



## Model bitki *Nicotiana benthamiana*'da Beet necrotic yellow vein virus izolatlarının semptom tipleri ve bazı viral proteinlerin araştırılması

Murat GÜNGÖR, Nazlı Dide KUTLUK YILMAZ\*

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Kurupelit, Samsun

### Öz

Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), dünyada şeker pancarı alanlarında 'rhizomania' olarak adlandırılan hastalığa neden olmaktadır. Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinde şeker pancarı üretim alanlarından elde edilmiş BNYVV ile bulaşık olduğu bilinen 15 toprak örneği kullanılmıştır. Öncelikle, tuzak bitki testi yöntemine göre BNYVV izolatlarının yeniden çoğaltımı sağlanmıştır. Daha sonra, 15 BNYVV izolatu virüsün sistemik konukçusu *Nicotiana benthamiana*'ya mekanik olarak inoküle edilmiştir. Şiddetli (cücelik ve mozayik) ya da zayıf (mozayik) semptom oluşumu gösteren bitkilerin sistemik yapraklarından RNA izolasyonunu takiben, gen spesifik primerler kullanılarak RT-PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda; 15 BNYVV izolatu ile enfekteli *N. benthamiana*'da P31 ile ilgili gen bölgesi saptanmasına rağmen, kılıf protein bölgesi 10 izolatta, P25 bölgesi bir izolatta, P26 bölgesi ise dört izolatta belirlenmiştir. Bu sonuç, *N. benthamiana*'da BNYVV'nin semptom oluşumunda P31 geninin rol oynadığını desteklemiş, P25 ve P26 gen bölgelerinin ise bazı izolatlarda virüsün replikasyonu esnasında tespit edilemediğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** CP, ELISA, Rhizomania, P25, P26, P31, RT-PCR, sekans analizi.

### Investigation of symptom types and viral proteins produced by Beet necrotic yellow vein virus isolates on the model plant *Nicotiana benthamiana*

#### Abstract

Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) causes a disease 'rhizomania' in sugar beet areas in the world. In this study, 15 BNYVV-infested soil samples were selected according to geographic locations. Firstly, BNYVV was propagated as bait plant technique. Then, systemic host *Nicotiana benthamiana* was mechanically inoculated by 15 BNYVV isolates. Some BNYVV isolates induced very strong symptom (dwarfing and mosaic) the others induced mild symptom (mosaic) on *N. benthamiana*. After RNA isolation, RT-PCR studies were conducted by using gene specific primers. This study showed that the P31 gene could be detected in *N. benthamiana* plants infected with 15 BNYVV isolates, the CP gene with only 10 isolates, the P25 gene with one isolate and the P26 gene with four isolates. This result supported that the P31 gene is involved symptom expression on *N. benthamiana* of BNYVV, the P25 and P26 genes were not possible to be detected with some BNYVV isolates during virus replication.

**Keywords:** CP, ELISA, P25, P26, P31, Rhizomania, RT-PCR, Sequencing.

© 2023 Türkiye Toprak Bilimi Derneği. Her Hakkı Saklıdır

### Giriş

Rhizomania, Türkiye'de ve dünyada şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.) üretim alanlarında sıklıkla rastlanan en tahripkar toprak kökenli virüs hastalığıdır (Scholten ve Lange, 2000). Bu hastalığa Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) neden olmakta ve virüs toprak kaynaklı protozoa vektör *Polymyxa betae* Keskin tarafından taşınmaktadır (Keskin, 1964; Tamada ve Kondo, 2013). BNYVV, *P. betae*'nin dinlenme spor yapılarının içerisinde en az 15 yıl enfeksiyon oluşturma yeteneğini korumaktadır. Rhizomania'nın şeker pancarında oluşturduğu en karakteristik belirtisi ise, lateral köklerin aşırı çoğalması sonucu yumruda oluşan kök sakallaması şeklindedir (Liebe ve Varrelmann, 2022).

\* Sorumlu yazar:

Tel. : 0 362 312 1919

E-posta : nazlik@omu.edu.tr

Makale Türü : ARAŞTIRMA MAKALESİ

Geliş Tarihi : 19 Temmuz 2023 e-ISSN : 2146-8141

Kabul Tarihi : 15 Aralık 2023 DOI : 10.33409/tbbbd.1329616

BNYVV, *Benyviridae* familyasının, *Benyvirus* cinsinin bir üyesi olup (Gilmer ve ark., 2017), genomu dört ya da beş adet rijit çubuk şeklinde, pozitif sens tek sarmal RNA partiküllerinden oluşmaktadır (Tamada ve ark., 1989). Bu segmentlerden; RNA-1, RNA'ya bağımlı RNA polimeraz'ı kodlayan bir açık okuma çerçevesi (ORF) içermektedir (Bouzoubaa ve ark., 1987). RNA-2'den sentezlenen ilk gen kılıf protein (CP) geni olup bu gen bir amber UAG durdurma kodonu ile sonlanmakta ve böylelikle virüsün vektör ile taşınması için önemli olan CP-readthrough (CP-RT) proteininin translasyonu gerçekleşmektedir (Haeberle ve ark., 1994; Tamada ve ark., 1996). CT-RT'yi, hücreden hücreye hareketten sorumlu olan üçlü gen blok proteinlerini kodlayan ORF takip etmektedir (Gilmer ve ark., 1992). Bu RNA segmenti üzerindeki 3' terminal ORF'den ise antiviral RNA susturmanın (RNA silencing) baskılanması ile ilgili gen bölgesi sentezlenmektedir (Chiba ve ark., 2013). RNA-3'den şeker pancarındaki şiddetli rizomania hastalığı simptomlarından sorumlu patojenite faktörü olan P25 proteini (Tamada ve ark., 1999); RNA-4'den ise BNYVV'nin vektör *P. betae* ile etkili bir şekilde taşınmasında görev alana P31 proteini kodlanmaktadır (Tamada ve Abe, 1989; Rahim ve ark., 2007). Ayrıca, RNA-4'ün *Nicotiana benthamiana* L. bitkilerinde şiddetli simptom oluşumu (Rahim ve ark., 2007) ve bu segmentten sentezlenen P31 proteininin ise şeker pancarı bitkilerinin köklerinde post transcriptional gene silencing (PTGS)'in baskılanması ile BNYVV'nin virülensinden de sorumlu olduğu bildirilmiştir (Tamada ve Abe, 1989; Tamada ve ark., 1990; Rahim ve ark., 2007). Bazı BNYVV izolatları ise ek olarak, 26 kDa'lık bir proteini (P26) kodlayan RNA-5 partikülünü içermektedir (Koenig ve ark., 1997; Miyanishi ve ark., 1999). RNA-5 ise şeker pancarı köklerinde oluşan simptomların daha şiddetli hale gelmesi ile ilişkilendirilmektedir (Tamada ve ark., 2020).

BNYVV izolatlarının büyük bir kısmı, CP dizilerine göre göre A- ve B-tip olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılmaktadır. Her iki BNYVV tipi de dünya çapında yaygındır (Schirmer ve ark., 2005). Sınırlı yayılım alanına sahip bir diğer tip olan P-tip ise A-tipi ile yakından ilişkili olup bu P-tipi izolatlar, Asya'da yaygın olarak görülen A- ve B-tipi BNYVV izolatlarında bulunan RNA-5'ten (J-tip) filogenetik olarak farklı olan bir RNA-5 taşımaktadır (Koenig ve ark., 1997; Miyanishi ve ark., 1999).

Doğada BNYVV, şeker pancarı, hayvan pancarı, pazı (*B. vulgaris* var. *cicla*), ıspanak (Tamada, 2016) ve *Brassicaceae* familyasının bir üyesi olan yabani turp (*Raphanus raphanistrum* L.)'u (Kutluk Yılmaz ve ark., 2016a) enfekte edebilmektedir. Diğer taraftan; virüs sınırlı konukçu listesine sahip olmakla birlikte, *Chenopodiaceae* familyasına ait birçok bitki türü, *Aizoaceae*, *Solanaceae*, *Caryophyllaceae* ve *Amaranthaceae* familyasında yer alan birkaç bitki türüne bitki özsuynunun mekanik inokulasyonu yöntemi ile taşınabilmektedir (Tamada ve Baba, 1973; Kuszala ve Putz, 1977; Horvath, 1994; Hugo ve ark., 1996). Bu konukçulardan; *Chenopodium quinoa* Willd. ve *Tetragonia expansa* Murr. gibi bitkilerde BNYVV lokal lezyon oluşumuna neden olurken (Gilmer, 2016); *N. benthamiana*, *Spinacia oleracea* L., *B. macrocarpa*, *B. vulgaris* subsp. *maritima* M8 (Tamada, 1975, 2002, 2007) ve *C. murale* (Gilmer, 2016) gibi bazı konukçularında ise virüsün sistemik enfeksiyona neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, BNYVV'nin uzun mesafelere yayılımında konukçu bitki türü ve viral genom kompozisyonunun etkili olduğu belirtilmiştir (Gilmer, 2016).

Ülkemizde BNYVV'nin varlığı ilk olarak 1987 yılında rapor edilmiş (Koch, 1987) olup, daha sonra yürütülen çalışmalarla Türkiye şeker pancarı üretim alanlarının büyük bir kısmının bu virüs ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir (Özer ve Ertunç, 2005; Kutluk Yılmaz ve ark., 2010, 2016b, 2019; Kaya, 2009; Yardımcı ve Çulal Kılıç, 2011). Şu ana kadar yürütülen moleküler çalışmalar ile, ülkemizde A- ve J-tip BNYVV izolatlarının bulunduğu belirlenmiştir (Kruse ve ark., 1994; Kutluk Yılmaz ve ark., 2007, 2010, 2016b). Yakın zamanda ülkemizde yürütülen bir çalışma ile de, farklı virüs tipleri arasında genetik reassortment (parça değişimi) oluşumuna dair bulgular elde edilmiştir (Özmen ve ark., 2020).

Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden elde edilen BNYVV izolatlarının, virüsün sistemik konukçusu olan *N. benthamiana* bitkilerine mekanik yolla aktarımı yapılarak, farklı BNYVV izolatlarının bu bitkide oluşturdukları reaksiyonların incelenmesinin yanısıra, bu model bitkide enfeksiyon anında oluşan BNYVV'nin patojenesinde rol oynayan bazı önemli proteinlerine (CP, P25, P31 ve P26) ait genlerin detaylı olarak irdelenmesi hedeflenmiştir.

## Materyal ve Yöntem

### Toprak örnekleri

Daha önce yürütülen bir çalışma ile, Türkiye'de BNYVV ile bulaşık olarak belirlenen pancar üretim alanlarına ait örnekler içerisinde (Kutluk Yılmaz ve ark., 2016b), coğrafik orjinlerine göre seçilen 15 toprak örneği bu çalışmanın ana materyalini oluşturmuştur (Çizelge 1).

Çizelge 1. Tuzak bitki testi çalışmalarında kullanılan toprak örneklerinin temin edildiği lokasyonlar ile bu topraklarda yetiştirilen şeker pancarlarında Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV)'un DAS-ELISA testi ile bulunma durumu

Örnek no	İzolot adı	Orjin (köy, ilçe, il)	Ortalama ELISA absorbans değeri*
6	IGR-6	Ortaköy, Aralık, Iğdır	0.241 (+)
27	GZP-27	Örtülü, İslahiye, Gaziantep	0.361 (+)
44	ELZ-44	Yedigöze, Merkez, Elazığ	2.926 (+)
61	SMS-61	Yukarı Narlı, Vezirköprü, Samsun	2.743 (+)
106	TKT-106	Köseoğlu, Pazar, Tokat	0.544 (+)
125	EDR-125	Bosna, Merkez, Edirne	3.507 (+)
134	KRL-134	Büyük Mandıra, Babaeski, Kırklareli	3.326 (+)
148	BRS-148	Çardak, Yenişehir, Bursa	3.363 (+)
150	CNK-150	Sarıkaya, Biga, Çanakkale	2.669 (+)
225	ESK-225	Merkez, Çifteler, Eskişehir	2.360 (+)
281	KAS-281	Aşağı Çayırıcık, Taşköprü, Kastamonu	2.757 (+)
291	ADP-291	Merkez, Erenler, Adapazarı	0.361 (+)
524	KYS-524	Mahzemin, Merkez, Kayseri	3.193 (+)
602	KTY-602	Gümel, Simav, Kütahya	3.354 (+)
617	ANK-617	Mucar, Ayaş, Ankara	3.508 (+)
Sağlıklı Kontrol			0.102 (-)

\*: Tuzak bitki testi sonrasında uygulanan ELISA testinde 2 saatlik substrat inkubasyonu sonucu elde edilen ELISA değeri ortalamaları; + = sağlıklı kontrolün 2 katından fazla olan ELISA absorbans değerlerini, -: sağlıklı kontrolün 2 katından daha az olan ELISA absorbans değerini ifade etmektedir.

### Şeker pancarı tohumları

Bu çalışmada, rhizomania'ya hassas cv. Ansa şeker pancarı tohumu kullanılmıştır. Bu çeşidin tohumları Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş. Şeker Enstitüsü'nden temin edilmiştir.

### Tuzak bitki testi yöntemi

Çalışmada coğrafik orjinlerine göre seçilen 15 adet BNYVV ile bulaşık toprak örneği tuzak bitki testi çalışmalarında kullanılmıştır (Çizelge 1). Ayrıca, vektör *P. betae* ile taşınan toprak kökenli virüsler (BNYVV, BSBV ve BVQ) ile bulaşık olmadığı bilinen, bir toprak örneği ise negatif kontrol olarak denemeye dahil edilmiştir (Kutluk Yılmaz ve ark., 2016b). Bu topraklar 1: 1 oranında steril kum ile karıştırıldıktan sonra, hazırlanan bu karışımlar plastik saksılara konularak, 10'ar adet BNYVV'e hassas şeker pancarı tohumları ekilmiştir. Herbir toprak örneği için 3'er tekerrür uygulanmıştır. Takiben, saksılar 14 saat fotoperiyotta, 20°C (gece) ve 25°C (gündüz) sıcaklıklarda iklim odasında tutularak, haftada bir kez Hoagland besin solüsyonu ile sulanmıştır. Altı haftalık yetiştirme periyodu sonrası, tuzak bitkiler hasat edilerek kök bölgeleri alınmış (Meunier ve ark., 2003) ve ayrı ayrı etiketlenerek, biyolojik çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C'deki derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

### Biyolojik çalışmalar

Biyolojik çalışmalarda, BNYVV'nin sistemik konukçusu olan *N. benthamiana* bitkileri kullanılmıştır (Gilmer, 2017). Nitekim, *N. benthamiana*, farklı bitki-patojen interaksiyon çalışmalarında gen ekspresyonunun kıyaslanması ve bitki-patojen interaksiyonlarının irdelenmesi amacıyla model bitki olarak kullanılmaktadır (Goodin ve ark., 2008; Satoh ve ark., 2010). Böylelikle; farklı lokasyonlardan seçilen 15 BNYVV izolatının *N. benthamiana* bitkisinde meydana getirdiği reaksiyonlara göre izolatlar arasında biyolojik olarak herhangi bir farklılığın olup olmadığının incelenmesinin yanısıra, bu bitkide enfeksiyon anında oluşan ve BNYVV'nin patojenitesinde rol oynayan diğer bazı önemli proteinlerine (CP, P25, P31 ve P26) ait genlerin de detaylı olarak irdelenmesi hedeflenmiştir.

Bu amaçla, öncelikle test bitkilerinin tohumları torf içeren plastik kaplara ekilmiştir. Bitkiler uygun inokulasyon dönemine geldiğinde, torf dolu plastik bardaklara şaşırtılarak, 25°C'de iklim odasında inkübe edilmiştir. Fungal hastalık ve böcek zararlarından korumak için bitkiler rutin olarak kontrol edilmiş, zaman zaman yaprak biti ve beyaz sineklere karşı ilaçlama yapılmıştır.

Tuzak bitki testi sonucu 15 farklı BNYVV izolatlarından elde edilen, -80°C'deki derin dondurucuda muhafaza edilen şeker pancarı kök örnekleri biyolojik çalışmalarda kullanılmıştır. Bu amaçla, 1g kök /1g yaprak: 5 ml tampon çözelti olacak şekilde steril havanda homojenize edilmiştir. Tampon çözelti olarak ise %1 oranında

2-mercapto ethanol içeren 0.1 M fosfat tampon çözeltisi kullanılmıştır (Tamada ve Baba, 1973; Liu ve ark., 2005). Elde edilen bitki özsuvarı, üç tekerrürlü olarak 400 mesh'lik karbarandum tozu kılınılarak *N. benthamiana* bitkilerinin yapraklarına inokule edilmiştir. Ayrıca, bir adet bitki ise kontrol olarak bırakılmış ve bu bitkinin yapraklarına sadece tampon çözelti uygulaması yapılmıştır. Virüs inokule edilen bitkilerin yaprakları, karbarandum tozu ve bitki artıklarının arındırılması için musluk suyu altında dikkatlice yıkandıktan sonra, bu bitkiler 20°C/25°C (gece/gündüz) sıcaklık ve 16 saat fotoperiyoda sahip iklim odasında dört hafta süre ile inkübe edilmiştir. Bu süreç içerisinde bitkiler periyodik olarak izlenip, simptomlar kayıt edilmiş ve fotoğrafları çekilmiştir. Takiben, test bitkisinin virüs ile inokule edilen ve inokule edilmeyen yapraklarının bir kısmı alınarak DAS-ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Örneklerin kalan kısımları ise, total RNA ekstraksiyonu çalışmalarında kullanılmak üzere etiketlenerek -80°C'deki derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

### Serolojik çalışmalar

Tuzak bitki testi sonucu elde edilen şeker pancarı kök örneklerinin bir kısmı ile mekanik inokulasyon çalışmaları sonrasında *N. benthamiana* bitkilerinden elde edilen yaprak örnekleri Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (DAS-ELISA) testi çalışmalarında kullanılmıştır. DAS-ELISA yöntemi antiserumun temin edildiği firmanın (Bioreba, İsviçre) açıklamaları göz önüne alınarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ELISA mikroyoklet okuyucusunda (Tecan Spectra II, Avusturya) 405 nm dalga boyunda absorbans değerlerinin alınmasıyla elde edilmiştir. Negatif kontrollerin absorbans değerlerinden iki katı ve daha fazla değer veren örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Meunier ve ark., 2003).

### Reverse-Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Onbeş BNYVV izolatu ile inokule edilen *N. benthamiana* bitkilerinin, virüs inokulasyonu yapılmayan üst yapraklarından örnekleme yapılmıştır. Moleküler çalışmaların maliyetinin oldukça yüksek olması nedeniyle, 15 BNYVV izolatu'nun mekanik olarak aktarıldığı *N. benthamiana* bitkilerine ait üç tekerrürün tamamında, RNA izolasyonu yapılamamış, ancak her bir izolata ait birer tekerrür seçilerek çalışmalar yürütülmüştür. Bu tekerrürlerin seçiminde, ELISA absorbans değeri (en yüksek absorbans değeri) ile bitkide oluşan simptomlar göz önüne alınmıştır (Çizelge 1). Sağlıklı ve BNYVV izolatları ile inokuleli *N. benthamiana* bitkilerinin yapraklarından, toplam 16 örnekte toplam RNA'lar RNeasy RNA İzolasyon Kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak firmanın önerilerine göre izole edilmiştir. Böylelikle, test bitkilerinde gözlenen sistemik simptomların BNYVV enfeksiyonundan kaynaklanıp kaynaklanmadığının net olarak ortaya konulması ve *N. benthamiana*'nın üst yapraklarında farklı BNYVV izolatlarının enfeksiyon esnasında oluşturdukları; virüsün patojenitesi ve simptom oluşumunda rol oynayan bazı önemli proteinlerine (CP, P25, P31 ve P26) ait gen bölgelerinin RT-PCR yöntemi ile araştırılması amaçlanmıştır.

BNYVV izolatlarının RNA-2 tarafından kodlanan kılıf protein (CP) bölgesinin çoğaltılmasında uygulanan RT-PCR çalışmalarında Lennefors ve ark. (2005)'in belirttikleri BNYVV/F ve BNYVV/R primerler kullanılmıştır (Çizelge 2). Öncelikle, 17 örnekte Omniscript Reverse Transcription kit (Qiagen, Almanya) ile cDNA sentezi, kit protokolü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu; 10 µl 5xGC Buffer, 1 µl 10 mM dNTP mix, her bir primerden (10 µM) 2.5 µl, 1.5 µl DMSO, 2.5 µl cDNA ve 0.5 µl enzimden (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase; ThermoFisher Scientific, ABD) oluşturulmuştur. Toplam reaksiyon hacmi 19.5 µl RNase içermeyen su ile 40 µl'ye tamamlanmıştır. Amplifikasyonlar Bio-Rad MJ Mini PCR Thermocycler'da, 25 döngü olacak şekilde 98°C'de 30" başlangıç denatürasyon basamağından sonra, 98°C'de 10", 54.2°C'de 30", 72°C'de 30" ve 1 döngü 72°C'de 5' şeklinde uygulanmıştır.

Çizelge 2. Moleküler çalışmalarda kullanılan primerler, baz dizileri ve beklenen bant büyüklükleri

Primer	Nükleotit dizilimi	Hedef RNA ve bölgesi	Beklenen bant büyüklüğü (bp)	Literatür
BNYVV/F	CCATTGAATAGAATTTACCC	RNA-2, CP	567	Lennefors ve ark., 2005
BNYVV/R	CCCATAGTAATTTAACTC			
F29	TTAATCCAAGTACCTCGTCT	RNA-3, P25	1.015	Acosta-Leal ve ark., 2008
R30	TTGAAATTTGTGATAACTCTAA			
RT-4F	CAGTCTATCAGTAAGGGGTAG	RNA-4, P31	997	Chiba ve ark., 2011
RT-4R	GAGCCGTTAATACAATTATAC			
Rhizo5F	GTTTTTCGGCTCGCACAAGCG	RNA-5, P26	885	Schirmer ve ark., 2005
Rhizo5R	CGAGCCGTTAAACACCGCATA			

BNYVV'nin RNA-3 segmenti tarafından kodlanan P25 proteinine ait bölgenin çoğaltılmasında [Acosta-Leal ve ark. \(2008\)](#)'ın belirttikleri F29 ve R30 primerleri; RNA-4 tarafından kodlanan P31 proteinine ait bölgenin çoğaltılmasında ise [Chiba ve ark. \(2011\)](#)'ın belirttikleri RT-4F ve RT-4R primerleri kullanılmıştır (Çizelge 2). Tek aşamalı olarak yürütülen RT-PCR çalışmaları, Superscript I One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase kiti (Invitrogen, ABD) protokolleri takip edilerek uygulanmıştır. Bu kit ile yapılan optimizasyonlar sonucunda; PCR tampon çözeltisindeki MgSO<sub>4</sub> konsantrasyonuna (2.4 mM)'a, 0.5 mM daha MgSO<sub>4</sub> ilavesi ile daha iyi ürün elde edilebilmiştir. RT-PCR reaksiyonu; 3 µ total RNA (10 pg-1 µg), 25 µl 2x reaction mix, her bir primerden (10 µM) 1 µl, 0.5 µl MgSO<sub>4</sub> (50 mM) ve 1 µl enzimden (RT/Platinum Taq mix) oluşturulmuş ve toplam reaksiyon hacmi 18.5 µl RNase içermeyen su ile 50 µl'ye tamamlanmıştır. Bu kit ile gerçekleştirilen amplifikasyonlar 50°C'de 30', 94°C'de 2', 35 döngü olacak şekilde 94°C'de 15'', 50°C'de 30'' ve 72°C'de 60'' ve 1 döngü 72°C'de 7' ile tamamlanmıştır.

BNYVV'nin RNA-5'i tarafından sentezlenen P26 protein genine ait bölgenin araştırılmasında kullanılan primerler Rhizo5F ve Rhizo5R ([Schirmer ve ark., 2005](#))'dir (Çizelge 2). Yedi örnekte gerçekleştirilen tek aşamalı RT-PCR, Superscript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase kiti (Invitrogen, ABD) protokolleri takip edilerek uygulanmıştır. Reaksiyon 12.5 µl 2x reaksiyon karışımı, her bir primerden 0.5 µl (son konsantrasyon: 10 µM), 1 µl Superscript III RT/Platinum Taq Mix ve 1 µl RNA'dan oluşturulmuştur. Toplam reaksiyon hacmi RNase içermeyen su ile 25 µl'ye tamamlanmıştır. Amplifikasyonlar thermocycler'da, 55°C'de 30', 94°C'de 2', 40 döngü olacak şekilde 94°C'de 15'', 59°C'de 30'' ve 68°C'de 1' ve 1 döngü 68°C'de 5' ile tamamlanmıştır.

PCR ürünleri TBE tampon çözeltisinde hazırlanan %1'lik agaroz jelde (0.5 µg/ml etidium bromür içeren) 90 mA sürekli akımda elektroforez yöntemi ile analiz edilmiştir. Jeldeki PCR fragmentlerinin analizi ise GelDoc 2000 (Biorad, ABD) görüntüleme sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve jelde oluşan bantların fotoğrafları çekilmiştir.

## Nükleotit dizi analizi

Bu çalışmada, *N. benthamiana*'da gözlenen simptom tipleri dikkate alınarak; zayıf simptom gelişimine sebep olan iki BNYVV izolatı (ELZ-44-1 ve BRS-148-2) ve şiddetli simptom oluşumuna neden olan ise üç izolat (CNK-150-3, KYS-524-1 ve ANK-617-3) seçilmiş ve P31 proteinine ait PCR ürünlerinden 40'ar µl, önerilen konsantrasyonda hazırlanan (5 pmol) primerler ile birlikte Genoks firmasına (Ankara) gönderilerek, Sanger Dizileme Yöntemi ile sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Sekans analizi sonrasında, MEGA 7 programında ([Kumar ve ark., 2016](#)) Clustal W ([Thompson ve ark., 1994](#)) yöntemi kullanılarak BNYVV izolatlarına ait her iki yönde (ileri ve geri) elde edilen ham sekans verileri hizalanmış, düzgün okunan kısımlar alınarak konsensus diziler oluşturulmuştur. Daha sonra, BNYVVV izolatlarına ait bu konsensus diziler kendi aralarındaki genetik benzerliklerin incelenmesi amacıyla NCBI'daki BLASTn ve BLASTp algoritmaları kullanılarak analiz edilmiştir.

## Bulgular ve Tartışma

### Biyolojik çalışmalar

Bu çalışmada, öncelikle Türkiye şeker pancarı üretim alanlarından coğrafik orjinlerine göre seçilen 15 toprak örneğinde, BNYVV'e hassas şeker pancarları (cv. Ansa) tuzak bitki testi yöntemine göre altı hafta süre ile yetiştirilerek, BNYVV izolatlarının çoğaltımı sağlanmış ve örneklerde virüsün varlığı ELISA testi ile de teyit edilmiştir (Çizelge 1). Daha sonra, 15 BNYVV izolatının BNYVV'nin sistemik konukçusu olan *N. benthamiana*'ya üç tekerrürlü, mekaniksel olarak aktarımı gerçekleştirilmiştir. Nitekim, *N. benthamiana*, Solanaceae familyasına ait bir tür olup, çok sayıda virüs tarafından enfekte edildiğinden, bitki virolojisinde en çok kullanılan deneysel konukçudur ([Bally ve ark., 2018](#)). Ayrıca, çok çeşitli bitki patojeni organizmalara (bakteri, oomycetes, fungus gibi) da hassas olduğu bilinmektedir ([Goodin ve ark., 2007](#)). Bu çalışmada, *N. benthamiana* bitkilerinde oluşan virüs benzeri belirtiler bir ay boyunca gözlenmiş ve kayıt edilmiştir. Bu bitkilerin virüs inokulasyonu yapılmayan üst yapraklarında gözlenen en yaygın belirtiler; yapraklarda kıvrılma, mozayik, nekrotik leke ve bitkide ise cüceleşme şeklinde olmuştur (Çizelge 3, 4). [Andika ve ark. \(2005\)](#), BNYVV'nin *N. benthamiana*'ya mekanik olarak aktarımını takiben 10-12 gün içerisinde, enfekteli bitkilerde cüceleşmenin oluştuğunu, bitkinin üst yapraklarının aşağı doğru kıvrıldığını ve hatta kıvrılan yaprakların zamanla solduğunu bildirmişlerdir. [Rahim ve ark. \(2007\)](#) ise, inokulasyondan üç hafta sonra, yapraklarda şiddetli mozayik ile birlikte; şekil bozukluklarının da oluştuğunu belirtmiş ve bu tip belirtiler 'şiddetli simptom' olarak adlandırılmıştır. Ayrıca, bazen belirtilerin hafif seyrettiği ve bitkilerde cüceleşme

oluşmadığı belirtilmiş ve bitkilerdeki bu görünüm ise 'hafif simptom' olarak ifade edilmiştir (Rahim ve ark., 2007). Bu çalışmada, 15 farklı BNYVV izolatının inokule edildiği *N. benthamiana*'ya ait incelenen 45 bitkinin neredeyse tamamının bitkinin üst yapraklarında mozayik tarzı belirti oluşumu gözlenmiştir. Bitkilerde cüceleşme tarzı simptom; sadece KYS-524 izolatı inokule edilen *N. benthamiana* bitkilerine ait tekerrürlerin tamamında ve bazı izolatlar (GZP-27, KRL-134, BRS-148, CNK-150, ESK-225 ve ANK-617) ile inokuleli bitkilerin ise yalnızca bir ya da birkaç tekerrüründe makroskobik olarak tespit edilmiştir. Ancak, IGR-6, ELZ-44, SMS-61, TKT-106, EDR-125, KAS-281, ADP-291 ve KTY-602 izolatları ile inokuleli bitkilerde ise tekerrürlerin hiçbirisinde cüceleşme belirtisi kayıt edilmemiştir (Çizelge 3, 4).

Çizelge 3. BNYVV izolatlarının *Nicotiana benthamiana* bitkilerinin tekerrürlerinde oluşturduğu simptomlar ve ELISA testi sonuçları

İzolat adı	P31 grubu	1. Tekerrür		2. Tekerrür		3. Tekerrür	
		Simptom*	ELISA absorbans değeri**	Simptom*	ELISA absorbans değeri**	Simptom*	ELISA absorbans değeri**
IGR-6	II	M, YK	0.106 (-)	M, YK	0.123 (-)	M, NL, YK	0.166 (-)
GZP-27	III	M, YK	0.098 (-)	M, YK	0.129 (-)	M, YK, C	0.386 (+)
ELZ-44	III	M, NL, YK	0.111 (-)	M, NL, YK	0.100 (-)	M, NL, YK	0.090 (-)
SMS-61	III	M, NL, YK	0.112 (-)	M, NL, YK	0.097 (-)	M, YK	0.091 (-)
TKT-106	TE	M, NL, YK	0.096 (-)	M, NL, YK	0.104 (-)	M, YK	0.102 (-)
EDR-125	III	M, YK	0.097 (-)	M, NL, YK	0.105 (-)	M, NL, YK	0.101 (-)
KRL-134	TE	M, YK, C	0.150 (-)	M, YK	0.109 (-)	M, NL, YK	0.101 (-)
BRS-148	III	M, NL, YK	0.104 (-)	M, NL, YK, HC	0.099 (-)	M, YK	0.103 (-)
CNK-150	III	M, YK, C	0.127 (-)	M, NL, YK	0.100 (-)	KL, NL, YK, C	0.137 (-)
ESK-225	TE	M, NL, YK, C	0.119 (-)	KL, YK, C	0.106 (-)	M, NL, YK	0.106 (-)
KAS-281	III	M, NL, YK	0.107 (-)	M, NL, YK	0.103 (-)	M, NL, YK	0.102 (-)
ADP-291	TE	M, NL, YK	0.102 (-)	M, NL, YK	0.121 (-)	M, NL, YK	0.114 (-)
KYS-524	III	M, NL, YK, C	0.105 (-)	M, NL, YK, C	0.101 (-)	M, NL, YK, C	0.093 (-)
KTY-602	TE	M, NL, YK, HC	0.101 (-)	M, NL, YK	0.099 (-)	M, NL, YK	0.107 (-)
ANK-617	III	M, YK, C	0.111 (-)	M, NL, YK	0.113 (-)	M, YK, C	0.124 (-)
-C (Bioreba)			0.098		0.098		0.098

Öte yandan, Chiba ve ark. (2011), çoğunluğunu Asya izolatlarının oluşturduğu 73 BNYVV izolatının CP, P25, P26 ve P31 genlerini detaylı olarak incelemişler ve bu izolatların P31 genine göre dört gruba (P31-I, P31-II, P31-III ve P31-IV) ayrıldıklarını bildirmişlerdir. Güngör ve ark. (2022) ise, Türkiye'nin farklı bölgelerine ait pancar üretim alanlarından elde edilen 12 BNYVV izolatının (bu çalışmadaki 10 BNYVV izolatını içeren) P31 gen bölgesinin nükleotid dizilerini elde etmiş ve oluşturulan filogenetik ağaçta, ülkemiz BNYVV izolatlarının P31 genine göre iki farklı gruba ayrıldıklarını saptamış olup, buna göre; Iğdır (IGR-6 ve IGR-9) ve Erzincan (ERC-52) illerinden elde edilen izolatların Grup II; diğer illere ait izolatların (GZP-27, ELZ-44, SMS-61, EDR-125, BRS-148, CNK-150, KAS-281, KYS-524 ve ANK-617) ise Grup III içerisinde yer aldıklarını bildirmişlerdir (Çizelge 3). Bu çalışmada, daha önce yürütülen çalışma ile (Güngör ve ark., 2022) P31 genine göre grup düzeyinde ayırımı yapılan 10 BNYVV izolatının (Grup-II ve Grup-III) *N. benthamiana*'da oluşturdukları simptom tipleri de irdelenmiştir. Buna göre, *N. benthamiana* bitkilerinde Grup-II'de yeralan dört BNYVV izolatı (GZP-27, ELZ-44, SMS-61 ve KAS-281) zayıf simptom (sadece mozayik); aynı grupta bulunan diğer beş izolat (EDR-125, BRS-148, CNK-150, KYS-524 ve ANK-617) ise şiddetli simptom (mozayik+ cüceleşme) oluşumuna neden olmuştur. Grup-III'de bulunan tek izolat olan IGR-6'nın ise bu bitkide hafif simptom oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3, 4).

*Nicotiana benthamiana*'da oluşan BNYVV tarzı simptomların virüs enfeksiyonundan kaynaklandığının teyit edilmesi amacıyla, bu bitkilerinin üst yapraklarından alınan örneklerle uygulanan DAS-ELISA testi sonucunda, GZP-27 izolatı ile inokule edilen *N. benthamiana* bitkilerinin sadece 3. tekerrüründe BNYVV enfeksiyonunun varlığı tespit edilmiştir (Çizelge 3). Serolojik yöntemlerden biri olan ELISA testinde tanılama, virüslerin nükleik asitlerini çevreleyen kılıf ya da membran proteinlerine ve onların özelliklerine dayalı olarak yapılmaktadır (Erkan ve ark., 2011). Bu çalışmada, *N. benthamiana* bitkilerinde ELISA yöntemi ile virüsün tespit edilememesi nedeninin (GZP-27-2 hariç), bu bitkilerde viral CP konsantrasyonunun düşük olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür.

## Moleküler çalışmalar

Çalışmanın bu aşamasında; 15 BNYVV izolatının *N. benthamiana* bitkilerine üç tekerrürlü olarak mekanik yolla aktarımdan yaklaşık bir ay sonra, herbir izolata ait birer tekerrür seçilerek, bu bitkilerin virüs inokulasyonu yapılmayan üst yapraklarından örnekleme yapılmış ve RNA izolasyonu çalışmalarında kullanılmıştır. Böylelikle, hem bu bitkide virüsün RT-PCR yöntemi ile varlığının araştırılması, hem de *N. benthamiana*'da enfeksiyon esnasında oluşan ve BNYVV'nin patojenitesinde rol oynayan bazı önemli proteinlerin (CP, P25, P26 ve P31) genlerinin bulunma durumlarının ortaya konulması hedeflenmiştir. *N. benthamiana*, virüs kaynaklı gen susturma ve geçici protein ekspresyonu çalışmaları için uygun bir konukçu olup, özellikle protein lokalizasyonu, interaksiyonu ve protein ifadesi (expression) gibi bitki bazlı sistemler gerektiren çalışmalarda yoğun olarak kullanılmaktadır (Goodin ve ark., 2007). Son yıllarda, bu türün taslak genom dizisinin ortaya konulması, bitki patojen etkileşimlerini araştırmak ve farklı bitki-patojen çiftleri arasındaki gen ekspresyonunu karşılaştırmak için model bitki olarak rolünü daha da güçlendirmiştir (Goodin ve ark., 2008; Satoh ve ark., 2010).

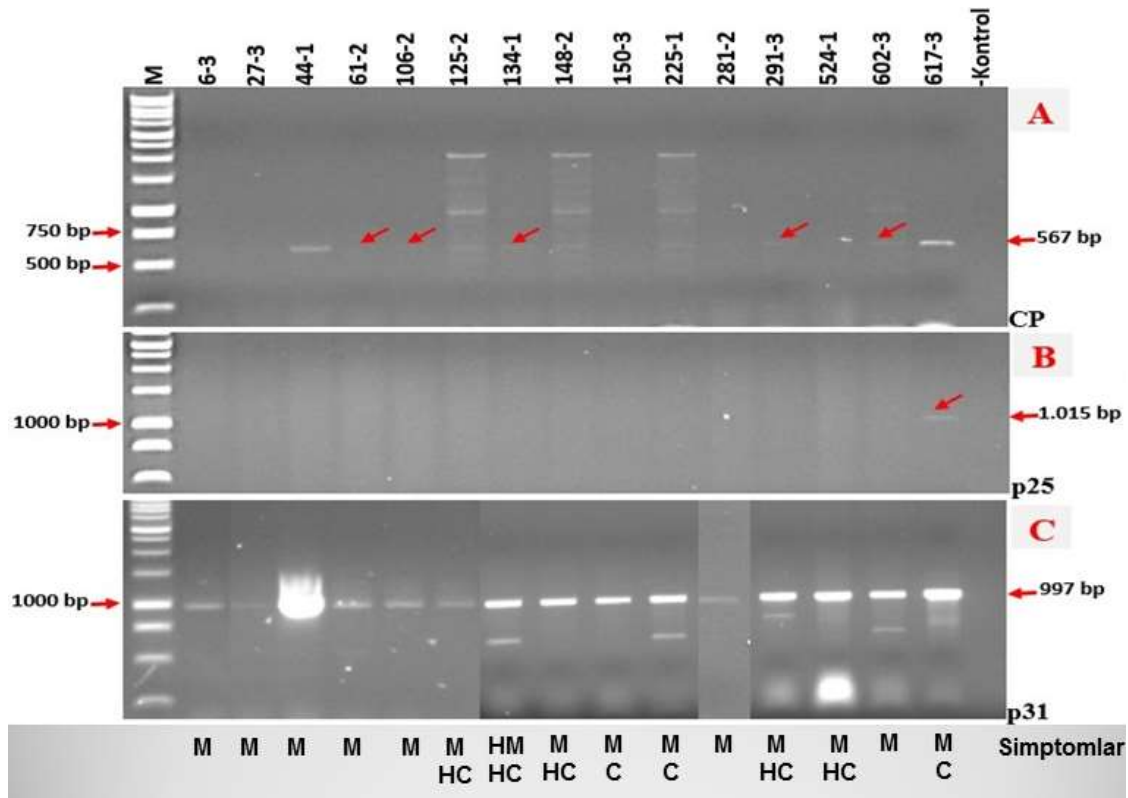
*Nicotiana benthamiana*'da oluşan yapraklarda şiddetli mozayik, kıvrılma ve bitkide cüceleşme şeklindeki şiddetli semptomların BNYVV RNA-4'ü tarafından kodlanan P31 proteini ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Rahim ve ark., 2007; Wang ve ark., 2011). Bu çalışmada, 15 BNYVV izolatının seçilen birer tekerrüründe P31 geninin çoğaltılması amacıyla uygulanan RT-PCR çalışmaları sonucunda, önceki çalışmalarla uyumlu olarak (Rahim ve ark., 2007; Wang ve ark., 2011) incelenen örneklerin tamamında P31 genine spesifik beklenen büyüklükte (977 bp) ürün elde edilmiştir (Şekil 1-C). Böylelikle, *N. benthamiana* bitkilerinin tamamının BNYVV ile enfekteli olduğu ve bu bitkide görülen semptomların (Çizelge 3) BNYVV enfeksiyonundan kaynaklandığı RT-PCR çalışmaları ile doğrulanmıştır. Elde edilen bu sonuç, *N. benthamiana*'da BNYVV enfeksiyonunun araştırılmasında, ELISA testi çalışmalarının yeterli ve güvenilir olmadığını göstermiştir. Bu bitkide BNYVV'nin varlığının kesin olarak saptanabilmesi için, RT-PCR çalışmalarının uygulanmasının gerekliliği ortaya konulmuştur. Yürütülen bu çalışmada; yedi BNYVV izolatu (IGR-6-3, GZP-27-3, ELZ-44-1, SMS-61-2, TKT-106-2, KAS-281-2 ve KTY-602-3) ile inokule edilen *N. benthamiana* bitkilerinde zayıf semptom oluşumu (sadece mozayik); diğer sekiz BNYVV izolatu (EDR-125-2, KRL-134-1, BRS-148-2, CNK-150-3, ESK-225-1, ADP-291-3, KYS-524-1 ve ANK-617-3) ile inokuleli bitkilerde ise şiddetli semptom (mozayik+cüceleşme) oluşumu gözlenmiştir (Çizelge 3, 4). Bu araştırmada, ayrıca, *N. benthamiana*'da gözlenen semptom tipleri dikkate alınarak; zayıf semptom gelişimine sebep olan iki BNYVV izolatu (ELZ-44-1 ve BRS-148-2) ve şiddetli semptom oluşumuna neden olan ise üç izolat (CNK-150-3, KYS-524-1 ve ANK-617-3) seçilmiş (Çizelge 4) ve P31 proteinine ait PCR ürünlerinin sekans analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sonrasında, MEGA 7 programı kullanılarak BNYVV izolatlarına ait ileri ve geri yönde elde edilen ham sekans verileri hizalanmış ve konsensus diziler elde edilmiştir. İzolatlarda sekans analizi yapılan bölgenin uzunluğu yaklaşık 849 baz kadar olup P31 geninin tamamını içermektedir. Takiben, BNYVV izolatlarının kendi aralarındaki genetik benzerliklerinin incelenmesi amacıyla BLASTn ve BLASTp analizleri uygulanmış ve buna göre, *N. benthamiana*'dan izole edilen beş BNYVV izolatının hem nükleotit, hem de amino asit düzeyinde %100 benzer oldukları belirlenmiştir (veri gösterilmedi). Bu çalışma sonucunda; incelenen örneklerin tamamında P31 proteininin varlığı tespit edilmiş olup, semptom tipleri (zayıf veya şiddetli) ile P31'in bulunma durumu arasında doğrudan bir ilişkinin olmadığı sonucuna varılmıştır.

Diğer taraftan konu ile ilgili yürütülen bir araştırmada, BNYVV O11 izolatu (RNA-1, RNA-2, RNA-3 ve RNA-4 segmentlerini içeren) ile inokuleli 18 *N. benthamiana* bitkisinin, şiddetli semptom sergileyen 14'ünde wild tip RNA-4'ün bulunduğu; zayıf semptom sergileyen dördünde ise wild tip RNA-4'ün tespit edilemediği bildirilmiştir. Bununla birlikte, zayıf semptom gözlenen dört örneğin birinde ise, wild tip RNA-4'e spesifik beklenen 846 bp'de bant oluşumu yerine, 846 bp'den biraz daha küçük bir bant oluşumu gözlenmesinden dolayı RNA-4'ün delesyonlu bir formunun bulunduğu belirtilmiştir (Rahim ve ark., 2007). Diğer taraftan, *N. benthamiana*'da şiddetli semptom oluşumuna neden olan (yapraklarda kıvrılma+cüceleşme) Çin izolatu BN345 (RNA-1, RNA-2, RNA-3, RNA-4 ve RNA-5 segmentlerini içeren) ile yürütülen bir diğer araştırmada ise, mekanik inokulasyon yapılan 25 bitkide RNA-4'ün bulunduğu, bu örneklerin bir tanesinde ise jelde oluşan bant profiline göre RNA-4'ün delesyonlu formunun olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark., 2011). Önceki çalışmalara benzer şekilde (Rahim ve ark., 2007; Wang ve ark., 2011), bu çalışmada da, beş farklı BNYVV izolatu (KRL-134-1, ESK-225-1, KTY-602-3, ADP-291-3 ve ANK-617-3) ile inokuleli *N. benthamiana* örneklerinde, 997 bp'de P31 genine spesifik oluşan bant ile birlikte daha küçük ekstra bir bant oluşumu da dikkat çekmiştir (Şekil 1-C).

Çizelge 4. Farklı Beet necrotic yellow vein virus izolatları ile inokule edilen *Nicotiana benthamiana* bitkilerinde oluşan belirtilerin görünümü, tipleri ve bu izolatların dahil oldukları P31 grupları

BNYVV ile inokule edilen <i>N. benthamiana</i> bitkileri							
İzolat adı /tekerrür	IGR-6-1	ELZ-44-1	BRS-148-2	CNK-150-3	KYS-524-1	ANK-617-3	Sağlıklı Kontrol
P31 grubu	II	III	III	III	III	III	
Semptom tipi	zayıf	zayıf	zayıf	şiddetli	şiddetli	şiddetli	

Jelde oluşan bant profilleri incelendiğinde ise; KRL-134-1, ESK-225-1 ve KTY-602-3 izolatları ile inokuleli örneklerde oluşan ekstra bant büyüklüğünün birbirleri ile benzer olduğu görülmüştür. ADP-291-3 ve ANK-617-3 izolatları ile inokuleli örneklerde ise tespit edilen ekstra bantın diğer üç örnekten farklı büyüklükte olmakla birlikte, bu iki örnekte birbirine yakın büyüklükte olduğu saptanmıştır (Şekil 1-C). Bu sonuç, *N. benthamiana* bitkisine BNYVV'nin mekanik olarak ilk aktarımı sonucunda, yukarıda belirtilen beş örnekte P31 gen bölgesinde delesyon olabileceğini düşündürmüştür. Bu durumun net olarak ortaya konulabilmesi için, ileride bu ekstra bantlara ait PCR ürünlerinin elde edilerek, sekans analizlerinin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.



Şekil 1. *Nicotiana benthamiana* bitkilerinden elde edilen BNYVV izolatlarında kılıf protein (CP) (A), P25 (B) ve P31 proteinlerinin (C) RT-PCR yöntemi ile araştırılması [M: 1Kb DNA Ladder (Promega), 6-3: Aralık-İğdir, 27-3: İslahiye-Gaziantep, 44-1: Merkez-Elazığ, 61-2: Vezirköprü-Samsun, 106-2: Niksar-Tokat, 125-2: Merkez-Edirne, 134-1: Babaeski-Kırklareli, 148-2: Yenişehir-Bursa, 150-3: Biga-Çanakale, 225-1: Çifteler-Eskişehir, 281-2: Taşköprü-Kastamonu, 291-3: Erenler-Adapazarı, 524-1: Merkez-Kayseri, 602-3: Simav-Kütahya, 617-3: Ayaş-Ankara illerine ait BNYVV izolatları ile inokuleli *N. benthamiana*'nın sistemik yaprak örneklerinden elde edilen RNA'lar], *N. benthamiana* bitkilerinde kayıt edilen belirtiler (D); M: Mozaik, HM: Hafif mozaik, C: Cüceleşme, HC:Hafif cüceleşme

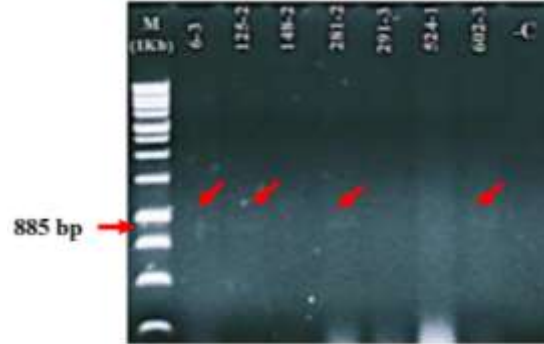


*Nicotiana benthamiana* bitkilerinde BNYVV izolatlarının RNA-2 tarafından sentezlenen CP'lerinin varlığı, ELISA testine ilaveten, RT-PCR yöntemi ile de araştırılmıştır. Bu amaçla, cDNA sentezini takiben, CP gen bölgesine spesifik primer kullanılarak yürütülen PCR çalışmaları sonucunda; incelenen örneklerin 10'unda (ELZ-44-1, SMS-61-2, TKT-106-2, ESK-125-2, KRL-134-1, BRS-148-2, ESK-225-1, ADP-291-3, KTY-602-3 ve ANK-617-3) bu bölgeye spesifik 567 bp büyüklüğünde zayıf bant oluşumu gözlenmiştir (Şekil 1-A). Çeşitli araştırmacılar tarafından, *N. benthamiana* ve *S. oleracea* gibi sistemik konukçularında vasküler taşınma ve lokal lezyon konukçularında virüsün replikasyonu için BNYVV'nin genom segmentlerinden sadece RNA-1 ve RNA-2'sinin gerekli ve yeterli olduğu belirtilmektedir (Lauber ve ark., 1998a, 1998b; Andika ve ark., 2005). Bununla birlikte, Plasmodiophorid vektörler tarafından taşınan bitki virüsleri, laboratuvarında tekrarlanan mekanik inokulasyonlarda; genomlarının bazı parçalarını kaybedebilmektedirler. Özellikle; *Benyvirus*, *Furovirus* ve *Pomovirus* cinslerinde yer alan virüs türlerinde RNA-2 tarafından kodlanan CP+Readthrough (RT) bölgesinin silinmelere meyilli olduğu bildirilmektedir. Bu silinmelerin Potato mop top virus (PMTV) ve BNYVV'nin vektörle taşınmasını etkilediği deneysel olarak gösterilmiştir (Adams ve ark., 2001). Bu çalışmada, incelenen beş örnekte (IGR-6-3, GZP-27-3, CNK-150-3, KAS-281-2 ve KYS-524-1), BNYVV CP'nin RT-PCR çalışmaları ile de belirlenememesi, *N. benthamiana* örneklerinin tamamında BNYVV CP'nin tespit edildiğini bildiren Rahim ve ark. (2007) ve Wang ve ark. (2011)'in bulguları ile uyumsuzdur. Bununla birlikte, RNA-2 tarafından kodlanan P75 proteininin (CP+RT) vektörle taşınma için mutlaka gerekli olduğu bildirilmektedir (Tamada ve ark., 1996). Bu çalışmada virüs izolatları mekanik olarak *N. benthamiana* bitkilerine taşındığından, bu durum virüsün ilk aktarımını takiben bir aylık periyot süresince viral CP'nin sentezine ihtiyaç duymaması nedeni ile, CP bölgesinin silinmesinden kaynaklanmış olabilir. Bu durumun net olarak ortaya konulabilmesi için, BNYVV CP'nin tespit edilemediği beş izolata ait diğer tekerrürlerde de RT-PCR çalışmalarının yürütülerek, elde edilen sonuçların teyit edilmesi yerinde olacaktır.

Ayrıca, *N. benthamiana*'dan izole edilen 15 örnekte BNYVV RNA-3'ü tarafından kodlanan P25 proteininin bulunma durumu da araştırılmıştır. P25 bölgesine spesifik primerler ile yürütülen RT-PCR çalışmaları sonrasında, incelenen örneklerden sadece birinde (ANK-617-3) bu bölgeye spesifik 1.015 bp büyüklüğünde bant elde edilmiştir. Bu bitkide rapor edilen semptom; mozayik+cüceleşme şeklinde olup bu tarz belirtiler 'şiddetli semptom' olarak ifade edilmektedir. Benzer belirtilere sahip diğer izolatlar ile enfekteli *N. benthamiana* örneklerinde (EDR-125-2, KRL-134-1, BRS-148-2, CNK-150-3, ESK-225-1, ADP-291-3 ve KYS-524-1) ise P25 geni tespit edilememiştir (Şekil 1-B). Bu sonuç, *N. benthamiana*'da gözlenen farklı semptom tipleri (zayıf veya şiddetli) ile P25'in bulunma durumu arasında bir ilişkinin bulunmadığını ve P25 bölgesinin *N. benthamiana*'da virüs çoğalması esnasında kendiliğinden elemine olabileceğini göstermiştir. Virüsler genellikle farklı koşullara uyum sağlayabilmek için, replikasyonda rol oynayan bazı gerekli RNA'ları tercih ederken, gerek duymadıkları diğer RNA'ların tamamını veya bir kısmını elemine edebilmektedirler. Nitekim, Japon O11 BNYVV izolatının RNA-3 segmentinin *N. benthamiana* bitkilerinde genellikle spanton olarak elemine olduğu (silindiği) belirlenmiştir. Ayrıca, RNA-3'ün *N. benthamiana* bitkilerinde şiddetli semptom oluşumu ile bir ilgisinin olmadığı da bildirilmiştir. P31 ve P25 proteinlerinden her ikisi de semptom oluşumunda görev almakla birlikte; bu proteinlerin etkilerinin konukçuya spesifik ve farklı şekilde olduğu bildirilmiştir (Rahim ve ark., 2007). Nitekim, RNA-3 tarafından kodlanan P25 proteini doğal konukçularda klasik rhizomania semptomlarının oluşumu için gerekli olmaktadır (Chiba ve ark., 2011)

İlave olarak, *N. benthamiana* bitkilerinden elde edilen örneklerden yedisinde (IGR-6-3, EDR-125-2, BRS-148-2, KAS-281-2, ADP-291-3, KYS-524-1 ve KTY-602-3), BNYVV'nin patojenitesinde rol oynayan, bir diğer ifade ile virüsün şeker pancarında semptom şiddetini arttıran (Tamada ve ark., 1996) ve RNA-5 üzerinde yer alan P26 proteini de, gen spesifik primerler kullanılarak RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Diğer sekizi ise, daha önce yürütülen çalışmalarda şeker pancarlarından izole edilen bu örneklerde RNA-5'in bulunmadığı bilindiğinden (Kutluk Yılmaz ve ark., 2016b), çalışmalara dahil edilmemiştir. Analiz edilen yedi örneğin, dördünde (IGR-6-3, EDR-125-2, KAS-281-2 ve KTY-602-3) bu bölgeye spesifik (885 bp) zayıf bant oluşumu saptanmıştır (Şekil 2). Wang ve ark. (2011), *N. benthamiana*'da şiddetli semptom oluşumuna (yapraklarda kıvrılma+cüceleşme) neden olan BN345 izolatı (RNA-1, RNA-2, RNA-3, RNA-4 ve RNA-5 segmentlerini içeren) ile yürüttükleri çalışmada, virüsün mekanik inokulasyonunu takiben BNYVV ile enfekteli 25 bitkiden, sadece ikisinde RNA-5'in bulunduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, BNYVV ile enfekteli *N. benthamiana*'da RNA-5'in hareket ve replikasyonun çok düşük seviyede olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, RNA-3 ve RNA-4'ün birlikte enfeksiyonunda RNA-5'in sistemik hareketini engelleme olasılığını ortadan kaldırmak için, sadece RNA-1, RNA-2 ve RNA-5 segmentlerini içeren mutant BNYVV izolatını *N. benthamiana* bitkilerine inokule etmişler ve sonrasında gerçekleştirdikleri RT-PCR çalışmaları ile RNA-5'in sadece virüs inokuleli yapraklarda mevcut olduğunu bildirmişlerdir. Öte yandan, aynı araştırmacılar aynı çalışmada; RNA-

1+RNA-2+RNA-3+RNA-4 ya da RNA1+RNA2 segmentlerini içeren BNYVV örneklerinde RNA-5'in sistemik yapraklarda saptandığını rapor etmişlerdir (Wang ve ark, 2011). Yürütülen bu araştırma sonucunda; semptom tiplerine göre bir ayırım olmaksızın, zayıf (IGR-6-3, KAS-281-2 ve KTY-602-3) ya da şiddetli semptom (EDR-125-2) sergileyen *N. benthamiana* bitkilerinin sistemik yapraklarına ait örneklerde RNA-5'in bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 2). Diğer bazı konukçularında BNYVV'nin patojenitesini arttırdığı bildirilen RNA-5'in (Liu ve ark., 2003; Link ve ark., 2005; Tamada ve ark., 2020), *N. benthamiana*'da bu yönde ilave bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır.



Şekil 2. *Nicotiana benthamiana* bitkilerinden elde edilen BNYVV izolatlarında P26 geninin RT-PCR yöntemi ile araştırılması [M: 1Kb DNA Ladder (Promega), 6: Aralık-Iğdır, 125: Merkez-Edirne, 148: Yenişehir-Bursa, 281: Taşköprü-Kastamonu, 291: Erenler-Adapazarı, 524: Merkez-Kayseri, 602: Simav-Kütahya illerine ait *N. benthamiana* sistemik yaprak örneklerinden elde edilen RNA'lar]

## Sonuç

Bu çalışmada, BNYVV'nin sistemik konukçusu olan *N. benthamiana* bitkisinde 15 BNYVV izolatının oluşturdukları semptom tipleri ve farklı gen bölgeleri (CP, P25, P26 ve P31) araştırılmıştır. Dünya izolatları ile bu çalışmadaki izolatlar kıyaslandığında, *N. benthamiana* bitkilerinde belirlenen semptom tipleri (zayıf veya şiddetli) ile P31, P25 ve P26 proteinlerinin bulunma durumları arasında doğrudan bir ilişkinin olmadığı sonucuna varılmıştır. İlave olarak; bu çalışmada elde edilen bulgular; *N. benthamiana* bitkilerine virüsün ilk aktarımını takiben, bazı izolatlarda özellikle P31 genom bölgelerinde silinmenin olabileceğine işaret etmiştir. Bu sebeple; bu silinmenin net olarak ortaya konulabilmesi için, ileride P31 bölgesine spesifik bant ile birlikte gözlenen bu ekstra bantlara ait PCR ürünlerinin elde edilerek, sekans analizlerinin yapılması gerekmektedir.

## Teşekkür

Bu çalışmada kullanılan toprak örnekleri TÜBİTAK (TOVAG: 1100188) projesi kapsamında toplanmıştır.

## Kaynaklar

- Acosta-Leal R, Fawley MW, Rush CM, 2008. Changes in the intra isolate genetic structure of Beet necrotic yellow vein virus populations associated with plant resistance breakdown. *Virology* 376: 60-68.
- Adams MJ, Antoniv JF, Mullins JGL, 2001. Plant virus transmission by plasmodiophorid fungi is associated with distinctive transmembrane regions of virus-encoded proteins. *Arch. Virol.* 146: 1139-1153.
- Andika IB, Kondo H, Tamada T, 2005. Evidence that RNA-silencing-mediated resistance to Beet necrotic yellow vein virus is less effective in roots than in leaves. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18: 194-204.
- Bally J, Jung H, Mortimer C, Naim F, Philips JG, Hellens R, Bombarely A, Goodin MM, Waterhouse PM, 2018. The rise and rise of *Nicotiana benthamiana*: A plant for all reasons. *Annu. Rev. Phytopathol.* 56: 405-426.
- Bouzoubaa S, Quillet L, Guilley H, Jonard GT, Richards K, 1987. Nucleotide sequence of beet necrotic yellow vein virus RNA-1. *J. Gen. Virol.* 68: 615-626.
- Chiba S, Kondo H, Miyanishi M, Andika IB, Han C, Tamada T, 2011. The evolutionary history of Beet necrotic yellow vein virus deduced from genetic variation, geographic origin and spread, and the breaking of host resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24 (2): 207-218.
- Chiba S, Hleibieh K, Delbianco A, Klein E, Ratti C, Ziegler-Graff V, Bouzoubaa S, Gilmer D, 2013. The benyvirus RNA silencing suppressor is essential for long-distance movement, requires both zinc-finger and NoLS basic residues but not a nucleolar localization for its silencing-suppression activity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26: 168-181.
- Erkan S, Gümüş M, Paylan İC, Sipahioğlu HM, 2011. Bitki virüslerinin tanınmasında kullanılan serolojik yöntemler. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 9 (2): 35-49.

- Gilmer D, Bouzoubaa S, Hehn A, Guilley H, Richards K, Jonard G, 1992. Efficient cell-to-cell movement of Beet necrotic yellow vein virus requires 3' proximal genes located on RNA 2. *Virology*, 189: 40-47.
- Gilmer D, 2016. Molecular biology and replication of Beet necrotic yellow vein virus. In: *Rhizomania*. (eds. Biancardi E, Tamada T). Springer International Publishing Switzerland, pp. 85-107.
- Gilmer D, Ratti C, ICTV Report Consortium, 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Benyviridae. *J. Gen. Virol.* 98 (7): 1571-1572.
- Goodin MM, Chakrabarty R, Banerjee R, Yelton S, De Bolt S, 2007. New Gateways to discovery. *Plant Physiol.* 145 (4): 1100-1109.
- Goodin MM, Zaitlin D, Naidu R A, Lommel SA, 2008. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant-pathogen interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21: 1015-1026.
- Güngör M, Erkan E, Kutluk Yılmaz ND, 2022. Türkiye'de şeker pancarı üretim alanlarında enfeksiyon oluşturan Beet necrotic yellow vein virus izolatlarının p31 geninin moleküler karakterizasyonu. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 37 (3): 505-524.
- Haeberle AM, Sutissi-Garaud C, Schmitt C, Garaud JC, Richards KE, Guilley H, Jonard G, 1994. Detection by immunogold labelling of P75 readthrough protein near an extremity of beet necrotic yellow vein virus particles. *Arch. Virol.* 134: 195-203.
- Horváth J, 1994. Beet necrotic yellow vein furovirus 1. New hosts. *Acta Phytopathologica Et Entomologica Hungarica*, 29:109-118.
- Hugo SA, Henry CM, Harju V, 1996. The role of alternative hosts of *Polymyxa betae* in transmission of Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in England. *Plant Pathol.* 45: 662-666.
- Kaya R, 2009. Distribution of rhizomania disease in sugar beet growing areas of Turkey. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 15 (4): 332-340.
- Keskin B, 1964. *Polymyxa betae* n.sp. ein parasit in den wurzein von *Beta vulgaris* Tournefort, besonders während den jugendentwicklung den zuckerrübe. *Archives of Microbiology*, 49: 348-374.
- Koch F, 1987. Bericht über eine in verschiedene zuckerrübenanbaugebiete der Turkseker in Anatolien und Thrazien zum stadium von wurzelerkrankungen. KWS Kleinwanzlebener Saatzzucht, AG, Einbeck, Germany.
- Koenig R, Haeberle AM, Commandeur U, 1997. Detection and characterization of a distinct type of Beet necrotic yellow vein virus RNA-5 in sugar beet growing area in Europe. *Arch. Virol.* 142:1499-1504.
- Kruse M, Koenig R, Hoffman A, Kaufmann A, Commandeur U, Solevjev AG, Savenkov I, Burgermeister W, 1994. Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription-PCR products reveals the existence of two major strain groups of beet necrotic yellow vein virus. *J. Gen. Virol.* 75: 1835-1842.
- Kuszala M, Putz C, 1977. Rhizomania of sugar beet in Alsace. Host range and biological properties of Beet necrotic yellow vein virus. *Annales de Phytopathologie*, 9 (4): 435-446.
- Kutluk Yılmaz 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 Pathol.* 56: 311-316.
- Kutluk Yılmaz ND, Arlı Sokmen M, 2010. Occurrence of soilborne sugar beet viruses transmitted by *Polymyxa betae* northern and central parts of Turkey. *Journal of Plant Pathology*, 92 (2): 497-500.
- Kutluk Yılmaz ND, 2016a. New natural weed host *Raphanus raphanistrum* L. (Brassicaceae) for Beet necrotic yellow vein virus and its vector *Polymyxa betae* Keskin. *Turk J Agric For.* 40: 120-126.
- Kutluk Yılmaz ND, Arlı-Sokmen M, Kaya R, Sevik MA, Tunali B, Demirtas S, 2016b. 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. *Eur. J. Plant Pathol.* 144 (2): 443-455.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.
- Lauber E, Bleykasten-Grosshans C, Erhardt M, Bouzoubaa S, Jonard G, Richards KE, Guilley H, 1998a. Cell-to-cell movement of Beet necrotic yellow vein virus: I. Heterologous complementation experiments provide evidence for specific interactions among the triple gene block proteins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 618-625.
- Lauber E, Guilley H, Tamada T, Richards KE, Jonard G, 1998b. Vascular movement of Beet necrotic yellow vein virus in *Beta macrocarpa* is probably dependent on an RNA-3 sequence domain rather than a gene product. *J. Gen. Virol.* 79: 385-393.
- Lennefors BL, Savenkoc EI, Mukasa SB, Valkonen JPT, 2005. Sequence diversity of four soilborne sugarbeet-infecting viruses. *Virus Genes*, 31: 57-64.
- Link D, Schmidlin L, Schirmer A, Klein E, Erhardt M, Geldreich A, Lemaire O, Gilmer D, 2005. Functional characterization of the Beet necrotic yellow vein virus RNA-5 encoded p26 protein: evidence for structural pathogenicity determinants. *J. Gen. Virol.* 86: 2115-2125.
- Liu T, Han C, Li D, Cai Z, Yu J, Liu Y, 2003. Effect of the RNA5 component on pathogenicity of beet necrotic yellow vein virus. *Chinese Science Bulletin*, 48: 796-799.
- Liu HY, Sears JL, Lewellen RT, 2005. Occurrence of resistance-breaking beet necrotic yellow vein virus of sugar beet. *Plant Dis.* 89: 464-468.
- Liebe S, Varrelmann M, 2022. Ongoing evolution of Beet necrotic yellow vein virus towards Rz1-resistance breaking in Europe. *Plant Pathol.* 71:1647-1659.

- Link D, Schmidlin L, Schirmer A, Klein E, Erhardt M, Geldreich A, Lemaire O, Gilmer D, 2005. Functional characterization of the Beet necrotic yellow vein virus RNA-5 encoded p26 protein: evidence for structural pathogenicity determinants. *J. Gen. Virol.* 86: 2115-2125.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 2356-2360.
- Miyaniishi M, Kusume T, Saito M, Tamada T, 1999. Evidence for three groups of sequence variants of beet necrotic yellow vein virus RNA 5. *Arch. Virol.* 144: 879-892.
- Özer G, Ertunç F, 2005. Detection of rhizomania disease in sugar beet plantations of Amasya sugar refinery. *Journal of Agricultural Sciences*, 11 (3): 339-343.
- Özmen CY, Khabbazi SD, Khabbazi AD, Gürel S, Kaya R, Oğuz MÇ, Turan F, Rezaei F, Kibar U, Ergül A, 2020. Genome composition analysis of multipartite BNYVV reveals the occurrence of genetic re-assortment in the isolates of Asia Minor and Thrace. *Nature Scientific Reports*, 10, 4129.
- Rahim MD, Andika IB, Han C, Kondo H, Tamada T, 2007. RNA4-encoded P31 of Beet necrotic yellow vein virus is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots. *J. Gen. Virol.* 88: 1611-1619.
- Satoh K, Kondoh H, Sasaya T, Shimizu T, Choi IR, 2010. Selective modification of rice (*Oryza sativa*) gene expression by Rice stripe virus infection. *J. Gen. Virol.* 91: 294-305.
- Schirmer A, Link D, Cognat V, Moury B, Beuve M, Meunier A, Bragard C, Gilmer D, Lemaire O, 2005. Phylogenetic analysis of isolates of Beet necrotic yellow vein virus collected worldwide. *J. Gen. Virol.* 86: 2897-2911.
- Scholten OE, Lange W, 2000. Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet: a review. *Euphytica*, 112: 219-231.
- Tamada T, Baba T, 1973. Beet necrotic yellow vein virus from rhizomania affected sugar beet in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 39: 325-332.
- Tamada T, 1975. Beet necrotic yellow vein virus. CMI/ABB. Description of Plant Viruses, Association of Applied Biologists, Wellesbourne, UK, 144: 4.
- Tamada T, Abe H, 1989. Evidence that beet necrotic yellow vein virus RNA-4 is essential for efficient transmission by the fungus *Polymyxa betae*. *J. Gen. Virol.* 70: 3391-3398.
- Tamada T, Abe H, Saito M, Kiguchi T, Harada T, 1989. Production and pathogenicity of isolates of Beet necrotic yellow vein virus with different numbers of RNA components. *J. Gen. Virol.* 70: 3399-3409.
- Tamada T, Saito M, Kiguchi T, Kusume T, 1990. Effect of isolates of Beet necrotic yellow vein virus with different of RNA components on the development of rhizomania symptoms. *Proc. Ist Symp. Int. Work. Group. Plant Viruses Fungal Vectors*, 41-44, 21-24 Ağustos, Braunschweig, Germany.
- Tamada T, Kusume T, Uchino H, Kiguchi T, Saito M, 1996. Evidence that Beet necrotic yellow vein virus RNA 5 is involved in symptom development of sugar beet roots. *Proc. 3rd Symp. Int. Work. Group Plant Viruses Fungal Vectors*, 49-52, 6-7 Ağustos, Dundee, Scotland.
- Tamada T, 2002. Beet necrotic yellow vein virus. CMA/ABB descriptions of plant viruses. Association of Applied Biologists. Wellesbourne UK.
- Tamada T, 2007. Susceptibility and resistance of *Beta vulgaris* subsp. *maritima* to foliar rub-inoculation with beet necrotic yellow vein virus. *J. Gen. Plant Pathol.* 73 (1): 76-80.
- Tamada T, Kondo H, 2013. Biological and genetic diversity of plasmodiophorid-transmitted viruses and their vectors. *J. Gen. Plant Pathol.* 79: 307-320.
- Tamada T, 2016. General features of Beet necrotic yellow vein virus. In: *Rhizomania*. (eds. Biancardi E, Tamada T), Springer International Publishing, Switzerland, pp. 55-83.
- Tamada T, Uchino H, Kusume T, Iketani-Saito M, Chiba S, Andika IB, Kondo H, 2020. Pathogenic roles of beet necrotic yellow vein virus RNA5 in the exacerbation of symptoms and yield reduction, development of scab-like symptoms, and Rz1-resistance breaking in sugar beet. *Plant Pathol.* 70: 219-232.
- 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.
- Yardımcı N, Çulal Kılıç H, 2011. Identification of Beet necrotic yellow vein virus in lakes district: A major beet growing area in Turkey. *Indian Journal of Virology*, 22 (2): 127-130.
- Wang Y, Fan H, Wang X-B, Li M, Li D, Yu J, 2011. Detection and characterization of spontaneous internal deletion mutants of Beet necrotic yellow vein virus RNA3 from systemic host *Nicotiana benthamiana*. *Virology Journal*, 8: 335-344.