

Çanakkale ili kanola (*Brassica napus* L.) üretim alanlarında Şalgam mozaik virüsü (*Turnip mosaic virus*; TuMV) enfeksiyonunun tanınması ve karakterizasyonu

Ali KARANFİL¹

Savaş KORKMAZ¹

ABSTRACT

Identification and characterization of *Turnip mosaic virus* (TuMV) infection on canola plants (*Brassica napus* L.) in Çanakkale province

This study was carried out in canola plants in Çanakkale province in 2014. For this aim, canola plants showing severe mosaic symptoms were collected from 2 districts (Ezine and Lapseki) of Çanakkale province in Turkey. Collected twenty-one samples were tested by DAS-ELISA with polyclonal antisera (Bioreba, Switzerland) and RT-PCR using gene specific primers containing partial NIB+CP to determine the presence of *Turnip mosaic virus* (TuMV). DAS-ELISA and RT-PCR test results indicated that 15 sample were infected with TuMV. Corresponding 1178 bp DNA fragment of isolate CK01 chosen randomly was purified and sequenced. The nucleotide sequence of the partial NIB+CP gene of CK01 isolate was compared with TuMV isolates from different parts of the world found in gen bank. Sequence analysis of partial NIB+CP genes showed 88-93% identities among CK01 and world TuMV isolates at nucleotide level. Phylogenetic relationship was determined among CK01 and TuMV isolates from different parts of the world. To our knowledge; although TuMV infections were identified in different plants, this is the first report of TuMV infection on canola plants in Turkey.

Keywords: *Turnip mosaic virus*, canola, DAS-ELISA, RT-PCR, phylogenetic analysis

ÖZ

Bu çalışma 2014 üretim yılı içinde Çanakkale ili kanola üretim alanlarında yürütülmüştür. Bu amaçla kanola tarlalarına arazi çıkışları yapılarak bu bitkiler Şalgam mozaik virüsü (*Turnip mosaic virus*; TuMV) açısından görsel olarak incelenmiş ve tipik olarak mozaik ve kloroz simptomları gösteren 21 bitkiden örnekler alınmıştır. Toplanan örnekler TuMV'nin varlığını belirlemek amacıyla DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleriyle test edilmiş ve testlemeler sonucunda 21 örnekten 15'i enfekteli bulunmuştur. Hastalıklı olduğu belirlenen izolatlar içerisinde tek bir örnek (CK01) seçilerek bu örneğe ait moleküler karakterizasyon

¹ Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü
Sorumlu Yazar (Corresponding author) e-mail: skorkmaz@comu.edu.tr
Alınış (Received): 24.12.2015, Kabul ediliş (Accepted): 30.03.2016

çalışması yapılmıştır. Bu amaçla seçilen örneğe ait Nib+CP geninin bir kısmını içeren 1178 bp'lik RT-PCR ürünleri saflaştırılarak direkt olarak çift yönlü nükleik asit dizilimleri belirlenmiştir. Sekans analizi yapılan TuMV izolatına özgü Nib+CP genlerinin nükleotid dizilimleri gen bankasında bulunan ve dünyanın farklı üretim bölgelerinden TuMV izolatları ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalar sonucunda ülkemiz kanola TuMV izolatının nükleotid düzeyinde %88-93 oranında bir benzerliğe sahip olduğu bulunmuştur. Yapılan filogenetik analiz sonucunda ise bu izolatın dünyanın farklı bölgelerindeki izolatlarla farklı düzeylerde genetik ilişki gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışma ile ilk defa ülkemizde kanola bitkisinde TuMV'nin varlığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Şalgam mozaik virüsü, kanola, DAS-ELISA, RT-PCR, filogenetik analiz

GİRİŞ

Kanola dünyadaki en önemli yağlı tohum bitkilerinden birisidir. Tohumları %23-35 arasında protein ve %40-45 yağ içermektedir (Ebrahim-Ghomi 2014). Son yıllarda ülkemizde yaşanan yağlı tohumlardaki ürün açığına paralel olarak kanola tarımı giderek yaygınlaşmaktadır (Kumbar ve Unakıtan 2011). Diğer yağlı tohumlu bitkilere göre birim alandan elde edilen verim ülkemizde kolza adı ile de bilenen kanolada oldukça yüksektir. Kanolanın ülkemizde tanınırlığının artması ve dünyadaki gelişmelere paralel olarak biyodizel üretiminde de kullanılması bu ürünün önemini arttırmaktadır. Ülkemize 2. dünya savaşından sonra giren kanola ile ilgili bitki koruma problemlerinin tespitine yönelik yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmalar fungal etmenlerin tespiti ve yabancı otlar ile ilgilidir (Kadioğlu ve ark. 1995, Topçu 2014). Ülkemizde şu ana kadar kanola üretim alanlarında virüs hastalıklarının tespitine yönelik yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Dünyada yapılan birçok çalışmada diğer kültür bitkilerinde olduğu gibi kanolada da bazı virüs hastalıklarının önemli ekonomik kayıplara neden olduğu belirtilmiştir (Goheen 1988, Nooh 2012). Kanola bitkisinde en yaygın olarak görülen virüs hastalıklarından birisi de Şalgam mozaik virüsü (*Turnip mosaic virus*; TuMV)'dür (Coutts and Jones 2000, Lathan et al. 2003, Tabarestani et al. 2011, Zhao et al. 2013). Ülkemizde Brassicaceae familyasına bağlı bitkiler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda TuMV'nin yaygın olarak bulunmasından dolayı (Korkmaz et al. 2008) aynı familyaya ait olan kanola bitkilerinde de TuMV enfeksiyonu olabileceği düşünülerek, Çanakale ili kanola üretim alanlarında bu çalışma yürütülmüştür.

TuMV'nin bitkilerde oluşturduğu belirtiler konukçu bitkiye göre değişmekle birlikte *Raphanus* cinsine bağlı bitkilerde ilk belirtiler zamanından önce yapraklarda sararma, yaşlı yaprakların tamamen veya kısmen ölmesi, genç yapraklarda küçülme ve tipik mozaik semptomlarıdır. İlk belirtiler genellikle enfeksiyondan 3 hafta sonra ortaya çıkar. *Brassica* cinsine bağlı bitkilerde ise en tipik belirtiler genç yapraklarda klorotik halkalı lekelerin oluşmasıdır. Yaprak yaşına bağlı olarak bu halkalı lekeler küçük-yuvarlak sarımsı-kahverengimsi bir yapıya dönüşmektedir. Belirtiler daha çok yaprak damarlarına yakın alanlarda

oluşmakta ve lekeler çoğaldıkça ve büyüdükçe yaprak yanmış ya da kurumuş gibi bir görünüm almaktadır (Provvidenti 1982).

TuMV *Potyvirus* cinsine dahil olup bitki virüsleri içinde en büyük grubu oluştururlar. Sebze virüsleri içinde ekonomik olarak önemli olan virüsler arasında TuMV, Hıyar mozaik virüs (*Cucumber mosaic virus*; CMV)' ünden sonra ikinci sırayı almaktadır (Provvidenti 1996, Ohshima et al. 2002).

TuMV 40' in üzerinde yaprak biti türü ile non-persistent olarak taşınmakta ve başta Afrika, Asya, Avustralya, Avrupa, Hindistan, Kuzey ve Güney Amerika olmak üzere tropik ve ılıman iklim bölgelerinde yaygın olarak bulunmaktadır (Provvidenti 1996, Walsh and Jenner 2002). Ülkemizde ise yapılan bir çalışmada başta Marmara Bölgesi olmak üzere Brassicaceae tarımının yapıldığı birçok alanda beyaz lahanaya, Brüksel lahanası, turp, roka ve yabani turpta hastalık etmeni bulunmuştur (Korkmaz et al. 2008). Ayrıca TuMV'nin orijininin ülkemizi de içine alan bir coğrafya da olduğu düşünülmektedir (K. Ohshima, Kişisel görüşme).

Dünyada da kanola ile ilgili yapılan çalışmalarda TuMV'nin varlığı belirlenmiştir. Coutts and Jones (2000), tarafından Avustralya'da 1998-1999 yıllarında yapılan bir sörvey çalışmasında alınan örnekler Şekerpancarı batı sarılık virüsü (*Beet western yellow virus*; BWYV), Karnabahar mozaik virüsü (*Cauliflower mosaic virus*; CaMV) ve TuMV'nin varlığını belirlemek açısından testlenmiştir. İlk yıl aldıkları 139 örneğin %5'inde, ikinci yıl ise toplanan 56 örneğin sadece 1'inde TuMV varlığını tespit etmişlerdir. Jiang et al. (2010) Çin'de gerçekleştirdikleri farklı *Brassica* cinsinden elde edilen 11 TuMV izolatının moleküler karakterizasyonu sonucu yapılan nükleotid dizi analizlerinde izolatların kendi içlerinde %97-100, gen bankasında bulunan diğer Çin TuMV izolatları ile %89-99 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiklerini belirtmişlerdir. Zhao et al. (2013) Çin kanola üretim alanlarında gerçekleştirmiş oldukları çalışmalarında 86 örnek toplamışlardır. Yapılan RT-PCR testi sonuçlarına göre örneklerin %43'ünün TuMV ile enfekteli olduğunu bildirmişlerdir. Enfekteli örneklerden izole ettikleri 32 TuMV izolatının moleküler karakterizasyonu sonucunda elde edilen filogenetik ağaçta Çin TuMV izolatlarının birbirleri ile yakın ilişki gösteren farklı dallara dağıldığını belirtmişlerdir. Singh et al. (2015) Hindistan'da lahanagillerden elde etmiş oldukları TuMV izolatlarının karakterizasyonu sonucu TuMV izolatlarının birbirleri ile yakın ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Gerçekleştirilen bu çalışma ile Çanakkale ilinin kanola üretimi yapılan iki ilçesinden virüs hastalığı semptomu gösteren kanola bitkilerinden örnekler alınarak TuMV'nin varlığı DAS-ELISA ve RT-PCR testi ile araştırılmıştır. Enfekteli bulunan bitkilerden elde edilen TuMV izolatlarından bir tanesinin Nib+CP (nuclear inclusion b + coat protein) geninin 1178 bp içeren bölgesinin moleküler karakterizasyonu yapılarak dünya izolatları ile benzerlik ve filogenetik ilişkileri ortaya konmuştur.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışma 3 farklı aşamada yürütülmüştür. İlk olarak Çanakkale'nin Ezine ve Lapseki ilçeleri kanola üretim alanlarına arazi çıkışları yapılarak, virüs ve virüs benzeri hastalık ile enfekteli olduğu düşünülen kanola bitkilerinden örnekler alınmış ve laboratuvara getirilmiştir. İkinci aşamada toplanan örneklerde TuMV varlığını belirlemek amacı ile DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile tespit çalışmaları yapılmıştır. Son aşamada ise elde edilen RT-PCR ürünleri kullanılarak, rastgele seçilen bir izolatın Nİb+CP geninin bir kısmını içeren bölgenin nükleik asit dizilimleri belirlenmiştir. Ayrıca dünya TuMV izolatları ile benzerlik dizi analizi yapılarak, filogenetik soyağacı oluşturulmuştur.

Arazi çalışmaları

Çalışma kapsamında yürütülen arazi çalışmaları 2014 yılı erken ilkbaharında kanola üretiminin yapıldığı Çanakkale'nin Ezine ve Lapseki ilçelerinde yürütülmüştür. Üretim sezonu boyunca kanola alanlarına arazi çıkışları yapılarak bitkiler görsel olarak incelenmiş ve viral hastalık belirtilerine benzer belirti görülen bitkilerden bitkinin büyüklüğüne göre yaprak örnekleri ya da bitkinin tamamı olacak şekilde örnekler alınmıştır. Kanola üretim alanlarının seçimi tesadüfi olarak yapılmış ve her bir üretim bölgesinden örnekleme yapılmaya çalışılmıştır. Arazi çıkışlarında örnekleme yapılırken, aynı alanda birden fazla bitkide TuMV ve benzeri semptom görülmesi durumunda en fazla 3 bitkiden örnek alınmıştır. Örnekleme alanlarında kanola çeşitleri dikkate alınmamıştır. Alınan örnekler buz kutusunda muhafaza edilerek laboratuvara getirilmiştir. Arazi çalışmaları sonucu Ezine'den 11, Lapseki'den ise 10 örnek olmak üzere toplamda 21 kanola örneği alınmıştır.

Laboratuvar çalışmaları

Serolojik test (DAS-ELISA)

TuMV'nin serolojik bir yöntem olan ELISA testi ile tanınmasında Bioreba (İsviçre) firmasından sağlanan ELISA komple kiti kullanılmıştır. ELISA testi üretici firmanın önerileri doğrultusunda Clark and Adams (1977)'in belirttiği yöntem temel alınarak yapılmıştır. Yöntemin uygulanmasında öncelikle tabak virüse spesifik IgG ile kaplanmış, ikinci aşamada örnekler ilave edilmiştir. Üçüncü aşamada ise konjugat ve son aşamada ise substrat eklenerek 405 nm dalga boyunda ELISA okuyucusunda sonuçlar değerlendirilmiştir. Spesifik IgG ve konjugat firmanın önerileri doğrultusunda 1:1000 oranında sulandırılmış, örnekler ise örnek tampon çözeltisi içerisinde 1:10 oranında sulandırılarak kullanılmıştır. Negatif kontrolün 2 katı ve üzerinde olan örnekler enfekteli olarak değerlendirilmiştir.

Moleküler test (RT-PCR)

Tüm örnekler DAS-ELISA'ya göre daha hassas bir yöntem olan RT-PCR ile testlenmiştir. RT-PCR çalışmalarında TuMV'nin tanısına yönelik gen spesifik

primer çiftleri kullanılarak PrimeScript™ RT-PCR (Fermantas, Litvanya) kitinin alındığı firmanın önerileri doğrultusunda temel olarak 3 aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak kanola bitkilerinden Suehiro et al. (2005)'nin belirttiği şekilde total RNA ekstraksiyonu yapılmıştır. İkinci aşamada elde edilen total RNA'lar thermal cyclers'da 65 °C'de 5 dk bekletilmiş ve hemen ardından buza alınarak denatürasyon aşaması tamamlanmıştır. Denatüre edilmiş RNA'lardan komplementar DNA (cDNA)'ların sentezlenmesi amacı ile RT karışım hazırlanarak 30 °C'de 10 dk, 42 °C'de 45 dk, 70 °C'de 15 dk ve 4 °C'de bekleyecek şekilde programlanan PCR makinesine konularak cDNA'lar sentezlenmiştir. RT-PCR çalışmalarının son aşamasında elde edilen cDNA'ların amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hazırlanan PCR karışımına cDNA'lar eklenerek 94 °C'de 3 dk, 40 defa tekrarlanan 94 °C'de 30 sn, 56°C'de 30 sn ve 72 °C'de 1.5 dk, 72 °C'de 5 dk daha sonra da 4 °C'de bekleyecek şekilde programlanan PCR makinesine konularak TuMV gen spesifik primerler ile (Çizelge 1) istenilen gen bölgesinin çoğaltılması yapılmıştır. Son olarak elde edilen PCR ürünleri DNA büyüklük markörleriyle birlikte %1'lik agaroz jel içinde 100 voltta, 45 dakika ayrıştırılıp EtBr ile boyandıktan sonra Major Science UV jel görüntüleme cihazında hedef virüsün Nib+CP geninin bir kısmına ait 1178 bp'lik bantlar görüntülenmiştir.

Çizelge 1. *Turnip mosaic virus* için tasarlanan Nib+CP genlerinin bir kısmına spesifik primer çifti

Kod	Primer Dizisi	Sense	Spesifik Geni
TUNIP17P	5' TGG TTY ATG TCG CAC CAA GG 3'	Forward	Nib+ CP (1178 bp)
CP8M	5' TCC GTG TTC TCT ACC GTT GT 3'	Reverse	

Moleküler karakterizasyon çalışmaları

RT-PCR ürünlerinin saflaştırılması ve sekans analizi

Çoğaltılmış TuMV Nib+CP genlerinin bir kısmına ait RT-PCR ürünlerinden, Lapseki'den elde edilen CK01 numaralı izolat rastgele seçilmiş ve EZ Column PCR pürifikasyon kiti (Bio Basic, Kanada) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Hedef genlerin DNA dizilimi Refgen Biyoteknoloji (Ankara) firmasında yaptırılmıştır. DNA dizilimi TUNIP17P ve CP8M primerleri kullanılarak çift yönlü olarak yaptırılmıştır.

Benzerlik dizi analizleri ve filogenetik analiz

CK01 numaralı izolatin sekans dizilerine ait çift yönlü veriler CLC Main Workbench programında çalışılarak CK01'in 5'-3' yönü doğrultusundaki DNA dizilimleri elde edilerek NCBI veri tabanında BLAST analizi yapılmıştır. Blast analizi sonuçlarına göre seçilen ve dünyanın farklı bölgelerinden elde edilerek gen bankasına yüklenmiş bulunan 9 adet TuMV izolatu (Çizelge 2) ile nükleotid benzerlik dizi analizleri CLC Main Workbench programında yapılarak, Neighbor-

Çanakkale ili kanola (*Brassica napus* L.) üretim alanlarında Şalgam mozaik virüsü (*Turnip mosaic virus*; TuMV) enfeksiyonunun tanınması ve karakterizasyonu

Joining Phylogeny yöntemi ile 100 tekrarlı bootstrap analiziyle filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

Çizelge 2. Gen bankasında bulunan ve farklı ülkelerden elde edilen *Turnip mosaic virus* izolatlarının erişim numaraları ve elde edildikleri konukçu bitkiler

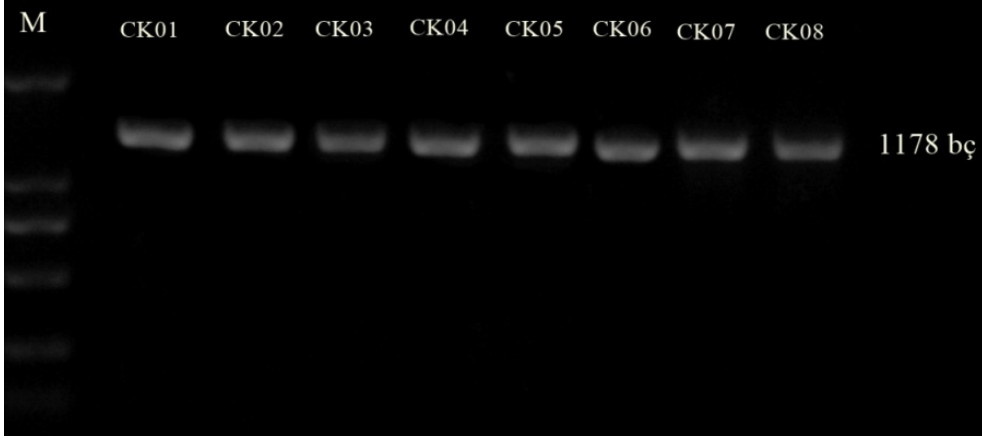
Gen Bankası Erişim Numarası	Orijin Ülke	Konukçu
AB093612	Yeni Zelanda	<i>Brassica pekinensis</i>
AB093600	İtalya	<i>Raphanus raphanistrum</i>
AB252115	Japonya	<i>R. sativus</i>
AB362513	Türkiye	<i>R. sativus</i>
AB093604	Almanya	<i>Lactuca sativa</i>
AB093606	Rusya	<i>B. napus</i>
AF169561	İngiltere	<i>B. napus</i>
D10927	Kanada	<i>B. rapa</i>
AB093609	Amerika	<i>B. oleracea</i>

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Serolojik ve moleküler testlemeler

Arazi çalışmaları sonucunda Çanakkale'nin Ezine ve Lapseki ilçelerinden toplanan 21 kanola örneğinden 15'i hem ELISA hem de RT-PCR testlerinde TuMV ile enfekteli olarak bulunmuştur. Toplanan örnekler bazında enfeksiyon oranı %71.4 olarak gerçekleşmiştir. Yapılan bu çalışma ile ülkemizde ilk defa kanola bitkilerinde TuMV'nin varlığı belirlenmiştir. DAS-ELISA testi sonucunda pozitif bulunan örnek sayısı ile bu teste göre çok daha hassas bir yöntem olan RT-PCR analiz sonucunda pozitif olarak bulunan örnek sayıları aynı çıkmıştır. Bu sonuçlar DAS-ELISA'nın geniş alanlarda sörvey çalışmalarında güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir. TuMV Potyvirus cinsine ait olan bir virüsdür. Potyvirusler bitki içinde homojen olarak dağılmakta ve kısa sürede yüksek konsantrasyona ulaşabilmektedir (Lunello et al. 2002). Bu çalışma kapsamında her iki yöntemde de aynı sayıda enfekteli bitki elde edilmesi Potyviruslerin bu özelliğinden kaynaklanmaktadır. Dünyanın birçok bölgesinde farklı kültür bitkileri ile yapılan çalışmalarda TuMV'nin DAS-ELISA ile tanısının yapılabildiği ve sörvey çalışmalarında yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir (Korkmaz ve Önder 2006, Bellardi et al. 2013, Farzadfar and Pourrahim 2014). Ülkemizde yapılan bir çalışmada Korkmaz ve ark. (2011) Güneybatı Marmara Bölgesi Brassicaceae bitkilerindeki TuMV enfeksiyonunun tespiti amacı ile topladıkları 167 örneği DAS-ELISA ile testlemişler ve 33 örneğin TuMV ile enfekteli olduğunu saptamışlardır. Yapılan bu çalışmalar DAS-ELISA testinin Brassicaceae bitkilerinde TuMV enfeksiyonlarının tanısında etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

RT-PCR analizlerinde DAS-ELISA testi sonucu pozitif bulunan tüm örneklerden Nib+CP geninin bir kısmını içeren 1178 bç büyüklüğünde istenilen DNA bantları elde edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. RT-PCR testi sonucunda *Turnip mosaic virus* ile enfekteli bulunan bazı örneklere ait elde edilen bantlar (CK01, CK02, CK03, CK04, CK05, CK06, CK07, CK08: araziden alınan örneklere ait numaralar, M: 100-2000 bç marker)

Bellardi et al. (2013) *Erysimum linifolium* L. bitkisindeki TuMV enfeksiyonunun karakterizasyonu ve filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi amacı ile gerçekleştirmiş oldukları çalışmalarında da 862 bç büyüklüğüne karşılık gelen CP genine ait DNA bantlarını TuMV ile enfekteli bitkilerden elde etmişlerdir. Jiang et al. (2010) Çin'de yaptıkları bir çalışmada mozaik belirtiler gösteren Cruciferae familyasına ait 11 bitkiden örnek almışlardır. Araştırmacılar yaptıkları elektron mikroskobu çalışmalarında bu semptomlara neden olan etmenin potyvirus grubuna ait olduğunu belirlemişlerdir. Gen spesifik TuMV primerleri ile gerçekleştirilen RT-PCR çalışmalarında ise tüm örneklerden 1000 bç büyüklüğüne karşılık gelen bantlar elde ederek etmenin TuMV olduğunu tespit etmişlerdir. Yukarıda bahsedilen ve yürütülen çalışmalardan görüldüğü üzere; RT-PCR testi ile TuMV'nün güvenilir bir şekilde tespit edildiği görülmektedir. Verilen örneklerdeki RT-PCR sonucunda elde edilen farklı DNA büyüklükleri ise araştırmacıların kullandıkları gen bölgelerine spesifik farklı primer çiftlerinden kaynaklanmaktadır. Zhao et al. (2013) 86 kanola örneğindeki TuMV enfeksiyonunu tespit etmek amacıyla RT-PCR yöntemini etkin bir şekilde kullanarak enfekteli örnekleri saptamışlardır. Tüm bunların ışığında PCR ve diğer moleküler yöntemlerin TuMV enfeksiyonlarının saptanmasında ve teşhisinde başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

Yapılan bu çalışmada toplanan şüpheli örneklerdeki yüksek TuMV enfeksiyon oranının, toplanan örneklerin hepsinin virüs ve virüs benzeri hastalık semptomu taşıması, örnekleme yapılan zamandaki TuMV'yi etkin şekilde taşıyan yaprak biti vektörlerinin yoğun şekilde bulunması ve de örnekleme yapılan dönemde bitkinin içinde bulunduğu fenolojik dönemin TuMV enfeksiyonunu tespit etmek için en

ideal zaman olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Dünyada yapılan bir çok çalışmada TuMV konukçusu olduğu bitkilerde serolojik ya da moleküler yöntemlerle kolaylıkla teşhis edilirken, enfeksiyon oranlarının da birbirinden çok farklı olduğu görülmektedir. Coutts and Jones (2000) Güneybatı Avustralya'da kanola alanlarındaki virüslerin yaygınlık durumlarının ve bazı özelliklerinin belirlenmesi amacı ile yaptıkları bir çalışmada toplanan 139 örneğin %5'inin TuMV ile enfekteli olduğunu bulmuşlardır. Farzadfar and Pourrahim (2014) ise Brassicaceae familyası bitkilerindeki TuMV izolatlarının karakterizasyonunu belirlemek amacı ile İran'ın 9 farklı ilinde örneklemeler yapmışlar ve toplanan kanola örneklerinin %38'inin TuMV ile enfekteli olduğunu belirtmişlerdir. Gerek bu çalışmada gerekse diğer iki çalışmada olduğu gibi, enfeksiyon oranlarının birbirinden farklı olduğu görülmüştür. Çünkü bir kültür bitkisinde bir virüs hastalığının yaygınlık durumu ya da enfeksiyon oranı yetiştirilen çeşide, hastalığı taşıyan vektörlerin durumuna, iklim koşullarına, bitkinin fenolojik durumuna ve diğer bir çok faktöre bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir.

Simptomatolojik gözlemler

DAS-ELISA ve RT-PCR testleri sonucunda TuMV ile enfekteli olarak bulunan bitkilerde şiddetli mozaik belirtiler ve sararmalar görülmüştür (Şekil 2). Bitkinin vejetasyon periyodunun ilerlemesi ile yapraklardaki mozaik belirtiler ve sararmaların nekroza dönerek, kurumalara da neden olduğu gözlemlenmiştir. Araziden alınan örneklerde genel olarak virüs hastalıklarının temel belirtilerinden olan bodurluk belirtilerine ise rastlanılmamıştır. Arazide gözlenen belirtiler daha önceden birçok çalışmada belirtilen belirtilerle benzerlik göstermektedir (Oshima et al. 2002, Zhao et al. 2013, Singh et al. 2015). Alınan örneklerin hepsinin virüs ve virüs benzeri hastalık belirtileri göstermesine rağmen bazı bitkilerin TuMV ile enfekteli bulunmamasının nedeninin, bu bitkilerin TuMV dışındaki diğer virüs hastalıkları ile enfekteli olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 2. DAS-ELISA ve RT-PCR testleri sonucunda *Turnip mosaic virus* ile enfekteli olduğu belirlenen kanola bitkilerinde mozaik ve sararma belirtileri

Moleküler karakterizasyon çalışmaları

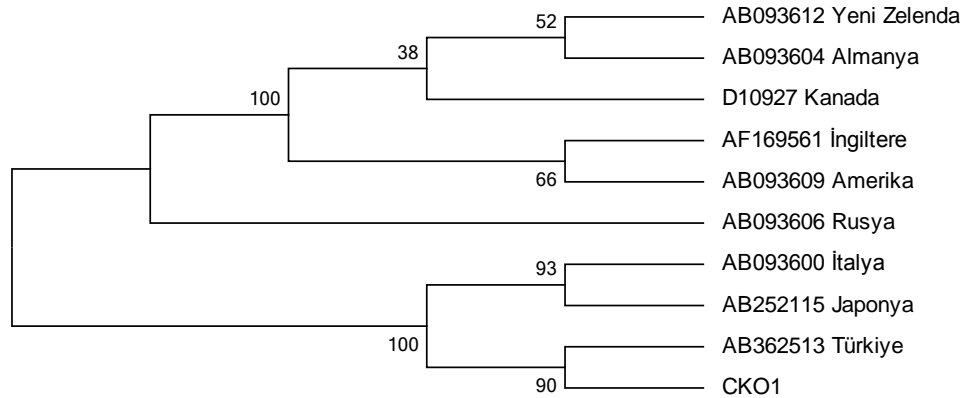
İzolatlar arasından rastgele seçilen CK01 nolu izolatın RT-PCR ürünleri kullanılarak gerçekleştirilen sekans analizi sonucunda dünya izolatları ile CK01'in nükleotid (nt) benzerlik oranları ve filogenetik ilişkileri ortaya konmuştur. Nükleotid dizi analizleri sonucunda CK01 nolu izolat gen bankasından elde edilen 9 dünya izolatı ile %88-93 arasında değişen oranlarda benzerlik göstermiştir. En fazla benzerlik oranı gen bankasında tüm genom sekansı bulunan ve bir Türk izolatı olan AB362513 erişim numaralı izolat ile %93 olarak bulunmuştur. En düşük benzerlik oranı ise %88 ile Rusya'dan elde edilen izolat ile bulunmuştur (Şekil 3). Yapılan bazı çalışmalarda aynı bölgeden elde edilen TuMV izolatlarının yüksek genetik benzerlik gösterebildiği belirtilmiştir (Stavolone et al. 1998, Oshima et al. 2002). Bu durum CK01'in gen bankasında bulunan Türk izolatı ile göstermiş olduğu %93'lük benzerlik oranını desteklemektedir. Jiang et al. (2010), 11 Güneybatı Çin TuMV izolatının moleküler karakterizasyonu amacı ile gerçekleştirmiş olduğu nt dizi analizlerinde izolatların kendi içlerinde %97-100 arasında benzerlik gösterdiğini, bu izolatların tüm Çin'den elde edilen TuMV izolatları ile %89-99 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Zubareva et al. (2013) Rusya'dan elde ettikleri TuMV izolatlarının karakterizasyonunu belirlemek amacı ile yapmış oldukları çalışmalarında, TuMV izolatlarının kendi içlerindeki benzerlik oranını %95 olarak bildirmişlerdir. Babu et al. (2013), Etiyopya hardalında TuMV enfeksiyonunu tespit ederek bunu ilk kayıt olarak bildirmişlerdir. Elde ettikleri TuMV izolatının CP ve Nİb bölgelerine göre gerçekleştirmiş oldukları nt dizi benzerlik analizleri sonucu TuMV izolatının dünya izolatları ile CP genine göre %98-99, Nİb'e göre ise %96-98 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiğini belirtmiştir. Yapılan birçok çalışmada da görüldüğü gibi TuMV izolatlarının farklı benzerlik oranlarına sahip olması genetik akrabalık düzeylerini göstermektedir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AB093612	1	98,13	97,37	96,94	96,18	90,66	90,32	89,39	88,88	89,13
AB093604	2	98,13	97,71	97,28	96,35	90,66	90,66	88,88	89,13	89,30
AF169561	3	97,37	97,71	97,20	96,94	90,49	90,15	89,13	89,13	89,22
D10927	4	96,94	97,28	97,20	95,67	89,73	89,56	87,61	88,71	88,37
AB093609	5	96,18	96,35	96,94	95,67	89,22	88,88	87,95	88,62	88,71
AB093606	6	90,66	90,66	90,49	89,73	89,22	89,30	87,95	87,95	88,12
AB093600	7	90,32	90,66	90,15	89,56	88,88	89,30	94,06	93,38	92,53
AB252115	8	89,39	88,88	89,13	87,61	87,95	87,95	94,06	91,85	91,43
AB362513	9	88,88	89,13	89,13	88,71	88,62	87,95	93,38	91,85	93,04
CK01	10	89,13	89,30	89,22	88,37	88,71	88,12	92,53	91,43	93,04

Şekil 3. CLC Main Work Bench programında oluşturulan *Turnip mosaic virus* izolatlarına ait nükleotid dizi benzerlik analiz tablosu

CK01 izolatının nt dizileri kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç Şekil 4'de verilmiştir. Nükleotid dizileri kullanılarak yapılan filogenetik analizler sonucunda

izolatların genetik ilişkisi belirlenmiştir. CK01 ve diğer dünya TuMV izolatlarının N1b+CP genlerinin nt dizilimlerine göre yapılan filogenetik analizde üçü aynı anlamına gelen “trichotomy” tipi dallanma meydana gelmiştir. Oluşturulan soyağaçlarının dalları 38-100 arasında değişen bootstrap değerleri ile desteklenmekte olup tesadüfi olmadığı ve soy ağacındaki dalların istatistiksel açıdan desteklendiğini göstermiştir. Filogenetik ağaçta CK01, AB362513 erişim numaralı olan Türk izolatu ile yüksek benzerlik göstererek aynı alt grup içinde yer almıştır. Singh et al. (2015) Hindistan'da lahanagillerden elde etmiş oldukları TuMV izolatlarının karakterizasyonu çalışmaları sonucunda oluşturdukları filogenetik ağaçta Hindistan TuMV izolatlarının birbirleri ile yakın ilişki gösterdiği belirtilmiştir. Aynı bölgeden elde edilen izolatlar genellikle aynı grup yada alt grup içinde yer almaktadır. Birbirlerine en uzak olan izolatlar ise CK01 ile Yeni Zelanda (AB093612) TuMV izolatu olarak bulunmuştur. Soyağacında yapılan gruplandırmaya göre; birinci grupta CK01, diğer Türk izolatu (AB362513), Japonya (AB252115) ve İtalya (AB093600)'nın bulunduğu, ikinci grupta ise Amerika (AB093609), İngiltere (AF169561), Kanada (D10927), Almanya (AB093604) ve Yeni Zelanda (AB093612) izolatlarının bulunduğu görülmektedir. Rusya (AB093606)'nın ise her iki gruba da yakın olduğu görülmektedir. Ülkelerin bulunduğu coğrafik lokasyonlara göre değerlendirmek gerektiğinde ise Almanya izolatının birinci grupta yer alması gerektiği düşünülebilir. Fakat TuMV izolatları arasındaki filogenetik ilişkilerin coğrafik orijinlere, konukçu bitkilere ve çevre koşullarına bağlı olmadığı, unutulmaması gereken etkenlerdir (Jiang et al. 2010, Zhao et al. 2013, Nyalugwe et al. 2015). Bunlar ile birlikte TuMV'nin yaprak biti ile taşınmasının yanı sıra mekanik yolla da taşınması da bu konudaki etken faktörlerden birisi olabilir. Ancak TuMV izolatları arasındaki yüksek değişkenliğin bir başka nedeni de dünyada çok yaygın olmasından da kaynaklanabilir (Oshima et al. 2002, Zubareva et al. 2013).



Şekil 4. CK01 ve Dünya izolatlarına ait dendrogram

Ülkemizde bugüne kadar yapılan çalışmalarda TuMV'nin varlığı farklı bitkilerde saptanmıştır (Korkmaz et al. 2007, 2008). Bu çalışma ile ülkemizde hem TuMV varlığı ilk kez kanola bitkilerinde saptanmış, hem de ilk defa kanola alanlarında virüs hastalıkları ile ilgili bir çalışma yürütülmüştür. Bundan sonra kanola alanlarında yapılacak diğer çalışmalarda Şekerpancarı batı sarılık virüsü (BWYV), Karnabahar mozaik virüsü (CaMV) ve Hıyar mozaik virüsü (CMV)'nün ülkemiz kanola alanlarında varlığının saptanması, karakterizasyonu ve kanola alanlarındaki mevcut virüslerin ülkemiz ekosisteminde meydana getirebileceği kayıpların tespitine yönelik olması gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Babu B., Dankers H., George S., Wright D., Marois J. and Paret M. 2013. First Report of Turnip Mosaic Virus Infecting *Brassica carinata* (Ethiopian Mustard) in the United States. *Plant Disease*, 97 (12), 664.
- Bellardi M.G., Cavicchi L., Stradis A.D., Panno S. and Davino S. 2013. Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Turnip Mosaic Virus (TuMV) in *Erysimum linifolium* L. in Italy. *International Research Journal of Plant Science*, 4(4), 97-102.
- Clark M.F. and Adams A.N. 1977. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *Journal General Virology*, 34 (3), 475-483.
- Coutts B.A. and Jones R.A.C. 2000. Viruses Infecting Canola (*Brassica napus*) in South-West Australia: Incidence, Distribution, Spread and Infection Reservoir in Wild Radish (*Raphanus raphanistrum*). *Australian Journal of Agricultural Research*, 51 (7), 925-936.
- Ebrahim-Ghomi M. 2014. Study on Distribution and Detection of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) in Dezful Region of Iran. *International Journal of Biosciences*, 4 (11), 271-275.
- Farzadfar S. and Pourrahim R. 2014. Characterization of *Turnip mosaic virus* from the Asian-BR Population in Iran. *J Phytopathol*, 162, 824-828.
- Goheen A.C. 1988. Diseases caused by virus and virus-like agents. In: Pearson R.C., Goheen A.C. (eds). *Compendium of Canola Diseases*, pp. 47-49. American Phytopathological Society St. Paul Minnesota, USA.
- Jiang Y., Wang J.H., Yang H., Xu M.Y., Yuan S., Sun W., Xu W.L., Xi D.H. and Lin H.H. 2010. Identification and Sequence Analysis of *Turnip Mosaic Virus* Infection on Cruciferous Crops in Southwest Of China. *Journal of Plant Pathology*, 92 (1), 241-244.
- Kadıoğlu İ., Uluğ E. ve 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.

Çanakkale ili kanola (*Brassica napus* L.) üretim alanlarında Şalgam mozaik virüsü (*Turnip mosaic virus*; TuMV) enfeksiyonunun tanınması ve karakterizasyonu

- Korkmaz S. ve Önder S. 2006. Güney-Batı Marmara Bölgesinde Şalgam Mozaik Virüsünün (*Turnip mosaic virus*=TuMV) Brassica Cinsi Bitkilerde Biyolojik ve Serolojik Yöntemlerle Saptanması. VI. Sebze Tarımı Sempozyumu, Kahramanmaraş, 381-385.
- Korkmaz S. , Onder S. Tomitaka Y. and Ohshima K. 2007. First Report of *Turnip Mosaic Virus* on Brassicaceae Crops in Turkey. *Plant Pathology*, 56 (4),720-720.
- Korkmaz S., Tomitaka Y., Onder S. and Ohshima K. 2008. Occurrence and Molecular Characterization of Turkish Isolates of *Turnip mosaic virus*. *Plant Pathology*, 57 (6), 1155-1162.
- Korkmaz S., Çevik B., Kurtuluş E. ve Tuzlalı H.T. 2011. Güneybatı Marmara Bölgesi'nde Brassicaceae ve Alliaceae Familyasına Bağlı Bitkilerde Virüs Hastalıklarının Teşhisi. Çanakkale Tarımı Sempozyumu Dünü, Bugünü, Geleceği, 460-467.
- Kumbar N. ve Unakitan G. 2011. Trakya Bölgesinde Kanola Üretiminin Ekonomik Analizi. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 8 (1), 75-80.
- Lathan L.J., Smith L.J. and Jones R.A.C. 2003. Incidence of Three Viruses in Vegetable Brassica Plantings and Associated Wild Radish Weeds in Southwest Australia. *Australian Journal of Plant Pathology*, 32 (3), 387-391.
- Lunello P., Ducasse D.A., Helguera M., Nome S.F. and Conci V.C. 2002. An Argentinean Isolate of Leek Yellow Stripe Virus from Leek Can Be Transmitted to Garlic. *Journal of Plant Pathology*, 84 (1), 11-17.
- Nooh S. 2012. An Overview of Oilseed Rape (canola) Virus Diseases in Iran. *International Research Journal of Microbiology*, 3 (1), 24-28.
- Nyalugwe E.P., Jones R.A.C., Barbetti M.J. and Kehoe M.A. 2015. Biological and Molecular Variation Amongst Australian Turnip mosaic virus Isolates. *Plant Pathology*, 64 (5), 1215-1223.
- 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. and 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.
- Provvidenti R. 1982. A Destructive Disease of Garden Balsam Caused by Strain of *Turnip mosaic virus*. *Plant Disease*, 66 (11), 1076-1077.
- Provvidenti R. 1996. *Turnip mosaic potyvirus*. In: Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J., Gibbs A.J., Watson L. (eds). *Viruses of Plants*, pp.1340-1343. Wallingford, CAB International, UK.
- Singh R., Banerjee A., Sharma K.S., Bhagawati R., Baruah S., Ngachan S.V. 2015. First report of *Turnip mosaic virus* occurrence in cole crops (*Brassica* spp) from Arunachal Pradesh, India. *Virus Disease*, 26 (3), 211-213.
- Stavolone L., Alioto D., Ragozzino A. and Laliberte J.F. 1998. Variability Among *Turnip Mosaic Potyvirus* Isolates. *Phytopathology*, 88 (11), 1200-1204.

- Suehiro N., Matsuda K., Okuda S. and Natsuaki T. 2005. A Simplified Method for Obtaining Plant Viral RNA for RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 125 (1), 67-73.
- Tabarestani A.Z., Shamsbakhsh M. and Safaei N. 2011. Distribution of Three Important Aphid Borne Canola Viruses in Golestan Province. *Iranian journal of Plant Protection Science*, 141 (2), 112-118.
- Topçu D.A. 2014. İthal edilen ve Trakya Bölgesi'nde tarımı yapılan alanlardan alınan kanola tohum örneklerinde tohum kökenli fungal etmenlerin tespiti. Yüksek lisans tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ, 45 s.
- Walsh J.A. and Jenner C.E. 2002. *Turnip Mosaic Virus* and the Quest for Durable Resistance. *Molecular, Plant Pathology*, 3 (5), 289 – 300.
- Zhao L., Feng C., Hao X., Wang R., Hu L., Wang Q. and Wu Y. 2013. Detection and Molecular Variability of *Turnip mosaic virus* (TuMV) in Shaanxi, China. *Journal of Phytopathology*, 162 (7-8), 519-522.
- Zubareva I.A., Vinogradova S.V., Gribova T.N., Monakhos S.G., Skryabin, K.G. and Ignatov A.N. 2013. Genetic Diversity of *Turnip Mosaic Virus* and the Mechanism of Its Transmission by Brassica Seeds. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 450 (1), 119–122.