

Araştırma Makalesi
(Research Article)

Ali KARANFİL^{1a}

Savaş KORKMAZ^{1b*}

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat
Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, 17100
Çanakkale, Türkiye

^{1a}Orcid No: 0000-0002-4503-6344

^{1b}Orcid No: 0000-0001-8227-3800

*sorumlu yazar: skorkmaz@comu.edu.tr

Anahtar Sözcükler:

Benzerlik, Filogenetik, Klonlama, RT-PCR

Keywords:

Similarity, Phylogenetic, Cloning, RT-PCR

Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.,2020, 57 (1):53-61
DOI: [10.20289/zfdergi.589422](https://doi.org/10.20289/zfdergi.589422)

**Çanakkale ve Tekirdağ İlleri Kanola Üretim Alanlarında Önemli
Virüs Hastalıklarının Tanılanması ve Karakterizasyonu**

Identification and Characterization of Important Virus Diseases on Canola
Production Fields of Çanakkale and Tekirdağ Provinces in Turkey

Alınış (Received): 09.07.2019

Kabul Tarihi (Accepted): 10.10.2019

ÖZ

Amaç: Bu çalışma Çanakkale ve Tekirdağ illeri kanola üretim alanlarındaki bazı virüs hastalıklarının tespiti ve moleküler karakterizasyonu amacı ile yürütülmüştür.

Materyal ve Metot: Kanola bitkileri görsel olarak incelenmiş, virüs ve virüs-benzeri simptom gösteren bitkilerden örnekler toplanmıştır. Toplanan örnekler turnip mosaik virus (TuMV), cucumber mosaic virus (CMV) ve cauliflower mosaic virus (CaMV)'ün varlığının belirlenmesi amacı ile DAS-ELISA ile testlenmiştir. Enfekteli bulunanlar içerisinde her bir virüs için 2 izolat seçilerek RT-PCR ile istenilen gen bölgeleri kısmi olarak çoğaltılmış, klonlanmış ve dizilenmiştir. Elde edilen dizileme verileri kullanılarak çoklu dizi ve filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: Testlemeler sonucunda 16 örnek TuMV ile 3 örnek ise CMV ile enfekteli olarak bulunmuştur. Bir örnekte ise CMV ve TuMV karışık enfeksiyonu tespit edilmiştir. Toplanan örneklerin hiçbirisinde CaMV enfeksiyonuna rastlanılmamıştır. İzolatların moleküler karakterizasyonları sonucunda TuMV izolatlarının dünya izolatları ile %80-94 ve 90-98, CMV izolatlarının ise %77-98 ve 82-100 oranında sırası ile nükleotit ve amino asit düzeyinde benzerlikler gösterdiği tespit edilmiştir. Filogenetik analizler sonucunda ise TuMV izolatlarının Asian BR ve CMV izolatlarının ise IA gruplarında yer aldığı belirlenmiştir.

Sonuç: Gerçekleştirilen bu çalışma ile kanola üretim alanlarında TuMV ve CMV enfeksiyonu tespit edilerek çoğaltılan kısmi gen bölgeleri moleküler olarak karakterize edilmiştir.

ABSTRACT

Objective: This study was carried out for the detection and molecular characterization of important virus diseases in canola fields of Çanakkale and Tekirdağ provinces in Turkey.

Material and Methods: Canola plants were examined visually and ones showing virus and virus-like symptoms were collected. Collected samples were tested with DAS-ELISA to determine the presence of turnip mosaic virus (TuMV), cucumber mosaic virus (CMV) and cauliflower mosaic virus (CaMV). Two isolates were selected for each virus and the desired gene regions were partially amplified, cloned and sequenced. This sequences obtained were used in similarity and phylogenetic analysis.

Results: As a result of the tests, 16 and 3 samples were found to be infected with TuMV and CMV, respectively. In one example, CMV and TuMV mixed infection was detected. None of the samples collected had CaMV infection. In the similarity analyses, TuMV isolates showed similarities 80–94% and 90–98%, CMV isolates showed similarities 77–98% and 82–100% with world isolates at nucleotide and amino acid levels, respectively. Moreover in phylogenetic analyses, TuMV and CMV isolates were found in the Asian BR and IA groups, respectively.

Conclusion: TuMV and CMV infections in canola production areas were detected and partially amplified gene regions molecularly characterized with this study.

GİRİŞ

Son yıllarda dünyada ve ülkemizde fosil yakıtlara alternatif olabilecek fikirler üzerinde yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bu araştırmaların bazıları biyodizel üretiminde kullanılabilen kanola bitkisi üzerinden yürütülmektedir. Son derece önemli bir yere sahip olan bu bitkinin ülkemiz açısından diğer bir önemi ise son yıllarda yaşadığımız yağlı tohumlu bitki açığını doldurma potansiyelidir. Son yıllarda literatüre girmiş olan enerji tarımı ile de kanola bitkisinin önemi giderek artmaktadır (Günay, 2008). Ülkemizde toplam 321.330 da alandan 110.000 ton kanola üretimi gerçekleştirilmektedir. Bu üretimin de %75'i ise Marmara Bölgesi'nden karşılanmaktadır (Anonim, 2018). İstatistiki verilerden de anlaşılacağı üzere Marmara Bölgesi ülkemizin en büyük kanola üretim potansiyeline sahip bölgesi olarak öne çıkmaktadır.

Bu önemli yağ bitkisinin ülkemizde kültüre alınması ikinci dünya savaşının bitimini takiben gerçekleşmiştir. Ancak ülkemizde kanola tarımındaki bitki koruma ile ilgili sorunların tespitine yönelik gerçekleştirilen çalışmalar oldukça az sayıdadır (Kadioğlu ve ark., 1995; Topçu, 2014). Bu bağlamda ülkemizde de şu ana kadar kanola üretim alanlarında viral etmenlerin tespitine yönelik oldukça sınırlı sayıda gerçekleştirilmiş çalışma bulunmaktadır (Şeker, 2015; Karanfil ve Korkmaz, 2016). Dünyada ise konu hakkında gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda birçok virüs hastalığının kanola tarımında önemli seviyede maddi kayıplara neden olabileceği belirtilmiş ve virüs hastalıklarından kaynaklı kayıpların %90'lara ulaşabileceği bildirilmiştir (Goheen, 1988; Nooh, 2012). Tüm bu bilgilerin doğrultusunda yapılan literatür taramalarında da kanola tarımında enfeksiyon meydana getiren en önemli virüs hastalıklarının ise cucumber mosaic virus (CMV), cauliflower mosaic virus (CaMV) ve turnip mosaic virus (TuMV) olduğu bildirilmiştir (Nooh, 2012; Ebrahim-Ghomi, 2014). Ülkemizde de kanola haricindeki Brassicaceae familyası bitkilerinde yapılan bazı araştırmalarda bu 3 virüsün varlığı yaygın olarak tespit edilmiştir (Korkmaz ve ark., 2007, 2008; Erkan ve ark., 2013; Tuzlalı ve Korkmaz, 2014).

Belirtilen bu virüslerin en genel özellikleri ise kısaca şöyledir. TuMV, bitki virüsleri arasında en büyük grubu oluşturan potyvirus cinsine dahildir. Bu zamana kadar bu gruba ait olan 180 virüsün olduğu belirlenmiştir. Sebzelede ekonomik kayıplara neden olan CMV'den sonra ikinci sırada gelmektedir (Provvidenti, 1996; Ohshima et al., 2002). TuMV izolatlarının filogenetik sınıflandırılmasında ise 6 grup tanımlanmıştır. Bu gruplar World B, Basal B, Orchis, Asian BR, Basal BR ve

Iranian gruplarından oluşmaktadır (Ohshima et al., 2002; Nguyen et al., 2013b; Yasaka et al., 2017).

CMV ise tobacco mosaic virus (TMV)'den sonra en fazla konukçu genişliğine sahip viral etmen olup 85 bitki familyasına dahil 1000'den fazla bitkiyi enfekte edebilmektedir. Doğada birçok monokotiledon ve dikotiledon yabani ve kültür bitkisinde ekonomik olarak önemli verim kayıplarına sebep olmaktadır. CMV, Bromoviridae familyasının cucumovirus cinsine ait olup, yuvarlak şekilli, zarf içermeyen, yaklaşık olarak 29-30 nm çapında, üç segmentli (+) ssRNA genomuna sahip ve tek bir partikülden oluşan bir virüstür (Palukaitis and Garcia-Arenal, 2003). Etmen ile gerçekleştirilen moleküler çalışmalar sonucunda; CMV izolatlarının filogenetik sınıflandırılmasının ilk olarak; izolatların sahip oldukları serolojik özellikler ve sekans benzerlik oranları dikkate alınarak grup I ve grup II şeklinde yapıldığı bildirilmiştir (Palukaitis et al., 1992). Ancak gerçekleştirilen yeni çalışmalar ile grup I'in IA ve IB olarak 2 alt gruba ayrıldığı belirtilmiştir (Roossinck et al., 1999).

CaMV, caulimovirus cinsine ait ve dsDNA'ya sahiptir. Etmenin halkasal yapıdaki genom büyüklüğü ise yaklaşık olarak 8 kb'dir (Cheng et al., 1992). Etmen doğada yaprak bitleriyle taşınabilmekte olup, CaMV'ye vektörlük yaptığı bilinen 27 tür yaprak bitinin olduğu ve etmenin mekanik olarak taşınabilirken, polen ya da tohum ile taşınmadığı bildirilmiştir (Kennedy et al., 1962; Blanc et al., 2001; Palacios et al., 2002). CaMV izolatlarının filogenetik sınıflandırılmalarında grup A ve B olmak üzere 2 büyük grup ile bu gruplarda yer alan izolatların coğrafik orijinlere göre alt gruplar oluşturduğu belirtilmiştir (Yasaka et al., 2014).

Ülkemiz kanola üretim alanlarındaki virüs hastalıklarının mevcut durumu ile ilgili son derece sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Gerçekleştirilen bu çalışma ile Çanakkale ve Tekirdağ illeri kanola üretim alanlarında önemli 3 virüsün varlığının araştırılarak tanınması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma ülkemiz kanola üretim alanlarında virüs hastalıkları açısından gerçekleştirilen en kapsamlı çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

MATERYAL ve METOT

Arazi Çalışmaları

Arazi çalışmaları Çanakkale ve Tekirdağ illeri kanola üretim alanlarında 2017 ve 2018 yılları üretim sezonunda gerçekleştirilmiştir. Kanola üretim dönemi boyunca tesadüfi olarak seçilen üretim alanlarında arazi çalışmaları gerçekleştirilerek bitkiler görsel olarak incelenmiş ve viral hastalık benzeri belirti gösteren

kanola bitkilerinden örnekler alınmıştır. Arazi çalışmaları yürütülürken aynı üretim alanında birden fazla bitkide benzer belirtilerin görülmesi durumunda en fazla 3 bitkiden örnekleme gerçekleştirilmiştir. Toplanan örnekler silika jel içinde 4 °C'de ileri analizlerin yapılması için saklanmıştır.

DAS-ELISA Testleri

Virüs ve benzeri simptom göstererek toplanan örneklerin CMV, TuMV ve CaMV'ye karşı testlenmesi DAS-ELISA ile virüs spesifik poliklonal antiserumlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DAS-ELISA testleri kitlerin sağlandığı firmanın önerileri doğrultusunda (Bioreba, İsviçre) Clark and Adams (1977)'in belirttiği temel yöntem esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Test sonuçları Medispec ESR 2000 ELISA plate okuyucusunda (Awareness Technology Inc., ABD) 405 nm dalga boyunda yapılan okumalarla değerlendirilmiş ve negatif kontrolün en az 2 katı ve üzerinde oluşan değerler pozitif olarak kabul edilmiştir.

Moleküler Karakterizasyon Çalışmaları

Gerçekleştirilen DAS-ELISA testleri sonucunda CaMV ile enfekteli örnek bulunmadığı için moleküler karakterizasyon çalışmaları TuMV ve CMV üzerinden yürütülmüştür. Bu amaçla ilk olarak TuMV ve CMV ile enfekteli olduğu DAS-ELISA testlerinde belirlenen örneklerden Li ve ark. (2008)'in belirttiği şekilde CTAB metodu ile total nükleik asit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RT-PCR aşamasında kullanılan kitler TaKaRa (Japonya) firmasından temin edilerek üretici firmaların önerileri dikkate alınarak PCR cihazında (BioRad, ABD) CMV'nin kılıf protein (CP) geninin 638 bç'lik bölgesi Karanfil ve ark. (2016), TuMV'nin nuclear inclusion b+kılıf protein (NIb+CP) gen bölgesinin 1178 bç'lik kısmı ise Karanfil ve Korkmaz (2016)'ın belirttiği gen spesifik primerler kullanılarak kısmi olarak çoğaltılmıştır. Çoğaltılan PCR ürünlerinin, agaroz jel elektroforezine yüklenmesinin ardından hedef ürünlere ait bantlar Major Science UVDI (ABD) jel görüntüleme cihazında görüntülenmiş ve bir sonraki aşama olan klonlama çalışmalarına geçilmiştir.

RT-PCR yöntemiyle çoğaltılan hedef gen bölgelerini içeren ürünler T-A klonlama yöntemiyle pGEM-T Easy plazmid vektörü kullanarak klonlanmıştır (Promega, ABD). Klonlama çalışmaları kapsamında izolatların elde edildiği bölgeler göz önünde bulundurularak Çanakkale ve Tekirdağ illerini temsil edecek şekilde her bir virüs için 2 izolatın klonlanması gerçekleştirilmiştir. Klonlama çalışmaları Çevik et al. (1995) ve Jiang et al. (2008)'in belirttiği yöntem esas alınarak klonlama kitlerinin sağlandığı firmanın (Promega, ABD) önerileri

doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Klonlama çalışmaları sonucunda istenilen gen bölgelerini kesin olarak taşıdığı belirlenen plazmitlerin saflaştırılması yapılarak sahip oldukları DNA dizimleri Refgen Biyoteknoloji (Ankara) firmasından hizmet alımı ile M13F ve M13R üniversal primerleri ile çift yönlü olarak belirlenmiştir. Elde edilen ham DNA dizimleri CLC Main Workbench V.8.0.1 programına aktararak öncelikle pGEM-T Easy plazmid vektörüne ait DNA dizileri temizlenmiş ve hedef gen bölgelerine ait kısmi nükleotit (nt) ve amino asit (aa) dizileri elde edilmiştir.

Benzerlik ve Filogenetik Analizler

Elde edilen nt ve aa dizileri ile gen bankasına dünyanın farklı bölgelerinden yüklenmiş olan CMV ve TuMV izolatlarına ait veriler kullanarak çoklu nt ve aa dizi karşılaştırmaları gerçekleştirilmiştir (Çizelge 1).

CLC Main Workbench V.8.0.1 programında Clustal W ile izolatlara ait dizileme verilerinin benzerlik oranları belirlenmiştir. Ayrıca benzerlik oranları Muhire ve ark. (2014) tarafından geliştirilen Sequence Demarcation Tool V. 1.2 (SDT) kullanılarak renklendirilmiş matris olarak da elde edilmiştir. Gerçekleştirilen bu işlemlerin hepsi her iki virüs içinde ayrı ayrı yapılmıştır.

TuMV ve CMV izolatlarının filogenetik ilişkileri ise Mega 7 programında belirlenmiştir (Kumar et al., 2016). Bu amaçla ilk olarak çalışma kapsamında elde edilen izolatların dizileme verileri ile dünya izolatlarına ait veriler Clustal W ile dizilenmiştir. Elde edilen çoklu nt dizi verileri 1000 tekrarlı bootstrap analizi ile kiamura 80 parametresine göre neighbor-joining modeli kullanılarak izolatların filogenetik ilişkileri belirlenmiştir. Oluşturulan filogenetik ağaçlarda TuMV için japanese yam mosaic virus (JYMV), CMV için tomato aspermy virus (TAV) dış grup olarak kullanılmıştır.

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Arazi Çalışmaları ve DAS-ELISA Testleri

Gerçekleştirilen arazi çalışmaları sonucunda Çanakkale ve Tekirdağ illerinden viral hastalık benzeri belirti gösteren toplam 84 örnek toplanmıştır. Alınan örneklerin DAS-ELISA ile testlenmesi sonucunda 16 örnekte TuMV, 3 örnekte CMV ve 1 örnekte de TuMV ve CMV karışık enfeksiyonu tespit edilmiştir. Toplanan örneklerin hiçbirisinde CaMV enfeksiyonuna rastlanılmamıştır. TuMV ile enfekteli bulunan örneklerin tümü Çanakkale ilinden toplanan örneklerden elde edilmiştir. Tekirdağ ilinden toplanan örneklerden ise sadece 1 örnek CMV ile enfekteli olarak bulunmuştur (Çizelge 2).

Çizelge 1. Moleküler karakterizasyon çalışmalarında kullanılan cucumber mosaik virus ve turnip mosaik virus izolatlarına ait bilgiler
Table 1. Information for cucumber mosaic virus and turnip mosaic virus isolates used in molecular characterization studies

Cucumber mosaik virus izolatları					
Genbankası Erişim Numarası	Izolat	Orjin	Genbankası Erişim Numarası	Izolat	Orjin
HG917910	Palampur	Hindistan	AB368498	42CM	Japonya
AM114273	LeO2	Macaristan	LC066494	IRNWRSh41	İran
EF202597	Tsh	Çin	LC066479	IRNTim1	İran
AF127976	LS	ABD	AB506800	LiCB	Güney Kore
L15336	Trk7	-	AJ810259	KS44	Tayland
AF198103	LY	Avustralya	HE962480	Vir	İtalya
AJ276481	mf	Güney Kore	EF593026	Jatropha	Hindistan
LC066500	TUR4	Türkiye	LC066467	IRNREY4	İran
LC066509	TUR83	Türkiye	LC066503	TUR54	Türkiye
Turnip mosaik virus izolatları					
AB701691	OMA	Almanya	AB440239	IRNSS5	İran
AB701692	ORM	Almanya	AB440238	IRNTRa6	İran
AB701693	OS	Almanya	AP017762	IRNCQ	İran
AB701701	DEU4	Almanya	AP017763	IRNDM	İran
AB701699	DEU1	Almanya	AP017768	IRNKBS58	İran
AB701700	DEU2	Almanya	AP017769	IRNKBS65	İran
AB701695	DEU7	Almanya	AP017770	IRNKhCa	İran
AB701740	USA5	ABD	AP017778	IRNMY57	İran
AB701741	USA6	ABD	AP017780	IRNRaNi3	İran
AB701734	TIGA	Almanya	AP017783	IRNRK	İran
AB701735	TIGD	Almanya	AP017784	IRNRkaraj	İran
KJ936087	NSW1	Avustralya	AP017785	IRNRN6	İran
KJ936088	NSW2	Avustralya	AP017794	IRNST	İran
AB701711	GBR27	Birleşik Krallık	AP017795	IRNTH	İran
AB701713	GBR31	Birleşik Krallık	AP017796	IRNT1m1	İran
AB701716	GBR57	Birleşik Krallık	AP017799	IRNTOFS2	İran
AB701717	GBR83	Birleşik Krallık	AB252100	AKD934J	Japonya
AB701733	PV177	Birleşik Krallık	AB252130	ND10J	Japonya
KR153038	CCLB	Çin	AB093621	KD32J	Japonya
KR153040	WFLB14	Çin	AB701728	Pol 1	Polonya
KR153039	LWLB	Çin	AB701731	Pol 2	Polonya
AB701703	DNK3	Danimarka	AB701732	Pol 4	Polonya
AB701727	NLD2	Hollanda	AY227024	CDN1	Kanada
AB701720	ITA1A	İtalya	AB362512	TUR1	Türkiye
AB701722	ITA4	İtalya	AB362513	TUR9	Türkiye
AB701723	ITA5	İtalya	AB093612	NZ290	Yeni Zelenda
AB701725	ITA8	İtalya			

Çizelge 2. Çanakkale ve Tekirdağ illerinden toplanan ve araştırılan virüsler ile enfekteli örnek sayıları**Table 2.** Numbers of samples collected and found to be infected with viruses in Çanakkale and Tekirdağ provinces

İller	İlçeler	Toplanan Örnek Sayısı	Enfekteli Örnek Sayısı			
			TuMV	CMV	CaMV	TuMV+CMV
Çanakkale	Ezine	12	4	1	-	1
	Bayramiç	17	-	-	-	-
	Lapseki	15	12	1	-	-
	Eceabat	16	-	-	-	-
Tekirdağ	Hayrabolu	7	-	-	-	-
	Süleymanpaşa	12	-	1	-	-
	Malkara	5	-	-	-	-
Toplam		84	16	3	-	1

Gerçekleştirilen DAS-ELISA çalışmaları sonucunda, Çanakkale ilinden Tekirdağ iline göre çok daha fazla virüs ile enfekteli bitki elde edilmiştir. Üreticilerle yapılan görüşmelerde genel olarak Tekirdağ ilinde üretimin sözleşmeli olarak yapıldığı ifade edilmiş ve bitki koruma önlemlerinin de bu sözleşmeli üretime bağlı olarak oldukça sıkı bir şekilde gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Çanakkale ilinde de sözleşmeli üretim yapılmasına rağmen bazı üreticilerin kanolayı yağ bitkisi yerine yem bitkisi olarak kullandığı ve bitki koruma önlemlerine çok dikkat etmedikleri üreticiler tarafından ifade edilmiştir. Ayrıca virüs vektörü böceklerle genel olarak mücadele edilmediği de göz önünde bulundurulduğunda Çanakkale ilindeki yüksek enfeksiyon oranında vektör böcek popülasyonunun da etkili olabileceği düşünülmektedir. Karanfil ve Korkmaz (2016), Türkiye’de ilk kez kanola üretim alanlarında TuMV enfeksiyonu tespit ettikleri çalışmalarında oldukça tipik TuMV benzeri semptomların bitkilerde görüldüğünü ifade etmişlerdir. Aynı zamanda Coutts and Jones (2000), Avustralya kanola üretim alanlarındaki virüs enfeksiyonlarını araştırdıkları çalışmalarında 7 örnekte TuMV enfeksiyonu bildirmişlerdir. İran kanola üretim alanlarında gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise TuMV enfeksiyon oranının %38 olduğu bildirilmiştir (Farzadfar and Pourrahim, 2014). TuMV ile ilgili önceki çalışmalardan elde edilen sonuçlar, bu çalışmada elde edilen yüksek TuMV enfeksiyon oranını destekler niteliktedir. Çalışma kapsamında elde edilen 4 bitkideki CMV enfeksiyonu ise Karanfil ve Korkmaz (2017)’in ülkemiz kanola üretim alanlarında ilk kez bildirdikleri CMV enfeksiyonu ile ilgili çalışmaları ile paralellik göstermektedirler. Araştırmacılar 2014 yılında Çanakkale kanola alanlarından topladıkları 21 bitkinin bir tanesinde CMV enfeksiyonuna rastladıklarını bildirmişlerdir. Bununla birlikte ülkemiz kanola üretim alanlarında CMV enfeksiyonunun varlığı ilk kez bu

çalışmalar ile bildirilmiştir. Ayrıca virüs benzeri semptom gösterdikleri için toplanan 84 bitkiden 64’ün de aranılan virüs hastalıklarının varlığı tespit edilmemiştir. Bu nedenle toplanan bu örneklerin olasılıkla başka virüs ya da virüs benzeri etmenlerle de enfekteli olabileceği düşünülmektedir. Nitekim son yıllarda Tekirdağ kanola üretim alanlarında gerçekleştirilen bir çalışmada, beet western yellows virus (BWYV) enfeksiyonu kanola üretim alanlarında tespit edilmiştir (Şeker, 2015). Bu bağlamda ülkemiz kanola üretim alanlarında şu ana kadar gerçekleştirilen çalışmalar ile bulunan viral hastalıkların dışında çok sayıda virüs ve virüs benzeri hastalık olma ihtimalinin yüksek olduğu öngörülmektedir.

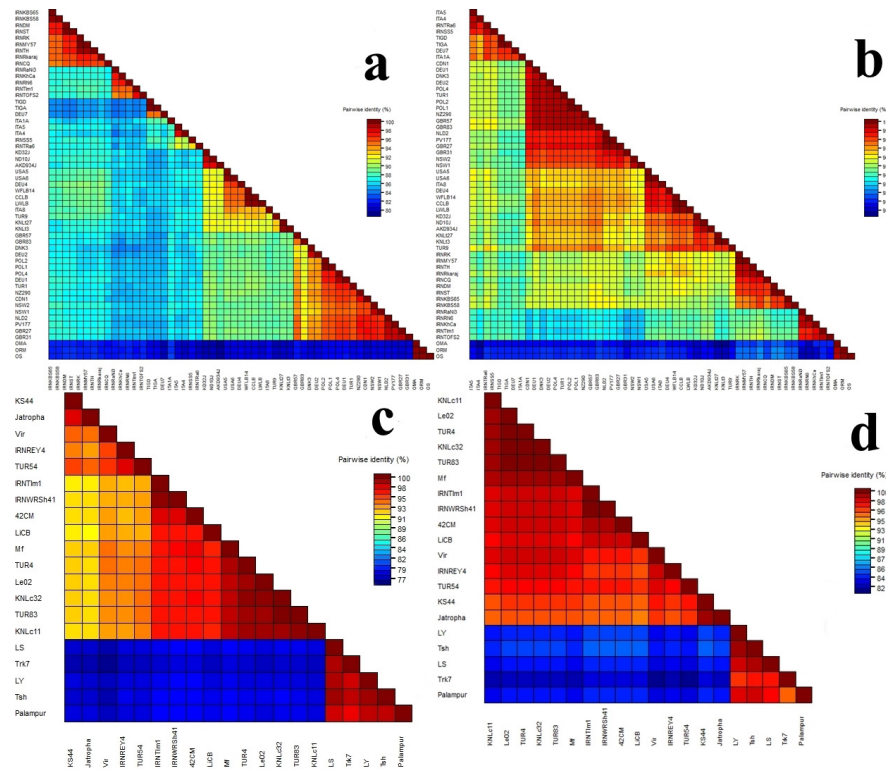
Moleküler Karakterizasyon Çalışmaları

Gerçekleştirilen dizileme çalışmaları sonucunda elde edilen izolatlar için dizileme verileri ilk olarak gen bankasına kaydedilmiştir (CMVKNLc11 ve KNLc32 kodlu izolatlar için erişim numaraları sırası ile MH426931 ve MH426932; TuMV KNLt3 ve KNLt27 kodlu izolatlar için erişim numaraları sırası ile MH426933 ve MH426934). CMV için 638 bç, TuMV içinde 1178 bç’ten oluşan dizileme verileri elde edilmiştir. Bu sonuçla kullanılan primer çiftlerine göre istenilen gen bölgelerinin çoğaltılması ve dizilenmesi başarı ile gerçekleştirilmiştir.

Gerçekleştirilen çoklu dizileme verilerinin karşılaştırmaları ile izolatların dünya izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik oranları hesaplanmıştır. Bu bağlamda dünya izolatları ile gerçekleştirilen çoklu nt ve aa dizi analizleri sonucunda kanola TuMV izolatları dünya izolatları ile nt düzeyinde %80-94, aa düzeyinde ise %90-98 oranında gen bankasında bulunan TuMV izolatları ile benzerlik göstermişlerdir (Şekil 1a ve 1b). Kanola TuMV izolatları en fazla benzerliği TUR9 kodlu Türk izolatı ile göstermiştir. En az benzerliği ise

nt düzeyinde %80 ile IRNKBS65 kodlu İran izolatu ile, aa düzeyinde ise yaklaşık olarak %90'lık benzerlik oranı ile ITA8 kodlu İtalyan izolatu ile göstermişlerdir. Dünyanın farklı bölgelerinde de gerçekleştirilen TuMV izolatlarının moleküler karakterizasyonları sonucunda da bu çalışmadakine paralel benzerlik oranları elde edilmiştir. Karanfil ve Korkmaz (2016) ülkemizde kanola bitkisinde ilk kez rapor ettikleri TuMV enfeksiyonunun moleküler karakterizasyonu sonucu dünya izolatları ile nt düzeyinde %88-93 oranında benzerlikler tespit etmişlerdir. Zhu et al. (2016) Çin'de Basal BR grubu TuMV izolatlarının tüm genomları ile gerçekleştirdikleri moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda aynı gruptaki TuMV izolatları ile ortalama olarak %95 oranında benzerlikler gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca genel olarak TuMV izolatlarının en fazla benzerliği coğrafik orijin olarak yakın izolatlar ile yada filogenetik gruplandırma aynı grupta bulunduğu izolatlar ile gösterdiği de TuMV'nin evrimi ile ilgili yapılan bir çalışmada belirtilmiştir (Yasaka et al., 2017).

CMV izolatları için gerçekleştirilen çoklu nt ve aa dizi karşılaştırmaları sonucunda ise nt düzeyinde %77-98 ve aa düzeyinde ise %82-100 arasında gen bankasında bulunan dünya izolatları ile benzerlik görülmüştür (Şekil 1c ve 1d). Kanola CMV izolatları ise en fazla benzerliği %98'in üzerinde bir oranla Türk izolatu olan TUR83 izolatu ile gösterirken, en az benzerliği nt düzeyinde yaklaşık olarak %77'lik benzerlik oranı ile KS44 kodlu Tayland izolatu ile, aa düzeyinde ise yaklaşık olarak %82'lik benzerlik oranı ile Palampur kodlu Hindistan izolatu ile göstermiştir. Kanola CMV izolatlarının dünya izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik oranlarını gösteren Şekil 1c ve 1d'deki benzerlik matrisleri daha detaylı incelendiğinde CMV izolatlarının literatüre uyumlu olarak alt grup I ve alt grup II olarak 2 alt gruba ayrıldığı görülmektedir (Roossinck, 2002). Bu alt gruplar içindeki benzerliklerin, gruplar arası benzerliklere göre daha yüksek olduğu da görülmektedir. Benzer sonuçlar ülkemizde Brassicaceae familyası bitkilerinden elde edilen CMV izolatları ile de gerçekleştirilen çalışmalarda



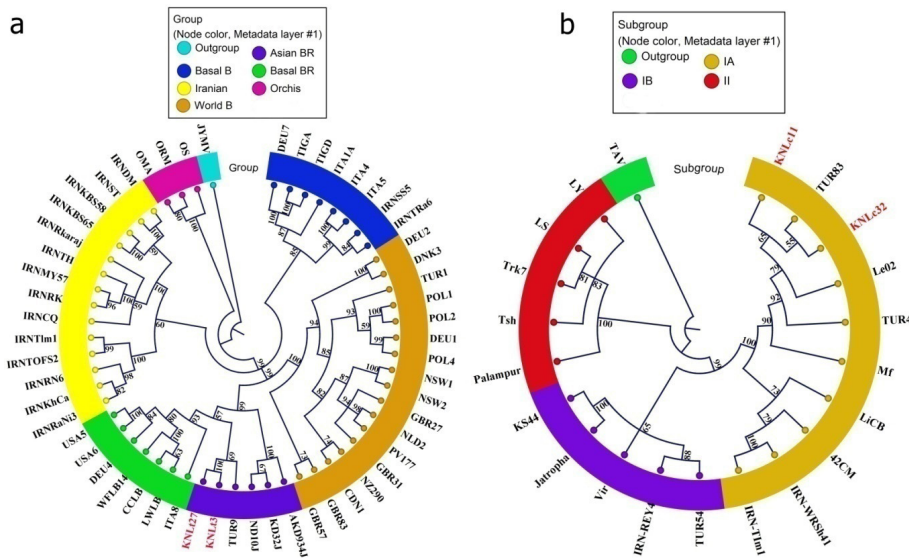
Şekil 1. Çanakkale kanola alanlarından elde edilen turnip mosaik virus (TuMV) ve cucumber mosaik virus (CMV) izolatlarının dünya izolatları ile göstermiş oldukları nükleotit (nt) ve amino asit (aa) düzeyindeki benzerlik oranları (a ve b: TuMV izolatlarının sırası ile nt ve aa, c ve d: CMV izolatlarının sırası ile nt ve aa düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları)

Figure 1. Similarity rates at nucleotide (nt) and amino acid (aa) level of turnip mosaic virus (TuMV) and cucumber mosaic virus (CMV) isolates obtained from Çanakkale and Tekirdağ provinces (a and b: nt and aa similarity rates for TuMV, respectively; c and d: nt and aa similarity rates for CMV, respectively)

ve börülce üretim alanlarındaki CMV enfeksiyonunun moleküler karakterizasyonu amacı ile gerçekleştirilen çalışmalarda da elde edilmiştir (Ohshima et al., 2016; Karanfil ve Korkmaz, 2017).

Gerçekleştirilen filogenetik analizler sonucunda Çanakkale ve Tekirdağ kanola üretim alanlarından elde edilen TuMV izolatlarının Basal BR grubunda, CMV izolatlarının ise IA alt grubunda yer aldığı belirlenmiştir (Şekil 2). Kanola TuMV izolatlarının daha önceden moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilen Brassicaceae familyası bitkilerinden elde edilmiş olan TUR9 izolatu ile aynı alt grupta yer aldığı görülmüştür (Korkmaz et al. 2008). Benzer şekilde CMV izolatları da yine şalgamgillerden izole edilmiş olan TUR83 izolatu ile aynı grupta yer almıştır (Ohshima et al., 2016). Bu

sonuçlar ile hem CMV hem de TuMV için izolatların elde edildikleri coğrafik orijin ve konukçuların filogenetik ilişkilerde rol oynadığı görülmektedir. Ancak unutulmamalıdır ki TuMV izolatlarının filogenetik ilişkileri tamamen coğrafik orijine bağlı değildir. Dünya TuMV izolatlarının evrimine yönelik bir çalışmada Türk TuMV izolatları 3 farklı gruba dağılmıştır (Yasaka et al., 2017). Benzer şekilde CMV için de gerçekleştirilen diğer birçok çalışmada da etmenin filogenetik ilişkilerinin konukçuya bağlı olmadığı belirtilirken, coğrafik orijinin önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (Roossinck, 2002). Ayrıca CMV segmentli bir virüs olduğu için etmenin genomunda meydana gelen rekombinasyonun filogenetik ilişkilerde etkili olduğu da bilinmektedir (Ohshima et al., 2016).



Şekil 2. Çanakkale ve Tekirdağ illeri kanola alanlarından elde edilen turnip mosaic virus (a) ve cucurbit mosaic virus (b) izolatlarının nükleotit düzeyinde dünya izolatları ile göstermiş oldukları filogenetik ilişkiler.

Figure 2. Phylogenetic relationships at nucleotide level of turnip mosaic virus (a) and cucumber mosaic virus (b) isolates obtained from canola fields of Çanakkale and Tekirdağ provinces with world isolates.

SONUÇ

Gerçekleştirilen bu çalışma ile Çanakkale ve Tekirdağ illeri kanola üretim alanlarında TuMV ve CMV enfeksiyonları tespit edilerek moleküler karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında araştırılan virüslerden CaMV enfeksiyonuna rastlanılmamıştır. Bundan sonra gerçekleştirilecek çalışmaların kanola üretim alanlarında enfeksiyon meydana getiren bu virüs hastalıklarının tüm genom dizilerinin belirlenmesine ve kanola tarımında sorun

oluşturan diğer virüs hastalıklarının tanısına yönelik olması gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca kanola üretim alanlarında enfeksiyon meydana getiren virüs hastalıklarının taşınım yollarının tespitine yönelik araştırmaların gerçekleştirilmesinin önemli olduğu göz önünde bulundurulmalıdır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: FBA-2017-1146.

KAYNAKLAR

- Anonim 2018. Türkiye İstatistik Kurumu. <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Erişim tarihi: 10.12.2018).
- Blanc S, Hebrard E, Drucker M, Froissart R. 2001. Molecular basis of vector transmission cauliflower mosaic virus Cabb-S strain and S Delta II hybrid by two species of aphid: *Myzus persicae* (sulzer) and *Brevicoryne brassicae* (L.). *Res Virol*, 141: 677-683.
- Cheng RH, Olson NH, Baker TS. 1992. Cauliflower Mosaic Virus: A 420 subunit (T=7), multi layer structure. *Virology*, 186: 655-668.
- Clark MF, Adams AN. 1977. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *J Gen Virol*, 34(3): 475-483.
- Coutts BA, Jones RAC. 2000. Viruses Infecting Canola (*Brassica napus*) in South-West Australia: Incidence, Distribution, Spread and Infection Reservoir in Wild Radish (*Raphanus raphanistrum*). *Aust J Agric Res*, 51: 925-936.
- Çevik B, Pappu SS, Pappu HR, Benschler D, Lee RF, Futch SH, Rucks P, Niblett CL. 1995. Molecular Cloning and Sequencing of Coat Protein Genes of Citrus tristeza virus Isolated from Meyer Lemon and Homely Tangor Trees in Florida. International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings, 13: 47-53.
- Ebrahim-Ghomi M. 2014. Study on Distribution and Detection of Cauliflower mosaic virus (CaMV) in Dezful Region of Iran. *Int J Biosci*, 4(11): 271-275.
- Erkan S, Gümtüş M, Paylan İC, Duman İ, Ergün M. 2013. İzmir ili ve çevresindeki bazı kışık sebzelerde görülen viral etmenlerin saptanması. *Ege Üniv Ziraat Fak Derg*, 50: 311-322.
- Farzadfar S, Pourrahim R. 2014. Characterization of Turnip mosaic virus from the Asian-BR Population in Iran. *J Phytopathol*, 162: 824-828.
- Goheen AC. 1988. Diseases caused by virus and virus-like agents. (Compendium of Canola Diseases, American Phytopathological Society, USA: Ed. Pearson RC, Goheen AC) 47-49.
- Günay S. 2008. Türkiye'de Enerji Tarımı Amacıyla Ayçiçeği, Kanola ve Soya Fasulyesinin Yetiştirilmesi. *Doğu Coğrafya Dergisi*, 13(20): 163-182.
- Jiang B, Hong N, Wang GP, Hu J, Zhang JK, Wang CX, Liu Y, Fan XD. 2008. Characterization of Citrus tristeza virus Strains from Southern China Based on Analysis of Restriction Patterns and Sequences of Their Coat Protein Genes. *Virus Genes*, 37(2): 185-92.
- Kadioğlu İ, Uluğ E, Üremiş İ. 1995. Çukurova'da Kanola (*Brassica napus* L. var *oleifera* D.C.) Ekim Alanlarındaki Yabancıotlar ve Mücadelesi. *Bitki Koruma Bülteni*, 35(2): 113-127.
- Karanfil A, Korkmaz S. 2017. Detection and molecular characterization of Cucumber mosaic virus (CMV) infection on canola grown in Çanakkale, Turkey. 2nd International Balkan Agriculture Congress, 16-18 May, Tekirdağ.
- Karanfil A, Soylu B, Korkmaz S. 2016. Çanakkale ili ve ilçelerindeki soğanlı süs bitkilerinde hiyar mozaik virüsü enfeksiyonunun serolojik ve moleküler yöntemler ile araştırılması. *Trak Univ Journal of Nat Sci*, 17: 105-110.
- Karanfil A, Korkmaz S. 2016. Çanakkale ili kanola (*Brassica napus* L.) üretim alanlarında şalgam mozaik virüsü (turnip mosaic virus; TuMV) enfeksiyonunun tanınması ve karakterizasyonu. *Bitki Koruma Bülteni*, 56(2): 185-197.
- Kennedy JS, Day ME, Eastop VF. 1962. A conspectus of aphids as vectors of plant viruses, Common Wealth Institute of Entomol London, The Eastern Press Ltd, London, 114p.
- Korkmaz S, Onder S, Tomitaka Y, Ohshima K. 2007. First report of turnip mosaic virus on brassicaceae crops in Turkey. *Plant Pathol*, 56: 720-720.
- Korkmaz S, Tomitaka Y, Onder S, Ohshima K. 2008. Occurrence and Molecular characterization of Turkish isolates of turnip mosaic virus. *Plant Pathology*, 57(6): 1155-1162.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870-1874.
- Li R, Mock R, Huang Q, Abad J, Hartung J, Kinard G. 2008. A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. *J Virol Methods*, 154: 48-55.
- Muhire BM, Varsani A, Martin DP. 2014. SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS One*, 9: 0108277.
- Nguyen HD, Tomitaka Y, Ho SYW, Duchene S, Vetten HJ, Lesemann D, Walsh JA, Gibbs AJ, Ohshima K. 2013b. Turnip mosaic potyvirus probably first spread to Eurasian brassica crops from wild orchids about 1000 years ago. *PLoS One*, 8: e55336.
- Nooh S. 2012. An overview of oilseed rape (canola) virus diseases in Iran. *Int J Microbiol*, 3: 24-28.
- Ohshima K, Yamaguchi Y, Hirota R, Hamamoto T, Tomimura K, Tan ZY, Sano T, Azuhata F, Walsh JA, Fletcher J, Chen JS, Gera A, Gibbs A. 2002. Molecular evolution of turnip mosaic virus: Evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *J Gen Virol*, 83: 1511-21.
- Ohshima K., Matsumoto K., Yasaka R., Nishiyama M., Soejima K., Korkmaz S., Ho S.Y.W., Gibbs A.J. and Takeshita M. 2016. Temporal analysis of reassortment and molecular evolution of cucumber mosaic virus: Extra clues from its segmented genome. *Virology*, 487: 188-197.
- Palacios I, Drucker M, Blanc S, Leite S, Moreno A. 2002. Cauliflower mosaic virus is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors. *J Gen Virol*, 83: 3163-3171.
- Palukaitis P, Garcia-Arenal. F. 2003. Cucumoviruses. *Adv Virus Res*, 62: 241-323.
- Palukaitis P, Roossinck MJ, Dietzgen RG, Francki RI. 1992. Cucumber mosaic virus. *Adv Virus Res*, 41: 281-348.
- Providenti R. 1996. Turnip mosaic potyvirus. (Viruses of Plants, CAB International, UK: Ed. Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L) 1340-1343.
- Roossinck MJ. 2002. Evolutionary history of cucumber mosaic virus deduced by phylogenetic analyses. *J Virol*, 76: 3382-3387.
- Roossinck MJ, Zhang L, Hellwald KH. 1999. Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of Cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *J Virol*, 73: 6752-6758.
- Şeker A. 2015. Trakya Bölgesi'ndeki kanola (*Brassica napus* L.) tarlalarında görülen abiyotik sorunlar ve beet western yellows virus (BWYV), turnip mosaic virus (TuMV)'lerinin DAS-ELISA ile saptanması. *NKÜ. Fen Bil. Ens., Bitki Koruma ABD, Yüksek Lisans Tezi*, 41 s.
- Topçu DA. 2014. İthal edilen ve Trakya Bölgesi'nde tarımı yapılan alanlardan alınan kanola tohum örneklerinde tohum kökenli fungal etmenlerin tespiti. *NKÜ. Fen Bil. Ens., Bitki Koruma ABD, Yüksek Lisans Tezi*, 45 s.
- Tuzlalı HT, Korkmaz S. 2014. Çanakkale ilinde Karnabahar mozaik virüsü (Cauliflower mosaic virus; CaMV) izolatlarının tanınması ve karakterizasyonu. *Mediterr Agric Sci*, 27(1): 1-7.

- Yasaka R, Fukagawa H, Ikematsu M, Soda H, Korkmaz S, Golnaraghi A, Katis N, Ho SYW, Gibbs AJ, Ohshima K. 2017. The Timescale of Emergence and Spread of Turnip Mosaic Potyvirus. *Sci Rep*, 7: 4240.
- Yasaka R, Nguyen HD, Ho SY, Duchêne S, Korkmaz S, Katis N, Takahashi H, Gibbs AJ, Ohshima K. 2014. The temporal evolution and global spread of Cauliflower mosaic virus, a plant pararetrovirus. *PLoS One*, 9(1): e85641.
- Zhu F, Sun Y, Wang Y, Pan H, Wang F, Zhang X, Zhang Y, Liu J. 2016. Molecular Characterization of the complete genome of three Basal-BR isolates of turnip mosaic virus infecting *Raphanus sativus* in China. *Int J Mol Sci*, 17: 888.