

Bitki Koruma Bülteni / Plant Protection Bulletin

<http://dergipark.gov.tr/bitkorb>

Original article

Detection and molecular characterization of *Turnip mosaic virus* infecting okra in Turkey

Bamya bitkisinde Şalgam mozaik virüsü (*Turnip mosaic virus*)'nün tespiti ve moleküler karakterizasyonu

Ali KARANFİL^a, Savaş KORKMAZ^{a*}

^a Çanakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, Çanakkale, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

DOI: [10.16955/bitkorb.517700](https://doi.org/10.16955/bitkorb.517700)

Received : 25.01.2019

Accepted : 17.05.2019

Keywords:

TuMV, identity, NIB, CP, cloning, phylogenetic

* Corresponding author: Savaş KORKMAZ

✉ skorkmaz@comu.edu.tr

ABSTRACT

Turnip mosaic virus (TuMV) has a broad host range and its presence has been detected in many species of vegetables both in the world and Turkey. However, there is no study on the infection of TuMV in okra plant, a summer vegetable belonging to the *Malvaceae* family, in Turkey. For this purpose, 31 samples of okra showing virus and virus-like symptoms were collected from the okra production areas from İzmir and Manisa provinces in 2017. The collected samples were tested by double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) with the aim of determining the presence of TuMV. The tests revealed that 23 samples (74.2%) were infected with TuMV. Molecular characterization of two TuMV isolates selected from the infected samples was performed. The partial nuclear inclusion b and coat protein genes of the selected isolates were amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), cloned and sequenced. The obtained sequences were used to determine similarity rates and phylogenetic relationships with the world isolates. As a result of the multiple sequence comparison, it was determined that TuMV isolates showed 84-88% and 91-94% identities with the world isolates at the level of nucleotide and amino acid, respectively. Moreover, the results of phylogenetic analyses revealed that the okra TuMV isolates were classified into basal-B group. With this study, the presence of TuMV has been identified for the first time in okra production fields of Turkey.

GİRİŞ

Bamya [*Abelmoschus esculentus* L. (Monch)] tarımı ülkemizin büyük bir kısmında uzun yıllardır gerçekleştirilmektedir. Yıllık ortalama 25 bin tona kadar üretimin gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Karagül 2002). Tarımının diğer sebzelere göre özellikle hasat açısından daha zor olması nedeni ile üretimi

sınırlı da olsa fiyatı en yüksek olan sebzelerden bir tanesidir. Bamyanın sahip olduğu besin içeriklerine bakıldığında diğer sebzelere kıyasla kalorisinin düşük olduğu ve daha az kuru madde oranına sahip olduğu belirlenmiştir. Bunlara ek olarak vitamin ve mineral madde bakımından da zengin

olduğu belirtilmiştir (Karagül 2002).

Tarımsal üretimde ürünün kalite ve miktarına etki eden birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerden birisi de hiç kuşkusuz virüs hastalıklarıdır. Viral kaynaklı hastalıkların kimyasal bir mücadelesi olmadığı için, diğer hastalık etmenlerine göre daha yıkıcı olabilmekte ve bazen üretimde %70-80'lere varan kayıplara neden olabilmektedirler. Bamyta tarımında da üretimi sınırlandıran en önemli faktörler, bitki koruma ile ilgili olan problemlerdir. Bunların başında da virüs hastalıkları gelmektedir. Dünyada gerçekleştirilen birçok çalışmada viral etmenlerin bamyta bitkisinde enfeksiyon gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Ndunguru and Rajabu 2004, Seth et al. 2017). Bamyta tarımında ekonomik kayıplara neden olan viral etmenlerden bir tanesi de Şalgam mozaik virüsü (*Turnip mosaic virus*, TuMV)'dür (Gera et al. 2001).

TuMV çok geniş bir konukçu dizisine sahip olup, 156 cinse bağlı 318 bitki türünü enfekte edebilmektedir. En önemli konukçuları karnabahar, lahanası, brokoli, Brüksel lahanası, Çin lahanası, enginar, marul, turp, kolza, hardal, su teresi, tütün ve birçok yabancı ot türü olup, dünyada bu bitkilerin yetiştirildiği bölgelerde ekonomik düzeyde zarara neden olmaktadır (Ohshima et al. 2002). TuMV'nin non-persistent olarak çok sayıda yaprak biti ile taşındığı ve tarım yapılan her kıtada enfeksiyona neden olduğu bildirilmiştir (Provvidenti 1996, Walsh and Jenner 2002).

TuMV partikülleri ipliksi çubuk şeklinde bir yapıda olup, uzunluğu 700-750 çapı ise 10-12 nm kadardır. Genomik nükleik asit pozitif duyarlılıkta tek sarmal RNA (ssRNA) içermektedir. RNA'nın içermiş olduğu nükleotit sayısı, yaklaşık 10.000 kadardır (Riechman et al. 1992).

Dünyada TuMV ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmış olup, halen de devam etmektedir. Etmenin biyolojik karakterizasyonu sonucunda 4 farklı patotip tanımlanmıştır. Bu patotiplerden B, birçok *Brassica* cinsini enfekte etmekte ve mozaik semptomlar göstermekte, *Raphanus* cinsinde enfeksiyon meydana getirememekte; (B) bazen *Brassica* cinsini genellikle latent bir şekilde enfekte ederken, *Raphanus* cinsinde enfeksiyon meydana getirmemekte; BR, sistemik mozaik semptomlar göstererek *Brassica* ve *Raphanus* cinslerini enfekte edebilmekte ve son olarak B(R) ise sistemik mozaik semptomlar göstererek birçok *Brassica* cinsini enfekte ederken *Raphanus* cinsini ise ara sıra latent olarak enfekte etmektedir (Ohshima et al. 2002, Tomimura et al. 2004). Bu 4 gruba ek olarak son yıllarda bir de OM grubu eklenmiştir. Bu grup üyeleri bazı *Eruca sativa* (roka) ve *Cameria sativa* (ketencik) gibi bazı *Brassicaceae* familyası bitkilerinde enfeksiyon meydana getirebilmekte iken, *Brassica* spp.'lerinin bir çoğunda enfeksiyon meydana getirmemektedir (Nguyen

et al. 2013a, 2013b). TuMV izolatlarının filogenetik sınıflandırılmasında ise 5 grup tanımlanmıştır. Genellikle filogenetik sınıflandırmalar TuMV'nin tüm genom sekans dizisine ve/veya kılıf protein gen bölgesine göre gerçekleştirilmiştir. Bu gruplar çoğunluğu B patotipinden oluşan World B ve Basal B, OM patotipinden oluşan Orchis, BR patotipinden oluşan Asian BR ve Basal BR gruplarından oluşmaktadır (Nguyen et al. 2013b, Ohshima et al. 2002, Ribeiro-Junior et al. 2018). Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar ile bu mevcut 5 gruba ek olarak İran grubu da 6. grup olarak eklenmiştir (Yasaka et al. 2017).

Virüs ile ilgili dünyada birçok çalışma yapılmasına rağmen, çalışmaların neredeyse tamamı *Brassicaceae* familyasına ait bitkilerde gerçekleştirilmiştir. TuMV enfeksiyonunun bugüne kadar yazlık ve *Malvaceae* familyasına ait bamyta bitkisinde tek kaydı İsrail'den bildirilmiştir (Gera et al. 2001).

Ülkemizde virüsün karakterizasyonu ile ilgili bazı çalışmalar gerçekleştirilmiştir, fakat gerçekleştirilen bu çalışmaların hepsi *Brassicaceae* familyasına ait kışlık bitkilerde yapılmıştır (Karanfil ve Korkmaz 2016, Korkmaz et al. 2008). Hastalığın enfeksiyon durumu ile ilgili olarak ise, Karadeniz Bölgesi'nde bulunan Samsun ili ve Ege Bölgesi'nde bulunan İzmir ili ve çevresinde TuMV enfeksiyonunun araştırılması şeklinde sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır (Erkan et al. 2013, Sevik 2016). Ancak, TuMV'nin ülkemiz bamyta üretim alanlarında tanısına yönelik herhangi bir çalışma şimdiye kadar gerçekleştirilmemiştir. Bu bağlamda bamyta tarımının ülkemizde yoğun olarak yapıldığı İzmir ve Manisa illerinden alınan örneklerde tespit edilen TuMV'nin tanılanması ve karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi ile ülkemiz için ilk, dünya için ise ikinci kez enfeksiyonunun bildirilmesi sağlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Arazi çalışmaları

Arazi çalışmaları İzmir ve Manisa illeri bamyta üretim alanlarında 2017 yılında gerçekleştirilmiştir. Bitkiler görsel olarak incelenmiş, virüs ve benzeri semptom gösteren bitkilerden örnekler alınmıştır. Örnekleme yapılan bamyta alanlarının seçimi tesadüfi olarak gerçekleştirilmiştir. Örnekleme yapılan aynı üretim alanında (ticari ve ev bahçeleri) çok sayıda birbirine benzer semptom görülmesi durumunda ise o alandan en fazla 3 örnek alınmıştır. Alınan örneklerde silika jel içinde soğuk zincirde muhafaza edilerek, virüs tanılama çalışmaları için laboratuvara getirilmiştir.

DAS-ELISA testleri

Toplanan örnekler ilk olarak TuMV varlığı açısından double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay

(DAS-ELISA) ile test edilmiştir. DAS-ELISA testi kitlerin alındığı firmanın önerileri (Bioreba, İsviçre) ve Clark and Adams (1977)'in belirttiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Teste ilk olarak ELISA platelerin TuMV-spesifik antikor (IgG) ile kaplanması ile başlanılmıştır. Bunu takiben bitki örnekleri eklenmiştir. Testin üçüncü aşamasında konjugat (enzimle işaretli IgG) platalere konularak, test substrat (p-nitrophenol phosphate) eklenmesi ile tamamlanmıştır. Sonuçlar Medispec ESR 2000 ELISA plate okuyucuda 405 nm dalga boyunda değerlendirilmiştir.

DAS-ELISA sonucunda elde edilen TuMV izolatlarının moleküler karakterizasyonu amacı ile her iki ilden seçilen birer izolatın Nükleer Inclusion b + Kapsid Protein (Nİb+CP) genlerinin 1178 bç'lik kısmı, reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) ile çoğaltılmıştır.

RT-PCR çalışmaları

Çalışmanın bu basamağındaki yöntemler, total nükleik asit izolasyonu ve RT-PCR olmak üzere 2 aşamadan oluşmuştur. Birinci aşamada TuMV ile enfeteki olduğu bilinen örnekler arasından seçilen örneklerden CTAB metodu ile total

nükleik asit izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Li et al. 2008). Çalışmaların ikinci aşamasında Takara (Japonya) firmasından sağlanan kitler ile RT-PCR testlemeleri gerçekleştirilmiştir. Örneklerin RT-PCR aşaması Karanfil ve Korkmaz (2016)'a göre gerçekleştirilmiştir.

Klonlama ve sekans çalışmaları

Seçilen 2 TuMV izolatının [TuMV6 (Manisa) ve TuMV2 (İzmir)] moleküler karakterizasyonu amacıyla, RT-PCR yöntemiyle çoğaltılan 1178 bç'lik Nİb ve CP gen bölgeleri T-A klonlama yöntemiyle pGEM-T Easy plazmid vektörüne klonlanmış (Promega, ABD) ve elde edilen plazmidlerin saflaştırılması, Omega-Bio (ABD) plazmid saflaştırma kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bu plazmidlerden, her bir izolat için en az bir tanesi seçilerek çift yönlü olacak şekilde Refgen Biyoteknoloji (Ankara) firmasında hizmet alımı yolu ile DNA dizilimlerinin belirlenmesi sağlanmıştır. CLC Main Workbench (V.8.1) programında bu veriler kullanılarak, İzmir ve Manisa izolatlarının dünyadaki diğer TuMV izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik oranları ve filogenetik ilişkileri araştırılmıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Çoklu dizi karşılaştırmaları ve filogenetik analizlerde kullanılan dünya Şalgam mozaik virüs izolatlarının izolat kodları, konukçuları, elde edildikleri ülke ve gen bankası erişim numaraları

İzolat	Konukçu	Ülke	Erişim Numarası
TuMV2	<i>Abelmoschus esculantus</i>	Türkiye	MK656463
TuMV6	<i>A. esculantus</i>	Türkiye	MK656464
AKD934J	<i>Raphanus sativus</i>	Japonya	AB252100
CCLB	<i>R. sativus</i>	Çin	KR153038
CDN1	<i>Brassica napus napobrassica</i>	Kanada	AY227024
DEU1	<i>Bilinmiyor</i>	Almanya	AB701699
DEU2	<i>R. sativus</i>	Almanya	AB701700
DEU4	<i>Lactuca sativa</i>	Almanya	AB701701
DEU7	<i>L. sativa</i>	Almanya	AB701695
DNK3	<i>B. rapa</i>	Danimarka	AB701703
GBR27	<i>B. oleracea</i>	Birleşik Krallık	AB701711
GBR31	<i>B. oleracea</i>	Birleşik Krallık	AB701713
GBR57	<i>wild B. oleracea</i>	Birleşik Krallık	AB701716
GBR83	<i>wild B. oleracea</i>	Birleşik Krallık	AB701717
ITA1A	<i>B. ruvo</i>	İtalya	AB701720
ITA4	<i>B. rapa</i>	İtalya	AB701722
ITA5	<i>B. ruvo</i>	İtalya	AB701723
ITA8	<i>Abutilon sp.</i>	İtalya	AB701725
IRNSS5	<i>Sisymbrium loeselii</i>	İran	AB440239
IRNTRa6	<i>Rapistrum rugosum</i>	İran	AB440238
KD32J	<i>R. sativus</i>	Japonya	AB093621
LWLB	<i>R. sativus</i>	Çin	KR153039
ND10J	<i>R. sativus</i>	Japonya	AB252130
NLD2	<i>B. oleracea</i>	Hollanda	AB701727
NSW1	<i>B. juncea</i>	Avustralya	KJ936087

Çizelge 1. Devamı

İzolot	Konukçu	Ülke	Erişim Numarası
NSW2	<i>B. juncea</i>	Avustralya	KJ936088
NZ290	<i>B. pekinensis</i>	Yeni Zelenda	AB093612
OMA	<i>Orchis militaris</i>	Almanya	AB701691
ORM	<i>Orchis morio</i>	Almanya	AB701692
OS	<i>O. simia</i>	Almanya	AB701693
Pol 1	<i>B. napus oleifera</i>	Polonya	AB701728
Pol 2	<i>Papaver somniferum</i>	Polonya	AB701731
Pol 4	<i>B. napus oleifera</i>	Polonya	AB701732
PV177	<i>Brassica spp.</i>	Birleşik Krallık	AB701733
TIGA	<i>Tigridia sp.</i>	Almanya	AB701734
TIGD	<i>Tigridia sp.</i>	Almanya	AB701735
TUR1	<i>B. oleracea</i>	Türkiye	AB362512
TUR9	<i>R. sativus</i>	Türkiye	AB362513
USA5	<i>R. sativus</i>	ABD	AB701740
USA6	<i>R. sativus</i>	ABD	AB701741
WFLB14	<i>R. sativus</i>	Çin	KR153040
IRNCQ	<i>Cheiranthus cheiri</i>	İran	AP017762
IRNDM	<i>Chrysanthemum sp.</i>	İran	AP017763
IRNKBS58	<i>S. loeselii</i>	İran	AP017768
IRNKBS65	<i>S. loeselii</i>	İran	AP017769
IRNKhCa	<i>B. oleracea var. botrytis</i>	İran	AP017770
IRNMY57	<i>B. rapa</i>	İran	AP017778
IRNRaNi3	<i>R. rugosum</i>	İran	AP017780
IRNRK	<i>R. rugosum</i>	İran	AP017783
IRNRkaraj	<i>R. rugosum</i>	İran	AP017784
IRNRN6	<i>R. rugosum</i>	İran	AP017785
IRNST	<i>S. loeselii</i>	İran	AP017794
IRNTH	<i>Hirschfeldia incana</i>	İran	AP017795
IRNT1m1	<i>Impatiens balsamina</i>	İran	AP017796
IRNTOFS2	<i>S. loeselii</i>	İran	AP017799

Bu amaçla, seçilen izolatların kendi içlerinde ve dünya izolatlarıyla göstermiş oldukları benzerlik oranları, ClustalW programı ile analiz edildikten sonra nükleotit ve aminoasit düzeyinde belirlenmiştir. Ayrıca izolatların benzerlik oranları Sequence Demarcation Tool Version 1.2 (SDTv1.2) ile görüntülenmiştir (Muhire et al. 2014). Türk TuMV izolatlarının dünya TuMV izolatları ile filogenetik ilişkileri ise CLC Main Workbench (V.8.1) programında belirlenmiştir. Bu amaçla ilk olarak CLC Main Workbench (V.8.1) programında Neighbor Joining yöntemi ile kiamura80 parametresi ve 1000 tekrarlı bootstrap analizi uygulanarak elde edilmiştir. Filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde Potyvirus cinsinde yer alan ve filogenetik açıdan TuMV'ye en yakın virüslerden biri olan *Japanese yam mosaic virus* (JYMV) dış grup olarak kullanılmıştır (Yasaka et al. 2017).

SONUÇLAR

Arazi çalışmaları ve DAS-ELISA testleri sonuçları

Yürütülen arazi çalışmalarında Manisa'dan 13 ve İzmir'den ise 18 örnek olmak üzere toplam 31 virüs ve virüs-benzeri semptom gösteren örnek alınmıştır. Toplanan örneklerin DAS-ELISA yöntemi ile TuMV enfeksiyonu bakımından testlenmesi sonucunda 23 tanesinin (%74.2) TuMV ile enfekteli olduğu bulunmuştur. Enfekteli bulunan örneklerin 15 tanesi İzmir, 8 tanesi ise Manisa'dan toplanan örnekler içerisinde elde edilmiştir. TuMV ile enfekteli bulunan bitkilerde tipik olarak mozaik ve damar açılması semptomları gözlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. DAS-ELISA testi sonucu Şalgam mozaik virüsü ile enfekteli bulunan bamyaya bitkisinin yapraklarındaki mozaik ve damar açılması belirtilerini gösteren bir fotoğraf.

RT-PCR çalışmaları

Bu aşama izolatların moleküler karakterizasyonu amacı ile yürütülmüş olup, sadece DAS-ELISA testleri sonucunda TuMV ile enfekteli olduğu belirlenen izolatlar arasından seçilen örnekler için gerçekleştirilmiştir. RT-PCR çalışmaları, Manisa ve İzmir illerinden alınan ve TuMV ile enfekteli olduğu DAS-ELISA sonucunda belirlenen 4'er izolat için gerçekleştirilmiştir.

RT-PCR analizleri sonucunda seçilen izolatların hepsinden 1178 bp büyüklüğünde ve hedef NIB+CP genlerine karşılık gelen ürünler elde edilmiştir. Daha sonra RT-PCR ile çoğaltılan örnekler içerisinde seçilen İzmir iline ait TuMV2 ve Manisa iline ait TuMV6 izolatları, NIB+CP gen bölgelerinin klonlanması çalışmalarında kullanılmıştır.

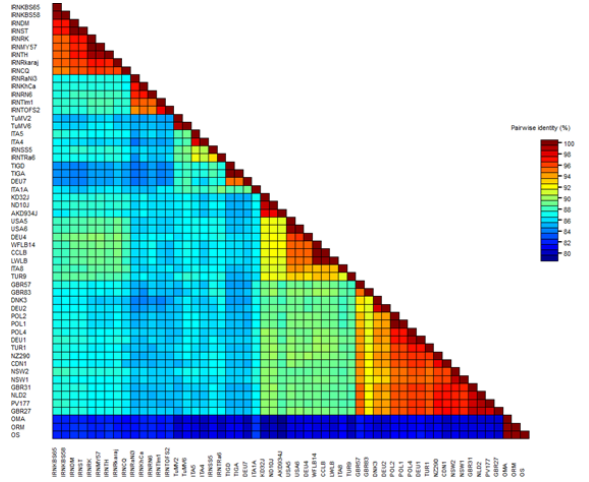
Klonlama ve sekanslama çalışmaları

Seçilen TuMV-2 (İzmir) ve TuMV-6 (Manisa) kodlu izolatların NIB+CP gen bölgelerinin klonlama çalışmaları sırasında, istenilen gen bölgelerini taşıyan plazmidler saflaştırılmış ve sahip oldukları nükleotit dizileri, M13-F ve M13-R primerleri ile çift yönlü olarak belirlenmiştir. Sekanslama sonucunda, her iki TuMV bamyaya izolatının 1178 bp'lik hedef gen bölgesinin nükleotit dizisinin tamamı elde edilmiştir. Elde edilen nükleotit dizileri kullanılarak, izolatların sahip oldukları amino asit dizileri belirlenmiştir.

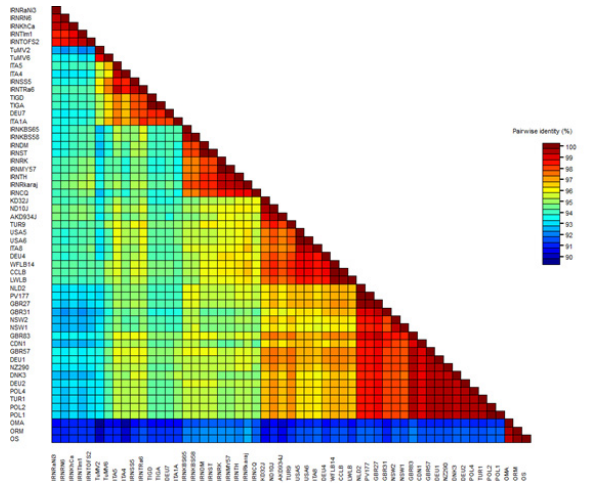
Çoklu dizi karşılaştırmaları ve filogenetik analizler

Gerçekleştirilen çoklu nükleotit ve amino asit dizi analizleri sonucunda bamyaya bitkisinden elde edilen TuMV izolatlarının kendi içlerinde %98'in üzerinde benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Dünya TuMV izolatları ile nükleotit ve amino asit düzeyinde gerçekleştirilen karşılaştırmalarda ise; ülkemiz bamyaya TuMV izolatlarının genel olarak dünya

TuMV izolatları ile nükleotit düzeyinde %84-88, aminoasit düzeyinde ise %91-94 oranında benzerlikler gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 2 ve 3).

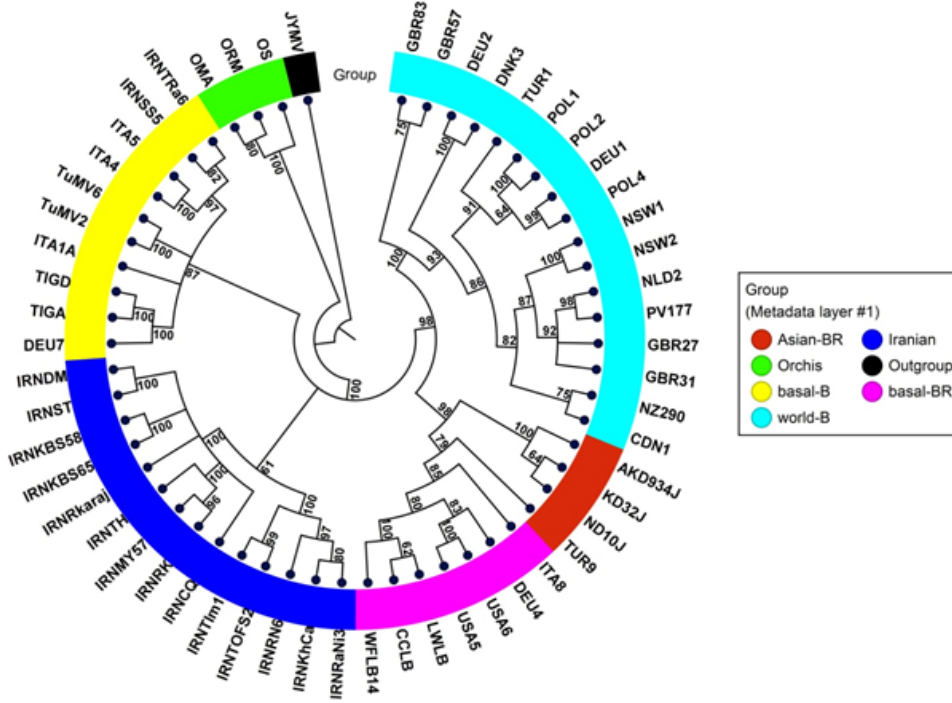


Şekil 2. Ülkemiz bamyaya Şalgam mozaik virüsü izolatlarının dünya izolatları ile nükleotit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları

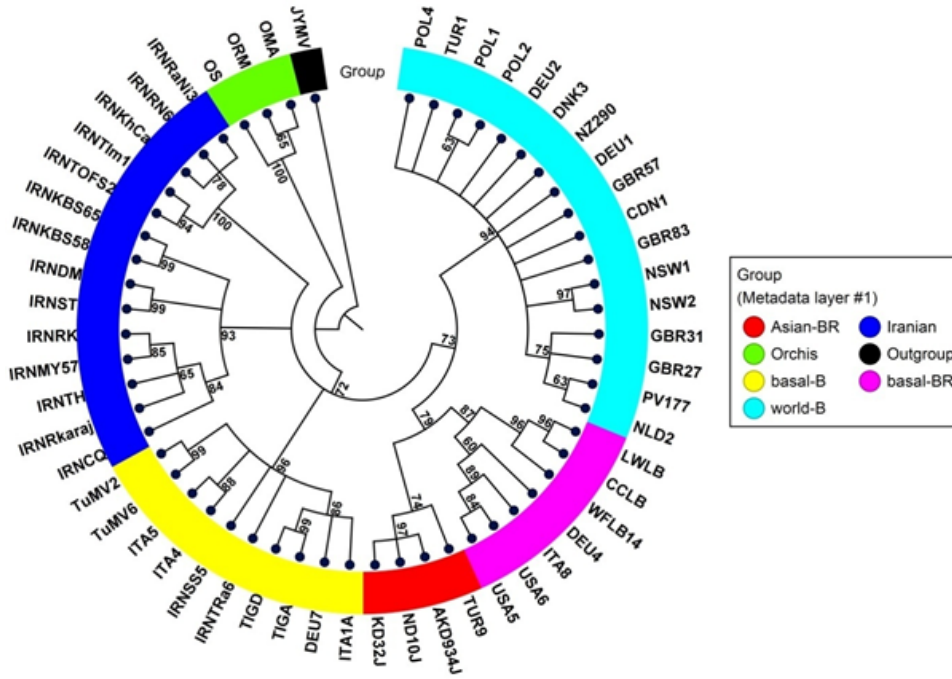


Şekil 3. Ülkemiz bamyaya Şalgam mozaik virüsü izolatlarının dünya izolatları ile amino asit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranları

Ülkemiz bamyaya TuMV izolatlarının dünya izolatları ile olan filogenetik ilişkileri incelendiğinde ise; her iki TuMV bamyaya izolatının da hem nükleotit hem de amino asit temelli oluşturulan filogenetik ağaçlarda basal-B grubunda yer aldığı görülmüştür (Şekil 4 ve 5).



Şekil 4. Ülkemiz bamyaya Şalgam mozaik virüsü izolatlarının dünya izolatları ile nükleotid düzeyindeki filogenetik ilişkileri (Filogenetik ağaç neighbor joining methodu ve kiamura80 parametresi kullanılarak oluşturulmuştur. *Japanese yam mosaic virus* dış grup olarak kullanılmıştır. Filogenetik ağaçta %60 bootstrap eşiği uygulanmıştır)



Şekil 5. Ülkemiz bamyaya Şalgam mozaik virüsü izolatlarının dünya izolatları ile amino asit düzeyindeki filogenetik ilişkileri (Filogenetik ağaç neighbor joining methodu ve kiamura80 parametresi kullanılarak oluşturulmuştur. *Japanese yam mosaic virus* dış grup olarak kullanılmıştır. Filogenetik ağaçta %60 bootstrap eşiği uygulanmıştır)

TARTIŞMA VE KANI

Gerçekleştirilen bu çalışma kapsamında, arazide virüs ve benzeri simptom gösteren örneklerdeki TuMV enfeksiyon oranı %74.2 gibi yüksek bir değer olarak elde edilmiştir. Enfeksiyon oranının yüksek çıkmasında, toplanan örneklerin hepsinin virüs ve benzeri simptom gösteren örneklerden alınması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ancak unutulmamalıdır ki elde edilen enfeksiyon oranı TuMV'nin örnekleme yapılan alanlardaki enfeksiyon durumundan ziyade, toplanan örneklerdeki enfeksiyon durumunu yansıtmaktadır. TuMV'nin bamyada bitkisinde enfeksiyon meydana getirdiğinin ilk raporu olan çalışmada da araştırmacılar yapraklarında kloroz, damar açılması, nekroz ve gelişme geriliği gösteren 10 bitkiden örnek aldıklarını belirtmişler ve gerçekleştirdikleri testlemeler sonucunda toplanan örneklerin tamamının TuMV ile enfekteli olduğunu belirtmişlerdir (Gera et al. 2001). Bu çalışma kapsamında toplanan bamyada örneklerinin tamamının viral etmen kaynaklı olduğu düşünülen simptom taşımalarına rağmen, bazı örneklerin TuMV enfeksiyonu bakımından negatif olarak bulunmasının nedeninin ise bu örneklerde bamyayı enfekte eden diğer virüs etmenlerinin varlığından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Nitekim dünyada gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda bamyada enfeksiyon meydana getiren çok sayıda viral etmenin varlığı bildirilmiştir (Ndunguru and Rajabu 2004, Seth et al. 2017).

Ülkemizde daha önce gerçekleştirilen birçok çalışmada, TuMV enfeksiyonu, ağırlıklı olarak, *Brassicaceae* familyasına ait bitkilerde tespit edilmiştir (Karanfil ve Korkmaz 2016, Korkmaz et al. 2006, 2008). TuMV'nin bamyada bitkilerinde enfeksiyon gerçekleştirdiği şimdiye kadar sadece İsrail'den bildirilmiştir (Gera et al. 2001). İsrail'den sonra ilk kez bamyada üretim alanlarındaki TuMV enfeksiyonu ülkemizde bu çalışma ile tespit edilmiştir. Bu bağlamda bamyanın da TuMV'nin doğal konukçusu olduğu teyit edilmiştir.

Gerçekleştirilen moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda bamyada TuMV izolatlarının birbirleri ile yüksek oranda sekans homolojisine sahip olduğu belirlenmiştir. Genel olarak aynı bölge izolatlarının birbirleri ile yüksek sekans homolojisine sahip olması beklenen bir olgu olarak göze çarpmaktadır. Dünyada konu hakkında yapılan çalışmaların bazılarında da aynı bölge orijinli TuMV izolatlarının yüksek seviyede sekans homolojisi gösterdiği bildirilmiştir (Ohshima et al. 2002, Stavelone et al. 1998). Rusya'da gerçekleştirilen başka bir çalışmada da, Rus TuMV izolatlarının kendi aralarındaki benzerlik oranının %95 olduğu bildirilmiştir (Zubareva et al. 2013). Bu bağlamda belirtilen çalışmalar ile bu çalışma sonucunda elde edilen benzerlik oranları birbirleri ile paralellik göstermektedir.

Bamyada TuMV izolatlarının dünya izolatları ile göstermiş olduğu benzerlik oranları incelendiğinde ise düşük sayılabilecek seviyede benzerlikler gösterdiği söylenebilir. TuMV'nin filogenetik sınıflandırılması sonucu 6 farklı grup ortaya çıkarılmasına rağmen, gruplar içi benzerlik seviyelerinin genel olarak daha yüksek bir oranda çıktığı bilinmektedir (Yasaka et al. 2017, Zubareva et al. 2013). Bu nedenle bamyada TuMV izolatlarından en az birinin tüm genom içeriklerinin belirlenmesinin, etmenin evrimine yönelik yeni bilgilerin elde edilmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Nitekim TuMV izolatlarının evrimi ile ilgili yapılan çalışmada da etmenin tarihsel süreçteki evrimi ile ilgili daha kesin yorumlar için, ülkemizin de içinde bulunduğu coğrafyadan çok daha fazla sayıda tüm genom sekans dizilimlerinin gerekli olduğu bildirilmiştir (Yasaka et al. 2017).

Bugüne kadar gerçekleştirilen farklı çalışmalar sonucunda, ülkemiz TuMV izolatlarının oldukça zengin bir genetik çeşitliliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Ülkemizde gerçekleştirilen bir çalışmada TuMV izolatlarının world-B ve Asian-BR grubunda olduğu belirlenmiştir (Korkmaz et al. 2008). Ülkemiz izolatları kullanılarak son yıllarda gerçekleştirilen başka bir çalışmada da, ülkemiz izolatlarının, içlerinde basal-B'nin de olduğu 3 farklı gruba dağıldığı görülmektedir (Yasaka et al. 2017). Bu sebeple bu çalışmada analiz edilen bamyada TuMV izolatlarının basal-B grubunda bulunması, beklenen bir durum olarak açıklanabilir. Bu bağlamda bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, ülkemizde TuMV'nin moleküler olarak tanımlanmasına yönelik gerçekleştirilen çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

Ülkemiz bamyada üretim alanlarında TuMV enfeksiyonunun tespit edilmesinin etmenin etiyolojisine yönelik önemli bir bulgu olduğu düşünülmektedir. Gerçekleştirilen bu çalışma ile ülkemiz bamyada üretim alanlarında ilk kez bir virüs hastalığının tanımlanmasının yanı sıra, fitopatolojik açıdan da ilk kez bir hastalıkla ilgili çalışma gerçekleştirilmiştir. Etmenin moleküler karakterizasyon aşamasının tam olarak tamamlanması amacı ile de en az bir bamyada TuMV izolatının tüm genom diziliminin ortaya çıkarılarak, bilim camiası ile paylaşılması düşünülmektedir. Gerçekleştirilmesi muhtemel sonraki çalışmalar ile TuMV'nin muhtemel konukçusu olabilecek diğer yazlık bitkilerin tespitinin de önemli olduğu düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: FHD-2018-2471.

ÖZET

Şalgam mozaik virüsü (*Turnip mosaic virus*, TuMV) geniş konukçu dizisine sahip olan bir virüs türü olup, gerek dünyada gerekse ülkemizde birçok sebze türünde saptanmıştır. Bununla birlikte ülkemizde *Malvaceae* familyasına bağlı yazlık bir sebze olan bamyada bitkisinde TuMV'nin enfeksiyonuna yönelik herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu amaçla 2017 yılı bamyada üretim sezonunda İzmir ve Manisa illeri bamyada üretim alanlarından 31 adet virüs ve virüs benzeri semptom gösteren bamyada örnekleri toplanmıştır. Toplanan örnekler double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) yöntemi ile TuMV'nin varlığının belirlenmesi amacıyla testlenmiştir. Testlemeler sonucunda 23 örnek (%74.2) TuMV ile enfekteli olarak bulunmuştur. Enfekteli bulunan örnekler içerisinde seçilen iki TuMV izolatının moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda seçilen izolatların kısmi nükleer inclusion b ve kapsid protein gen bölgeleri, reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) yöntemi ile çoğaltılmış ve daha sonra klonlanmış ve sekans dizileri elde edilmiştir. İzolatların sekans analizi sonucu elde edilen nükleotid dizileri kullanılarak dünya izolatları ile benzerlik oranları ve filogenetik ilişkileri belirlenmiştir. Yapılan çoklu sekans karşılaştırmaları sonucunda TuMV izolatlarının dünya izolatları ile %84-88 ve %91-94 oranında sırası ile nükleotid ve amino asit düzeyinde benzerlikler gösterdiği tespit edilmiştir. Filogenetik analizler sonucunda ise bamyada bitkisinden elde edilen TuMV izolatlarının basal-B grubunda olduğu bulunmuştur. Gerçekleştirilen bu çalışma ile ülkemiz bamyada üretim alanlarında TuMV varlığı ilk kez belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: TuMV, benzerlik, NIB, CP, klonlama, filogenetik

KAYNAKLAR

Clark M.F., Adams A.N., 1977. Characteristics of the microplate methods of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475-483.

Erkan S., Gümüş M., Paylan İ.C., Duman İ., Ergün M., 2013. İzmir ili ve çevresindeki bazı kışlık sebzelerde görülen viral etmenlerin saptanması. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 50 (3), 311-322.

Gera A., Lampel M., Cohen J., Rosner A., 2001. Okra (*Hibiscus esculentus*)—a new host of *Turnip mosaic virus* in Israel. *Plant Disease*, 85 (3), 336.

Karagül S., 2002. Bamyada (*Abelmoschus esculentus* L. (Monch)). *Alatarım*, 1 (2), 54-58.

Karanfil A., Korkmaz S., 2016. Çanak kale 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.

Korkmaz S., Onder S., Tomitaka Y., Ohshima K., 2006. First report of *Turnip mosaic virus* on Brassicaceae crops in Turkey. *New Disease Reports*, 14, 25.

Korkmaz S., Tomitaka Y., Onder S., Ohshima K., 2008. Occurrence and molecular characterization of Turkish isolates of *Turnip mosaic virus*. *Plant Pathology*, 57, 1155-1162.

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, 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 (9), 1-8.

Ndunguru J., Rajabu A.C., 2004. Effect of *Okra mosaic virus* disease on the above-ground morphological yield components of okra in Tanzania. *Scientia Horticulturae*, 99, 225-235.

Nguyen H.D., Trana H.T.N., Ohshima K., 2013a. Genetic variation of the *Turnip mosaic virus* population of Vietnam: a case study of founder, regional and local influences. *Virus Research*, 171, 138-149.

Nguyen H.D., Tomitaka Y., Ho S.Y.W., Duchene S., Vetten H.J., Lesemann D., Walsh J.A., Gibbs A.J., Ohshima K., 2013b. *Turnip mosaic potyvirus* probably first spread to Eurasian brassica crops from wild orchids about 1000 years ago. *PLoS One* 8 (2), e55336. doi:10.1371/journal.pone.0055336.

Ohshima K., Yamaguchi Y., Hirota R., Hamamoto T., Tomimura K., Tan Z.Y., Sano T., Azuhata F., Walsh J.A., Fletcher J., Chen J.S., 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, 1511-1521.

Provvidenti R., 1996. *Turnip mosaic potyvirus*. In: *Viruses of plants*. Brunt A.A., Crabtree K., Dallwitz M.J., Gibbs A.J., Watson L. (Eds.). CAB International, Wallingford, 1340-1343 p.

Ribeiro-Junior M.R., Baldini L.F.S., Nozaki D.N., Cruciol G.C.D., Pantoja K.F.C., Marchi B.R., Moura M.F., Pavan M.A., Krause-Sakate R., 2018. Biological and molecular characterization of a basal-B brassica/raphanus turnip mosaic virus isolate from *Eruca sativa*. *Tropical Plant Pathology*, 43 (4), 371-375.

Riechmann J.L., Lain S., Garcia J.A., 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. Journal of General Virology, 73, 1-16.

Seth T., Chattopadhyay A., Dutta S., Hazra P., Singh B., 2017. Genetic control of Yellow Vein Mosaic Virus disease in okra and its relationship with biochemical parameters. Euphytica, 213, 30, DOI 10.1007/s10681-016-1789-9.

Sevik M.A., 2016. Viruses infecting Brassica crops in the Black Sea Region of Turkey. Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science, 66 (7), 553-557.

Stavolone L., Alioto D., Ragozzino A., Laliberte J.F., 1998. Variability among *Turnip mosaic potyvirus* isolates. Phytopathology, 88 (11), 1200-1204.

Tomimura K., Spak J., Katis N., Jenner C.E., Walsh J.A., Gibbs A.J., Ohshima K., 2004. Comparisons of the genetic structure of populations of *Turnip mosaic virus* in West and East Eurasia. Virology, 330, 408-423.

Walsh J.A., Jenner C.E., 2002. *Turnip mosaic virus* and the quest for durable resistance. Molecular Plant Pathology, 3, 289-300.

Yasaka R., Fukagawa H., Ikematsu M., Soda H., Korkmaz S., Golnaraghi A., Katis N., Ho S.Y.W., Gibbs A.J., Ohshima K., 2017. The timescale of emergence and spread of *Turnip mosaic potyvirus*. Scientific Reports, 7, 4240.

Zubareva I.A., Vinogradova S.V., Gribova T.N., Monakhos S.G., Skryabin, K.G., 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.

Cite this article: Karanfil A., Korkmaz S., (2019) Detection and molecular characterization of *Turnip mosaic virus* infecting okra in Turkey, Plant Protection Bulletin, 59-3. DOI: 10.16955/bitkorb.517700

Atıf için: Kaptan S., Akşit T., Spodek M., (2019). Bamya bitkisinde Şalgam mozaik virüsü (*Turnip mosaic virus*)'nün tespiti ve moleküler karakterizasyonu, Bitki Koruma Bülteni, 59-3. DOI: 10.16955/bitkorb.517700