

İris Bitkilerinde Potyvirus Enfeksiyonlarının Durumu ve Moleküler Karakterizasyonu: Bilecik İli İris Yetiştirilen Alanlar, Türkiye

Merve KOÇ, Filiz RANDA-ZELYÜT*

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Bilecik, TÜRKİYE

Geliş Tarihi/Received: 14.08.2023

Kabul Tarihi/Accepted: 08.03.2024

ORCID ID (Yazar sırasına göre / by author order)

orcid.org/0009-0007-1544-8894 orcid.org/0000-0002-1366-4389

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: filizrandazelyut@yahoo.com

Öz: İris (*Iris* spp.) bitkilerinde uzun yıllar boyunca yapraklarda şiddetli mozaik, sararma ve nekroz gibi belirtiler gözlemlenmiştir. Bu çalışma kapsamında iris bitkilerinde ilgili semptomlara neden olabilecek Potyvirus türlerinin varlığı araştırılmıştır. Arazi çalışmaları 2022 yılında Güney Marmara Bölgesi'nde bulunan Bilecik ilinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, 34 semptomatik ve 7 asemptomatik olmak üzere toplam 41 iris bitkisi toplanmıştır. Potyvirus enfeksiyonları, Potyvirus cinsine özgün kısmi Nİb (nuclear inclusion protein b) gen bölgesinin amplifikasyonuna yönelik dejener primerler kullanarak konvensiyonel moleküler yöntemler ile belirlenmiştir. Moleküler çalışmalar sonucunda virüslerin neden olduğu belirtiler gösteren 6 bitkide Potyvirus enfeksiyonu tespit edilmiştir. Elde edilen 6 Potyvirus fragmentinin nükleotit dizileme çalışmaları tamamlandıktan sonra enfeksiyonlara iris şiddetli mozaik virüsü (iris severe mosaic virus, ISMV)'nin neden olduğu belirlenmiştir. Bu izolatlar kendi aralarında % 94'ün üzerinde nükleotit benzerliği gösterirken, global izolat ile % 82-99 oranlarında benzerlik göstermiştir. Filogenetik analizler ise bu dejener primerle elde edilen Nİb gen bölgesine göre Potyvirus türlerinin kendi aralarında başarılı bir şekilde ayrıldığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Bilecik, iris, Potyvirus, moleküler karakterizasyon, filogenetik

Status and Molecular Characterization of Potyvirus Infections in Iris Plants: Iris Growing Areas in Bilecik Province, Türkiye

Abstract: Symptoms such as severe mosaic, yellowing and necrosis of leaves have been observed in iris (*Iris* spp.) plants for many years. In this study, the presence of potyvirus species that can cause similar symptoms in iris plants was investigated. Field surveys were carried out in the province of Bilecik in the South Marmara region-Türkiye in the year 2022. In the study, a total of 41 iris plants were collected, including 34 symptomatic and 7 asymptomatic ones. Potyvirus infections were detected by conventional molecular methods using degenerate primers for amplification of the partial Nİb (nuclear inclusion protein b) gene region specific to the genus Potyvirus. As a result of the molecular assays, potyvirus infection was detected in 6 plants showing symptoms caused by viruses. After nucleotide sequencing of the 6 Potyvirus fragments obtained, the infections were determined to be caused by iris severe mosaic virus (ISMV). These isolates showed over 94% nucleotide similarity among themselves and 82-99% similarity with the global isolate. Phylogenetic analyses showed that Potyvirus species were successfully separated among themselves according to the Nİb gene region obtained with these degenerate primers.

Keywords: Bilecik, iris, Potyvirus, molecular characterization, phylogenetic

1. Giriş

Geniş iklim toleransı ile çok yıllık rizomlu bir bitki olan ve süsen olarak da bilinen iris (*Iris* spp.), Iridaceae familyasına ait olup, Türkiye'de peyzaj

alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Soğanlı süs bitkileri arasında değerlendirilen iris, diğer süs bitkilerinde olduğu gibi pek çok fitopatojenden olumsuz yönde etkilenmektedir. Bunlar içerisinde

özellikle virüslerin sebep olduğu enfeksiyonlar, doğrudan bir mücadelesi olmadığından dolayı diğer patojenik enfeksiyonlara göre daha fazla sorun teşkil etmektedir. Bu durum, bitkinin büyüme ve gelişmesini etkilemekle birlikte peyzaj alanlarında bitkinin kullanımı yönünden görsel amacı karşılamamaktadır.

Potyvirüs cinsi (Potyviridae), oldukça geniş bir konukçu dizisini enfekte eden ve önemli düzeylerde verim ve kalite kaybına neden olan en büyük bitki virüsü cinsidir (Ohshima ve ark., 2002). Potyvirüsler, kendine özgü morfolojik ve gonomik özelliklerinin kombinasyonu ile diğer birçok bitki virüsü cinslerinden ayırt edilir (Revers ve Garcia, 2015; Wylie ve ark., 2017). Genel olarak virionları 680-900 nm uzunluğunda 11-20 nm çapında bükülebilir iplikli yapıda olup, genomu poly-A kuyruğu dışında yaklaşık 10 kb büyüklüğünde pozitif polariteli (+) ssRNA özelliğindedir (Gibbs ve ark., 2020). Bu genomik RNA, virion replikasyonu ve hareketi için gerekli olan on olgun ve bir füzyon proteini sentezlemek için proteolitik bir süreç gerektiren iki poliproteine çevrilir. Bunlar; kılıf proteini KP (virüs hareketi, virion oluşumu ve yaprak biti taşınması), N1b (RNA -bağımlı RNA polimeraz), P1 (translasyon, replikasyon modülatörü), 6K2 (replikasyon veziküllerinin oluşumu), P3N-PIPO (hücreden hücreye hareket), P3 (virüs replikasyonu ve hareketi), yardımcı bileşen proteinaz HC-Pro (susturucu baskılama ve yaprak biti iletimi), 6K1 (replikasyon veziküllerinin oluşumu), sitoplazmik ilgi cisimciği proteini (CI, virüs hareketi ve replikasyonunda yer alan helikaz), genoma bağlı bir protein VPg (translasyon, virüs hareketi ve replikasyon) ve N1a-Pro (poliprotein işleme) proteinleridir (Revers ve Garcia, 2015; Cui ve Wang, 2016). Bununla birlikte Potyvirüslerde, genom organizasyonu ve protein fonksiyonları yüksek oranda korunmuştur (Revers ve Garcia, 2015). Potyvirüslerin bu özelliğinden yararlanılarak yüksek oranda korunmuş aminoasit motifleri içeren N1b gen bölgesinin jenerik N1b2F ve N1b3R primer çiftleri ile tanımlanmış ya da tanımlanmamış pek çok üyenin tespiti yapılabilmektedir (Zheng ve ark., 2010). Ayrıca birçok Potyvirüsün 200'ün üzerinde yaprak biti türüyle non-persistent ve non-sirkülatif yolla taşınmasının yanı sıra, üretim materyali ve mekanik inokülasyon yoluyla da taşındığı bildirilmiştir (Wylie ve ark., 2017).

Süs bitkisi olarak yetiştirilen iris bitkilerinde enfeksiyona neden olan Potyvirüsler ile ilgili dünyada bazı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda, bitkide; şalgam mozaik virüsü (Turnip mosaic virus, TuMV), iris şiddetli mozaik virüsü (Iris severe mosaic virus, ISMV), Akyıldız mozaik virüsü (Ornithogalum mosaic virus, OrMV), fasulye sarı mozaik virüsü (Bean yellow

mosaic virus, BYMV) ve iris hafif mozaik virüsü (Iris mild mosaic virus, IMMV) gibi etmenler rapor edilmiştir (Inouye ve Mitsuhata, 1978; Asjes, 1979; Brunt ve Phillips, 1980; Derks, 1985; Hammond ve ark., 1985). Ayrıca bu Potyvirüslerin afitler tarafından non-persistent yolla ve mekanik özsu inokülasyonu ile indikatör bitkilere taşındığı belirlenmiştir (Atreya ve ark., 1991; Van der Vlugt, 1994).

Türkiye'de ise süs bitkileri viral enfeksiyonları açısından gül bitkisindeki virüsler üzerine daha fazla çalışma yürütülmüştür (Yardimci ve Çulal, 2009; Kiliç ve ark., 2017; Karanfil ve ark., 2018; Karanfil, 2021). Iris bitkisinde enfeksiyonlara neden olan virüsler üzerine çalışmalar oldukça sınırlı olup, Türkiye'de ilk defa ISMV enfeksiyonu Karanfil ve Korkmaz (2022) tarafından Çanakkale ilinden bildirilmiştir. Yapılan diğer bazı çalışmalar arasında Türkiye'de iris bitkilerindeki Potyvirüs enfeksiyonunun/enfeksiyonlarının tanılanması ve moleküler karakterizasyonuna yönelik çalışmalar olmasına rağmen, bunlar az sayıdaki illerle sınırlı kalmıştır. Bu çalışmada, bu amaca yönelik olarak, geçiş iklim kuşağında bulunan Bilecik ilinde Potyvirüslerin varlığı park, bahçe, mezarlık ve kampüs alanlarında yetişen iris bitkilerinde belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen Potyvirüs izolatlarının genetik ve moleküler karakterizasyonları ortaya çıkarılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Bitki örneklerinin toplanması

Arazi çalışmaları kapsamında bitki örneklerinin toplanması 2022 yılının Mayıs ve Temmuz aylarında, Güney Marmara Bölgesi 40.1412° K enlem ve 30.4309° D boylamlarında bulunan Bilecik ili park, bahçe, kampüs ve mezarlık alanlarında gerçekleştirilmiştir. İlgili alanlardan virüs ve benzeri semptomlar gösteren iris bitkileri tesadüfi olarak seçilmiş ve her bir bölgeden en az 1 ve en çok 5 örnek alınmıştır. Ayrıca latent enfeksiyon olma ihtimaline karşı asimptomatik bitkiler de toplanmıştır. Böylece 34 semptomatik ve 7 asimptomatik olmak üzere toplam 41 iris bitkisi örneği toplanmıştır. Örnekler laboratuvara getirildikten sonra semptomatolojik kayıtları tutularak, etiketlenmiş ve moleküler çalışmalarda kullanılınca kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

2.2. Potyvirüs enfeksiyonlarının moleküler tespiti

Iris örneklerinde Potyvirüs enfeksiyonlarının moleküler yöntemlerle tespit edilmesi amacıyla öncelikle toplam nükleik asit (TNA) izolasyonları yapılmıştır. Katyonik deterjan setrimonyum bromür ezme tamponu çözeltisi kullanılarak ve Li ve ark.

(2008) tarafından önerilen CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) temelli yöntemle dayalı olarak izolasyon işlemleri minör modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek bitkiden yaklaşık 150 mg alınarak işlemlere devam edilmiştir. Elde edilen çökelekler % 70'lik alkol ile yıkandıktan sonra 25 µL nükleaz ari su (Nuclease Free Water, Invitrogen) ile sulandırılmış ve cDNA sentez çalışmalarına için -80 °C'de saklanmıştır.

Amplifikasyon çalışmaları öncesinde cDNA kütüphanelerinin oluşturulması amacıyla sentez çalışmaları iki basamaklı olarak gerçekleştirilmiştir. İlk basamakta TNA'dan 2 µL, 0.2 µg µL⁻¹ random hexamer primer (5'-NNNNNN-3') (Thermo Sci, ABD) ve yaklaşık 10 µL nükleaz ari su karıştırılarak 95 °C'de 3 dakika boyunca bir ısıl döngüleyici (Blue-Ray, Tayvan) denatürasyona tabi tutulmuştur. Tüpler daha sonra buz üzerine alınarak 5 dakika bekletildikten sonra 1X reaksiyon çözeltisi, 200 ünite reverse-transkriptaz enzim ve 40 ünite RNase inhibitör (Thermo Sci, ABD) ve 1.5 µL dNTP (10 µM) karışım buz üzerinde bulunan tüplere karıştırılmış ve toplam hacim 20 µL tamamlanmıştır. İkinci basamak işleminde ısıl döngüleyici de tüpler 25 °C'de 15 dakika (primer bağlanması), 42 °C'de 60 dakika (inkübasyon) ve 70 °C'de 5 dakika kalarak sentez tamamlanmıştır.

Potyvirüslerin moleküler olarak tespit edilmesi amacıyla sentez sonrası elde edilen kalıplardan cDNA'lardan 2 µL alınarak 2X Emerald PCR Master Mix (Takara, Japonya) reaksiyon karışımı ve her birinden 1 µL (10 µM) olmak üzere Nib2F (5'-GTITGYGTIGAYGAYTTTAAAYAA-3') ve Nib3R (5'-TCIACIACIGTIGAIGGYTGNC-3')

dejenere primer çiftleri Zheng ve ark. (2010) tarafından önerilen reaksiyon koşullarında amplifikasyona alınmıştır. Amplikonların belirlenmesi amacıyla etidyum bromür (EtBr) ile muamele edilmiş % 1'lik agaroz jelde yürütülen PCR ürünleri ultraviyole (UV) görüntüleme cihazında (Syngene, UK) kontrol edilmiştir.

2.3. Potyviruslerin moleküler karakterizasyonu

Amplifikasyon çalışmaları sonucu elde edilen tüm Potyvirus fragmentlerinin tür düzeyinde belirlenmesi amacıyla çift yönlü olarak Sanger metodu (BMLabsis, Ankara) ile dizilenmiştir. Sekanslama sonucunda elde edilen ham veriler BioEdit Version 7.2.5. yazılımında düzenlenip eşleştirildikten sonra NCBI BlastN analizleri ile Potyvirus fragmentlerinin tür tespiti yapılmıştır. Bu dizilerin konsensusu sağlandıktan sonra NCBI Gen Bankası'na yüklenmiş ve erişim numaraları alınmıştır (Tablo 1). Bununla birlikte hedef gen bölgesine karşılık gelen ilgili tür izolatları ve farklı Potyvirus türleri Gen Bankası'ndan alınarak moleküler evrimsel analizler ve nükleotid dizi homolojilerinin belirlenmesinde kullanılmışlardır (Tablo 2).

Tablo 1. Çalışma kapsamında elde edilen Potyvirus izolatları

Table 1. Potyvirus isolates obtained within the scope of the study

İzolat	Virüs	Lokasyon	NCBI erişim numarası
Bilecik-1	ISMV	Bilecik	OR327031
Bilecik-2	ISMV	Bilecik	OR327032
Bilecik-3	ISMV	Bilecik	OR327033
Bilecik-4	ISMV	Bilecik	OR327034
Bilecik-5	ISMV	Bilecik	OR327035
Bilecik-6	ISMV	Bilecik	OR327036

Tablo 2. Filogenetik analizlerde kullanılan Potyvirus türü izolatlar

Table 2. Potyvirus species isolates used in phylogenetic analyzes

İzolat	Virüs	Lokasyon	NCBI erişim numarası
TUR-CAN-10	Iris severe mosaic virus	Çanakkale	MZ736613
TUR-CAN-5	Iris severe mosaic virus	Çanakkale	MZ736611
TUR-CAN-3	Iris severe mosaic virus	Çanakkale	MZ736610
TUR-CAN-9	Iris severe mosaic virus	Çanakkale	MZ736612
20186	Iris severe mosaic virus	ABD	OQ630965
Taian	Iris severe mosaic virus	Çin	MF385582
BJ	Iris severe mosaic virus	Çin	KT692938
J	Iris severe mosaic virus	Japonya	LC433737
Ir	Iris severe mosaic virus	İran	MN520154
32ps	Maize dwarf mosaic virus	İspanya	MZ326122
TUR-CAN-111	Leek yellow stripe virus	Türkiye	MT038063
GX-YT861	Sorghum mosaic virus	Çin	KM025044
AZGL1	Pennisetum mosaic virus	Çin	JX070142
L1	pea seed-borne mosaic virus	Danimarka	AJ252242
Ivory	Coast Yam mosaic virus	ABD	YMU42596
A-30	Jasmine virus T	Tayvan	KX398054
OKD610J	Turnip mosaic virus	Japonya	LC639673
Khl-ct180	Watermelon mosaic virus	İran	JX124711
PV-0902	Euphorbia ringspot virus	Almanya	NC_031339
Canna	Canna yellow streak virus	İngiltere	NC_013261
VRS-495	Asparagus virus 1	Kanada	OK558621

Nükleotit ve aminoasit benzerliklerinin diyagramı Sequence Demarcation Tool V.1.2 (Muhire ve ark., 2014) yazılımında ve filogenetik analizler ise MEGA X (Kumar ve ark., 2018) yazılımında uygulanmıştır. Ayrıca filogenetik analizler uygulanırken çalışılan varyantların nükleotit dizileri ClustalW (Thompson ve ark., 1994) metodu ile hizalanırken, ağacın oluşturulmasında komşu birleştirme yöntemi olan Neighbour-Joining (NJ) metodu ile Tamura-3 (Tamura, 1992) parametre modeli kullanılmıştır. Dalların güvenilirlik değerlerinin yükseltilmesi amacıyla 1000 tekrarlı bootstrap testi uygulanmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Enfekteli iris bitkilerinin simptomatolojisi

Potyvirüsler bitki virüsleri içerisinde oldukça fazla tür içeren bir cins olup, çok yıllık ve tek yıllık geniş bir konukçu dizini enfekte ederek zaman zaman büyük verim ve kalite kayıplarına sebep olabilmektedir. Bu çalışma kapsamında, arazi çalışmaları boyunca örneklerde; yoğun şekilde sararma, paralel damarlar arası şiddetli mozaikler, klorotik lekeler ve yaprak kenarları ve uçlarında kurumalar gözlenmiştir (Şekil 1). Daha önce yapılan çalışmalarda etmenin göze çarpan şekilde çizgi ve/veya mozaik semptomlara ve şiddetli klorozlara sebep olduğu, hassas çeşitlerin çiçeklerinde ise renk kırılmaları meydana getirdiği

rapor edilmiştir (Grunwald ve ark., 2023). Bununla birlikte çalışmada örnekleme yapılan dönemlerde bitkilerde çiçek bulunmadığından çiçek semptomları gözlenmemiştir.

Örnekleme yapılan bitkilerden moleküler tanılama yöntemleri ile 6 Potyvirus izolatu elde edilmiştir. Bu bağlamda, toplanılan örneklerin 34 tanesinin virüs ve virüs benzeri semptomları göstermesine rağmen, sadece 6 bitkide Potyvirus tespit edilmiş ve 7 asimptomatik bitkide herhangi bir sonuç elde edilmemiştir. Böylece bu sonuçlar Bilecik ilinden yapılan örnekleme de Potyvirus enfeksiyonunun % 14.63 oranında olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde Çanakkale ilinde Karanfil ve Korkmaz (2022) tarafından yapılan bir çalışmada ISMV semptomu gösteren 17 bitkiden 14 tanesinde şüphelenilen etmen tespit edilmiştir. Hem bu çalışmadan hem de Türkiye’de yapılan diğer çalışmadan elde edilen bu sonuçlar iris bitkilerinde farklı cinslerde bulunan viral etmenlerin varlığını işaret etmektedir. Nitekim yapılan bir çalışmada doğal olarak enfekte olmuş iris bitkilerinde tütün halkalı leke nepovirüsü (tobacco ring spot nepovirus, TRSV), tütün mozaik virüsü (tobacco mosaic virus, TMV) ve tütün rattle virüsü (tobacco rattle virus, TRV) gibi etmenler tespit edilmiştir (Asjes, 1979). Böylece bu bulgular, gelecek dönemde yapılacak çalışmalarda farklı virüslerin iris bitkilerinde tek başına ya da farklı virüs kombinasyonlarıyla neden olduğu enfeksiyonların araştırılmasında faydalı olacaktır.



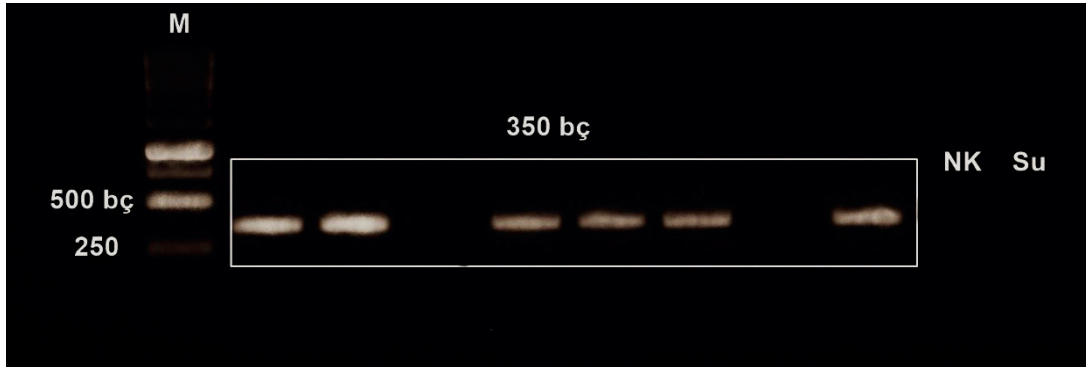
Şekil 1. İris bitkisi yapraklarında Potyviruslerin neden olduğu şiddetli mozaikler (a), sararmalar ve nekrozlar (b)

Figure 1. Severe mosaics (a), yellowing and necrosis (b) caused by potyviruses on iris plant leaves

3.2. Potyvirus enfeksiyonlarının moleküler karakterizasyonu

Son yıllarda Potyviruslerin moleküler yöntemlerle tespit edilmesinde korunmuş bir bölgeyi içeren Potyvirus Nib geninin amplifikasyonu sıklıkla kullanılmaktadır (Zheng ve ark., 2010). Mevcut çalışmada Zheng ve ark. (2010) tarafından tasarlanan universal (evrensel) Nib primerleri kullanılarak amplifikasyon çalışmaları sonucunda Potyvirus dejenere Nib gen bölgesinin bir kısmını çoğaltan primer dizileri ile beklenen 350 bç büyüklüğünde fragmentler elde edilmiştir (Şekil 2). Zheng ve ark. (2010) tarafından tasarlanan bu dejenere primerler ile bu zamana kadar pek çok Potyvirus türü tanımlanmıştır. Ayrıca Potyviruslerin tür çeşitliliğine odaklanan çalışmalarda ilgili primer dizileri ve Nib gen bölgesi dizi bilgileri başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Rodríguez-Nevado ve ark., 2017). Yakın zamanda İran'da nergis bitkisinde Potyvirus enfeksiyonlarının tanımlanmasında bahsi geçen primer dizileri kullanılarak nergis sarı çizgi virüsü (narcissus yellow stripe virus, NYSV) ve

nergis geç sezon sararma virüsü (narcissus late season yellows virus, NLSYV) etmenleri başarı ile tespit edilmiştir (Valouzi ve ark., 2022). Nitekim Türkiye'de de Randa-Zelyüt ve ark. (2022) tarafından tütün ekim alanlarında Potyvirus enfeksiyonlarının araştırılmasına yönelik yapılan bir çalışmada enfekteli tütün bitkilerinde patates Y virüsü (Potato virus Y, PVY) ve pırasa sarı çizgi virüsü (Leek yellow streak virus, LYSV) ile ilişkili enfeksiyonlar bu Nib primerleri ile belirlenmiştir. Böylece Zheng ve ark. (2010) tarafından test edilen Potyvirusler içerisinde ISMV etmeni bulunmamasına rağmen, bu çalışma kapsamında ve Karanfil ve Korkmaz (2022) tarafından yapılan araştırmada da Nib2F ve Nib3R universal primerleri ile etmenin kısmi Nib gen bölgesi çoğaltılarak, bir Potyvirusün teşhisinde başarılı olarak teşhis yapabileceği gösterilmiştir. Sonuç olarak mevcut çalışmada da benzer şekilde korunmuş bölge primer setleri kullanılarak başarılı bir şekilde Nib gen bölgesi amplifiye olmuş ve nükleotit dizilemesi sonucunda enfeksiyona neden olan Potyvirus tanımlanabilmiştir.



Şekil 2. Nib gen bölgesini bir kısmını amplifiye eden dejenere Potyvirus Nib2F ve Nib3R primerleri ile iris bitkilerinden elde edilen 350 bç büyüklüğünde fragmentler (Ladder: Solis Biodyne, 250 bç)

Figure 2. 350 bp fragments obtained from iris plants with degenerate potyvirus Nib2F and Nib3R primers that amplify part of the Nib gene region (Ladder: Solis Biodyne, 250 bç)

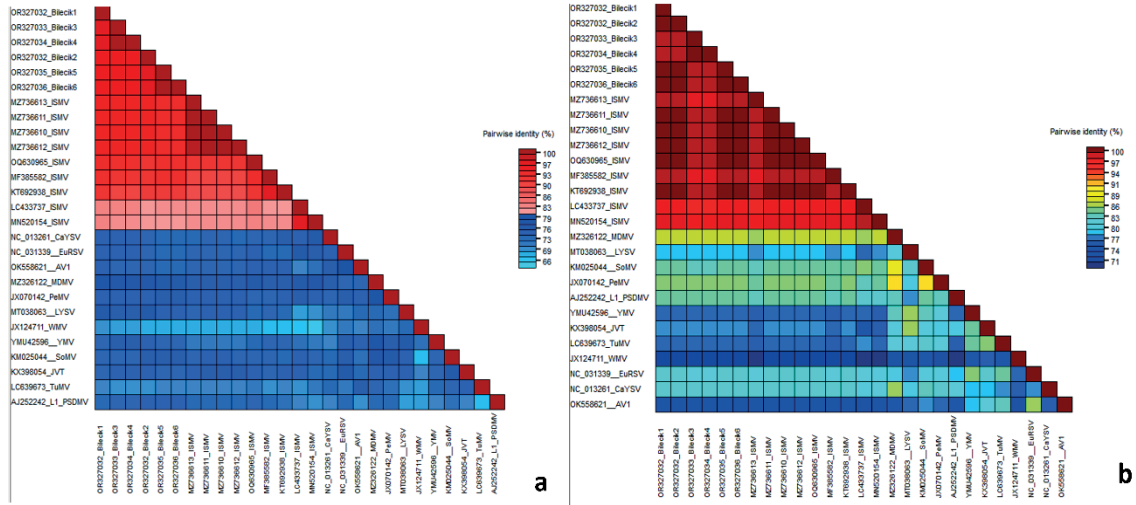
Bu çalışma kapsamında elde edilen 6 yeni ISMV izolatının parçalı Nib gen bölgesi için uygulanan benzerlik analizleri sonucunda izolatların kendi içlerinde % 94'ün üzerinde nükleotit dizi benzerliği gösterdiği, Gen Bankası'nda bulunan global izolatlar ile % 82-99 oranlarında dizi benzerliği gösterdiği belirlenmiştir. Amino asit düzeyinde ise kendi aralarında % 99-100 oranında benzerlik gösterirken, global izolatlar ile % 96-100 oranında benzerlik göstermişlerdir. Bununla birlikte diğer Potyvirus türleri ile ISMV izolatları ile % 77-86 oranlarında benzerlik göstermişlerdir (Şekil 3).

3.3. ISMV'nin diğer Potyvirusler ile moleküler evrimsel ilişkisi

Bu çalışma kapsamında elde edilen iris izolatlarının parçalı Nib gen bölgelerinin diğer Potyvirusler ile moleküler evrimsel ilişkilerin ortaya çıkarılması ve tür tanımlamasının doğruluğunun artırılması amacıyla filogenetik analizler yapılmıştır. Filogenetik ağacın oluşturulmasında oluşan dalların güvenilirlik oranlarını artırmak için aynı cinsin 12 türünün parçalı Nib bölgeleri kullanılmıştır. Benzer şekilde Zheng ve ark. (2010) tarafından yapılan çalışmada Nib gen bölgesinin Potyvirus türlerinin birbirleri arasında ayırımında farklı türler kullanılarak

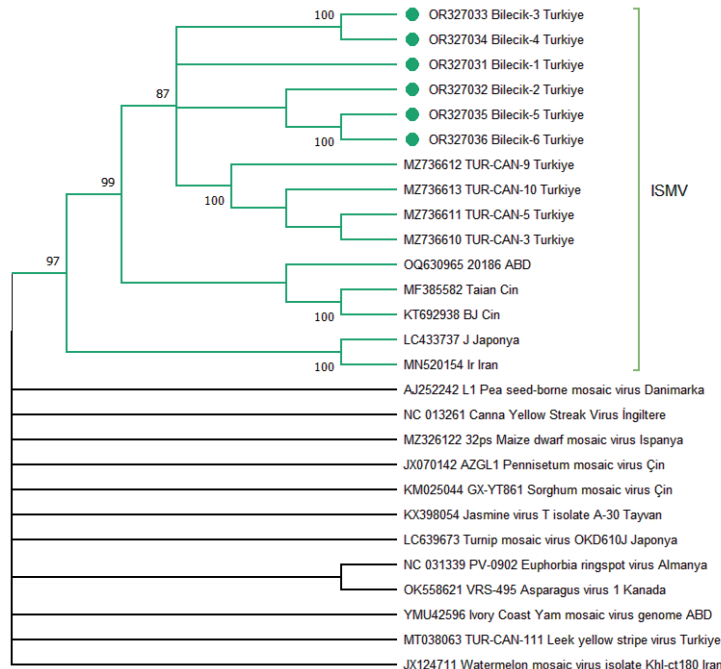
doğrulama yapılmıştır. Bu analizler sonucunda universal primerler ile elde edilen Nİb gen bölgelerine göre Potyvirus enfeksiyonunun ISMV etmeninden kaynaklandığı tekrarlı olarak doğrulanmıştır. Ayrıca bu çalışmadan elde edilen izolatlar ve global izolatlar bir ana dalda ISMV izolatları olarak kümelanmişler ve bu

dalların düğümleri 90 üzerinde güvenilirlik değerleri ile desteklenmiştir (Şekil 4). Diğer Potyvirus türleri ise ISMV ana dalının dışında dağılım göstermişlerdir. Filogenetik analizlerin sonuçlarına göre parçalı Potyvirus Nİb gen bölgesinin moleküler evrimsel ilişkilerde Potyvirus türlerini başarılı bir şekilde ayırdığı doğrulanmıştır.



Şekil 3. ISMV ve bazı Potyvirus tür izolatlarının kendi aralarında ve diğer türlerle gösterdiği dizi benzerlik diyagramları (a: nükleotit, b: amino asit)

Figure 3. Sequence similarity diagrams of ISMV and some Potyvirus species isolates among themselves and with other species (a: nucleotide, b: amino acid)



Şekil 4. Potyviruslerin Nİb gen bölgesine göre oluşturulan filogenetik ağaç*

*: Yeşil daireler bu çalışmadan elde edilen ISMV izolatlarını işaret etmektedir. Yeşil dal ISMV izolatlarını ve siyah dallar ise diğer Potyvirus türlerini göstermektedir. Güvenilirlik değerleri 80 altında olan rakamlar gösterilememiştir.

Figure 4. Phylogenetic tree constructed according to the Nİb gene region of Potyviruses*

*: Green circles indicate ISMV isolates from this study. The green branch indicates ISMV isolates, and the black branches indicate other potyvirus species. Figures with confidence values below 80 could not be shown.

4. Sonuçlar

Bu çalışma kapsamında 34 semptomatik bitki toplanmasına rağmen bunların yalnızca 6 tanesinde Potyvirus enfeksiyonu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, iris bitkilerinde farklı cinslerde bitki virüslerinin araştırılması gerektiğini önermektedir. Bununla birlikte universal Potyvirus primerleri ISMV etmeninin Nib bölgesinin bir kısmını başarılı bir şekilde amplifiye olmasına olanak sağlamıştır. Buna göre Potyvirus enfeksiyonu araştırmalarında ön değerlendirme sonuçlarını elde etmek için ilgili primer çiftleri tespit açısından yüksek oranda başarı sağlayacağı önerilmektedir.

Etik Beyanı

Yazarlar, bu araştırma için etik onay gerektirmediğini beyan etmektedir.

Finansman

Bu araştırma; Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) tarafından yürütülen, 2209-A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destekleme Programı 2022 yılı 1. dönem kapsamında 1919B012204121 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Yazarların Katkı Beyanı

Materyal, Araştırma, Yürütücü, Proje Yönetimi, Finansman Temini, M. KOÇ; Fikir/Hipotez, Yöntem, Veri İşleme, Veri Analizi, Danışman, Yazma-İnceleme ve Düzenleme, F. RANDA-ZELYÜT. Yazarlar, makalenin yayına hazır son halini gördüklerini/okuduklarını ve onayladıklarını beyan ederler.

Çıkar Çatışması Beyanı

Tüm yazarlar, bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

Teşekkür

Çalışmaya sağladığı katkılardan dolayı Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nden Doç. Dr. Ali KARANFİL'e teşekkür ederiz.

Kaynaklar

Asjes, C.J., 1979. Viruses and virus diseases in Dutch bulbous irises (*Iris hollandica*) in the Netherlands. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 85(6): 269-279.

Atreya, P.L., Atreya, C.D., Pirone T.P., 1991. Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect

transmissibility of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(17): 7887-7891.

- Brunt, A.A., Phillips, S., 1980. The detection, separation from naturally occurring complexes, and partial characterisation of four aphid-borne viruses infecting bulbous iris. *Acta Horticulturae*, 109: 503-508.
- Cui, H., Wang, A., 2016. Plum pox virus 6K1 protein is required for viral replication and targets the viral replication complex at the early stage of infection. *Journal of Virology*, 90(10): 5119-5131.
- Derks, A.F.L.M., 1985. Recent advances in bulb virus research. *Acta Horticulturae*, 164: 281-289.
- Gibbs, A.J., Hajizadeh, M., Ohshima, K., Jones, R.A.C., 2020. The potyviruses: An evolutionary synthesis is Emerging. *Viruses*, 12(2): 132.
- Grunwald, D., Stroschein, S.M., Grinstead, S., Mollov, D., Rioux, R.A., Rakotondrafara, A.M., 2023. Targeting the highly conserved 3' untranslated region of Iris severe mosaic virus for sensitive monitoring of the disease prevalence in iris production. *Plant Disease*, 107(12): 3763-3772.
- Hammond, J., Derks, A.F.L.M., Barnett, O.W., Lawson, R.H., Brunt, A.A., Inouye, N., Allen, T.C., 1985. Viruses infecting bulbous iris: A clarification of nomenclature. *Acta Horticulturae*, 164: 395-397.
- Inouye, N., Mitsuhashi, K., 1978. Turnip mosaic virus isolated from Iris. *Nogaku Kenkyu*, 57(1): 1-16. (In Japanese).
- Karanfil, A., 2021. Prevalence and molecular characterization of Turkish isolates of the rose viruses. *Crop Protection*, 143: 105565.
- Karanfil, A., Korkmaz, S., 2022. First report of Iris severe mosaic virus in bulbous irises in Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 104: 859-860.
- Karanfil, A., Randa-Zelyüt, F., Ertunç, F., Korkmaz, S., 2018. First report of rose yellow vein virus in Turkey. *New Disease Reports*, 38: 11-11.
- Kiliç, H.Ç., Yardımcı, N., Gübür, Ş., 2017. Serological, biological and molecular detection of Prunus necrotic ringspot virus on *Rosa damascena* Mill. in Turkey. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 16(1): 145-150.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nknyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1547-1549.
- 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. *Journal of Virological Methods*, 154(1-2): 48-55.
- Muhire, B.M., Varsani, A., Martin, D.P., 2014. SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS One*, 9: 0108277.
- Ohshima, K., Yamaguchi, Y., Hirota, R., Hamamoto, T., Tomimura, K., Tan, Z., Sano, T., Azuhata, F., Walsh, J.A., Fletcher, J., Chen, J., Gera, A., Gibbs, A., 2002. Molecular evolution of turnip mosaic virus: Evidence of host adaptation, genetic recombination and

- geographical spread. *Journal of General Virology*, 83(6): 1511-1521.
- Randa-Zelyüt, F., Karanfil, A., Korkmaz, S., 2022. Balıkesir ve Uşak illeri tütün ekim alanlarında potyvirus izolatlarının belirlenmesi ve karakterizasyonu. *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 37(1): 96-103.
- Revers, F., Garcia, J.A., 2015. Molecular biology of potyviruses. In: K. Maramorosch and T.C. Mettenleiter (Eds.), *Advances in Virus Research*, Elsevier, 92: 101-199.
- Rodríguez-Navado, C., Montes, N., Pagán, I., 2017. Ecological factors affecting infection risk and population genetic diversity of a novel Potyvirus in its native wild ecosystem. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1958.
- Tamura, T., 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*, 9(4): 678-687.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22): 4673-4680.
- Valouzi, H., Shahmohammadi, N., Golnaraghi, A., Moosavi, M.R., Ohshima, K., 2022. Genetic diversity and evolutionary analyses of potyviruses infecting narcissus in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 104(1): 237-250.
- Van der Vlugt, C.I.M., 1994. Distribution and multiplication of Iris severe mosaic potyvirus in bulbous Iris in relation to metabolic activity: Implications for ISMV detection. Ph.D. Thesis, Bulb Research Centre Lisse, Dutch Flower bulb Industry, Netherland.
- Wylie, S.J., Adams, M., Chalam, C., Kreuze, J., López-Moya, J.J., Ohshima, K., Praveen, S., Rabenstein, F., Stenger, D., Wang, A., Zerbini, F.M., 2017. ICTV virus taxonomy profile: Potyviridae. *Journal of General Virology*, 98: 352-354.
- Yardimci, N., Çulal, H., 2009. Occurrence and incidence of *Prunus necrotic ringspot virus*, *Arabis mosaic virus*, and *Apple mosaic virus* on oil rose (*Rosa damascena*) in the Lakes region of Turkey. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 37(2): 95-98.
- Zheng, L., Rodoni, B.C., Gibbs, M.J., Gibbs, A.J., 2010. A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. *Plant Pathology*, 59(2): 211-220.

ALINTI: Koç, M., Randa-Zelyüt, F., 2024. İris Bitkilerinde Potyvirus Enfeksiyonlarının Durumu ve Moleküler Karakterizasyonu: Bilecik İli İris Yetiştirilen Alanlar, Türkiye. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 11(1): 10-17.

CITATION: Koç, M., Randa-Zelyüt, F., 2024. Status and Molecular Characterization of Potyvirus Infections in Iris Plants: Iris Growing Areas in Bilecik Province, Türkiye. *Turkish Journal of Agricultural Research*, 11(1): 10-17. (In Turkish).