q virüs*), ve *Beet soil borne mosaic virus* (*Şeker pancarı toprakla taşınan mozayik virüs*) şeker pancarı üretim alanlarında toprakla taşınan en önemli virüs hastalıklarıdır. Bu dört virüs toprakta uzun yıllar kalan *Polymyxa betae* Keskin fungusu ile taşınmakta ve önemli ürün kayıplarına neden olmaktadırlar. Bu virüsler çoğunlukla aynı alanlarda ya da aynı bitkide bir arada bulunurlar. Bu çalışmada şeker pancarında enfeksiyon oluşturan toprakla taşınan virüsler ve bunların teşhisinde kullanılan moleküler yöntemler ile ilgili bazı çalışmaların sonuçları özetlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Şeker pancarı, Toprakla taşınan virüsler, Moleküler yöntemler

## Sugar Beet Viruses Transmitted by *Polymyxa betae* Keskin and Molecular Detection Methods

**Abstract:** *Beet necrotic yellow vein virus, Beet soil borne virus, Beet virus Q and Beet soil borne mosaic virus* are the important soil-borne virus diseases in the production areas of sugar beet. Four viruses are transmitted by fungus vector *Polymyxa betae* Keskin which survives in infested soil for many years. The viruses cause a significant crop yield reductions. These viruses are often found in same field, sometimes infecting the same beet. In this review, the results from some researches on the molecular techniques for diagnosis of soil borne viruses infecting sugar beet were summarized.

**Key words:** Sugar beet, Soil-borne viruses, Molecular techniques

## Giriş

Ülkemizde yetiştirilen endüstri bitkileri içerisinde şeker pancarı (*Beta vulgaris* var. *saccharifera* L.) önemli bir yere sahiptir. Türkiye'de şeker pancarı tarımı, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri dışındaki beş bölgede yapılmaktadır (Kıymaz, 2002).

2008 yılı verilerine göre ülkemizde toplam tarım alanı içerisinde yıllık şeker pancarı ekim alanı 320.700 hektar, üretim miktarı ise 15.488.000 tondur. Ortalama pancar verimi 48.290 kg/ha olarak belirlenmiştir (Anonim, 2010).

Şeker pancarı üretimi; bitkisel ve hayvansal üretimin gelişmesine, azami derecede endüstriyel girdiler kullanılmasına, toprakların fiziki yapıları ve ekolojik dengenin iyileşmesine katkı sağlamakta, kendinden sonra ekilecek ürünlerin verimlerini azami ölçüde arttırmaktadır (Kıymaz, 2002).

Şeker pancarı üretim alanlarında görülen hastalıklardan virüs ve benzeri etmenlerin neden olduğu kayıplar zaman zaman ciddi boyutlara ulaşarak üretimi tehdit etmektedir (Lennefors, 2006).

Dünya da şeker pancarı üretimi yapılan alanlarda *Polymyxa betae* Keskin ile taşınan 4 önemli virüs hastalığı vardır. Bunlar; *Beet*

*necrotic yellow vein virus:* (BNYVV: *Şeker pancarı nekrotik sarı damar virüsü*), *Beet soil borne virus* (BSBV: *Şeker pancarı toprakla taşınan virüs), Beet virus Q (*BQV: *Şeker pancarı Q virüs*), ve *Beet soil borne mosaic virus* (BSBMV: *Şeker pancarı toprakla taşınan mozayik virüs*)' dür. *Polymyxa betae* Keskin önceleri *Myxomycota*'nın bir üyesi olarak gruplandırılırken, son yıllarda yapılan moleküler çalışmalar ile Protozoa aleminin *Plasmodiophoromycetes* sınıfına yerleştirilmiştir (Ward et al., 2003). İlk olarak Dr. Bahattin Keskin tarafından teşhis edilmiştir (Keskin, 1964).

Virüsler *Tubiviridae* familyası içinde yer almaktadırlar. BNYVV ve BSBMV *Benyvirus* cinsinin üyesi iken, BSBV ve BVQ *Pomovirus* cinsinin üyesidirler. Bu virüsler çubuk şeklindedirler (Lennefors, 2006).

***Beet necrotic yellow vein virus***

İlk kez 1950'lerde İtalya'da rapor edilmiştir (Canova, 1959). Günümüzde ise Asya, Avrupa ve Amerika kıtalarında şeker pancarı yetiştiriciliği yapılan alanların büyük bir kısmına yayılmış durumdadır (Putz et al., 1990; Suarez et al., 1999). Ülkemizde ilk kez 1987 yılında Dr. Koch tarafından Erbaa ve Taşova bölgeleri ile Uzunköprü ve Keşan bölgelerinde saptanmıştır (Özgür, 1995). Türkiye'de uzun yıllardan beri pancar üretimi yapılan alanlardaki tarama çalışmalarında 2003 yılı itibari ile 121.000 hektar alanın BNYVV hastalığı ile infekteli olduğu ve giderek yayıldığı bildirilmiştir (Özgür, 2003). Kaya (2009), 17 şeker fabrikasının 102 bölgesinde şeker pancarı ekim alanlarında yaptığı surveyler sonucunda Rhizomania'nın yaygınlık oranını 1996-1998 döneminde 4 fabrikada toplam %19.30 (46.200 ha), 1999-2001 döneminde 9 fabrikada % 31.42 (94.140 ha), 2002-2004 döneminde 15 fabrikada % 48.66 (203.640 ha) olarak tespit etmiştir.

Hastalığın en karakteristik simptomu yan köklerin aşırı derecede çoğalması ve kökün sakallanmış gibi görüntü almasıdır. Virüse, köklerde aşırı kılcal kök oluşumuna neden olduğundan kök azmanlığı anlamına gelen "Rhizomania" adı verilmiştir (Putz et al., 1990). Hastalık yapraklarda, damarlar boyunca sarı renk açılmalarına ve yapraklarda dik gelişime neden olmaktadır. Daha sonra bu renk açılmaları koyulaşarak nekrotik alanları oluşturmaktadır (Whitney and Duffus 1991). İnfekteli alanlarda hastalık öbek öbek renk açılması şeklinde kendini göstermektedir. Toprak kuru veya sıcaklık yetersiz olduğunda kökler enfeksiyon noktasında daralmakta ve kadeh şeklini almaktadırlar. Yumrulardan boyuna kesit alındığında iletim dokusunda kahverengi renk oluşumunun meydana geldiği ve bu yapıların odunsu bir hale dönüştüğü görülmektedir (Kutluk Yılmaz ve Erkan 2005).

Hastalıklı bitkilerin şeker içeriğinde % 10, kök oluşumunda ise % 90 azalma meydana getirdiği bildirilmektedir (Lennefors, 2006). Kaya (2009), hastalığın kök veriminde % 90 oranında şeker veriminde ise % 70 azalmaya neden olduğunu ortaya koymuştur.

BNYVV genomu, genellikle RNA 1, RNA 2, RNA 3 ve RNA 4 olarak ifade edilen dört komponentten meydana gelmiştir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda bazı izolatların RNA 5 komponentini içerdiği tespit edilmiştir (Tamada et al., 1989; İlhan, 2004; Kutluk Yılmaz ve Sökmen 2007). Virüsün partikül büyüklükleri, 390, 265, 100, 85 nm uzunluğunda ve 20 nm enindedir (Rush and Heidel 1995).

***Beet soil borne mosaic virus***

İlk kez 1987 yılında Duffus and Liu tarafından Texas' da rapor edilmiş ve şu ana kadar Amerika Birleşik Devletlerinin dışında herhangi bir ülkede tespit edilmemiştir. BSBMV ve BNYVV; konukçu dizisi, kılıf protein molekül ağırlığı, partikül morfolojisi ve uzunlukları bakımından birbirlerine benzemekle birlikte serolojik olarak ayrılmaktadırlar (Rush and Heidel 1995). Bazı araştırıcılar BSBMV ile BNYVV'nün çeşitli yönlerden benzerliği sebebiyle, BNYVV'ün farklı bir ırkı olabileceğini ifade etmişlerdir (Rush et al., 1993).

BSBMV genomu 4 parçadan oluşmuştur. Virüs partiküllerinin genişliği 19 nm, uzunlukları ise 50 ila 400 nm

arasında değişmektedir. BNYVV ile BSBMV arasındaki nükleotid benzerliği; RNA 1 için % 77, RNA 2 için % 67, RNA 3 için % 60, RNA 4 için % 35'dir.

*Şeker pancarı toprak kökenli mozayik virüsü*'nün neden olduğu simptomlar çeşitlilik gösterebilmektedir. En tipik simptomunu yapraklar üzerinde göstermektedirler. Yapraklarda açık yeşil veya sarı renk açılmaları, damarlarda bantlaşmalar, yapraklar üzerinde geniş klorotik alanlar, yapraklarda kıvrılma görülmektedir. Bitkide Ş*eker pancarı nekrotik sarı damar virüs*'ü tarafından oluşturulan kök sakallanması simptomu bu virüs tarafından oluşturulmaz (Heidel et al., 1997).

***Beet soil borne virus***

İlk olarak Ivanovic ve McFarlane (1982) tarafından İngiltere de şeker pancarı üretim alanlarında bulunmuştur. Daha sonraları, Almanya, Belçika, Finlandiya, Bulgaristan, Macaristan, Amerika, İsveç, Türkiye, Danimarka, İran, Suriye' de de bulunduğu rapor edilmiştir (Rush and Heidel 1995; Meunier et al., 2003; Rysanek et al., 2006). BSBV genomu 3 parçadan oluşmuştur. Virüs partikülleri, 90 nm genişliğinde, 65, 150 ve 300 nm uzunluğundadır. Virüsün genomu ile ilgili yapılan moleküler çalışmalarda farklı izolatlar arasında önemli oranda sekans varyasyonunun olduğu belirlenmiştir (Lennefors, 2006).

BSBV'ün Ahlum ve Wierthe olmak üzere 2 serotipi belirlenmiştir (Lesemann et al., 1989). Daha sonraları Wierthe serotipi ayrı bir virüs olarak ele alınmıştır. Bu virüse de Beet Virus Q (BVQ) adı verilmiştir (Koenig et al., 1998). BSBV, şeker pancarı bitkisinin kök ve yapraklarında herhangi bir simptoma neden olmadan bulunabilmektedir (Rush and Heidel 1995). BSBV'nün toprakta genellikle BNYVV ile birlikte bulunduğu rapor edilmiştir (Prilwitz and Schlösser 1992). Meunier et al. (2003), dünyanın farklı bölgelerinden alınan örneklere Multiplex ters transkripsiyon–polimeraz zincir reaksiyonu (Multiplex Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction: mRT-PCR) yöntemini başarı ile uygulamışlardır. Çalışma da BNYVV, BSBV, BVQ ve *P. betae* (Keskin)'nın varlığını tespit etmişlerdir. Türkiye izolatlarında yalnızca BNYVV, BSBV ve *P. betae'*nın varlığını belirlemişlerdir.

***Beet virus Q***

Belçika, Bulgaristan, Fransa, Almanya, İtalya, İsveç, Macaristan ve Çek Cumhuriyeti ve İran'da rapor edilmiştir. BVQ genomu da BSBV gibi 3 parçadan oluşmuştur.

Kutluk Yılmaz ve ark. (2004), Tokat ili şeker pancarı üretim alanlarından aldıkları toprak örneklerinde BNYVV, BSBV ve BVQ'nün ve *P. betae*' nın varlığını tuzak bitki ve mRT-PCR yöntemi ile araştırmışlardır. 20 toprak örneğinde BNYVV, 24 örnekte BSBV ve 25 toprak örneğinin tümünde *Polymyxa betae* Keskin belirlemişlerdir. Toprak örneklerinin hiçbirinde BVQ bulunamamıştır.

Meunier et al. (2003) yaptıkları çalışmada ise farklı ülkelerden aldıkları toprak örneklerine mRT-PCR testi uygulamışlar ve örneklerde BNYVV, BSBV ve BVQ'nün birlikte bulunduğunu bildirmişlerdir.

**Vektör, *Polymyxa betae* Keskin**

*Polymyxa betae* Keskin'nın konukçu dizisi, *Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Caryophyllaceae* ve *Portulacaceae* familyası türlerini içermektedir. *P. betae* nın enfeksiyonu gerçekleştirebilmesi için en uygun toprak sıcaklığı 25° C'dir. Bunun yanısıra toprak pH'sının 6-8 arasında olması ve toprağın yüksek neme sahip olması önemlidir (Asher and Blunt 1987).

Kutluk Yılmaz ve ark., (2010) yaptıkları çalışma da *P. betae* enfeksiyonunun 7.4 üzerindeki PH değeri ile yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca araştırıcılar toprakta yüksek miktarda $CaCO_3$ (Kalsit) ve Mg olmasının BNYVV ve BSBV enfeksiyonlarını teşvik ettiğini vurgulamışlardır.

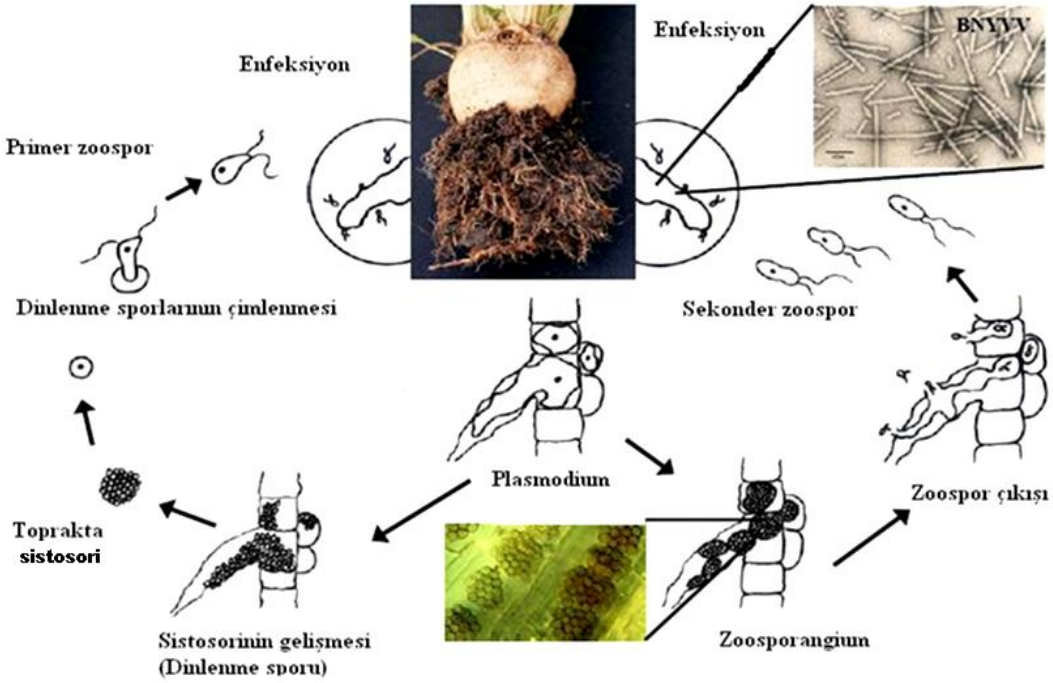
Fungus, toprakta çok uzun yıllar sporosori adı verilen kalın duvarlı spor kümeleri halinde kalabilmektedir. Daha sonra bu dinlenme sporları çimlenerek primer zoosporları oluşturur. Primer zoosporlar bitki dokusuna temas etmeleri durumunda kamçılarını kaybederek enkist hale dönüşürler ve yaklaşık 2 saat sonra

zoosporların içeriği bitki dokusuna aktarılır. Bitki dokusu içerisinde zoosporların çekirdekleri bölünmeye başlar ve plasmodium oluşur. Bu plasmodiumdan ya sekonder zoosporların serbest kalacağı zoosporangium ya da sporosorinin oluşacağı sporogenik plasmodium oluşur. Bir döngü yaklaşık 60 saat içerisinde tamamlanır (Ertunç ve ark., 1998) (Şekil 1.).

Virüs hastalıklarıyla mücadelede en önemli adım, öncelikle etmenin tam ve kesin olarak teşhis edilmesidir.

Son yıllarda moleküler biyoloji ve biyoteknoloji alanında görülen gelişmeler bitki virüs hastalıklarının tanılanmasında da etkisini göstererek hızlı ve güvenilir teşhislere olanak sağlamıştır (Makkouk and Kumari 2006). 1985'te özellikle Karry Mullis'in ortaya koyduğu PCR yöntemi ile yeni bir dönem başlamıştır (Mullis et al., 1986).

Bu dönemden itibaren virüs hastalıklarının teşhisinde nükleik asite dayalı veya serolojik yöntemlerle nükleik asitin kombine olduğu yöntemler ağırlık kazanmıştır.




**Şekil 1.** *Polymyxa betae* Keskin'nın Yaşam Döngüsü (Pferdmenges 2007)

## ***Polymyxa betae*** **Keskin** ***ile*** **Taşınan Virüslerin Tanılanmasında Kullanılan Moleküler Yöntemler**

Virüslerin tanısında kullanılan başlıca yöntemler şunlardır:

*dsRNA (çift iplikçikli RNA) Analiz Yöntemi*

dsRNA analizi bitki virüslerinin tanısında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin esası; CF-11 selüloz kolon kromatografisine dayanır. Analiz sonucuna göre, eğer bir bitkide dsRNA varsa bu bitkinin bir RNA virüsü veya virüs benzeri bir etmenle infekteli olduğunu gösterir (Korkmaz ve Çınar 1998). Nükleik asitlerin selüloz kolonda fraksiyonlarına ayrılması çeşitli ethanol konsantrasyonlarında tek ve çift sarmal RNA' nın ve DNA'nın selüloza bağlanması temeline dayanır. DNA ve ssRNA fraksiyonları %15-18 Ethanol içeren

tampon solüsyonda akıp giderken, dsRNA gibi yüksek sekonder yapılı olan RNA selülozda bağlı kalır. Daha sonra Ethanol içermeyen tampon solüsyonu uygulanarak dsRNA'lar selülozdan elde edilir. Bu işlemlerden sonra bitkisel dokulardan viral etmene özgü dsRNA elde edilmiş olur (Spiegel, 1987). Selüloz prosedürü ile bitkisel dokulardan elde edilmiş olan dsRNA nın analizi için, akrilamid ya da agar jel içerisinde elektroforetik ayrıma gidilir. Jel üzerinde oluşan dsRNA profili ile molekül ağırlık standardının oluşturduğu profillerin karşılaştırılması yapılarak elektroforeze tabi tutulan viral dsRNA'ların molekül ağırlığı saptanır (Açıkgöz ve ark., 1998). Bitki virüslerinden pürifiye edilen dsRNA'lar, daha sonra RNA'dan cDNA sentezinde kullanabilmektedir. Bunun yanı sıra, karışık enfeksiyonların tanısında da kullanılmaktadır.

Ertunç ve İlhan (2002) Kastamonu ve Turhal Şeker Fabrikaları ekim alanlarından aldıkları toprak örneklerine tuzak bitki olarak hassas şeker pancarı çeşitini (fiona) ekmişler ve daha sonra bu örnekleri dsRNA analizine tabi tutmuşlardır. 73 örnekten 34'ünde dsRNA profili tespit edilmiştir.

İlhan ve Ertunç (2001), Konya, Turhal ve Kastamonu şeker pancarı ekim alanlarından elde edilen BNYVV ile infekteli 6 izolat ile Çankırı'dan elde edilen *Toprak kökenli buğday mozayik virüs'*ü (*Soil-borne wheat mosaic virus*: SBWMV) ile infekteli 6 izolatın dsRNA analizlerini yapmışlar ve bu yöntemin furovirüsler için etkinliğini araştırmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda bir BNYVV izolatında 6.746 kb büyüklüğünde RNA 1, başka bir izolatta 1.774 kb büyüklüğünde RNA 3, bir izolatta 6.746 kb büyüklüğünde RNA 1 ve 1.774 kb büyüklüğünde RNA 3, bir izolatta da 6.746 kb büyüklüğünde RNA 1 ve 1.465 kb büyüklüğünde olan RNA 4 görmüşlerdir. Dört SBWMV izolatında ise 3.5 kb büyüklüğünde olan RNA 2 bandını gözlemlemişlerdir.

*Ters transkripsiyon–polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) Yöntemi*

PCR hedef DNA'nın tüp içerisinde sentetik olarak çoğaltılmasını sağlayan bir metotdur. RT-PCR'da ilk aşama RNA'dan cDNA'nın sentezlenmesi aşamasıdır. Bunu PCR ile çoğaltma aşaması takip eder. PCR 3 aşama'da gerçekleşir. Bunlar;

1- Çift iplikçikli DNA sarmalı yüksek sıcaklığa (94-98°C) maruz bırakılarak tek zincirli hale getirilir. Bu aşamaya denatürasyon adı verilir.

2- Özgün primerler uygun sıcaklıkta (37-65°C) tek iplikçik formundaki DNA'ya bağlanırlar. Bu aşamaya da bağlanma-annealing adı verilir.

3- DNA polimeraz ortamda bulunan dNTP'leri kullanarak primerlerin 3' ucuna kalıp DNA'ya uygun olan dNTP (Deoksinükleotid trifosfatlar)'leri ekler. Böylece çift iplikçikli DNA sentezlenmektedir. Bu aşamaya polimerizasyon–uzama aşaması adı verilir.

PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezde elektrik akımı altında moleküler ağırlıklarına göre ayrılmakta ve daha sonra UV ışığı altında gözlenmektedirler (Makkouk and Kumari 2006). RT-PCR yöntemi, şeker pancarında enfeksiyon yapan virüs hastalıklarının teşhisinde rutin olarak kullanılmaktadır (Rush and Heidel 1995).

Harju et al. (2005), yaptıkları çalışma'da Uzak doğu ve Avrupa'nın farklı bölgelerinden aldıkları şeker pancarı izolatlarında BNYVV'nün tespiti için RT-PCR yöntemini kullanmışlardır. Virüsün RNA-5'inin yaklaşık 500 bp'lik kısmını spesifik primerler kullanarak çoğaltmışlar ve virüse özgü bantı elde etmişlerdir.

Wisler et al. (1994), USA'dan alınan beş adet BNYVV izolatı ile sekiz adet BSBMV izolatının benzerlik derecesini serolojik, elektron mikroskobu, konukçu dizisi, fungal taşınma ve PCR testi kullanarak değerlendirmişlerdir. BSBMV izolatlarının çeşitli konukçularda BNYVV'den farklı simptomlar sergilediğini ve BSBMV izolatının BNYVV'den farklı furovirüsler olduğunu bildirmişlerdir.

Diğer bir çalışma da İran'nın Razavi Khorasan bölgesinde şeker pancarı üretim alanlarında BNYVV ve BSBV enfeksiyonunu belirlemek amacıyla serolojik yöntemleri ve RT-PCR

yöntemlerini kullanmışlardır. Araştırıcılar, infekteli kök örneklerinden BNYVV için 324 bp büyüklüğünde, BSBV için 399 bp büyüklüğünde virüslere spesifik bantlar elde etmişlerdir (Kardani et al., 2006).

*Nested ters transkripsiyon–polimeraz zincir reaksiyon (nRT-PCR: Nested Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) yöntemi*

PCR çalışmalarında elde edilen ilk ürünler ikinci PCR için kalıp olarak kullanılır. Bu yöntemde iki çift primer kullanılır. Nested PCR yöntemiyle çoğaltmaya çalıştığımız bölgede spesifik olmayan bantların oluşması engellenir. Bu yöntem ayrıca çok düşük virüs konsantrasyonlarında oldukça hassastır (Webster et al., 2004).

Morris et al. (2001), Avrupa, Amerika ve Asya'dan alınan toplam 21 şeker pancarı izolatında rhizomania hastalığının tespiti için virüsü *Chenopodium quinoa*'da çoğaltmış ve bu örneklere RT-PCR, Immunocapture RT-PCR ve nested PCR yöntemlerini uygulayarak hassasiyetlerini araştırmışlardır. Çalışmada nested PCR'ın, klasik RT-PCR yönteminden 1000 kat daha hassas olduğunu vurgulamışlardır.

Shahnejat-Busnehri et al. (2006) İran'da şeker pancarında görülen BNYVV'nün teşhis yöntemlerini geliştirmek amacıyla RT-PCR'dan sonra nested PCR yöntemini uygulamışlardır. Araştırıcılar bu yaklaşımla klasik RT-PCR'la karşılaşılan istenmeyen bantların oluşumunun üstesinden gelindiğini ve çok daha hassas bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan çalışmada ayrıca iki aşamalı RT-PCR yönteminin, DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay) yöntemine göre 1250 kez daha hassas olduğu bildirilmiştir.

*Multiplex ters transkripsiyon–polimeraz zincir reaksiyon (mRT-PCR: Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) yöntemi*

Bu metodla aynı anda çok sayıda virüs teşhis edilebilmektedir. Birden fazla hedef dizinin birlikte çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Bu amaçla farklı bölgelere bağlanan primer çiftleri kullanılır. Değişik hedeflerin aynı reaksiyon şartlarında çoğalmalarını sağlamak için, kullanılacak primerlerin dikkatli seçilmesi, bağlanma sıcaklıklarının birbirine uygun olması ve kendi aralarında eşleşmelerine olanak vermeyecek baz dizilerine sahip olmaları gerekmektedir (Webster et al. 2004). BNYVV, BSBV ve BVQ virüslerinin aynı anda belirlenmesi amacıyla bu yöntem başarıyla uygulanmıştır.

Meunier et al. (2003), dünyanın farklı bölgelerinden alınan örneklerde multiplex RT-PCR yöntemini başarı ile kullanmışlardır. Çalışma da BNYVV, BSBV, BVQ ve *P. betae*'nın varlığını tespit etmişlerdir.

Bir diğer çalışmada Polonya da şeker pancarı üretim alanlarında bulunan BNYVV, BSBV ve BVQ virüslerinin teşhisinde mRT-PCR yöntemini kullanarak, virüslerin kılıf protein geninin moleküler karakterizasyonunu ortaya koymuşlardır. Araştırıcılar kılıf protein geninin nükleotid dizilerini, klonladıkları cDNA'dan belirleyerek 567 nükleotitden, 189 aminoasitten oluştuğunu bildirmişlerdir. BNYVV'nün filogenetik analizleri sonucunda izolatların A ve B tipi ırk olduğunu ortaya koymuşlardır (Borodynko et al., 2009).

*Immunocapture ters transkripsiyon–polimeraz zincir reaksiyonu (Immunocapture RT-PCR: Immunocapture Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) yöntemi*

Virüse özgü spesifik antibody'ler kullanılarak, ezilen bitki dokusundaki viral formlar immunolojik olarak yakalanır ve elde edilen viral RNA amplifikasyonda kullanılmaktadır. Bu yöntemde nükleik asit izolasyonuna gerek kalmadan doğrudan bitki ekstraktlarının kullanılması virüs çalışmalarında çok büyük avantaj ve kolaylık sağlamaktadır.

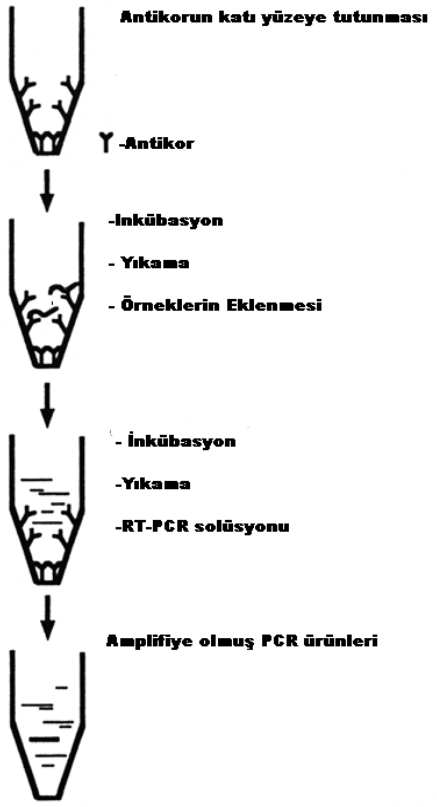
Bu yöntem kısaca şu şekilde uygulanmaktadır;

-PCR tüpleri veya ELISA plakaları virüse spesifik antibody ile kaplanır.
-Yıkama tamponu (PBST) ile tüpler yıkanır.

-Örnek ezme tamponu ile ezilen bitki örnekleri tüplere aktarılır.
-İnkübasyona bırakılır ve daha sonra ikinci bir yıkama gerçekleştirilir.
-Her bir tüpe RT-PCR karışımı eklenir ve reaksiyon gerçekleştirilir (Şekil 2.).

Suarez et al. (1999), İspanya'da yaptıkları çalışmada şeker pancarında BNYVV'nü tespit etmek için DAS-ELISA ve Immunocapture-RT PCR yöntemlerini kullanmışlardır. Irkın belirlenmesi amacıyla öncelikle IC-RT-PCR'la cDNA oluşturmuşlar, daha sonra bu ürünlerin RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) profillerini ortaya koymuşlardır. RFLP çalışmalarında, RNA 1'de 459 bp'lik kısmı çoğaltarak *Sca*I, *Eco*RI, RNA 2'de 343 bp'lik kısmı çoğaltarak *Taq*I, *Bst*UI, *Hinc*II, RNA 3'de 345 bp'lik kısmı çoğaltarak *Eco*RI, *Msp*I ve RNA 4'de 658 bp'lik kısmı çoğaltarak *Apa*LI ve *Hinc*II ile kesmişler ve RFLP analizlerini yapmışlardır. İspanya'da çalışılan bu izolatların Tip A' ya daha yakın olduğu belirlenmiştir.

Zizyte et al. (2006), Litvanya'da yaptıkları çalışmada şeker pancarı kök ve yapraklarından BNYVV virüsünü tespit etmek için Immunocapture RT-PCR yöntemini kullanmışlardır. Çalışmada BNYVV'nün kılıf protein geninin read-through bölgesinde yaklaşık 500 bp'lik bir kısmı amplifiye edilmiştir.




**Şekil 2.** Immunocapture RT-PCR'ın şematik anlatımı (Anonim, 2009a)

*PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; Kesilmiş Fragmentlerin uzunluğundaki Polimorfizm)*

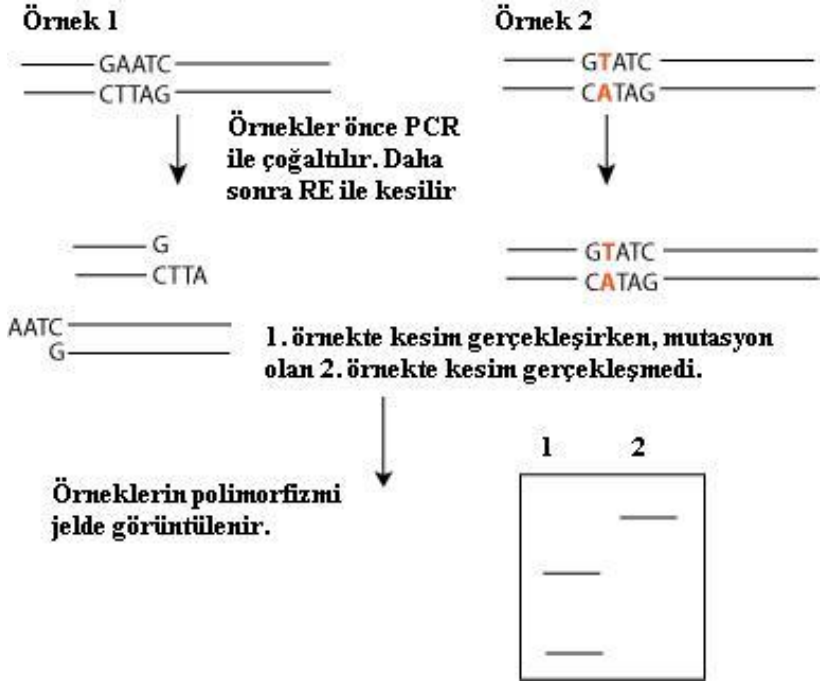
DNA'nın restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesiminden sonra agaroz jel elektroforezde bantların yer ve sayısının kıyaslanarak oluşturulan çeşitliliğe RFLP (Restriction fragment length polymorphism: Kesilmiş fragmentlerin uzunluğundaki polimorfizm) adı verilir. Bir virüsün ırkında

enzim için kesim bölgesi varken diğer ırk için olmayabilir veya birden fazla kesim bölgesi olabilir (Ulubaş, 2002). Öncelikle polimorfik noktayı içeren bölge, bu bölgeye spesifik bir çift primer kullanılarak PCR' la çoğaltılır. PCR'la çoğaltılan bölge uygun restriksiyon enzimiyle kesilir daha sonra bu DNA'lar agaroz veya poliakrilamid jel elektroforez yöntemiyle ayrılarak analiz edilir (Şekil 3.).

Moleküler çalışmalarda kullanılan restriksiyon enzimlerinin bazıları *Bam*HI, *Eco*RI, *Taq*I, *Hind*III, *Hind*II, *Rsa*I, *Msp*I, *Ava*II, *Sma*I, *Hga*I, *Ple*I' dir (Kayrın ve ark., 2003).

Türkiye'de Tokat ilinin farklı şeker pancarı üretim alanlarından alınan toprak örneklerinde Kutluk Yılmaz ve ark. (2007) tarafından BNYVV'nün moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışmada hedef nükleik asit olarak RNA 3 genomik RNA'sının P25 genine spesifik primerler kullanılarak RT-PCR yöntemi ile çoğaltılmış ve çoğaltılan bu spesifik ürünler RFLP, sekans ve aminoasit analizlerine tabi tutulmuşlardır. Nükleotid sekans analizleri, Türk izolatlarının Fransa, Japonya, İtalya ve Kazakistan izolatlarına yakın olduğunu göstermiştir. Türk izolatlarının hepsinin A tipi izolat olduğu belirlenmiştir.

Meunier et al. (2005), Belçika'nın 10 farklı bölgesinden alınan BNYVV ile infekteli şeker pancarı izolatlarının moleküler karakterizasyonlarını yaparak, Fransa, Çin, Kazakistan ve Japonya izolatları ile karşılaştırmışlardır. Çalışmada RNA 2'nin P75 OFR bölgesi, RNA 3'ün P25 protein geni ve RNA 4'ün belirli bir kısmı RT-PCR ile çoğaltmışlar, çoğaltılan bu bölgede *Sca* I, *Eco*R I, *Sma* I, *Taq* I, *Hind* III, *Acc* I, *Bst*U I, *Sty* I, *Bam*H I, *Msp* I, *Apa*L I, *Bis*HKA I, *Bsp*1286 enzimlerinin tanıdığı ve kestiği bölgelerin varolup olmadığını kontrol etmişlerdir. Ayrıca araştırıcılar çalışma da P75 ORF bölgesinin sekans analizlerini de yapmış ve buna göre, Belçika izolatlarının A ve B tipi ırk olduğunu belirlemişlerdir.

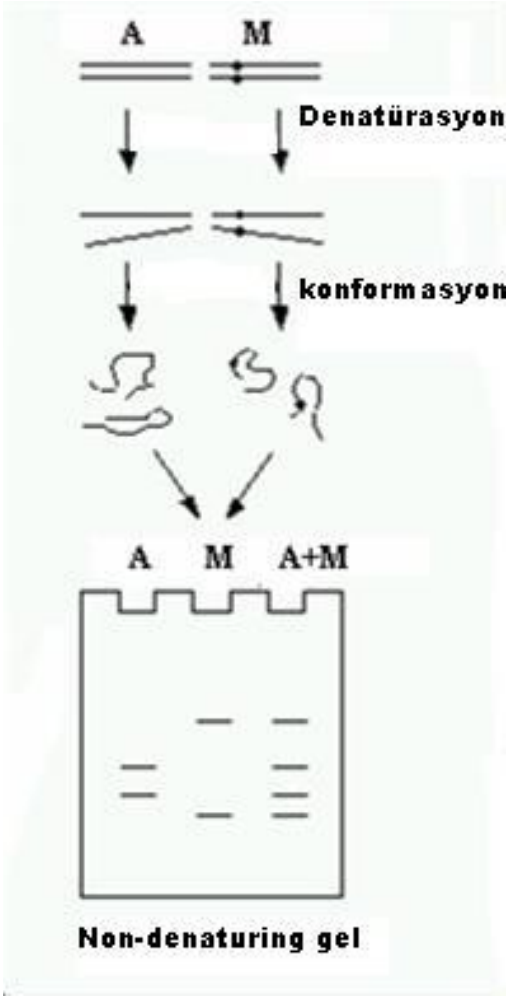



**Şekil 3.** RFLP-PCR'ın Şematik Anlatımı (Anonim, 2008)

*PCR-SSCP (Single-Strand Conformation Polimorphism : Tek kol konformasyon polimorfizmi)*

Denatüre olmayan poliakrilamid jelde mutant ve mutant olmayan tek sarmallı DNA moleküllerinin farklı hareketlilik göstermesi esasına dayanır. Tek sarmallı

DNA'nın katlanma özellikleri nükleotid dizilişiyle ilişkilidir. Mutant DNA molekülünde tek bir baz bile farklı olsa fragmentin katlanması farklı noktalardan olacaktır. Katlanma yerlerinin değişmesi tek sarmallı DNA'nın tersiyer yapısını değiştirerek jel üzerindeki hareketini etkilemektedir (Kayrın ve ark., 2003).




**Şekil 4.** PCR-SSCP'nin şematik anlatımı (Anonim, 2009b)

PCR ile çoğaltılan çift zincir DNA, sıcaklık (90-95°C) yada formamide uygulanarak tek zincirli hale getirilir. Ayrılan sarmalların tekrar birleşmesini engellemek için buzda bekletilir. Tek sarmal olarak yüklenen DNA'lar elektroforez sırasında kendi üzerine katlanarak yeni bir yapı kazanırlar ve jel üzerinde elektroforetik hareketleri farklılık oluşturur (Şekil 4.). Bu yöntem tek bir nükleotide dayalı farklılığı bile belirleyebilen çok hassas ve oldukça basit bir yöntemdir. SSCP yönteminin başarısı; DNA fragmentlerinin büyüklüğüne, jelin yapısına, DNA konsantrasyonuna, deneysel koşulların optimizasyonuna bağlıdır (Vorechovsky, 2005).

Koenig et al. (1995), SSCP yöntemini BNYVV için uygulamışlardır. Yapılan çalışma da Almanya'da B tipinin, Fransa'da ise A tipinin bulunduğu doğrulanmıştır. Büyük Britanya'da ise A ve B tipinin karışık olarak bulunduğu belirlenmiştir. Tamamen farklı bir tip olan P tipinin ise, Fransa'da küçük bir bölge olan Pithiviers'de bulunduğu bildirilmiştir. Yine A ve B tipinin mutant formlarına Fransa ve Almanya izolatlarında rastlanmıştır.

Liu et al. (2005), Kaliforniya'nın Imperial vadisinde 2002-2003 yılları arasında yaptıkları çalışmada IV-BNYVV izolatlarının hangi tip ırka ait olduklarını belirlemek için RT-PCR ve SSCP çalışmaları yürütülmüştür. Araştırıcılar RNA 5'in yaklaşık 260 bp'lik bir kısmını gen bankasında D63759 kayıt numarası ile yer alan spesifik bir çift primeri kullanarak PCR yöntemi ile çoğaltmışlardır. İzolatların hiç birinde RNA-5 bulamamışlardır. SSCP çalışmalarında ise, BNYVV'nün RNA 1 ve RNA 2 genomik RNA'sı oligonükleotid primerler kullanarak çoğaltmışlar ve bu çoğaltılan PCR ürünlerini sıcaklık ve formamid uygulaması ile tek zincirli hale getirmişlerdir. Örnekler % 10'luk bisacrilamid jelde 200 Volt elektrik akımında 6 saat süreyle elektroforetik ayrıma tabi tutulmuşlardır. Çalışma sonucunda IV-BNYVV izolatlarının, pozitif kontrol olarak kullanılan A tipi ırk ile eşleştiği ortaya konulmuştur.

## Sonuç

Şeker pancarında *P. betae* ile taşınan virüslerin tanılanmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar; test bitkilerine mekaniksel inokulasyon, tuzak bitki yöntemi, serolojik testler, partikül morfolojisi ve nükleik asitlerle yapılan çalışmalardır.

Son yıllarda görülen moleküler alandaki gelişmeler, virüs hastalıklarının çok kısa sürede ve daha hassas bir şekilde teşhis edilmesine olanak sağlamaktadır. Kullanılan moleküler yöntemlerin en önemli sorunlarından biri maliyettir. Şu an bu yöntemler pahalı gibi görünse de sürekli gelişen teknoloji bu analizleri hem daha pratik hem de daha ucuz hale getirecektir.

Sonuç olarak virüs hastalıklarının tanısında yukarıda bahsedilen moleküler tanılama yöntemleri tek başına yeterli değildir. Bu yüzden diğer yöntemlerle birlikte kullanılması gerekmektedir.

## Kaynaklar

Açıkgöz, S., Döken, M.T., Çıtır, A. ve Yardımcı, N. 1998. Amasya Kiraz Hastalığı Etmeninin dsRNA Analii ile Tanılanması ve Ege Bölgesi'nin Bu Hastalık Yönünden İncelenmesi. Türkite VIII. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, Ankara, 234-238.

Anonim, 2008. http://www. scienceblogs.com (Erişim tarihi: 20.05.2008)

Anonim, 2009a. http://www.Icnaes.affrc.go.jp (Erişim tarihi: 02.04.2007)

Anonim, 2009b. http://www.rennes.inra.fr (Erişim tarihi: 12.11.2008)

Anonim, 2010. İnternet Sitesi. http//www.turkseker.gov.tr. (Erişim Tarihi: 23.02.2010)

Asher, M.J.C. and Blunt, S.J. 1987. The Ecological Requirement of *Polymyxa betae*. In: Proc 50th IIRB Cong., Brussels, 45-55.

Borodynko, N., Rymelska, N., Hasiów-Jaroszewska, B., Pospieszny and H. 2009. Molecular Characterization of Three Soil-borne Sugar Beet-Infecting Viruses Based on the Coat Protein Gene. Journal of Plant Pathology, 91 (1): 191-193.

Canova, A. 1959. On the Pathology of Sugar Beet. Inf. Fitopatol., 9: 390-396.

Duffus, J.E. and Liu, H.Y. 1987. First Report of Rhizomania of Sugar Beet from Texas. Plant Disease, 71: 557.

Ertunç, F., Erzurum, K., Karakaya, A., İlhan, D. ve Maden, S. 1998. Incidence of Rhizomania Disease on Sugar Beet in Çorum, Kastamonu and Turhal Sugar Refinery Regions. The Journal of Turkish Phytopathology, Vol. 27, No:1: 39-46.

Ertunç, F. ve İlhan, D. 2002. dsRNA Analysis of Turkish Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) Isolates. The Journal of Turkish Phytopathology, Vol. 31, No:3: 173-183.

Harju, V.A., Skelton, A., Clover, G.R.G., Ratti, C., Boonham, N., Henry, C.M. and Mumford, R.A. 2005. The Use of Real-time RT-PCR (TaqMan) and Post-ELISA Virus Release for the

Detection of Beet Necrotic Yellow Vein Virus Types Containing RNA 5 and Its Comparison with Conventional RT-PCT. Journal of Virological Methods, 123: 73-80.

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.

İlhan, D. 2004. Şeker Pancarı Nekrotik Sarı Damar Virüsü (Beet Necrotic Yellow Vein Benyvirus: BNYVV)'nün Moleküler Olarak Tanılanması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Ensititüsü, 75s, Ankara.

İlhan, D. ve Ertunç, F. 2001. Investigation of Some Furoviruses by dsRNA Analysis Method. The Journal of Turkish Phytopathology, Vol. 30, No. 1: 27-34.

Ivanovic, M. and Mc F a r l a n e, I. 1982. A tubular Virus Associated with Infection of Sugar Beet by *Polymyxa betae*, Rothamsted Exp. Stn. Rep. 1981: 190—191.

Kardani, S. G., Tabasinezhad, F., Jafarpour, B. and Rastegar, M. F. 2006. Detection of Beet Soil Borne Virus and Type A of Beet Necrotic Yellow Vein Virus in Razavi Khorasan Province of Iran using the RT-PCR Method with Specific Primers. Ninth Arab Congress of Plant Protection, 19-23 November, Damascus, Syria.

Kaya, R. 2009. Türkiye'de Şeker Pancarı Ekim Alanlarında Rhizomania Hastalığının Yayılma Durumu. Tarım Bilimleri Dergisi, 15 (4): 332-340.

Kayrın, L., Aksoy, K., Tuli, A., Çürük, M.A. ve Attila, G. 2003. Restriksiyon Enzimleri. Tanıda DNA Teknikleri, VI. Biyokimya Yaz Okulu, 15-19 Eylül 2003, Adana.

Kıymaz, T. 2002. Şeker Politikalarında Yeni Yönelimler ve Türkiye'nin Konumu. İktisadi Sektörler ve Koordinasyon Genel Müdürlüğü Tarım Dairesi, DPT Yayın No: 2652, Ankara.

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.

Koenig, R., Lüddecke, P. and Haeberlé, 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: 2051-2055.

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.

Korkmaz, S. ve Çınar, A. 1998. Bitki Virus Hastalıklarının Double-Stranded RNA Analizi Yöntemiyle Tanısının Yapılması. Türkiye VIII. Fitopatoloji Kongresi, 21-25 Eylül 1998, Ankara.

Kutluk Yılmaz, N.D., Meunier, A., Schmit, J.F., Stas, A. and Bragard, C. 2004. Tokat ili Şeker Pancarı Üretim Alanlarında Beet Necrotic Yellow Vein Virus, Beet Soilborne Virus, Beet Virus Q ve Vektör *Polymyxa betae* Keskin'in Multiplex Reverse Transcription-PCR Yöntemi ile Belirlenmesi. Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi, 8-10 Eylül, Samsun, s.174.

Kutluk Yılmaz, N.D. ve Erkan, S. 2005. Şeker Pancarı (Beta vulgaris var. saccharifera)'nda Rhizomania Hastalığı. OMÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi, 20(1): 64-72.

Kutluk Yılmaz, N.D. ve Sökmen, M.A. 2007. Orta Karadeniz Bölgesi Şeker Pancarı Üretim Alanlarında Belirlenen Beet Necrotic Yellow Vein Virus Izolatlarında RNA-5'in Araştırılması. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi, 27-29 Ağustos, Isparta, s.303.

Kutluk Yılmaz, N.D., Meunier, A., Schmit, J.F., Stas, A. and Bragard, C. 2007.

Partial Nucleotide Sequence Analysis of Turkish Isolates of Beet Necrotic Yellow Vein (BNYVV) RNA-3. Plant Pathology, 56: 311-316.

Kutluk Yılmaz, N.D., Sökmen, M., Gulser, C., Saracoğlu, 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.

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. Bull. EPPO/OEPP, 19: 539-540.

Liu, H.Y., Sears, J.L. and Lewellen, R.T. 2005. Occurence of Resistance-Breaking Beet Necrotic Yellow Vein Virus of Sugar Beet. Plant Disease, 89: 464-468.

Makkouk, K. and Kumari, S. 2006. Molecular Diagnosis of Plant Viruses. Arab Journal of Plant Protection, Vol. 24: No.2.

Meunier, A., Schmit, J-F., Stas, A., Kutluk, N. and Bragard, C. 2003. Multiplex Reverse Transcription-PCR 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 Environment Microbiology, 69: 2356-2360.

Morris, J., Clover, G.R.G., Harju, V.A., Hugo, S.A. and Henry, C.M. 2001. Development of A Highly Sensitive Nested RT-PCR method for Beet Necrotic Yellow Vein Virus Detection. Journal of Virological Methods, 95: 163-169.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. 1986. Spesific Enzymatic Amplification of DNA in Vitro: The Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor. Symp. Quant Biol., 51: 263-273.

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 (Sugar Beet Diseases In Turkey). Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş. Genel Müdürlüğü, Yayın No: 219: 52-55.

Pferdmenges, F. 2007. Occurrence, Spread and Pathogenicity of Different Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) Isolates. Der Georg-August-Universität Göttingen, Doctoral Thesis, 110pp.

Prillwitz, H. and Schlösser, E. 1992. Beet Soil-Borne Virus: Occurence, Symptoms and Effect on Plant Development. Med. Fac. Landbouv. Üniv. Gent. 57/2a: 295-302.

Putz, C., Merdinoğlu, D., Lemaire, O., Stocky, B., Valentin, P. and Wiedemann, S. 1990. Beet Necrotic Yellow Vein Benyvirus causel agent of Rhizomania. Rewiev of Plant Pathology. 69(5): 247-254.

Rush, C. M., French, R.C. and Heidel G. B. 1993. Texas 7a Possible Strain of Beet Necrotic Yellow Vein Virus. Pages 59-In: Proc. Symp. Int. Work. Group Plant Viruses Fungal Vectors, 2nd. Montreal, Canada.

Rush, C. M. and Heidel G. 1995. Furovirus Diseases of Sugar Beets in the United States. Plant Disease, 79: 868-875.

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 Sa*d*, 110: 47-54.

Shahnejat-Busnehri, A.A., Jamaledin, A. and Dehkordi, M.K.H. 2006. Detection of Beet Necrotic Yellow Vein Virus with Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction. International Journal of Agriculture Biology, Vol.8: No.2.

Spiegel, S. 1987. Double-Stranded RNA in Strawberry Plants Infected with

Strawberry Mild Yellow-Edge Virus. Phytopathology, 77: 1492-1494.

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.

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.

Ulubaş, Ç. 2002. Sert Çekirdekli Meyve Ağaçlarında Enfeksiyon Yapan Virüslerin Moleküler Yöntemlerle Tanılanması. Sert Çekirdekli Meyve Virüslerinin Moleküler Yöntemlerle Tanılanması Kurs Notları. 30 Eylül-4 Ekim 2002. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Ankara.

Vorechovsky, I. 2005. Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis. Medical Biomethods Handbook. 73-77 p.

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.

Webster C.G., Wylie, S. J. and Jones, M. G. K. 2004. Diagnosis of Plant Viral Pathogens. Current Science, Vol, 86: No:12.

Whitney, E.D. and Duffus, J.E. 1991. Compendium of Beet Diseases and Insects, APS Pres, 76pp., USA.

Wisler, G. C., Liu, H. Y. and Duffus, J. E. 1994. Beet Necrotic Yellow Vein Virus and its Relationship to Eight Sugar Beet Furo-Like Viruses from the United States. Plant Disease, 78: 995-1001.

Zizyte, M., Staniulis, J. and Zitikaite, I. 2006. Identification of Beet Necrotic Yellow Vein Virus Isolate Detected in Lithuania. Agronomy Research, 4: 475-478.