



Marmara Bölgesi Kabak Üretim Alanlarında Tobacco Mosaic Virus İzolatlarının Yaygınlığı ve Moleküler Karakterizasyonu

Ali Karanfil^{1*}

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

Makale Tarihiçesi

Gönderim: 11.08.2021
Kabul: 05.12.2021
Yayın: 10.06.2022

Araştırma Makalesi

Öz – Kültür bitkilerinde önemli üretim kayıplarına neden olan etmenlerden bir tanesi de tobacco mosaic virus (TMV)'dir. TMV bilinen en fazla sayıda konukçu genişliğine sahip bitki virüs hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Ülkemizde de farklı konukçularda etmenin varlığı tespit edilmesine rağmen kabak bitkilerinde (*Cucurbita* spp.) TMV enfeksiyon durumu ve izolatlarının genetik çeşitliliğine yönelik gerçekleştirilmiş bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bağlamda Çanakkale, Edirne ve Tekirdağ illeri kabak üretim alanlarında arazi çıkışları gerçekleştirilerek, virüs hastalığı semptomu taşıyan 45 bitkiden yaprak örnekleri alınmıştır. Alınan örnekler RT-PCR ile TMV varlığı açısından testlenmiş ve 5 bitkide enfeksiyon belirlenmiştir. TMV ile enfekteli bulunan izolatlar içerisinde 3 TMV izolatu seçilerek, kılıf protein (Coat Protein: CP) gen bölgesine göre moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla etmenin CP gen bölgesi RT-PCR ile amplifiye edilerek, çift yönlü olarak sekanslanmıştır. Elde edilen sekans verileri kullanılarak gerçekleştirilen çoklu dizi analizleri sonucunda Marmara bölgesi CMV izolatlarının kendi içlerinde nükleotid ve amino asit düzeyinde %99'un üzerinde benzerlikler gösterdiği belirlenmiştir. Dünya TMV izolatları ile gerçekleştirilen benzerlik analizleri sonucunda ise izolatların birbirleri nükleotid düzeyinde %90-99, amino asit düzeyinde ise %94-99 oranlarında benzerlikler gösterdiği belirlenmiştir. Gerçekleştirilen filogenetik analizler sonucunda ise kabak TMV izolatlarının birbirleri ile oldukça yakın ilişkili olduğu ve gen bankasında bulunan diğer Türk TMV izolatları ile aynı bir alt-grup oluşturduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler – Benzerlik, filogenetik, kabak, RT-PCR, virüs

Prevalence and Genetic Diversity of Tobacco Mosaic Virus Isolates Infecting Squash Plants in Marmara Region of Turkey

¹Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Türkiye

Article History

Received: 11.08.2021
Accepted: 05.12.2021
Published: 10.06.2022

Research Article

Abstract – One of the most important virus diseases that cause significant production losses in cultivated plants is tobacco mosaic virus (TMV). TMV is defined as the plant virus disease with the largest known host range. Although the presence of TMV in different hosts has been detected in Turkey, there has been no study conducted on its prevalence and genetic diversity of isolates in squash plants (*Cucurbita* spp.). In this context, leaf samples were collected from 45 plants showing virus disease symptoms by surveying in the squash cultivation areas of Çanakkale, Edirne, and Tekirdağ provinces. The samples were tested for the presence of TMV by RT-PCR and infection was determined in 5 plants. The coat protein (CP) gene regions of the three isolates were sequenced for molecular characterization. For this purpose, the CP gene region of the isolates was amplified by RT-PCR and sequenced bidirectionally. Pairwise nucleotide and amino acid sequence identity among the three isolates was 99%. Moreover, the squash isolates showed 90-99% nucleotide and 94-99% amino acid similarities to world TMV isolates. The phylogenetic analysis showed that the squash TMV isolates were very closely related to each other forming a subgroup with the other Turkish TMV isolates retrieved from the GenBank.

Keywords – Phylogenetic, RT-PCR, similarity, squash, virus

¹ ali.karanfil@hotmail.com

*Sorumlu Yazar / Corresponding Author

1. Giriş

Kültür bitkilerinde önemli üretim kayıplarına neden olan etmenlerden bir tanesi de *tobacco mosaic virus* (TMV)'dir. TMV pozitif duyarlılıkta tek sarmal RNA (+ssRNA) genomlu Virgaviridae familyasının Tobamovirus cinsine ait bir bitki virüsüdür. Genel olarak TMV genomu 6400 nükleotid içermektedir. TMV genomu 4 gen bölgesine sahiptir. Bunlardan iki tanesi replikasyon ile ilgilidir. Diğerleri ise hareket ve kılıf protein genleridir (King, Lefkowitz, Adams, ve Carstens, 2011). Tanımlanan ilk bitki virüs hastalığı olması sebebiyle virüslerin konukçu patojen etkileşimlerinde model olarak rol oynamıştır (Scholthof, 2004). Ayrıca etmenin partikülleri oldukça uzun yıllar stabil olarak kalabildiği ve mekanik olarak da taşındığı için etmenin kültür bitkilerine taşınması kolaylıkla olabilmektedir. Bu durum etmenin mücadelesini de oldukça zorlaştırmaktadır (Creager, Scholthof, Citovsky, ve Scholthof, 1999; Harrison ve Wilson, 1999).

TMV, bilinen en fazla sayıda konukçu genişliğine sahip bitki virüs hastalığı olarak tanımlanmaktadır. Önemli derecede ekonomik kayıplara neden olduğu bitkilerden bir tanesi de kabaklardır. Kabaklarda çok sayıda virüs hastalığı olmasına rağmen, bunların enfeksiyon oranları yıldan yıla vektörlerinin bulunma durumu, ekolojik koşullar ve uygulanan sanitasyon önlemlerine paralel olarak değişkenlik göstermektedir (Karanfil ve Korkmaz, 2021).

Ülkemiz kabak ve kabakgöl üretim alanlarında da çok sayıda virüs hastalığı tanımlanmasına rağmen (Korkmaz, Topkaya, ve Yanar, 2018; Karanfil ve Korkmaz, 2021; Yeşil, 2021), kabaklarda (*Cucurbita* spp.) TMV'nin genetik çeşitliliğinin belirlenmesine yönelik gerçekleştirilmiş bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bağlamda Marmara bölgesinde bulunan Çanakkale, Edirne ve Tekirdağ illerinden örnekler alınarak TMV varlığı açısından testlenmiştir. Testlemeler sonucunda da elde edilen izolatlar arasından seçilenlerin genbankasında bulunan farklı ülkelerden TMV izolatları ile sekans düzeyinde göstermiş oldukları biyoinformatik ilişkileri araştırılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1 Arazi Sörveyleri

Arazi sörveyleri Tekirdağ, Edirne ve Çanakkale illeri kabak yetiştiriciliği yapılan alanlarda gerçekleştirilmiştir. 2020 yılı yaz mevsiminde üretim alanlarına tesadüfi olarak arazi çıkışları gerçekleştirilerek, virüs hastalığı semptomu taşıyan bitkilerden yaprak örnekleri alınmıştır. Alınan örnekler buz kutusu içerisinde laboratuara getirilerek virüs tanı ve moleküler karakterizasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi amacı ile buzdolabında 4°C'de saklanmıştır.

2.2 Virüs Tanı Çalışmaları

2.2.1. Total RNA İzolasyonu

Toplanan örneklerdeki TMV enfeksiyonu varlığı RT-PCR ile araştırılmıştır. Bu amaçla ilk olarak toplanılan örneklerden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Total RNA izolasyonunda "Trizol Reagent" (Ambion Life Technologies, ABD) kullanılmıştır. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

2.2.2. Komplimentar DNA'ların Sentezlenmesi

Komplimentar DNA (cDNA)'ların sentezlenmesinde Takara (Japonya) firmasından sağlanan cDNA sentez kiti kullanılmıştır. cDNA sentezine ilk olarak denatürasyon işlemi ile başlanılmıştır. Bu amaçla etiketlenen PCR tüplerine 2 µl total RNA, 6 µl steril su, 1 µl random primer ve 1 µl dNTP'den oluşan toplam 10 µl'lik denatürasyon karışımı hazırlanarak thermal cycler'da denatürasyon işlemi 65 °C'de 5 dk bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin hemen ardından örnekler buzda 2 dk bekletilmiştir.

cDNA'ların sentezlenmesi için 10 µl denatürasyon karışımına 5X Prime Script Buffer'dan 4 µl, RNase inhibitör'den 0.5 µl, Prime Script Reverse Transcriptase 0.5 µl, 10 mM dNTP karışımından 1 µl, random primer'den 1 µl ve steril sudan 3 µl eklenerek RT karışım hazırlanmıştır. PCR cihazında kit üreticisi firmanın önerileri doğrultusunda ilgili sıcaklık değerleri ayarlanarak cDNA'lar sentezlenmiştir.

2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Sentezlenen cDNA'larda TMV varlığının araştırılması TMV spesifik primer çifti kullanılarak Takara (Japonya) firmasından sağlanan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak PCR karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım için 10X PCR Buffer'dan 2.5 µl, 10 mM dNTP karışımından 1 µl, TMVspe ve Tob_Uni-1 (Tablo 1) primerlerinden 0.5 µl (her biri için), taq polimeraz enziminden 0.25 µl ve steril sudan 15.25 µl eklenerek oluşturulmuştur. Etiketlenen 200 µl'lik tüpler PCR karışımı ve 5 µl cDNA'lar eklenerek karışım primer bağlanma sıcaklığı 60°C olacak şekilde kit üreticisi firmanın önerileri doğrultusunda PCR cihazına konularak TMV enfeksiyonunun belirlenmesi sağlanmıştır.

Tablo 1

Tobacco mosaic virus izolatlarının tanısında ve moleküler karakterizasyonunda kullanılan primer çifti

Primer Kodu	Primer Sekansı	Ürün Büyüklüğü (bp)	Referans
TMVspe	CGGTCAGTGCCGAACAAGAA	700	<u>Letschert, Adam, Lesemann, Willingmann, ve Heinze (2002)</u>
Tob_Uni-1	ATTTAAGTGGASGGAAA VCACT		

2.3 Moleküler Karakterizasyon Çalışmaları

Gerçekleştirilen virüs tanılama çalışmaları sonucunda TMV ile enfekteli olarak bulunan örnekler içerisinden 3 izolat seçilerek CP gen bölgesi virüs tanılama çalışmalarında verildiği gibi amplifiye edilerek, çift yönlü olarak hizmet alımı ile sekanslanmıştır (BM Labosis, Ankara).

Elde edilen ham sekans verileri CLC Main Workbench V.20 paket programında değerlendirilerek düşük kalitede olan okuma bölgeleri elemine edilerek birleştirilmiştir. Elde edilen konsensüs diziler genbankası veri tabanında (NCBI) taratılarak elde edilen dizilerin hem TMV olup olmadığı kontrol edilmiş, hem de 5'- 3' yönünde olduğu kontrol edilmiştir.

Elde edilen kabakgil TMV izolatlarının dünyanın diğer bölge ve farklı konukçularından elde edilerek gen bankasına yüklenen TMV izolatları ile göstermiş olduğu benzerlik ve filogenetik ilişkilerin belirlenmesi amacı ile de Tablo 2'deki izolatlar gen bankasından çekilerek çoklu dizi karşılaştırmaları ile izolatların birbirleri ile gösterdikleri benzerlik oranları nükleotid ve amino asit seviyesinde CLC Main Workbench V.20 ve SDT V 1.2 (Muhire, Varsani, ve Martin., 2014) programları kullanılarak belirlenmiştir.

TMV izolatlarının filogenetik ilişkilerinin ise MEGAX programında (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, ve Tamura, 2018), maximum likelihood modeli ve 1000 tekrarlı bootstrap parametresi seçilerek belirlenmiştir. Oluşturulan filogenetik ağaçta *tomato mosaic virus* (ToMV, erişim no: JX025566) dış grup olarak kullanılmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

Gerçekleştirilen arazi çalışmaları kapsamında Çanakkale'den 16, Edirne'den 14 ve Tekirdağ'dan 15 örnek olmak üzere toplam 45 virüs hastalığı semptomu gösteren bitkiden örnekler alınmıştır. Alınan ör-

Tablo 2

Farklı ülkelerinden elde edilmiş genbankasında bulunan ve bu çalışma kapsamında kullanılan TMV izolatlarına ait bilgiler

Gen bankası erişim numarası	Elde edildiği ülke	Gen bankası erişim numarası	Elde edildiği ülke
AJ429082	Almanya	GQ370521	ABD
MF467216	Çin	LN651238	Vietnam
MK087763	İspanya	KJ406323	Rusya
KY810785	Birleşik Krallık	LC168124	Güney Kore
AF546184	Finlandiya	MK677444	Türkiye
AY028262	Brezilya	MK689859	Türkiye
AF126505	Hindistan	KF527471	İran

neklerin TMV enfeksiyonu açısından RT-PCR ile testlenmesi sonucunda ise Çanakkale ve Tekirdağ'dan 2 ve Edirne'den ise 1 örnekte olmak üzere toplam 5 bitkide TMV varlığı tespit edilmiştir. Bu sonuçla toplanılan örneklerin %11.11'in TMV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir (Tablo 3). Toplanılan örneklerin %88.89'unda ise TMV enfeksiyonunun tespit edilmemesi toplanılan bu örneklerin kabaklarda enfeksiyon meydana getiren diğer virüs hastalıkları ile enfekteli olma ihtimalini güçlendirmektedir. Nitekim bu çalışma kapsamında arazi çalışmalarının gerçekleştirildiği alanlara oldukça yakın olarak Güney Marmara bölgesinde gerçekleştirilen bir çalışma kapsamında da araştırmacılar topladıkları örneklerin %13.80'inin *cucumber mosaic virus* (CMV) ile enfekteli olduğunu bildirmişlerdir (Karanfil ve Korkmaz, 2021). İç Anadolu bölgesinde gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise araştırmacı topladığı örneklerin %88.32'sinin en az bir virüs hastalığı ile enfekteli olduğunu bildirirken (Yeşil, 2021), enfeksiyon oranı en fazla tespit edilen virüs hastalıklarının potyvirus türlerine ait olduğunu farklı araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Yeşil, 2021; Örs, Oksal, ve Sipahioğlu, 2021). Ayrıca etmenin ülkemizde gerçekleştirilen birçok çalışmada da enfeksiyonunun tespit edilemediği bildirilmiştir (Korkmaz ve ark., 2018).

Tablo 3

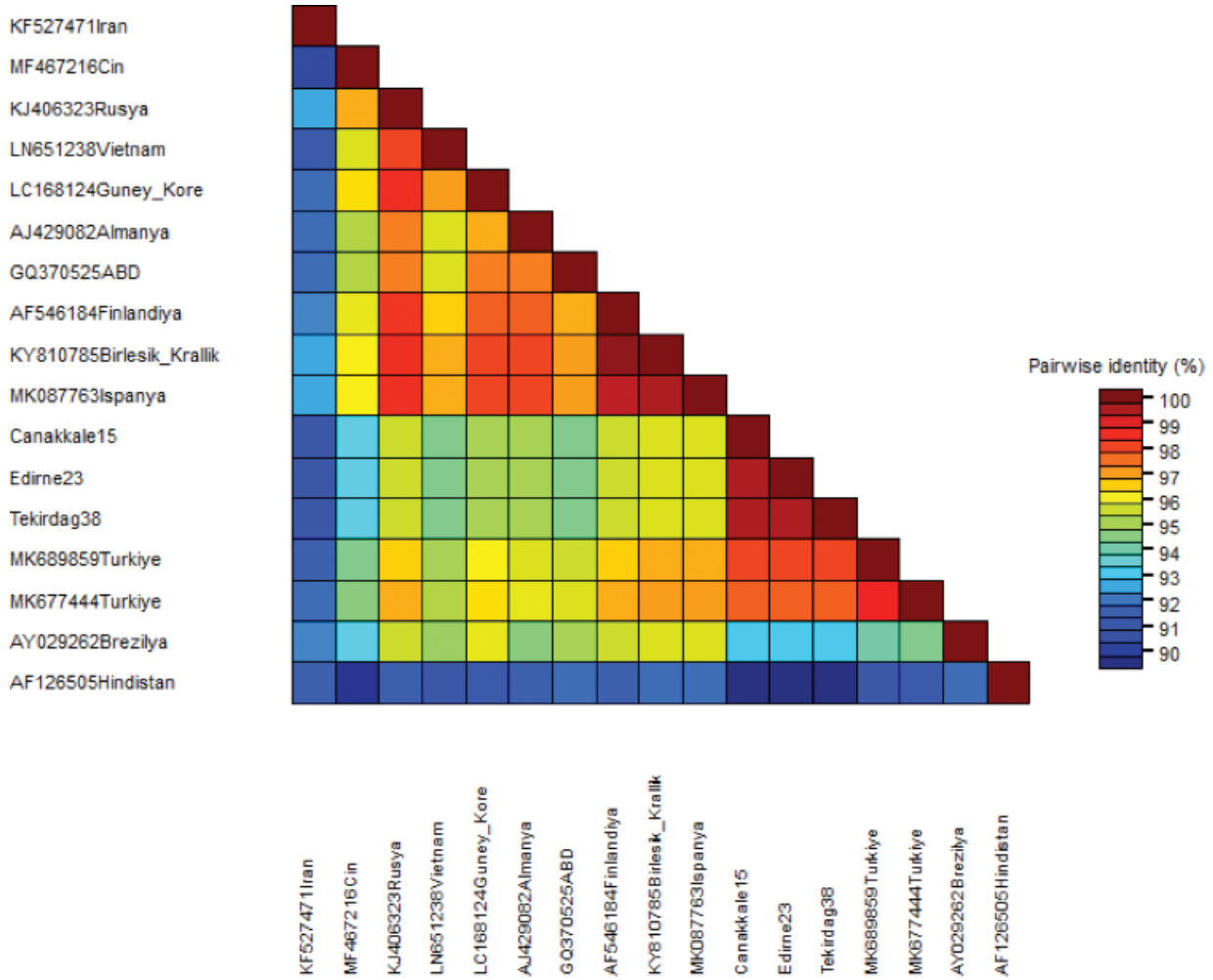
Enfekteli ve toplanılan örnek sayıları ile toplanılan örneklerdeki enfeksiyon oranı

İl	Enfekteli Örnek Sayısı	Toplanılan Örnek Sayısı	Toplanılan Örneklerdeki Enfeksiyon Oranı
Çanakkale	2	16	%12.50
Edirne	1	14	%7.14
Tekirdağ	2	15	%13.33
Toplam	5	45	%11.11

Enfekteli bulunan örnekler içerisinde her bir ilden bir izolat olacak şekilde toplam 3 izolat (Çanakkale'den Canakkale_15, Edirne ilinden Edirne_23 ve Tekirdağ'dan Tekirdag_38) seçilmiştir. Seçilen izolatların kılıf protein genlerinin RT-PCR ile amplifiye edilmesini takiben gerçekleştirilen sekanslama çalışmaları sonucunda 3 izolatında CP genlerinin 480 nükleotid uzunluğunda olduğu belirlenmiştir.

Çalışma kapsamında elde edilen TMV izolatların kendi içlerinde birbirleri ile benzerlik oranları nükleotid ve amino asit düzeyinde %99'un üzerinde olarak belirlenmiştir (Şekil 1 ve 2). Gen bankasında bulunan dünyanın farklı bölge ve ülkelerindeki TMV izolatları ile gerçekleştirilen nükleotid düzeyindeki benzerlik

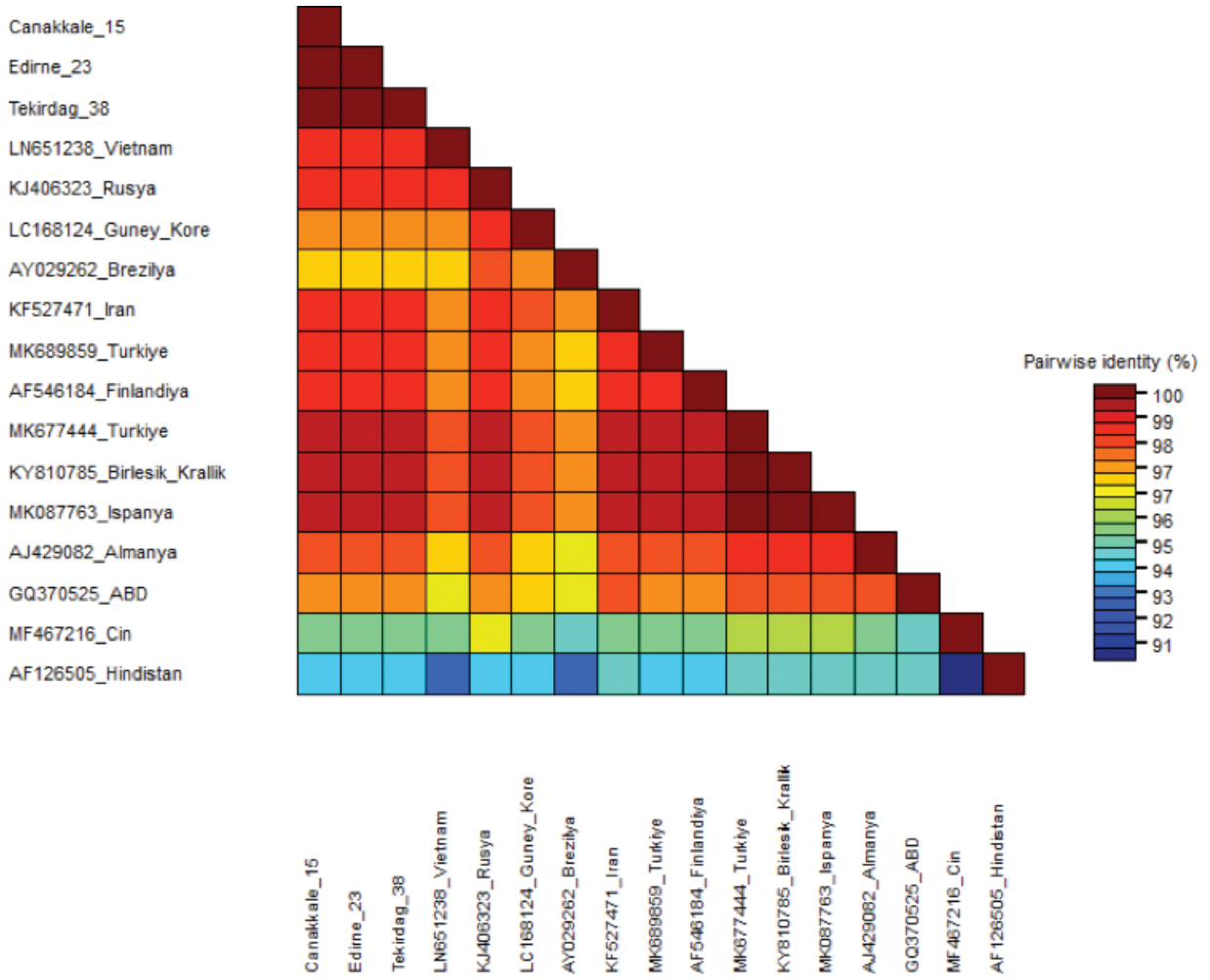
analizleri sonucunda ise izolatların birbirleri ile %90-99 oranında benzerlikler gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 1). Çalışma kapsamında moleküler karakterizasyonları gerçekleştirilen kabak TMV izolatlarının nükleotid düzeyinde en fazla benzerliği (%99) ülkemiz orijinli diğer TMV izolatları (MK689859-MK677444) ile gösterdiği belirlenirken, en düşük benzerliği (%90) ise AF126505 erişim numaralı Hindistan izolatı ile göstermişlerdir (Şekil 1).



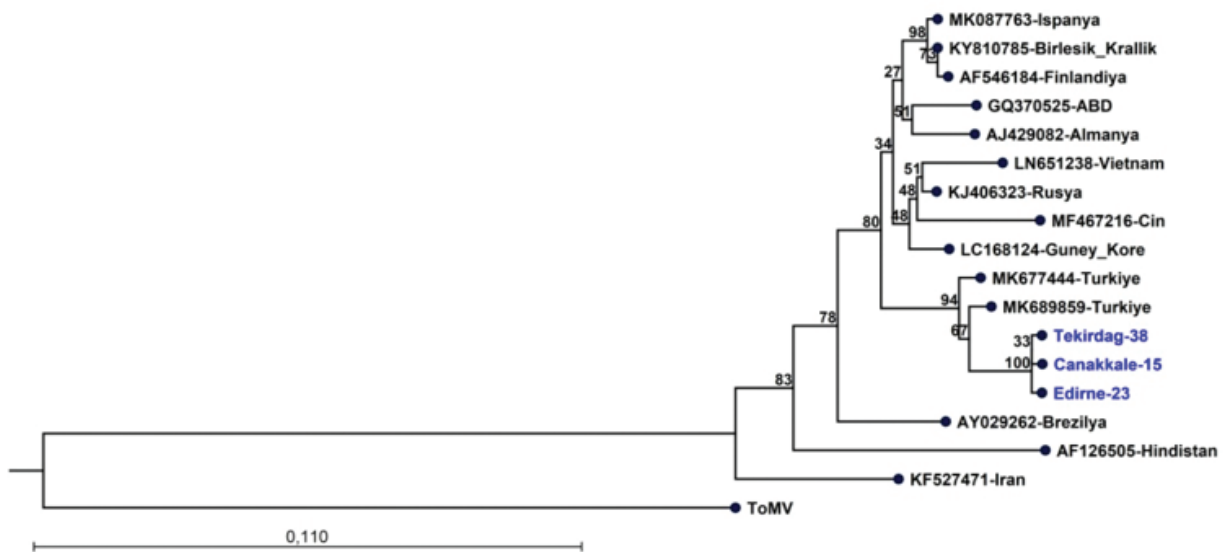
Şekil 1. Bu çalışma kapsamında elde edilen Türk ve gen bankasında bulunan dünyanın farklı bölge ve ülkelerindeki TMV izolatlarının nükleotid düzeyinde birbirleri ile göstermiş oldukları benzerlik oranları

Amino asit düzeyindeki çoklu dizi analizleri sonucunda ise TMV izolatlarının birbirleri ile %94-99 oranında benzerlikler gösterdiği belirlenmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen Türk izolatları amino asit düzeyinde en fazla benzerliği %98 oranında MK677444 erişim numaralı Türk izolatı ile gösterirken, en düşük benzerliği ise %94 benzerlik oranı ile AF126505 erişim numaralı Hindistan izolatı ile gösterdiği görülmüştür (Şekil 2).

Gerçekleştirilen filogenetik analizler sonucunda ise bu çalışma kapsamında elde edilen kabak CMV izolatlarının birbirleri ile oldukça yakın ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca kabak TMV izolatlarının diğer TMV izolatları ile olan filogenetik ilişkileri incelendiğinde diğer 2 Türk izolatı ile yakın ilişkili olduğu belirlenirken, kabak TMV izolatlarının Türk izolatları içinde ayrı bir alt-grup oluşturduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte CP gen bölgesi ve gen bankasından seçilen izolatlara bağlı olarak izolatların filogenetik ilişkilerinde coğrafik orijine göre dağılım olmadığı belirlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 2. Bu çalışma kapsamında elde edilen Türk ve gen bankasında bulunan dünyanın farklı bölge ve ülkelerindeki TMV izolatlarının amino asit düzeyinde birbirleri ile göstermiş oldukları benzerlik oranları



Şekil 3. Bu çalışma kapsamında elde edilen Türk ve gen bankasında bulunan dünyanın farklı bölge ve ülkelerindeki TMV izolatlarının nükleotid düzeyinde birbirleri ile göstermiş oldukları filogenetik ilişkileri

4. Sonuçlar

Gerçekleştirilen bu çalışma ile ülkemizde ilk kez kabak TMV izolatlarının genetik çeşitliliğine yönelik bir araştırma gerçekleştirilmiştir. Genel olarak kabak üretim alanlarında TMV enfeksiyonunun düşük oranda olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte Marmara bölgesi TMV izolatlarının birbirleri ile yüksek oranda sekans benzerliği gösterdiği ve filogenetik açıdan birbirleri ile oldukça yakın ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca TMV izolatlarının filogenetik ilişkilerinde kullanılan gen bölgesi ve gen bankasından çekilen izolatlar göre coğrafik orijin olarak izolatlar arasında kesin bir ilişki saptanmamıştır. Bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda ise TMV'nin tüm genom düzeyinde ve diğer kabakgil türlerindeki enfeksiyon durumu da göz önünde bulundurularak genetik çeşitliliğinin belirlenmesine yönelik gerçekleştirilmesi gerektiğine inanılmaktadır. Ayrıca toplanılan örneklerin hepsinin tipik olarak virüs hastalığı semptomu taşımasından dolayı da bu örneklerde kabakgillerde enfeksiyon meydana getiren diğer virüs hastalıklarının varlıkları olabileceği düşünülmektedir. Bu bağlamda kabakgillerde enfeksiyon meydana getiren diğer virüs hastalıkları da dikkate alınarak sörvey ve virüs tanılama çalışmalarının gerçekleştirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Yazar Katkıları

Ali Karanfil: Çalışmayı planlamış, örnekleri toplamış, analizleri gerçekleştirmiş ve makaleyi yazmıştır.

Çıkar Çatışması

Yazar çıkar çatışması bildirmemiştir.

Kaynaklar

- Creager, A. N., Scholthof, K. B. G., Citovsky, V. ve Scholthof, H. B. (1999). Tobacco mosaic virus: pioneering research for a century. *The Plant Cell*, 11(3), 301-308. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.3.301>
- Harrison, B. D. ve Wilson, T. M. A. (1999). Milestones in research on tobacco mosaic virus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 354(1383), 521-529. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0403>
- Karanfil, A. ve Korkmaz, S. (2021). Güney Marmara Bölgesi Kabakgil Üretim Alanlarında Cucumber Mosaic Virus Enfeksiyonunun Tespiti ve Genetik Çeşitliliği. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 58(2), 31-40. <https://doi.org/10.20289/zfdergi.682293>
- King, A. M., Lefkowitz, E., Adams, M. J. ve Carstens, E. B. (2011). Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam. <https://www.sciencedirect.com/book/9780123846846/virus-taxonomy>
- Korkmaz, F., Topkaya, Ş. ve Yanar, Y. (2018). Tokat Kabakgil üretim alanlarında enfeksiyon oluşturan virüslerin belirlenmesi. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, 7(2), 46-56. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/gbad/issue/35699/368329>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. ve Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Letschert, B., Adam, G., Lesemann, D. E., Willingmann, P. ve Heinze, C. (2002). Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. *Journal of Virological Methods*, 106(1), 1-10. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(02\)00135-0](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(02)00135-0)
- Muhire, B.M., Varsani, A. ve Martin, D. P. (2014). SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *Plos One*, 9(9), 0108277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108277>

- Örs, F., Oksal, H. D. ve Sipahioğlu, H. M. (2021). Occurrence and Molecular Characterization of Some Economically Relevant Cucurbit Viruses in Malatya, Turkey. *Alinteri Journal of Agriculture Science*, 36(1), 14-20. <https://doi.org/10.47059/alinteri/V36I1/AJAS21003>
- Scholthof, K. B. (2004). Tobacco mosaic virus: a model system for plant biology. *Annual Review of Phytopathology*, 42, 13–34. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140322>
- Yeşil, S. (2021). Detection and molecular characterization of viruses infecting edible seeds squash in Turkey. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128, 1341-1355. <https://doi.org/10.1007%2Fs41348-021-00477-4>