



Türkiye şeker pancarı üretim alanlarına ait topraklardan elde edilen *Beet soil-borne virus* izolatlarının kılıf protein genine göre moleküler karakterizasyonu

✉ Ebru ERKAN, ✉ Nazlı Dide KUTLUK YILMAZ*

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 55139 Atakum Samsun

Özet

Şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.), Türkiye'de şeker endüstrisinin hammaddesi olup, yaygın olarak yetiştirilmektedir. Pancar bitkisi, plazmodiophorid vektör *Polymyxa betae* tarafından taşınan bazı toprak kaynaklı virüsler tarafından enfekte edilmektedir. Taksonomik olarak *Virgaviridae* familyası içinde yer alan ve *Pomovirus* cinsine ait *Beet soil-borne virus* (BSBV) ve *Beet virus Q* (BVQ) şeker pancarında enfeksiyon oluşturan toprak kökenli virüs türleridir. Bu virüslerden BSBV, Türkiye'de ilk olarak 2003 yılında kayıt edilmiş ve daha sonra şeker pancarı üretim alanlarında oldukça yaygın olduğu (% 49.8) belirlenmiştir. Bu çalışmada, BSBV ile bulaşık 10 toprak örneği coğrafik orjinlerine göre rastgele seçilmiş ve bu toprak örneklerinden tuzak bitki testi yöntemiyle elde edilen izolatlar, moleküler yönden analiz edilmiştir. BSBV kılıf protein (CP) genine spesifik primerler ile uygulanan RT-PCR yöntemi ve elde edilen DNA ürünlerinin baz dizi analizi sonrasında, tüm BSBV izolatlarının CP bölgelerinin 495 nükleotit ve 164 amino asit (aa) içerdiği tespit edilmiştir. İlginç bir şekilde, farklı lokasyonlardan elde edilen 9 BSBV izolatı birbirleriyle karşılaştırıldığında, bu izolatların aa düzeyinde % 100 benzer oldukları saptanmıştır. Bununla birlikte, Yozgat ilinden elde edilen YZT-355S izolatının, diğer izolatlarla aa benzerlik oranının % 98.17 olduğu ve 92., 121. ve 122. pozisyonlarda yer alan aa'lerin diğer Türkiye izolatları ve daha önce tanımlanan BSBV dünya izolatlarından farklılık sergilediği tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, 24 BSBV izolatının (bu çalışmadan 10 ve GenBank'tan 14) filogenetik analizi, tüm izolatların I, II, III ve IV olmak üzere dört ana grupta toplandığını göstermiştir. Grup I'e ait Türkiye izolatları iki alt gruba (alt grup a ve c) ayrılırken, diğer Türkiye izolatları grup III ve grup IV içerisinde yer almışlardır.

Anahtar Kelimeler: BSBV, CP, RNA-2, RT-PCR, Sekans analizi

Molecular characterization based on coat protein gene of *Beet soil-borne virus* isolates obtained from the soils of sugar beet growing areas in Turkey

Abstract

Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) is widely grown in Turkey as a raw material for the sugar industry. The beet plant is infected by some soil-borne viruses, which are transmitted by the plasmodiophorid vector *Polymyxa betae* Keskin. Among the members of the genus *Pomovirus* in the family *Virgaviridae*, *Beet soil-borne virus* (BSBV) and *Beet virus Q* (BVQ) only infect sugar beet. In Turkey, BSBV was the first reported in 2003 and then was found to be very common (49.8%) in the sugar beet production areas. In the current study, 10 BSBV-infested soil samples were randomly selected according to their geographic origin, and the isolates derived from the soil samples by bait plant technique were molecularly analyzed. RT-PCR performed using BSBV-CP specific primers and sequence analysis revealed that the CP regions of all Turkish BSBV isolates consisted of 495 nucleotides and 164 amino acid (aa) residues. Interestingly, 9 BSBV isolates obtained from different locations had the same aa identity (100%) when those isolates were compared with each other. However, the isolate YZT-355S obtained from Yozgat province shared 98.17% aa identity with the corresponding sequences of other isolates, and had differences at the 92., 121. and 122. aa positions of the CP region when compared with other Turkish and previously identified BSBV isolates in the world. Besides this, phylogenetic analysis of 24 BSBV isolates (10 from this study and 14 retrieved from GenBank) showed that all isolates were clustered in four main groups, I, II, III and IV. Turkish isolates belonged to group I were divided into two subgroup (subgroup a, c) while the other Turkish isolates were clustered into group III and group IV.

Keywords: BSBV, CP, RNA-2, RT-PCR, Sequencing

© 2022 Türkiye Toprak Bilimi Derneği. Her Hakkı Saklıdır

* Sorumlu yazar:

Tel. : 0 (362) 312-1919
E-posta : nazlik@omu.edu.tr

Makale Türü: ARAŞTIRMA MAKALESİ

Geliş Tarihi : 26 Ocak 2022 e-ISSN : 2146-8141
Kabul Tarihi : 21 Mayıs 2022 DOI : 10.33409/tbbbd.1062915

Giriş

Şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.) *Amaranthaceae* familyasında yer alan iki yıllık, yüksek verimli bir endüstri bitkisi olup, Türkiye’de şeker sanayinin hammaddesi olarak kullanılmaktadır. Türkiye, 336.348 ha alanda gerçekleştirilen 23.025 milyon tonluk üretim ile Fransa, Almanya, Amerika Birleşik Devletleri ve Rusya’nın ardından dünyada beşinci sırada yer almaktadır (Anonymous, 2020).

Türkiye’de şeker ve şeker pancarı, kota sistemine göre üretildiğinden, hedeflenen şeker pancarı üretiminin aksamaması büyük önem taşımaktadır. Bu üretimin gerçekleşmesinde en başta verim ve kalitesi yüksek çeşitlerin ekimiyle birlikte, uygun üretim tekniklerini uygulayarak ve bitki koruma tedbirlerini alarak, maksimum verim temini temel hedeftir. Şeker pancarı üretiminde verimi olumsuz etkileyen sebepler arasında hastalıklar önemli bir yere sahiptir. Günümüzde hem ülkemizde, hem de dünyada toprak kökenli virüs hastalıkları pancar üretimini tehdit etmektedir. Nitekim, *Beet soil-borne virus* (BSBV) bu hastalıklara sebep olan başlıca virüsler arasında yer almakta olup, toprakta yaşayan vektör protozoa *Polymyxa betae* Keskin tarafından taşınmaktadır (Ivanovic ve ark., 1983).

BSBV, dar bir konukçu çevresine sahip olup, ıspanak (*Spinacia oleracea* L.), *Chenopodium quinoa* L. ve *Beta* cinsine ait türleri enfekte edebilmektedir (Henry ve ark., 1986). Bu virüs, tarımsal açıdan en önemli konukçusu olan şeker pancarında, ilk olarak 1980’lerin ortalarında İngiltere’de rapor edilmiştir (Henry ve ark., 1986). Takiben, tüm Avrupa (Meunier ve ark., 2003), Türkiye (Meunier ve ark., 2003; Kutluk Yılmaz ve ark., 2016), Orta Doğu (Mouhanna ve ark., 2002), İran (Farzadfar ve ark., 2002), ABD (Lindsten ve Rush, 1994), Çin (Wang ve ark., 2008), Fas (Nouayti ve ark., 2019), Brezilya (Camelo-Garcia ve ark., 2019) ve yakın zamanda ise Japonya’da (Nakagami ve ark., 2022) varlığı kayıt edilmiştir.

Taksonomik sınıflandırmaya göre BSBV, *Virgaviridae* familyasının *Pomovirus* cinsi içerisinde gruplandırılmıştır (Adams ve ark., 2009). Bu cinsin tipik üyesi *Potato mop-top virus* (PMTV) (Savenkov ve ark., 1999) olup, *Broad bean necrosis virus* (BBNV) (Lu ve ark., 1998), *Colombian potato soil-borne virus* (CPSbV) (Gil ve ark., 2016), şeker pancarını enfekte edebilen bir diğer tür *Beet virus Q* (BVQ) (Koenig ve ark., 1998) cinsin diğer türleri arasında yer almaktadır. Bu türlere ek olarak, patatesten enfeksiyon oluşturan *Pomovirus* benzeri başka bir virüsün de kısmi baz dizisi elde edilmiş, *Soil-borne virus 2* (SbV2) olarak adlandırılmış ve geçici olarak bu gruba dahil edilmiştir (Gil ve ark., 2016).

BSBV, pozitif polariteli, üç adet tek iplikli RNA içeren (RNA-1, RNA-2, RNA-3) rijit çubuk şeklinde partiküllerden oluşmaktadır (Barbarossa ve ark., 1992; Savenkov, 2021). RNA-1, replikasyonla ilgili proteinleri (Koenig ve Loss, 1997); RNA-2, kılıf protein (CP) ve CP-readthrough (CP-RT) proteinlerini kodlamaktadır (Koenig ve ark., 1997). En küçük segment olan RNA-3’den ise üçlü (triple) gen bloğu proteinleri (TGBp 1, 2 ve 3) sentezlenmekte ve bu proteinler virüs partiküllerinin hücreden hücreye taşınmasında görev almaktadır (Koenig ve ark., 1996).

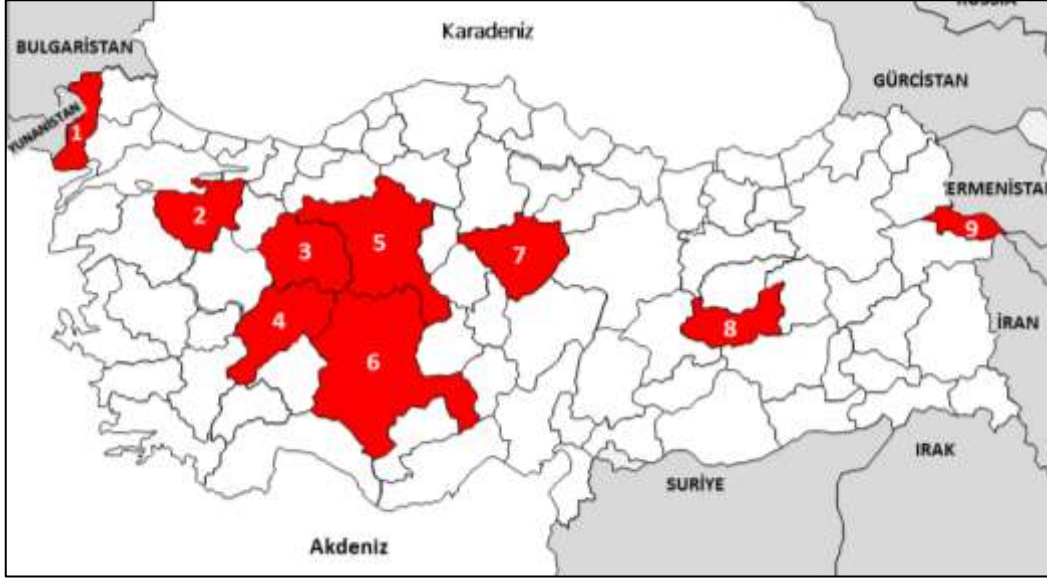
BSBV şeker pancarında tek olarak enfeksiyona neden olabilmekle birlikte, aynı vektör ile taşınan ve rhizomania hastalığının etmeni olan *Benyvirus* cinsinden *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) ve/veya bir diğer *Pomovirus* üyesi BVQ ile ortak enfeksiyon da oluşturabilmektedir (Meunier ve ark., 2003). Bu virüslerin karışık enfeksiyonu sonucu bitkilerde oluşan tipik semptomların BNYVV’den kaynaklandığı; BSBV ve/veya BVQ’nun tek olarak pancarda belirgin bir semptom oluşumuna neden olmadığı ifade edilmektedir (McGrann ve ark., 2009). BNYVV ile enfekteli bitkilerin yapraklarının rengi açılarak fıstık yeşili bir renk almakta ve aşırı yan kök gelişiminden dolayı köklerde sakallanma oluşmaktadır (Özgür, 2003). Bununla birlikte, Koenig ve ark. (2000) BSBV’nin çok sayıda mutantının olmasından dolayı, aynı toprak örneğinde yetişen bitkilerde bile patojenisinde farklılık olabileceği ve bu sebeple BSBV’nin pancarda % 0 ile % 70 arasında verim kaybı oluşturabileceğini bildirmişlerdir.

Ülkemizde, daha önce yürütülen çalışmalarla, pancar üretim alanlarında toprak kökenli virüslerden BSBV, BNYVV ve BVQ’nun varlığı belirlenmiştir (Meunier ve ark., 2003; Kutluk Yılmaz ve Arli-Sökmen, 2010; Kutluk Yılmaz ve ark., 2016; Erkan ve Kutluk Yılmaz, 2017). Ayrıca, bu virüslerden, özellikle BNYVV’nin farklı genom segmentlerinin moleküler karakterizasyonları üzerinde detaylı çalışmalar yürütülmüştür (Kutluk Yılmaz ve ark., 2007, 2016, 2018; Özmen ve ark., 2020). Ancak, BSBV dünyada ve ülkemizde yaygın bir virüs türü olmasına rağmen, genetik çeşitliliği hakkındaki bilgiler sınırlıdır (Koenig ve ark., 1996, 1997; Koenig ve Loss, 1997; Moradi ve ark., 2021). Bu çalışmada, Türkiye’nin farklı coğrafik bölgelerinden elde edilen BSBV izolatlarının kılıf protein genom bölgesine göre moleküler karakterizasyonu hedeflenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Toprak örnekleri

Daha önce yürütülen çalışma ile, Türkiye şeker pancarı üretim alanlarına ait incelenen toprak örneklerinin % 49.8'inin BSBV ile bulaşık olduğu saptanmıştır (Kutluk Yılmaz ve ark., 2016). Bir önceki çalışmada BSBV ile bulaşık olarak belirlenen örnekler içerisinde, Türkiye'de 9 ilden coğrafik orjinlerine göre seçilen 10 toprak örneği bu çalışmanın ana materyalini oluşturmuştur (Şekil 1, Çizelge 1).



Şekil 1. Çalışmada kullanılan toprak örneklerinin temin edildiği iller. Kırmızı renkli ve numaralı alanlar, örneklerin temin edildiği illeri göstermektedir. 1:Edirne, 2:Bursa, 3:Eskişehir, 4:Afyonkarahisar, 5:Ankara, 6:Konya, 7:Yozgat, 8:Elazığ, 9:Iğdır.

Çizelge 1. Tuzak bitki testi çalışmalarında kullanılan toprak örnekleri ve temin edildikleri lokasyonlar

İl	İlçe	Köy	Örnek no
Afyonkarahisar	Dinar	İshaklı	259
Ankara	Ayaş	Mucar	617
Ankara	Türbealtı	Merkez	625
Bursa	Yenişehir	Çardak	148
Edirne	Merkez	Bosna	125
Elazığ	Kovancılar	Yazıbaşı	38
Eskişehir	Çifteler	Merkez	225
Iğdır	Karakoyunlu	Taşburun	9
Konya	Çeltik	Hacıosmanoğlu	373
Yozgat	Yenifakılı	Merkez	355

Şeker pancarı tohumları

Bu çalışmada kullanılan şeker pancarı tohumları (cv. Ansa) Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş. Şeker Enstitüsü'nden temin edilmiştir.

Tuzak bitki testi yöntemi

BSBV ile bulaşık 10 toprak örneği, tuzak bitki testi çalışmalarında kullanılmıştır (Şekil 1, Çizelge 1). Ayrıca, BSBV ve diğer toprak kökenli virüsler (BNYVV ve BVQ) ile bulaşık olmadığı bilinen (Kutluk Yılmaz ve ark., 2016), bir toprak örneği de negatif kontrol olarak denemelere dahil edilmiştir. Bu topraklar 1: 1 oranında steril kum ile karıştırılmıştır. Takiben, bu toprak-kum karışımları plastik saksılara doldurularak, her birine 10'ar adet şeker pancarı (cv. Ansa) tohumu ekilmiştir. Saksılar iklim odasına yerleştirilip, altı hafta süre ile 25°C gündüz ve 20°C gece sıcaklığında tutulmuş ve haftada bir kez Hoagland besin solüsyonu (Dijkstra ve De Jager, 1998) ile sulanmıştır. Daha sonra, her bir saksıda gelişen şeker pancarı bitkileri hasat edilmiş ve bitki kökleri musluk suyunda yıkanarak topraktan arındırılmıştır (Meunier ve ark., 2003). Takiben, bu bitkilerin kök bölgeleri alınmış ve RNA izolasyon çalışmalarında kullanılmak üzere ayrı ayrı etiketlenerek -80°C'deki derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Reverse-transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)

BSBV ile enfekteli (10 adet) ve sağlıklı bitkilerin köklerinden toplam RNA'lar RNeasy RNA İzolasyon Kiti (Qiagen) kullanılarak firmanın önerilerine göre izole edilmiştir. RNA-2 segmenti tarafından kodlanan CP geninin çoğaltılmasında, [Lennefors ve ark. \(2005\)](#)'nın belirttikleri BSBV/F (5'-CATTACGTCATCTGTTAAGATG-3') ve BSBV/R (5'-GGCGGAGCAGTTGATTGCTA-3') primerleri kullanılmıştır. RT-PCR çalışmaları iki aşamalı olarak yürütülmüştür. Öncelikle, RT basamağında Omniscript RT kiti (Qiagen) kullanılmış ve kit protokolü takip edilerek çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, cDNA'ya dönüştürülmüş olan izolatların kılıf protein bölgesi, bu bölgeye spesifik primerler kullanılarak çoğaltılmıştır. Bu basamakta ise Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fischer Scientific) enzimi kullanılmıştır. PCR reaksiyonu; 2.5 µl cDNA, 10 µl 5X GC Buffer, 1 µl dNTP mix (10 mM), her bir primerden (10 µM) 2.5 µl, 1.5 µl DMSO, 0.5 µl Phusion DNA Polymerase enziminden oluşmuştur. Toplam reaksiyon hacmi, RNase içermeyen su ile 50 µl'ye tamamlanmıştır. Amplifikasyonlar, 25 döngü olacak şekilde 98°C'de 30 s başlangıç denatürasyon basamağından sonra, 98°C'de 10 s, 54.2°C'de 30 s, 72°C'de 30 s ve 1 döngü 72°C'de 5 dk ile tamamlanmıştır.

PCR ürünleri TBE tampon çözeltisinde hazırlanan % 1'lik agaroz jelde (0.5 µg/ml ethidium bromür içeren) 90 mA sürekli akımda elektroforez yöntemi ile analiz edilmiştir. Jeldeki PCR fragmentlerinin analizi ise GelDoc 2000 (Biorad) görüntüleme sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Nükleotit dizi analizleri ve *Beet soil-borne virus* izolatlarının filogenetik ilişkilerinin araştırılması

Çoğaltımı sağlanan BSBV izolatlarına ait PCR ürünlerinden 40'ar µl ve önerilen konsantrasyonda hazırlanan (5 pmol) BSBV-spesifik primerler sekans analizinde kullanılmıştır. Sekans analizleri, Sanger Dizileme Yöntemine göre ticari bir firma (Genoks, Ankara) tarafından gerçekleştirilmiştir. Sekans analizi sonrasında, MEGA 7 programında ([Kumar ve ark., 2016](#)) Clustal W ([Thompson ve ark., 1994](#)) yöntemi kullanılarak BSBV izolatlarına ait her iki yönde (ileri ve geri) elde edilen ham sekans verileri hizalanmış, düzgün okunan kısımlar alınarak konsensus nükleotit dizileri oluşturulmuştur. Daha sonra, BSBV izolatlarına ait bu konsensus diziler; hem kendi aralarında, hem de NCBI'dan indirilen dünyadaki diğer BSBV izolatlarına ait sekans verileri ile BLAST analizine tabi tutularak genetik benzerlik veya farklılıkları ortaya konulmuştur. Ayrıca, Mega 7 yazılımında yer alan Tamura-Nei Modeli ([Tamura ve Nei, 1993](#)) kullanılarak izolatların genetik uzaklıkları belirlenmiş ve Maximum Likelihood (ML) algoritmasına göre ([Felsenstein, 1981](#)) filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Filogenetik analizde 24 farklı BSBV izolatına ait sekans verisi (bu çalışmaya ait 10 ve GenBank'tan 14) kullanılmıştır (Çizelge 4). Bootstrap değeri olarak 1.000 alınmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Doğada vektör *P. betae* ile taşınan ve taksonomik olarak *Benyvirus* ve *Pomovirus* cinsleri içerisinde sınıflandırılan toprak kökenli virüsler, önemli patojen gruplarından biri olup, şeker pancarında büyük ölçüde verim kaybına neden olabilmektedirler. Ayrıca bu virüsler vektörleri olan *P. betae*'nin kalın duvarlı dinlenme sporları içerisinde toprakta en az 15 yıl canlı kalabilmektedirler ([Mehrvar, 2009](#)). Nitekim toprak kaynaklı virüs türlerinden biri olan BVQ'nun ülkemiz pancar üretim alanlarında oldukça yaygın (% 88.35) olduğu tespit edilmiştir ([Erkan ve Kutluk Yılmaz, 2017](#)). Daha önce yürütülen bir diğer çalışma ile de, Türkiye'de yoğun olarak şeker pancarı yetiştirilen 32 ile ait, incelenen 632 toprak örneğinin % 49.8'inin BSBV ve % 38'inin ise BNYVV ile bulaşık olduğu saptanmıştır ([Kutluk Yılmaz ve ark., 2016](#)). Bu çalışmada, BSBV ile bulaşık olarak belirlenen örnekler içerisinde, coğrafik orjinlerine göre seçilen 10 örnekte (Çizelge 1) BSBV'nin CP bölgesine spesifik primerler ile yürütülen RT-PCR çalışmaları sonucunda, incelenen örneklerin tamamında BSBV için beklenen büyüklükte (495 bp) DNA ürünü elde edilmiştir (Sonuç gösterilmedi).

Daha sonra, farklı lokasyonlara ait 10 BSBV izolatının CP bölgesine ait PCR ürünlerinin nükleotit dizileri elde edilmiş ve bu diziler NCBI'a gönderilerek, OL870481-OL870490 kayıt numaraları altında GenBank'a kayıt edilmiştir (Çizelge 4). Bu çalışmada kullanılan BSBV izolatlarının RNA-2 genomik segmentine ait sekans analizi yapılan bölgenin uzunluğu 495 baz kadar olup, 164 aa kodlamakta ve CP bölgesinin tamamını içermektedir. İzolatların kendi aralarındaki genetik benzerliklerin incelenmesi amacıyla NCBI'daki BLASTn algoritması kullanılmıştır. Buna göre; IGR-9S ile ELZ-38S izolatlarının birbirleriyle, ESK-225S, AFY-259S ve ANK-625S izolatlarının ise kendi aralarında CP genine göre nükleotit düzeyinde % 100 benzer oldukları belirlenmiştir. Diğer beş BSBV izolatının ise nükleotit düzeyinde yüksek oranda (% 97.17-% 99.80) birbirleriyle benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir. Farklı coğrafik alanlardan elde edilen 10 BSBV izolatının CP gen bölgesinde farklılık belirlenen nükleotit pozisyonları Çizelge 2'de gösterilmiştir.

Almanya'ya ait Ahlum izolatu (U64512) referans alınarak oluşturulan bu çizelgede, Türkiye izolatlarının maksimum 17 pozisyonda birbirlerinden farklılık sergilediği tespit edilmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. BSBV izolatlarının kılıf protein bölgesinde farklılık belirlenen nükleotit pozisyonları [Almanya'ya ait Ahlum izolatu (U64512) referans olarak kullanılmıştır]

Ülke	İzolatu adı	Nükleik asit pozisyon numaraları																
		33	36	60	72	99	120	153	168	171	183	192	194	201	204	207	225	227
Almanya	Ahlum	A	T	A	T	T	C	G	A	G	T	T	C	C	C	A	T	A
Türkiye	EDR-125S	A	.	.	.	A
Türkiye	BRS-148S	.	.	.	C	A	.	T	.	.	.
Türkiye	YZT-355S	.	.	.	A	C	.	.	G	.	.	.	A	.	T	.	C	.
Türkiye	IGR-9S, ELZ-38S	C	.	.	G	.	.	.	A	.	T	.	C	.
Türkiye	KNY-373S	C	.	.	G	.	.	.	A
Türkiye	ANK-617S	G	.	.	.	C	A
Türkiye	ESK-225S, AFY-259S, ANK-625S	C	A

Çizelge 2.Devam

Ülke	İzolatu adı	Nükleik asit pozisyon numaraları																
		246	264	274	297	318	329	351	360	361	364	393	396	415	441	447	456	495
Almanya	Ahlum	G	A	G	G	C	T	A	G	G	G	C	C	A	T	C	A	G
Türkiye	EDR-125S	T	.	.	A
Türkiye	BRS-148S	A
Türkiye	YZT-355S	.	.	A	A	A	A	.	T	.	A	T	.	.
Türkiye	IGR-9S, ELZ-38S	A	A	T	.	.
Türkiye	KNY-373S	.	.	.	A	.	.	.	A	T	G	.
Türkiye	ANK-617S	A	T	G	.
Türkiye	ESK-225S, AFY-259S, ANK-625S	A	T	G	.

Kılıf protein genom bölgesi için bu çalışmada incelenen BSBV izolatlarının dünya izolatları ile BLASTn analizi ile nükleotit düzeyinde karşılaştırılması sonucu; EDR-125S (Edirne) ve BRS-148S (Bursa) izolatları, Polonya'ya ait WSBcp izolatu ile sırasıyla % 99.36 ve % 99.39 oranları ile en yüksek benzerliğe sahip olmuştur. Yozgat ili şeker pancarı üretim alanından elde edilen YZT-355S izolatu en yüksek genetik benzerliğe Türkiye'ye ait (Tokat) TR1 izolatu ile (% 99.19); IGR-9S ve ELZ-38S izolatları ise Türkiye'den TR1 ve TR3 izolatları ile (% 99.39) göstermiştir. KNY-373S izolatu nükleotit düzeyinde en yüksek benzerliği Çin'e ait pBSBV-cp061027-1 izolatu ile (% 99.39); ANK-617S izolatu, Polonya'ya ait PL izolatu ile (% 99.19) sergilemiştir. Diğer taraftan, ESK-225S, AFY-259S ve ANK-625S izolatları ise % 99.39 oran ile Polonya'ya ait PL ve JBScp izolatları ve ayrıca Çin'e ait pBSBV-cp061027-1 izolatu ile benzerlik göstermişlerdir.

İzolatlarının kendi aralarındaki amino asit (aa) düzeyindeki benzerliklerini incelemek amacıyla ise NCBI'daki Blastp analizi uygulanmış ve İğdır (IGR-9S), Elazığ (ELZ-38S), Edirne (EDR-125S), Bursa (BRS-148S), Eskişehir (ESK-225S), Afyonkarahisar (AFY-259S), Ankara (ANK-617S ve ANK-625S) ve Konya (KNY-373S) illerinden elde edilen dokuz BSBV izolatının birbirleriyle aa düzeyinde % 100 benzer oldukları saptanmıştır. Ayrıca, Yozgat ilinden elde edilen YZT-355S izolatının ise, diğer izolatlarla benzerlik oranının % 98.17 olduğu belirlenmiş olup 92. [Aspartat (D) → Asparagin (N)], 121. [Glutamat (E) → Lizin (K)] ve 122. [Aspartat (D) → Asparagin (N)] pozisyonlarda yer alan aa'lerin diğer izotlardan farklılık sergilediği tespit edilmiştir (Çizelge 3).

Çizelge 3. Türkiye şeker pancarı üretim alanlarından elde edilen BSBV izolatlarının kılıf protein gen bölgesinde farklılık belirlenen amino asit pozisyonları [Almanya'ya ait Ahlum izolatu (U64512) referans olarak kullanılmıştır]

Ülke	İzolatu adı	Amino asit pozisyon numaraları			
		65	92	121	122
Almanya	Ahlum	T	D	E	D
Türkiye	IGR-9S, ELZ-38S, EDR-125S, BRS-148S, ESK-225S, AFY-259S, KNY-373S, ANK-617S, ANK-625S	N	.	.	.
Türkiye	YZT-355S	N	N	K	N

Bu çalışmadaki BSBV izolatları kılıf protein bölgesi bakımından dünya izolatları ile BLASTp yöntemi ile karşılaştırıldığında, ülkemizin farklı coğrafik bölgelerden elde edilen 9 BSBV izolatı, Çin'e ait pBSBV-cp061027-1 izolatı ile % 100 benzer bulunmuştur. YZT-355S izolatı ise diğer incelenen 9 BSBV izolatından farklı olarak Çin, Almanya Polonya, Brezilya ve Türkiye'ye ait bahsedilen sıraya göre; pBSBV-cp061027-1 ve XJ, Ahlum, PL, Brazilian ve TR3 izolatları ile % 98.17 oran ile en yüksek benzerliği göstermiştir. Ayrıca, bu çalışmada incelenen BSBV izolatlarının tamamının, [Lennefors ve ark. \(2005\)](#), [Wang ve ark. \(2008\)](#) ve [Moradi ve ark. \(2021\)](#)'nın belirttikleri gibi, Almanya'ya ait Ahlum izolatında 65. aa pozisyonunda belirtilen Treonin (T) ([Koenig ve ark., 1997](#)) yerine, Asparagin (N) içerdikleri belirlenmiştir (Çizelge 3).

BSBV dünyada yaygın bir virüs olmasına rağmen, tam genom dizisi ve genetik çeşitliliği hakkındaki bilgiler sınırlıdır. Bununla birlikte, BSBV'nin şu ana kadar, bir Alman izolatı (BSBV-G), iki Çin (BSBV-XJ ve BSBV-IM) ([Koenig ve ark., 1996; 1997; Koenig ve Loss, 1997; Wang ve ark., 2008](#)) ve yakın zamanda ise iki Türkiye izolatının (TR1 ve TR2) tam genom dizi analizleri gerçekleştirilmiştir ([Moradi ve ark., 2021](#)). Tokat iline ait iki Türkiye izolatı ile yürütülen genom analizi çalışmasında, diğer gen bölgeleri ile kıyaslandığında, en fazla genetik varyasyonun RNA-3 tarafından kodlanan TGB-3'de görüldüğü bildirilmiştir ([Moradi ve ark., 2021](#)). Ayrıca, aynı çalışmada, Türkiye izolatlarının CP'nin karboksilik ucunda korunmuş ¹²¹EDSALNVAHQL₁₃₁ şeklinde aa diziliminin bulunduğu dikkat çekilmiştir ([Moradi ve ark., 2021](#)). Bu çalışmada ise, incelenen 9 BSBV izolatının benzer şekilde aa dizilimi içerdiği tespit edilmekle birlikte; YZT-355S izolatının ¹²¹KNSALNVAHQL₁₃₁ şeklindeki motif ile incelenen tüm dünya izolatlarından farklılık sergilediği belirlenmiştir.

Kılıf protein bölgesine ait nükleotit dizileri, virüslerin intraspesifik değişkenliği ve filogenetik ilişkilerini araştırmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır ([Lennefors ve ark., 2005](#)). Bu çalışmada, farklı lokasyonlara ait 10 BSBV izolatının CP bölgesine ait PCR ürünlerinin nükleotit dizileri elde edilmiş ve NCBI veri tabanındaki diğer BSBV izolatlarının dizileri ile Clustal W yöntemi kullanılarak hizalanmıştır. Daha sonra BSBV izolatları arasındaki filogenetik ilişki ML yöntemine göre Mega 7 yazılımı ile analiz edilmiştir. Clustal W analizi ve filogenetik çalışmalarda kullanılan BSBV izolatlarına ait bilgiler, Çizelge 4'de verilmiştir.

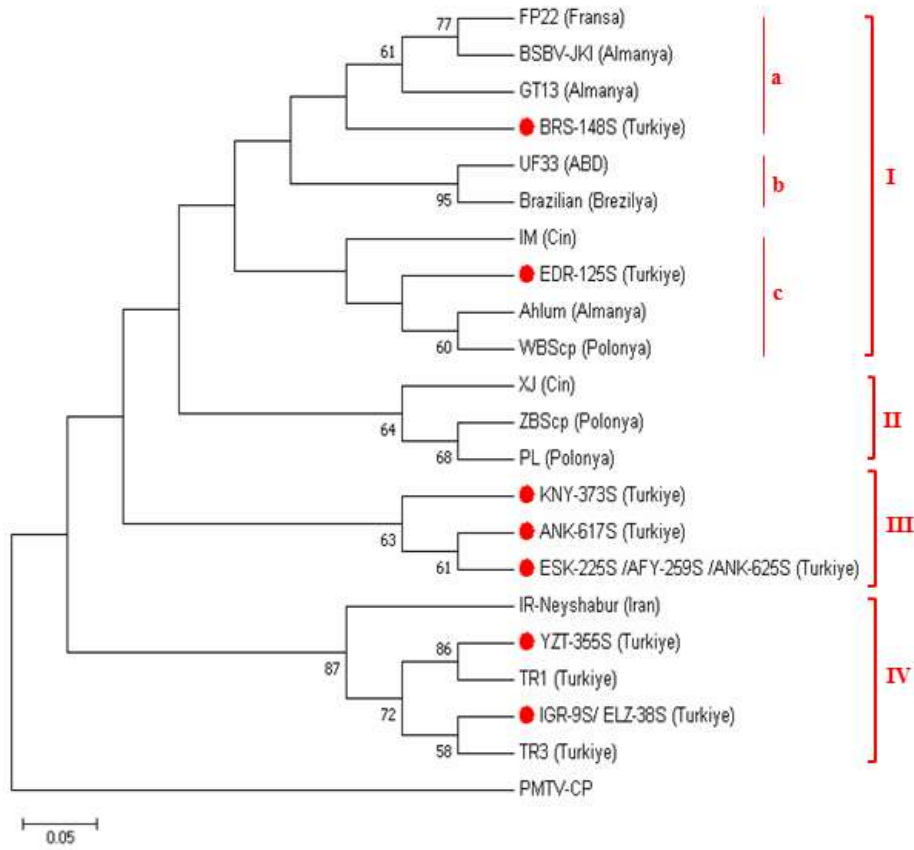
BSBV izolatlarına ait ML dendogramı incelendiğinde, bu izolatların dört ayrı dala ayrıldığı belirlenmiştir (Şekil 2). Buna göre, Türkiye'ye ait BSBV izolatlarının, 3 ayrı dalda kümelendikleri gözlenmiştir (Grup I, Grup III ve Grup IV). Marmara bölgesine ait BSBV izolatları Grup I içerisinde toplanmıştır. Grup I'in kendi içerisinde de, 3 alt kola ayrıldığı görülmüştür. Buna göre; Bursa ilinden elde edilen BRS-148S izolatının Almanya (BSBV-JKI ve GT13) ve Fransa (FP22) izolatları ile (Grup I-a); Edirne ilinden elde edilen EDR-125S izolatının ise Almanya'dan Ahlum ve Polonya'dan WBScp izolatları ile (Grup-I-c) ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Grup I-b'de ise ABD (UF33) ve Brezilya (Brazilian)'ya ait izolatlar yer almıştır (Şekil 2). Dendogramda Grup III olarak işaretlenen alt dal, % 63 bootstrap değeriyle desteklenen ayrı soydan köken alarak ayrılmış ve sadece İç ve Batı Anadolu Bölgesi'lerine ait Türkiye izolatlarından oluşmuştur. Bu grup içerisinde; Konya (KNY-373S), Ankara (ANK-617S ve ANK-625S), Eskişehir (ESK-225S) ve Afyonkarahisar (AFY-259S) illerinden elde edilen BSBV izolatları yer almıştır (Şekil 2). ML ağacı incelendiğinde; Grup IV'ün % 87'lik bootstrap değeriyle desteklenen ayrı soy hattından kaynaklandığı saptanmıştır. Bu grup içerisinde, Doğu Anadolu Bölgesi'nden, Iğdır (IGR-9S) ve Elazığ (ELZ-38S) illerine ait izolatlar ile İç Anadolu Bölgesi'nden Yozgat (YZT-355S) izolatı ve bir diğer çalışma ile Tokat ilinden elde edilen (TR1 ve TR3) izolatlar ([Moradi vd, 2021](#)) ve İran'a ait IR-Neyshabur izolatı gruplanmıştır (Şekil 2). Grup II ise, Çin (XJ) ve Polonya'ya ait iki BSBV izolatından (ZBscp ve PL) oluşmuştur (Şekil 2).

Sonuç

Yürütülen moleküler çalışmalar sonucunda, 10 BSBV izolatının CP genom bölgesinin nükleotit dizileri elde edilmiştir. BSBV izolatlarının Dünya izolatları ile BLASTn analizi ve elde edilen filogenetik ağaç, Türkiye şeker pancarı üretim alanlarından elde edilen izolatların üç farklı gruba ayrıldıklarını göstermiştir. Elde edilen bu sonuç, CP geni bakımından BSBV Türkiye izolatlarının coğrafik orjinlerine göre genetik farklılıklarının olduğunu ortaya koymuştur.

Teşekkür

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisi (PYO.ZRT.1904.12.015) tarafından desteklenmiş olup, çalışmada kullanılan toprak örnekleri TÜBİTAK (TOVAG: 1100188) projesi kapsamında toplanmıştır.



Şekil 2. Beet soil-borne virus (BSBV) izolatlarının ve GenBank (NCBI) veri tabanında kayıtlı bazı BSBV izolatlarının kılıf protein genine göre nükleotid dizileri esas alınarak oluşturulan filogenetik ağaç. Filogenetik analizde, Maximum Likelihood yöntemi ve Tamura-Nei modeli kullanılmıştır. Dendogramda bootstrap değerleri, dallarda % olarak gösterilmiş ve % 50'nin altındaki değerler ağaçta yer almamıştır. Ölçek, aynı pozisyon için baz değişim miktarını göstermektedir (0.05). Pomovirus cinsi üyesi Potato mop-top virus (PMTV), filogenetik ağacın oluşturulmasında dış grup olarak kullanılmıştır. Referans izolatlara ait bilgiler Çizelge 4'te yer almaktadır.

Çizelge 4. Çalışmada kullanılan *Beet soil-borne virüs* izolatları

Ülke	Lokasyon	İzolat	GenBank Kayıt No	Literatür
Türkiye	Iğdır	IGR-9S	OL870481	Bu çalışma
Türkiye	Elazığ	ELZ-38S	OL870482	Bu çalışma
Türkiye	Edirne	EDR-125S	OL870483	Bu çalışma
Türkiye	Bursa	BRS-148S	OL870484	Bu çalışma
Türkiye	Eskişehir	ESK-225S	OL870485	Bu çalışma
Türkiye	Afyonkarahisar	AFY-259S	OL870486	Bu çalışma
Türkiye	Yozgat	YZT-355S	OL870487	Bu çalışma
Türkiye	Konya	KNY-373S	OL870488	Bu çalışma
Türkiye	Ankara	ANK-617S	OL870489	Bu çalışma
Türkiye	Ankara	ANK-625S	OL870490	Bu çalışma
Türkiye	Tokat	TR1	MN087412	Moradi ve ark. (2021)
Türkiye	Tokat	TR3	MN087415	Moradi ve ark. (2021)
İran	Neyshabur	IR-Neyshabur	FN386613	Crutzen ve ark. (2009)
Almanya	-*	Ahlum	U64512	Koenig ve ark. (1997)
Almanya	Thurnhof	GT13	AJ810287	Lennefors ve ark. (2005)
Almanya	-	BSBV 1825732	MK731955	Gaafar ve Ziebell (yayınlanmamış veri)
Fransa	Pithiviers	FP22	AJ810286	Lennefors ve ark. (2005)
Polonya	-	WBScp	EU785965	Borodynko ve ark. (2009)
Polonya	-	ZBScp	EU785967	Borodynko ve ark. (2009)
Polonya	-	PL	FJ971718	Borodynko ve ark. (2009)
Çin	Xinjiang	XJ	EF545141	Wang ve ark. (2008)
Çin	Inner Mongolia	IM	EF545140	Wang ve ark. (2008)
ABD	Fort Morgan	UF33	AJ810288	Lennefors ve ark. (2005)
Brezilya	-	Brazilian	MH106715	Camelo-Garcia ve ark. (2019)

Kaynaklar

- Adams MJ, Antoniv JF, Kreuze J, 2009. Virgaviridae: a new family of rod-shaped plant viruses. *Archives of Virology*, 154: 1967-1972.
- Anonymous, 2020. Food and Agriculture Organization Statistics Division. Available from URL: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. (Erişim Tarihi: 20 Ocak 2022)
- Barbarossa L, Vetten HJ, Kaufmann A, Lesemann DE, Koenig R, 1992. Monoclonal antibodies to beet soil-borne virus. *Annals of Applied Biology*, 121: 143-150.
- Borodynko N, Rymelska N, Hasiow-Jaroszewska B, Pospieszny H, 2009. Molecular characterization of three soil-borne sugar beet-infecting viruses based on the coat protein gene. *Journal of Plant Pathology*, 91 (1): 191-193.
- Camelo-Garcia VM, Rezende JAM, Nagata T, 2019. First report of beet soil-borne virus on red table beet in Brazil. *Plant Disease*, 103: 2146.
- Crutzen F, Mehrvar M, Gilmer D, Bragard C, 2009. A full-length infectious clone of beet soil-borne virus indicates the dispensability of the RNA-2 for virus survival in planta and symptom expression on *Chenopodium quinoa* leaves. *Journal of General Virology*, 90: 3051-3056.
- Dijkstra J, De Jager CP. 1998. *Practical Plant Virology. Protocols and Exercises*. The Netherlands: Department of Virology, Wageningen Agricultural University.
- Erkan E, Kutluk Yilmaz ND, 2017. Prevalence of Beet virus Q in sugar beet production areas of Turkey. *Journal of Turkish Phytopathology*, 46: 53-60.
- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17 (6): 368-376.
- Farzadfar S, Pourrahim R, Golnaraghi AR, Shahraeen N. 2002. First report of beet soil-borne virus on sugar beet in Iran. *Plant Disease*, 86: 187.
- Gil JF, Adams I, Boonham N, Nielsen SL, Nicolaisen M, 2016. Molecular and biological characterization of two novel pomovirus-like viruses associated with potato (*Solanum tuberosum*) fields in Colombia. *Archives of Virology*, 161: 1601-1610.
- Henry CM, Jones RAC, Coutts RHA, 1986. Occurrence of a soil-borne virus of sugar beet in England. *Plant Pathology*, 35: 585-591
- Ivanovic M, Macfarlane I, Woods RD, 1983. Viruses of sugar beet associated with *Polymyxa betae*. *Ann. Rep. Rothamstead Exp. Stn.*, 189-190.
- Koenig R, Beier C, Commandeur U, Lüth U, Kaufmann A, Lüddecke P, 1996. Beet soil-borne virus RNA-3- a further example of the heterogeneity of the gene content of furovirus genomes and of triple gene block-carrying RNAs. *Virology*, 216: 202-207.
- Koenig R., Loss S., 1997. Soil-borne virus RNA-1: genetic analysis enabled by a starting sequence generated with primers to highly conserved helicase-encoding domains. *Journal of General Virology*, 78: 3161-3165.
- Koenig R, Commandeur U, Loss S, Beiner C, Kaufmann A, Lesemann DE, 1997. Soil-borne virus RNA-2: similarities and dissimilarities to the coat protein gene-carrying RNAs of other furoviruses. *Journal of General Virology*, 78: 469-477.
- Koenig R, Pleij C WA, Beier C, Commandeur U, 1998. Genome properties of Beet virus Q, a new furo-like virus from sugar beet, determined from unpurified virus. *Journal of General Virology*, 79: 2027-2036.
- Koenig R, Pleij CW, Büttner G, 2000. Structure and variability of the 3' end of beet soil-borne pomovirus: a virus with uncertain pathogenic effects. *Archives of Virology*, 145: 1173-1181.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870-1874.
- Kutluk Yilmaz ND, Meunier A, Schmit JF, Stas A, Bragard C, 2007. Partial nucleotide sequence analysis of Turkish isolates of Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) RNA-3. *Plant Pathology*, 56: 311-316.
- Kutluk Yilmaz ND, Arlı Sökmen M, 2010. Occurrences of sugar beet soilborne viruses transmitted by *Polymyxa betae* Northern and Central Parts of Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 92 (2): 497-500.
- Kutluk Yilmaz ND, Arlı Sokmen M, Kaya R, Sevik MA, Tunali B, Demirtas S, 2016. The widespread occurrences of Beet soil-borne virus and RNA-5 containing Beet necrotic yellow vein virus isolates in sugar beet production areas in Turkey. *European Journal of Plant Pathology*, 144: 443-455.
- Kutluk Yilmaz ND, Arlı-Sökmen M, Kaya R, 2018. P25 pathogenicity factor deletion mutants of Beet necrotic yellow vein virus occurring in sugar beet fields in Turkey. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 125: 89-98.
- Lennefors L, Savenkov EI, Mukasa SB, Valkonen JPT, 2005. Sequence divergence of four soilborne sugar beet-infecting viruses. *Virus Genes* 31: 57-64.

- Lindsten, K, Rush CM, 1994. First report of Beet soilborne virus in the United States. *Plant Disease*, 78: 316.
- Lu X, Yamamoto S, Tanaka M, Hibi T, Namba S. 1998. The genome organization of the broad bean necrosis virus (BBNV). *Archives of Virology*, 143: 1335-1348.
- McGrann GRD, Grimmer MK, Mutasa-Gottgens ES, Stevens M. 2009. Progress towards the understanding and control of sugar beet rhizomania diseases. *Molecular Plant Pathology*, 10: 129-141.
- Mehrvar M, 2009. Diversity of soil-borne sugar beet viruses in Iran: a comprehensive study of Beet necrotic yellow vein virus, Beet black scorch virus and other pomoviruses in Iran. Ph.D. Thesis. Universite Catholique de Louvain, Belgium, 160 pp.
- Meunier A, Schmit JF, Stas A, Kutluk N, Bragard C, 2003. Multiplex reverse transcription for simultaneous detection of Beet Necrotic Yellow Vein Virus, Beet Soilborne Virus, and Beet Virus Q and their vector *Polymyxa betae* KESKIN on sugar beet. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (4): 2356-2360.
- Moradi Z, Maghdoori H, Nazifi E, Mehrvar M, 2021. Complete genomic characterization of two Beet soil-borne virus isolates from Turkey: Implications of comparative analysis of genome sequences. *Plant Pathology Journal*, 37 (2): 152-161.
- Mouhanna AM, Nasrallah A, Langen G, Schlösser E. 2002. Surveys for beet necrotic yellow vein virus (the cause of Rhizomania), other viruses, and soil-borne fungi infecting sugar beet in Syria. *Journal of Phytopathology*, 150: 657-662.
- Nakagami R, Chiba S, Yoshida N, Senoo Y, Saito M, Iketani S, Kondo H, Tamada T, 2022. Epidemic progress of beet necrotic yellow vein virus: Evidence from an investigation in Japan spanning half a century. *Plant Pathology*. 71:715-728.
- Nouayti F, Tahiri A, Madani I, Blenzar A, Lahlali R, 2019. Detection and prevalence of viruses associated with sugar beet in the Tadla region of Morocco. *Journal of Plant Pathology*, 101: 173-177.
- Özgür OE, 2003. Türkiye Şeker Pancarı Hastalıkları (1. Basım). Ankara: Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş. Genel Müdürlüğü Yayınları.
- Özmen CY, Khabbazi SD, Khabbazi AD, Gürel S, Kaya R, Oğuz MÇ, Turan, F, Rezaei F, Kibar U, Gürel E, Ergül A, 2020. Genome composition analysis of multipartite BNYVV reveals of genetic re-assortment in the isolates of Asia Minor and Thrace. *Scientific Reports*, 10: 4129.
- Savenkov, E, Sandragen M, Valkonen JPT, 1999. Complete sequence of RNA 1 and presence of tRNA-like structures in all RNAs of potato mop-top virus, genus Pomovirus. *Journal of General Virology*, 80: 2779-2784.
- Savenkov E, 2021. Pomoviruses (Virgaviridae). In: Bamford, D.H, Zuckerman, M. (Eds.) *Encyclopedia of Virology (Fourth Edition)*, Academic Press, Elsevier, Volume 3, pp. 603-611.
- Tamura K, Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 512-526.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 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: 4673-4680.
- Wang B, Li M, Zhang J, Han C, Li D, Yu J, 2008. First report of beet soil-borne virus on sugar beet in China. *Plant Pathology*, 57: 389.