



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI**

**ŞEKER PANCARINDA TEPE KIVIRCIKLIĞI VİRÜSÜNÜN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE VEKTÖREL
KLONLANMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Cansu CAN

Danışman
Doç. Dr. Kubilay YILDIRIM

SAMSUN
2021

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI



ŞEKER PANCARINDA TEPE KIVIRCIKLIĞI VİRÜSÜNÜN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE VEKTÖREL
KLONLANMASI

Yüksek Lisans Tezi

Cansu CAN

Danışman

Doç.Dr. Kubilay YILDIRIM

Bu tez çalışması TOVAG-2170232 no'lu 'Curtovirüslere Karşı Şeker Pancarında Crispr/Cas9 Temelli Dayanıklılık Sisteminin Geliştirilmesi' başlıklı proje ile TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

SAMSUN
2021

TEZ KABUL VE ONAYI

Cansu CAN tarafından, **Doç. Dr. Kubilay YILDIRIM** danışmanlığında hazırlanan **Şeker Pancarında Tepe Kıvirıcıklığı Virüsünün Moleküler Karakterizasyonu ve Vektörel Klonlanması** başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 19.2.2021 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan	Doç. Dr. Kubilay YILDIRIM Ondokuz Mayıs Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye (Danışman)	Doç. Dr. Kubilay YILDIRIM Ondokuz Mayıs Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Doç. Dr. Musa KAVAS Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Doç. Dr. Mehmet Aydın AKBUDAK Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı		<input checked="" type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

ONAY

... / ... / ...

Prof. Dr. Ali BOLAT
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım yüksek lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklarda gösterilenlerden oluştuğunu, enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

... / ... / 20...

Cansu CAN

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : Şeker Pancarında Tepe Kıvrıklığı Virüsünün Moleküler Karakterizasyonu ve Vektörel Klonlanması

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 30.12.2020 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 15

Tek kaynak oranı : % 1 çıkmıştır.

... / ... / 20...

Doç. Dr. Kubilay YILDIRIM

ÖZET

ŞEKER PANCARINDA TEPE KIVIRCIKLIĞI VİRÜSÜNÜN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU VE VEKTÖREL KLONLANMASI

Cansu CAN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Yüksek Lisans, Şubat/2021

Danışman: Doç. Dr. Kubilay YILDIRIM

Tepe kıvrıklığı hastalığı, dünyanın kurak ve yarı kurak bölgelerinde şeker pancarı (*Beta vulgaris*) üzerinde ciddi verim kayıplarına sebep olan, viral bir hastalıktır. Tepe kıvrıklığı virüs türleri bugüne kadar genelde *Curtovirus* ve *Becurtovirus* cinslerinin altında sınıflandırılmıştır. Tepe kıvrıklığı hastalığının, son yıllarda Türkiye'nin şeker pancarı üretiminde önemli verim kayıplarına neden olduğu da raporlanmıştır. Türkiye'de altmış yıl önce semptomatik olarak saptanmasına rağmen, Türk şeker pancarı tarlalarında bulunan tepe kıvrıklığı virüs türlerinin veya varyantlarının moleküler karakterizasyonu daha önce araştırılmamıştır. Bu çalışmada, Türkiye'nin önemli şeker pancarı ekim alanları olan 14 Orta Anadolu kentinin tarım arazilerinde 628 enfekte şeker pancarı bitkisi toplanmıştır. *Curtovirus* ve *Becurtovirus* cinslerine özgü primerler ile PCR tarama testi yapılmıştır. PCR testi Türk şeker pancarı tepe kıvrıklığı virüsü izolatlarının sadece *Becurtovirus* cinsine ait olduğunu göstermiştir. Filogenetik analiz ile birlikte kısmi ve tüm genom dizilemesinin sonuçları, 13 şehirden izole edilen Türk virüslerinin genomlarının, rapor edilen pancar tepe kıvrıklığı İran virüsü (BCTIV) izolatlarına yüksek bir sekans özdeşliğine (> %98) sahip olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, Yozgat şehrinden elde edilen bir Türk virüs genomu, daha önce İran'ın kuzey kesiminde bürülce, domates, biber ve şeker pancarında bildirilen BCTIV izolatlarına > %97'lik genomik sekans özdeşliği göstermiştir. Bu çalışmada bir *Agrobacterium* plazmidinde Türk virüs izolatının tandem tekrarlanan dimeri de oluşturulmuştur. Şeker pancarı yapraklarının agroinokülasyonu, belirgin tepe kıvrık semptomları olan bitkilerin %84'ünde etkili enfeksiyon olduğunu göstermiş, hastalık oluşumu PCR ve qPCR verileri ile teyit edilmiştir. Bu çalışma, Türk pancar tepe kıvrıklığı virüs türlerinin tanımlandığı ve *Becurtovirus* türlerinin Ortadoğu bölgesinde yayılışını ortaya koyan ilk moleküler karakterizasyon çalışmasıdır. Virüsün küresel ısınmanın artmasıyla birlikte Türkiye ve Avrupa şeker pancarı tarlalarında daha fazla yayılması, şeker pancarı üretimi ve diğer tarımsal ürün yetiştiriciliği için ciddi bir tehdit oluşturacağı öngörülmektedir. Bu kapsamda çalışmadan elde edilen karakterizasyon verileri ile virüs klonu, dayanıklı şeker pancarı çeşitlerinin geliştirilmesi açısından son derece önemlidir.

Anahtar Sözcükler: şeker pancarı, tepe kıvrıklığı virüsü, Türkiye, *Becurtovirus*, *Curtovirus*

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION AND VECTOR CLONING OF BEET CURL TOP VIRUS IN SUGAR BEET

Cansu CAN

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Molecular Biology and Genetics

Master, February/2021

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Kubilay YILDIRIM

Curly top disease is a serious, yield-limiting viral disease of sugar beet (*Beta vulgaris*) throughout arid and semi-arid regions of the world. Several phenotypic variants and distinct genetically characterized members of the curly top viruses have been described as causative agents for sugar beet. Curly top disease has been reported to cause significant yield reduction in sugar beet production of Turkey in recent years. Despite its symptomatic detection in sixty years ago in Turkey, molecular characterization of curly top virus species or variants distributed in Turkish sugar beet fields was not studied previously. In the current study, 628 infected sugar beet plants were collected in the fields of 14 central Anatolia cities that are the major sugar beet cultivation areas in Turkey. PCR screening test with the *Curtovirus* genus and *Becurtovirus* genus specific primers indicated that Turkish sugar beet curly top virus isolates belongs to only *Becurtovirus* genus. The results of partial and whole genome sequencing, together with phylogenetic analysis, revealed that genomes of Turkish viruses isolated from 13 cities have a high level of sequence identity (> 98%) to that of a *Beet curly top Iran virus* (BCTIV) isolates reported from Urmia province (bordering Turkey) of Iran. In addition, one Turkish virus genome derived from Yozgat city had a genomic sequence identity of > %97 to those of the BCTIV isolates previously reported in cowpea, tomato, pepper and sugar beet in northern part of Iran.. A tandem repeated dimmer of Turkish virus isolate was also constructed in an *Agrobacterium* plasmid in the current study. Agroinoculation of the sugar beet leaves indicated efficient infection of 84% of plants with apparent curly top symptoms. Disease progress in agroinoculated sugar beet plants was also verified with the PCR and qPCR results. This is the first molecular characterization study revealing the species of Turkish beet curly top viruses and widespread of *Becurtovirus* species in the Middle East region. Further spread of the virus in Turkish and European sugar beet fields with increase in global warming would create a serious threat to sugar beet production as well as other agricultural crop cultivation.

Keywords: sugar beet, curly top virus, Turkey, *Becurtovirus*

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmalarım boyunca bilimsel düşünce, bilgi birikimi ve tecrübelerini benden esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Kubilay YILDIRIM'a başta olmak üzere öğrenimim boyunca emeği geçen bütün hocalarıma sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım,

Bu süreçte yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Ayten BOZDOĞAN, Belemir ŞENGÜL, Şafak Esra ASLAN, Mutlu YALÇIN olmak üzere aynı laboratuvarında çalıştığımız ve tez çalışmam kapsamında emeği geçen İrem PAK, Dr. Eda UĞURTAY, Zafer SEÇGİN'e

Beni bugünlere getirmek için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, her konuda maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her koşulda yanımda olan, kararlarıma saygı duyan ve destekleyen, tecrübeleriyle yolumu aydınlatıp bugünlere gelmemde çok büyük emeği olan başta anneme ve babama olmak üzere bütün aileme sonsuz teşekkür ederim.

Cansu CAN

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT	viiiv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. BİTKİ VİRÜSLERİ	4
2.1. Bitki Dayanıklılık Mekanizmaları	5
2.2. Geminivirüslerin Tanımı ve Özellikleri.....	6
3. ŞEKER PANCARININ (<i>Beta vulgaris</i> L.) ÖNEMİ	12
3.1. Şeker Pancarı (<i>Beta vulgaris</i> L.) Bitkisine Virüslerin Etkisi	12
3.1.1.Şeker Pancarı Tepe Kıvırcıklığı Virüsü İki Cins Altında Toplanmıştır; <i>Curtovirus</i> ve <i>Becurtovirus</i>	14
3.2. Dünyada ve Türkiye’de Şeker Pancarı (<i>Beta vulgaris</i> L.) Bitkisinde Tepe Kıvırcıklığı Hastalığının Yayılışı ve Yarattığı Ekonomik Zarar	16
4. MATERYAL VE YÖNTEM	19
4.1. Enfekte Bitki Örneği Toplama.....	19
4.2. Enfekte Şeker Pancarı Genomik DNA İzolasyonu	19
4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Pancar Tepe Kıvırcıklığı Virüsünün (BCTTV) Primer Bazlı Tanımlanması	20
4.4. Pancar Tepe Kıvırcıklığı Türk Virüsü (BCTTV) İzolatlarının Kısmi ve Tüm Genom Dizilemesi	22
4.5. BCTTV İzolatının Enfeksiyöz Klonunun Oluşturulması.....	23
4.6. BCTTV İzolatının Şeker Pancarı Üzerinde Agroiokülasyonu ve Bulaşıcılığın Doğrulanması	24
5. BULGULAR	25
5.1. Pancar Tepe Kıvırcıklığı Türk Virüsü İzolatlarının PCR Bazlı Tanımlanması	25
5.2. Pancar Tepe Kıvırcıklığı Türk Virüslerinin Tüm Genom Analizi	28
5.3. Şeker Pancarı Tepe Kıvırcıklığı Türk Virüsü İzolatlarının Klonlanması	31
6. TARTIŞMA	33
7. KAYNAKÇA	37
8.EKLER	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

SİMGELER

µl	: Mikrolitre
Bp	: Baz çifti
dH ₂ O	: Distile Su
G	: Gram
Ha	: Hektar
Kb	: Kilobaz
L	: Litre
M	: Molar
mM	: Milimolar
Nm	: Nanometre
NO	: Nitrit Oksit
Sn	: Saniye
U	: Ünite

KISALTMALAR

BBSV	: <i>Beet black scorch virus</i>
BChV	: <i>Beet chlorosis virus</i>
BCTD	: Pancar Tepe Kıvrıcıklığı Hastalığı
BCTIV	: <i>Beet curly top Iran virus</i>
BCTTV	: <i>Beet curly top türkiye virüs</i>
BCTV	: <i>Beet curly top virus</i>
BLCV	: <i>Beet leaf curl virus</i>
BMYV	: <i>Beet mild yellows virus</i>
BNYVV	: <i>Beet necrotic yellow vein virus</i>
BOLV	: <i>Beet oak-leaf virus</i>
BSBMV	: <i>Beet soil-borne mosaic virus</i>
BSBV	: <i>Beet soil-borne virus</i>
BtMV	: <i>Beet mosaic virus</i>
BVQ	: <i>Beet virus Q</i>

BWYV	: <i>Beet western yellows virus</i>
BYV	: <i>Beet yellows virus</i>
CP	: Kapsit Protein
CTAB	: Cetyl trimethylammonium bromide,
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotit trifosfat
dsDNA	: Çift zincirli DNA
HCTV	: <i>Horseradish curly top virus</i>
HR	: Aşırı Duyarlı Tepki
IR	: İntergenik Bölge
MP	: Movement Protein
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R geni	: Direnç geni
RCA	: Rolling Circle Amplifikasyon
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: reaktif hidrojen türevleri
SAR	: Sistemik Edinilmiş Direnç
SpSCTV	: <i>Spinach severe curly top virus</i>
ssDNA	: Tek zincirli DNA
TCTV	: <i>Turnip curly top virus</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Geminiviridae</i> familyasının genel yapısı	6
Şekil 2.2. <i>Geminiviridae</i> ssDNA'sının RCR mekanizması ile çoğalması	8
Şekil 2.3. <i>Geminiviridae</i> familyasındaki türlerin temsili izolatlarının genom sekanslarına göre (bipartite geminivirüsler için DNA-A sekansları) Neighbor-Joining yöntemi kullanılarak filogenetik ağacı.....	9
Şekil 2.4. Farklı <i>geminivirus</i> cinslerine ait virüslerin genom organizasyonları.....	10
Şekil 2.5. <i>Geminivirus</i> familyasının vektörü, <i>Hemiptera</i> familyası.....	11
Şekil 3.1. Şeker pancarında benzer semptomlarla tepe kıvrıcıklığı hastalığını yaratan <i>Curtovirus</i> cinsinde bulunan BCTV ile <i>Becurtovirus</i> içerisinde bulunan BCTIV genomik olarak birbirinden farklıdır. MP (V2, movement-hareket proteini), CP (V1 capsit-kılıf proteini) ve Rep (C1 replikasyon proteini)	15
Şekil 3.2. Şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı hastalığı.....	17
Şekil 4.1. Türkiye'de enfekte şeker pancarının toplandığı iller ve miktarları	19
Şekil 5.1. <i>Becurtovirus</i> (A) ve <i>Curtovirus</i> (B) spesifik primerler ile enfekte şeker pancarı Türk koleksiyonunun PCR taraması.....	25
Şekil 5.2. BCTIV-Türk izolatlarının <i>Becurtovirus</i> ve <i>Curtovirus</i> cinslerinde bulunan diğer türlerle filogenik ilişkisi	27
Şekil 5.3. Pancar tepe kıvrıcıklığı Türk virüsü izolatlarının tüm genomları, yuvarlanma PCR amplifikasyonu ve Hind-III enzimatik kesiminin jel elektroforez görüntüsü.....	28
Şekil 5.4. Aşılınmış şeker pancarı yapraklarında Şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı Türk virüsü (BCTTV) amplifikasyonun PCR (A), Real-Time PCR (B) doğrulanması ve hastalık semptomları (C).....	32
Şekil 8.1. Bitki ekspresyon vektörüne BCTTV dimerinin eklenmesi için Takara infüzyon aracı ile klonlama primerlerinin tasarlanması	43
Şekil 8.2. BCTTV bulaşıcı klon oluşturulması ve koloni PCR ile doğrulanması.....	45

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1. Şeker pancarında enfeksiyon oluşturan virüsler	13
Tablo 4.1. BCTTV'nin moleküler tanımlanmasında kullanılan Curtovirus cinsi ve Becurtovirus cinsine özgü spesifik primerler.	21
Tablo 4.2. BCTTV'nin moleküler tanımlanmasında kullanılan PCR döngü basamakları.....	21
Tablo 4.3. BCTTV'nin moleküler tanımlanmasında kullanılan <i>Becurtovirus</i> cinsine özgü Primer 3 programı ile tasarlanan spesifik primerler.	24
Tablo 5.1. Beş Türk pancar tepe kıvrıcıklığı virüsü izolatının tüm genomu ve kodlama dizisi ve bunların daha önce bildirilen <i>Becurtovirus</i> suşları ile genomik benzerlikleri.....	29
Tablo 8.1. <i>Agrobacterium</i> bitki ifade vektörünün HindIII enzimi ile kesimi.. ..	43
Tablo 8.2. İnsert 1 için BCTTV-1.0 genomunun PCR amplifikasyonu.	44
Tablo 8.3. İnsert 2 için BCTTV-2.0 genomunun PCR amplifikasyonu.	44
Tablo 8.4. İki BCTTV klonunun bitki ekspresyon vektörüne ligasyonu.....	44
Tablo 8.5. Koloni PCR reaksiyonu ile ligasyonun doğrulanması.	45

1. GİRİŞ

Pancar tepe kıvrıcıklığı hastalığı (BCTD), Orta Doğu, Kuzey ve Orta Amerika, Hindistan Yarımadası ve Akdeniz Havzasının kurak ve yarı kurak bölgelerinde görülen yıkıcı, verimi sınırlayan bitki viral enfeksiyonudur (Bennett ve Tanrisever, 1957; Gibson, 1967; Bennett, 1971; Chen et al., 2010; Heydarnejad et al., 2013; Strausbaugh and Eujaly, 2017). Tepe kıvrıcıklığı virüsünün en yaygın konukçusunun şeker pancarı (*Beta vulgaris*) olduğu bilinmektedir. Pancar tepe kıvrıcıklığı hastalığının üç farklı cinse ait olduğu bilinmektedir: Pancar tepe kıvrıcıklığı virüsü (BCTV, *Curtovirus*) ve pancar tepe kıvrıcıklığı İran virüsü (BCTIV, *Becurtovirus*) ve nadiren turnip tepe kıvrıcıklığı virüsü (TCTV, *Turncurtovirus*) (Varsani et al., 2014a and Varsani et al., 2014b; Kamali et al., 2016). Her üç virüs de *Circulifer tenellus* ve / veya *C. haematoceps* tarafından taşınan halkasal tek sarmallı genomik DNA'ya sahiptir (Fauquet, et al., 2000; Varsani et al., 2014a). BCTV'nin çeşitli fenotipik varyantları ve genetik olarak karakterize edilmiş türleri, daha önce şeker pancarı için nedensel etkenler olarak tanımlanmıştır (Strausbaugh et al., 2008). Adams ve Carstens'in (2013) önerisine göre, %94'ün üzerinde genomik sekans benzerliğine sahip olan *Curtovirus* cinsi aynı türün varyantları olarak kabul edilirken, %77 veya daha az sekans benzerliği farklı türler olarak kabul edilmiştir. Bu genomik değerlendirme, üç *Curtovirus* türü ortaya çıkarmıştır: *Curtovirus* cinsi pancar tepe kıvrıcıklığı virüsü (BCTV), ıspanak şiddetli tepe kıvrıcıklığı virüsü (SpSCTV) ve Yaban turpu tepe kıvrıcıklığı virüsü (HCTV) olmak üzere üç farklı türü kapsamaktadır. (Varsani et al, 2014a). Bu yeniden sınıflandırmadan sonra, daha önce farklı *Curtovirus* spp. olarak bilinen (Kaliforniya/Logan, Kolorado; Hafif; Şiddetli; biber tepe kıvrıcıklığı; ıspanak tepe kıvrıcıklığı ve Kolorado) BCTV'nin suşları olarak kabul edilmiştir. Tarihsel olarak BCTV 1888'de ABD'nin Batı bölgelerinde keşfedilmiştir ve 1930'ların ortasında dirençli kültürler ortaya çıkana kadar bölgede şeker pancarı üretimini neredeyse ortadan kaldırmıştır (Strausbaugh et al., 2008). Bununla birlikte, kombine insektisit tedavileri ile kültür direnci kullanımının sadece hastalık insidansını azalttığı bildirilmiştir (Strausbaugh et al., 2012; 2014). Bazı raporlar, dirençli şeker pancarı kültürlerinin genç evrede enfekte olmaları durumunda önemli verim sınırlamalarına sahip olabileceğini göstermiştir (Strausbaugh et al., 2016). ABD'nin Batı bölümünde hâlâ büyük bir sorun olduğu ve hastalığın bölgede önemli ekonomik kayıplara yol açabileceği bildirilmiştir (Strausbaugh and Eujaly,

2017). BCTV, şeker pancarına ek olarak, 44 bitki ailesinde 300'den fazla geniş yapraklı türü enfekte eden geniş bir konukçu bitki aralığına sahiptir. Domates, biber, fasulye, patates, ıspanak, su kabağı, lahana, kaba yonca ve birçok yabancı ot türü tepe kıvrıcıklığı virüslerinin konukçu bitkisidir (Zerbini et al., 2017). Bu nedenle, tarımsal bitkilerin yetiştirilmesi de ABD'deki BCTV salgınlarından etkilenmiştir (Chen et al., 2010). BCTV salgınlarına neden olan faktörler tam olarak anlaşılmadığından, her yıl tarımsal üretim için göreceli hastalık insidansını ve şiddetini tahmin etmek zordur (Strausbaugh and Eujaly, 2017). *Curtovirus* cinsi üyelerinin şeker pancarı üzerinde damar şişmesi (enasyon), yaprak kıvrılması, yaprakların esnekliği ve bodur büyüme gibi tipik hastalık semptomları vardır. (Strausbaugh and Eujaly, 2017). Benzer semptomlar, şeker pancarında, son yıllarda farklı bir tepe kıvrıcıklığı virüsü olan pancar tepe kıvrıcıklığı İran virüsü (BCTIV) için de bildirilmiştir (Heydarnejad et al., 2013; Bolok-Yazdi et al., 2008). BCTIV'in biyolojik ve semptomatik özellikleri *Curtovirus* cinsi ile yakından ilişkilidir (Heydarnejad et al., 2007). Bununla birlikte, BCTIV'in genom yapısında nükleotid sekansının, *Curtovirus* cinsinde oldukça farklı olduğu bulunmuştur (< %60 genomik benzerlik). Bitki enfeksiyonu sırasında semptomatik benzerliğe rağmen, iki cins genom dizisi, organizasyonu ve açık okuma çerçevelerinin sayısı bakımından farklıdır. *Curtovirus* üyeleri tamamlayıcı oryantasyonda dört açık okuma çerçevesine (C1-C4) sahipken, *Becurtovirus* cinsi aynı oryantasyonda sadece iki açık okuma çerçevesine (C1-C2) sahiptir (Heydarnejad et al., 2013). BCTIV genomunun kapsit proteini, *Curtovirus* cinsi benzeri iken, replikasyonla ilişkili protein (Rep) dizisi Mastrevirus cinsine daha yakındır. Viral ve tamamlayıcı zincir açık okuma çerçevelerinin büyük ve küçük intergenik bölgelerle ayrılması BCTIV'nin bir başka genomik özelliğidir. Şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı hastalığının viral etmenlerinin iki cins içerisinde sınıflandırılması kararlaştırılmıştır: *Geminiviridae* ailesinden *Curtovirus* ve *Becurtovirus* üyesi olarak tanımlanmıştır. (Varsani et al., 2014b). BCTIV'in İran'daki şeker pancarı ve diğer önemli mahsuller için yaygın bir virüsü olduğu bildirilmiştir. Buna bağlı olarak BCTIV enfeksiyonu, İran'da tarımsal üretim için önemli yıllık hasara ve verim azalmasına neden olmuştur (Heydarnejad et al., 2007; Bolok-Yazdi et al., 2008; Heydarnejad et al., 2013; Soleimani et al, 2013; Gharouni-Gharouni-Kardani et al., 2013; Eini et al., 2016; Kamali et al., 2017; Tahan et al., 2020).

Şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı hastalığının yirmi yılı aşkın süredir Türkiye'nin şeker pancarı üretiminde önemli verim azalmasına neden olduğu bildirilmiştir. Türk şeker pancarı tarım arazilerinde tepe kıvrıcıklığı virüsünün semptomatik olarak saptanması ilk kez 1960'larda bildirilmiştir (Bennett ve Tanrısever, 1958; Tanrısever, 1961; Bennett, 1971). Küresel ısınmanın artmasıyla birlikte hastalığın keşfinden sonra, hastalık insidansının son on yılda daha sık ve şiddetli olduğu bildirilmiştir. Kaya vd. (2013), Türkiye'nin özellikle bazı orta bölgelerinde her yıl tepe kıvrıcıklığı hastalığının ortaya çıkmaya başladığını ve bazı şeker pancarı tarlalarında %50 verim azalmasına neden olduğunu belirtmişlerdir. Şeker pancarı üretimi üzerindeki olumsuz etkilerine rağmen, Türkiye'de pancar tepe kıvrıcıklığı virüsü BCTD'ye neden olan virüsün etiyolojisi henüz Türkiye'de genetik olarak izlenmemiştir. Bu tür genetik ve moleküler tanımlamalar, virüslerin türünü belirlemek ve ticari kültürlerin viral hastalığa karşı performansını test etmek için oldukça önemlidir. Bu çalışma, öncelikle Türk şeker pancarı koleksiyonundaki yaygın tepe kıvrıcıklığı virüsün türlerinin veya suşlarının PCR-primer bazlı tespiti amaçlamaktadır. Tepe kıvrıcıklığı virüs izolatları için genom dizilemesi, BCTD'ye neden olan virüs türlerini değerlendirmek ve tanımlamak için kullanılmıştır. PCR temelli tarama ve genom sekanslama ile Türkiye'de yayılım gösterilen tepe kıvrıcıklığı virüs izolatları tespit edildikten sonra virüsün *Agrobacterium* içerisine klonlanarak şeker pancarında hastalığın kontrollü olarak yaratılması da hedeflenmiştir. Bu çalışma kapsamında, Türkiye'de şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı hastalık etmenlerinin ilk defa genetik olarak tanımlanması ve bu virüslerin ıslah programlarında şeker pancarının dayanım ve hassasiyetini test etmek için kullanılması amaçlanmıştır.

2. BİTKİ VİRÜSLERİ

Bitki virolojisinin ve başlı başına virolojinin başlangıcı, daha sonra tütün mozaik virüsü olarak adlandırılan ilk virüsün 1892'de Ivanovski ve 1898'de Beijerinck tarafından rapor edildiği 19. yüzyılın sonlarına kadar uzanmaktadır. Bu iki öncü çalışmadan bu yana, yaklaşık olarak 1400 bitkiyi enfekte eden 4400'e yakın başka virüs türü tanımlanmıştır (Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi'nin 10. Raporu, ICTV). Bitki virüslerinin büyük çoğunluğu, virüs partiküllerini, virüs replikasyonuna yatkın bitki hücre türlerinin sitoplazmasına doğrudan enfekte etme kapasitesine sahip bir vektör organizması tarafından bulaşmaktadır. Bir virüs bir veya düzinelerce farklı bitki türünü enfekte edebilir ve her bitki türüne genellikle birçok farklı virüs türü saldırabilmektedir. Bir bitkiye bazen aynı anda birden fazla virüs bulaşabilmektedir (Agrios, 2005).

Virüsler bölünmez ve spor gibi herhangi bir özel üreme yapısı üretmemektedirler. Bunun yerine, daha fazla virüs oluşturmak için konakçı hücreleri indükleyerek çoğalmaktadırlar. Virüsler, hücreleri tüketerek veya toksinlerle öldürerek değil, çoğalma sırasında hücresel maddeleri kullanarak, hücrelerde yer kaplayarak ve hücresel süreçleri bozarak hastalığa neden olmaktadır. Bunların sonucunda ise hücresel metabolizma bozulmaktadır. Ayrıca hücrenin veya organizmanın işlevlerine ve yaşamına zarar veren anormal maddelerin ve koşulların gelişmesine yol açmaktadır (Agrios, 2005).

Her bitki virüsü en az bir nükleik asit ve bir proteinden oluşmaktadır. Bazı virüsler birden fazla boyutta nükleik asit ve proteinlerden oluşur ve bazıları enzimler veya membran lipitleri içermektedir. Nükleik asit virüsün %5-40 oranında bir alanını oluşturmaktadır geri kalan %60-90 oranlık kısım protein tarafından tamamlanmaktadır. Düşük nükleik asit yüzdeleri uzun virüslerde bulunurken, küresel virüsler daha yüksek nükleik asit yüzdeleri içermektedir (Agrios, 2005).

İlk bitki virüsünün tanımlanmasından bu yana sadece yüz yıldan fazla bir süre içinde bitki virüsü türlerinin sayısı katlanarak artış göstermiştir. Üstel artış sadece yeni virüslerin keşfine değil aynı zamanda gelişmiş teşhis testlerine ve virüs enfeksiyonlarının diğer koşullarla karıştırıldığı vakaların düzeltilmesiyle de ilişkilidir. Uluslararası hareketin artması ve ticaretin küreselleşmesi de virüslerin ülkeler arasında yayılmasını ve çoğalmasını etkilemiştir (Tennant et al., 2018).

Virüs hastalıkları, bitkileri etkileyen yeni ortaya çıkan hastalıkların %47'sini oluşturmaktadır (Anderson et al., 2004). Bu nedenle, bitki enfekte eden virüsler çok başarılıdır. Virüs konakçıları olarak bitkiler, hayvanlardan ve hatta bakterilerden çeşitli şekillerde farklılık göstermektedir. Hayatta kalabilmek için bitki enfekte eden virüslerin bir konakçı bitkiden diğerine geçmek için etkili araçlara sahip olması gerekmektedir. Bitki virüslerinin bitkiden bitkiye yayılması aşı, tohum ve yumrular veya böcekler, nematodlar, funguslar ve plasmodiophorid gibi vektörler tarafından gerçekleştirilmektedir (Raccach ve Fereres, 2009). Bitki virüslerinin büyük çoğunluğu, bir bitkiden diğerine taşınmalarını ve hayatta kalmalarını sağlamak için spesifik vektörler kullanmaktadır. Bitki virüslerinin vektörlerle taşınması konusunda yapılan çalışmalar oldukça önemlidir. Taşınmanın vektöre spesifik gerçekleşmesi için kapsit proteini (CP) veya türevleri (Readthrough CP ve yardımcı CP), yardımcı komponent (HC) ve taşınma faktörünü içeren yapısal olmayan proteinler önemli bir yere sahiptir.

2.1. Bitki Dayanıklılık Mekanizmaları

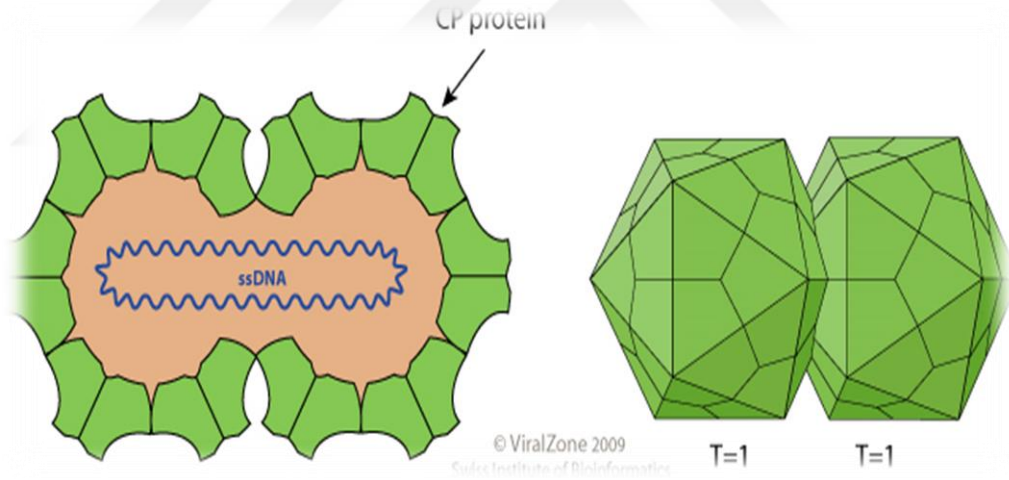
Bir virüs yalnızca belirli bitki türlerini enfekte edebilmektedir. Virüs bir bitki türüne bulaşabilir ve çoğalabilirse, bitki bu mikroorganizma için bir konakçı olarak adlandırılmaktadır. Virüs bir bitki türünü enfekte edemezse, bitki türü konakçı olmayan olarak tanımlanmaktadır. Konakçı olmayan bir türü enfekte edememe, genellikle hücre duvarı, kütikula tabakası gibi enfeksiyona yapısal savunmaların yanı sıra bazı maddeler hem konakçı hem de konakçı olmayan patojenlere karşı engelleyici role sahip biyokimyasal savunma olup ve bitki tarafından salgılanmaktadır. Bu maddeler arasında fenolik maddeler ve fenol yapılı olmayan bileşikler olarak ayrılmaktadır. Örneğin, enfeksiyon sonrası oluşan biyokimyasal moleküller, salisilik asit, reaktif hidrojen türevleri (ROS) ve nitrit oksit (NO)'tir. Bu moleküller dokularda dayanıklılık sinyallerini oluşturmaktadır (Soosaar, 2005).

Diğer bir savunma mekanizması ise genetik dayanıklılıktır. Her bir R geni, belirli bir patojene direnç kazandırır. Çoğu R-gen aracılı direnç tepkisinde ilk savunma fenotipi aşırı duyarlı tepkidir (HR). HR'ye, bitki direnç genlerinin (R) etkisi aracılık eder ve virüsün bitki boyunca daha fazla yayılmasını önleyen giriş noktasındaki bir programlı hücre ölüm alanının geliştirilmesi ile karakterize edilmektedir (Tennant et al., 2018). Virüs genellikle lezyonla ve onu hemen çevreleyen hücrelerle sınırlıdır ve lezyonlardan komşu sağlıklı dokulara

yayılmamaktadır. R-gen aracılı direncin ikinci fenotipi - sistemik edinilmiş direnç (SAR) ilk enfeksiyon bölgesinden uzak dokularda meydana gelir ve onları aynı veya yakından ilişkili patojenlerin neden olduğu enfeksiyona karşı bağışıklık kazandırmaktadır. Gen susturma (gene silencing), bitkilerde virüslere karşı geliştirilmiş doğal bir savunma mekanizmasıdır. Ago proteini RISC ile birlikte hedef viral ssRNA'yı kesmektedir. RISC ile siRNA komponenti parçalanmış hedef RNA'ya yapışarak viral RNA'nın yapısı değişir. Yeni oluşan RNA'nın protein sentez dizisi tamamen değişmekte ve etkili bir şekilde susturulmaktadır (Soosaar, 2005).

2.2. Geminivirüslerin Tanımı ve Özellikleri

Bilinen bitki virüs türlerinin çoğu tek sarmallı (ss)RNA genomlarına sahipken (Zaitlin ve Palukaitis, 2000), dünya çapında ekinlere karşı ortaya çıkan en büyük tehdit, *Geminiviridae* ailesindeki ssDNA genomlarına sahip virüslerdir (Harkins et al., 2009). *Geminivirus* ailesi, küçük, zarfsız 2.5-5.2 kb'lik bir veya iki adet tek iplikli halkasal DNA genomlarına sahip geniş bir bitki virüs ailesidir.



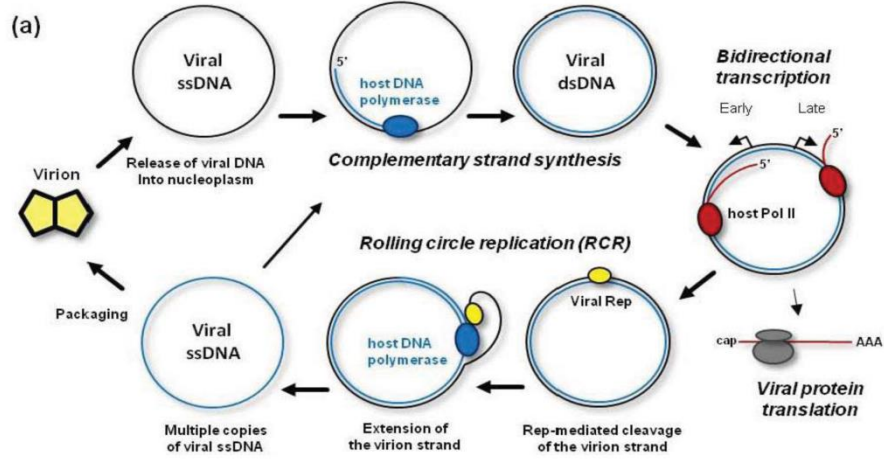
Şekil 2.1. *Geminiviridae* familyasının genel yapısı (ViralZone, 2020)

Kapsid, uzun ve çift olup, ikosahedral simetri göstermektedir. Toplam 22 kapsomerden oluşan kapsid, 22 nm çapında ve 38 nm uzunluğunda olmakla birlikte adını üyelerinin karakteristik ikiz (geminiate) parçacık morfolojisinden almıştır (ICTV, 2020). *Geminivirus* ailesi, tüm dünyada agronomik açıdan önemlidir (Lazarowitz, 1992). Hem monokotiledon hem de dikotiledon bitkileri enfekte etmektedir. *Geminivirus* genellikle domates, mısır, pamuk, nohut gibi ekonomik açıdan önemli mahsullerde ciddi verim kayıplarından sorumludur. *Geminivirus*

enfeksiyonlarının semptomları arasında yaprak buruşması, kıvrılma, sararma, bodurluk, mozaik ve / veya çizgiler yer almaktadır (ICTV, 2020).

Geminivirus ailesi tek bir yapısal protein içermektedir. Virionlarla ilişkili başka protein bulunamamıştır. Genom, çift sarmallı ara ürünler yoluyla replike olmaktadır. Replikasyon (Rep) proteini, DNA replikasyonu için konakçı DNA polimerazını kullanarak replikasyon başlatmakta ve sonlandırmaktadır. Intergenik bölgede ssDNA sentezinin başlatıldığı korunmuş bir nükleotid sekansı (TAATATTAC) içeren potansiyel bir kök-ilmek yapısı bulunmaktadır (ICTV, 2020).

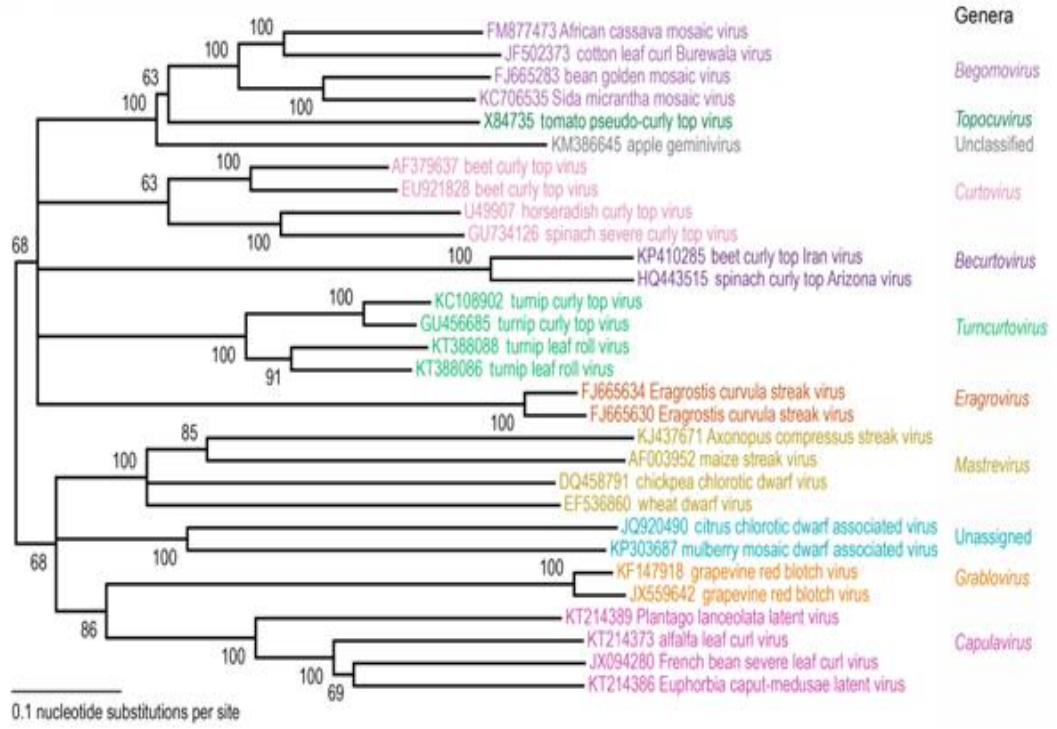
Virüs DNA sı tek zincirli olmasına karşın hücre içerisine girdiğinde çift zincirli hale geçmektedir. *Geminiviridae* familyası virüs ssDNA sınıfının çoğalma mekanizması Rolling circle replikasyon (RCR) mekanizması ile açıklanmaktadır (Şekil 2.2). Bu sistemde virüs DNAsı hücre içeriinde aktarıldıktan sonra konak hücreye ait nükleus içerisine yönlendirilmektedir. Nükleusta DNA polimerazlar kullanılarak tek zincirli olan halkasal DNA çift zincirli hale getirilir. Çift zincirli bu virüs DNAsı REP ve kılıf proteini olmak üzere iki protein için gerekli mRNA sentezinde kalıp görevi üstlenmektedir. Konak hücre enzimleri kullanarak üretilen mRNAlar sitoplazmaya geçerek burada translasyonla REP ve kılıf proteini üretilmeye başlanmaktadır. REP proteini daha sonra tekrar nükleusa geri dönerek burada RCA mekanizması ile virüs DNAsının çoğaltılması için gerekli replikasyonu başlatmaktadır. Bunun için REP virüs DNAnın replikasyon orijinden bir zincire kesik atarak konak DNA hücresi tarafından 3' ucuna doğru replikasyonun yapılmasını sağlamaktadır. Bu sayede her seferinde boş kalan tek zincirli virüs DNA'sı ya yeni replikasyonlar için kılıf proteinlerine sarılarak yeni virüslerin oluşturulması için ya da bitkide plazmodezmal aracığı ile diğer hücrelere geçerek orada çoğalmak için kullanılmaktadır. Virüslerin enfeksiyon etkisi hücresel çapta yavaşken, virüslerin iletim demetlerine yayılmaya başladıklarında hızlı bir patojenite göstererek bitkide ciddi zararlara sebep olmaktadır (Pooggin,2013).



Şekil 2.2. Geminiviridae ssDNA'sının RCR mekanizması ile çoğalması (Pooggin, 2013)

Bu tür virüsler, virüs protein C4, protein C2, kapsid protein (coat protein), hareket proteini, replikasyon artırıcı protein, replikasyondan sorumlu protein (REP) ve protein V2 olmak üzere toplam 7 adet protein sentezlemektedir. Yapılan sekans analizleri tüm geminiviridae familyasında özellikle REP genlerinde ve replikasyon orijinlerinde çok yoğun korunmuş bölgelerin bulunduğunu ve bu bölgelerin virüsün replikasyonu için şart olduğunu ortaya koymuştur (Nash et al., 2011).

Geminiviridae familyasındaki cins sınır belirleme kriterleri arasında konakçı aralığı (monokotlar veya dikotlar), vektör tipi (yaprak bitleri, yaprak zararlıları, ağaç zararlıları, beyaz sinekler), genom organizasyonu (monopartit veya dipartit) ve filogenetik ilişkiler bulunmaktadır. *Geminiviridae* familyasındaki temsili türlerin izolatlarından alınan genom dizilerinin filogenetik analizi, geminivirüslerin dokuz cinse karşılık gelen gruplar halinde kümelendiğini göstermektedir (Şekil 2.3).



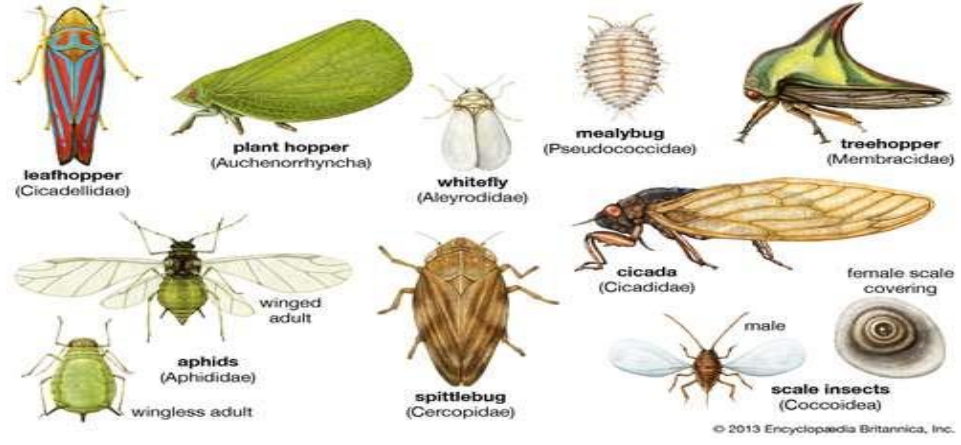
Şekil 2.3. Geminiviridae familyasındaki türlerin temsili izolatlarının genom sekanslarına göre (bipartite geminivirüsler için DNA-A sekansları) Neighbor-Joining yöntemi kullanılarak filogenetik ağacı (ICTV,2020)

Şu anda *Geminivirus* ailesi dokuz cinse göre sınıflandırılmıştır: *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* ve *Turncurtovirus*, genom organizasyonları şekil 2.4'te gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Farklı *geminivirus* cinslerine ait virüslerin genom organizasyonları (ICTV, 2020)

Dokuz tanınmış cins ve 500'e yaklaşan bir dizi türle, *Geminiviridae* ailesinin en büyük evrimsel başarıya sahip bitki virüsü ailesi olduğu ortaya çıkmıştır. Genellikle monopartit genoma sahip olmakla birlikte (*Begomovirus* hariç) konakçılarını verimli bir enfeksiyona yönlendirmek için 5-7 protein kodlamaktadırlar (ICTV, 2020).



Şekil 2.5. *Geminivirus* familyasının vektörü, *Hemiptera* familyası (DeLong, 2013)

Geminivirus familyası, *Hemiptera* familyasında bulunan (beyaz sinekler, yaprak zararlıları, yaprak bitleri ve ağaç zararlıları) çeşitli böcekler tarafından iletilmektedir (Şekil 2.4). *Becurtovirus*, *Mastrevirus*, *Turncurtovirus* ve *Curtovirus* yaprak zararlıları ile taşınmaktadır. *Begomovirus* beyaz sineklerle, *Capulavirus* yaprak bitiyle, *Topocuvirus* ise ağaç zararlısı aracılığıyla taşınmaktadır (ICTV, 2020).

3. ŞEKER PANCARININ (*Beta vulgaris* L.) ÖNEMİ

Şeker pancarı, şeker kamışından sonra dünyada şeker üretimin de kullanılan en önemli bitki türü olup iki yıllık yazlık bir kültür bitkisidir. Birinci yılda toprak altında kök gövdesini oluşturarak şeker elde edilmesine olanak sağlamaktadır. İkinci yılda ise sapa kalkarak toprak üstü organlarını geliştirerek tohum oluşturmaktadır (Geçit vd., 2011). İnsan beslenmesinde önemli bir yeri olan şeker; Avrupa'da ve ülkemizde şeker pancarından (*Beta vulgaris* L.) elde edilmektedir. Şeker pancarı *Amaranthaceae* familyasında yer alan ekonomik öneme sahip bir kültür bitkisidir (Monteiro et al., 2013). Beslenmenin temel maddesi olmasının yanı sıra, tarımsal üretime katkısı, yan ürünler ve istihdama katkısı nedeniyle şeker tüm dünyada korunan bir ürün haline gelmiştir (Akbaş, 2003; Erdinç, 2017).

Şeker Fabrikaları, Türkiye Cumhuriyeti'nin ilk sanayi işletmelerindedir. Şeker fabrikası kurma çalışmaları ilk defa, Uşak'lı Molla Ömeroğlu Nuri (Şeker) adında bir çiftçi tarafından Uşak'ta başlatılmıştır. 6 Kasım 1925 tarihinde ilk şeker fabrikasının temeli atılmıştır. Türkiye şeker ve şeker pancarına verdiği önem sonucunda dünya ölçeğinde bir ülke olmayı başarmıştır. Türkiye; pancardan şeker üreten ülkeler arasında önemli bir konuma sahip olup, Dünya'da Rusya, Fransa, Almanya ve ABD'nin ardından beşinci, Avrupa Kıtası içerisinde Rusya, Fransa ve Almanya'nın ardından dördüncü sırada yer almaktadır. Pancar ekimi ve şeker sanayisi Türkiye ekonomisi için önemini korumaktadır (Anonim, 2020).

Şeker, dünyada stratejik öneme sahip bir üründür. Şeker pancarının, Türkiye'de ve birçok ülkede tarım politikalarında öncelikli olmasının temel nedeni endüstriyel bir bitki olmasıdır. Şeker pancarının işlenmesi sonucu ortaya çıkan yan ürünlerin tamamına yakını stratejik ürünlerdir. Küspe, melas, etanol bunlardan başlıcalarıdır. Melas ve küspe hayvan yemi olarak kullanılmakla birlikte ispiroto üretimiyle içki sanayinin önemli bir hammaddesidir. Bunların yanı sıra şeker; maya, antibiyotik, bio-etanol gibi birçok ürünün hammaddesini oluşturmaktadır (Sunulu, 2016).

3.1. Şeker Pancarı (*Beta vulgaris* L.) Bitkisine Virüslerin Etkisi

Dünya'da şeker pancarında verimi olumsuz etkileyen, fungal, bakteriyel ve viral kaynaklı toplam 82 hastalıktan, 51'i ülkemizde sorun oluşturmaktadır (Özgür, 2003). Viral hastalıklar şeker pancarında önemli bir yere sahiptir. Dünya'da şeker

pancarı üretim alanlarında enfeksiyona neden olan ve yaygın olarak görülen virüsler tabloda verilmiştir.

Tablo 3.1. Şeker pancarında enfeksiyon oluşturan virüsler (Biancardi and Lewellen, 2016)

Virüs Adı	Cins	Familya	Vektör
<i>Beet curly top virus</i> (BCTV)	<i>Curtovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	<i>Circulifer tenellus</i>
<i>Beet curly top Iran virus</i> (BCTIV)	<i>Becurtovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>	<i>Circulifer haematoceps</i>
<i>Beet leaf curl virus</i> (BLCV)	<i>Nucleorhabdovirus</i>	<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Piesma quadrata</i>
<i>Beet yellows virus</i> (BYV)	<i>Closterovirus</i>	<i>Closteroviridae</i>	<i>Myzus persicae</i> <i>Aphis fabae</i>
<i>Beet mild yellows virus</i> (BMYV)	<i>Polerovirus</i>	<i>Luteoviridae</i>	<i>Myzus persicae</i>
<i>Beet western yellows virus</i> (BWYV)	<i>Polerovirus</i>	<i>Luteoviridae</i>	<i>Myzus persicae</i>
<i>Beet chlorosis virus</i> (BChV)	<i>Polerovirus</i>	<i>Luteoviridae</i>	<i>Myzus persicae</i>
<i>Beet mosaic virus</i> (BtMV)	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	<i>Myzus persicae</i> <i>Aphis fabae</i>
<i>Beet necrotic yellow vein virus</i> (BNYVV)	<i>Benyvirus</i>	<i>Benyviridae</i>	<i>Polymyxa betae</i>
<i>Beet soil-borne mosaic virus</i> (BSBMV)	<i>Benyvirus</i>	<i>Benyviridae</i>	<i>Polymyxa betae</i>
<i>Beet soil-borne virus</i> (BSBV)	<i>Pomovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>	<i>Polymyxa betae</i>
<i>Beet virus Q</i> (BVQ)	<i>Pomovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>	<i>Polymyxa betae</i>
<i>Beet oak-leaf virus</i> (BOLV)	<i>Varicosavirus</i>	<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Polymyxa betae</i> ?
<i>Beet black scorch virus</i> (BBSV)	<i>Betanecrovirus</i>	<i>Tombusviridae</i>	<i>Olpidium brassicae</i>

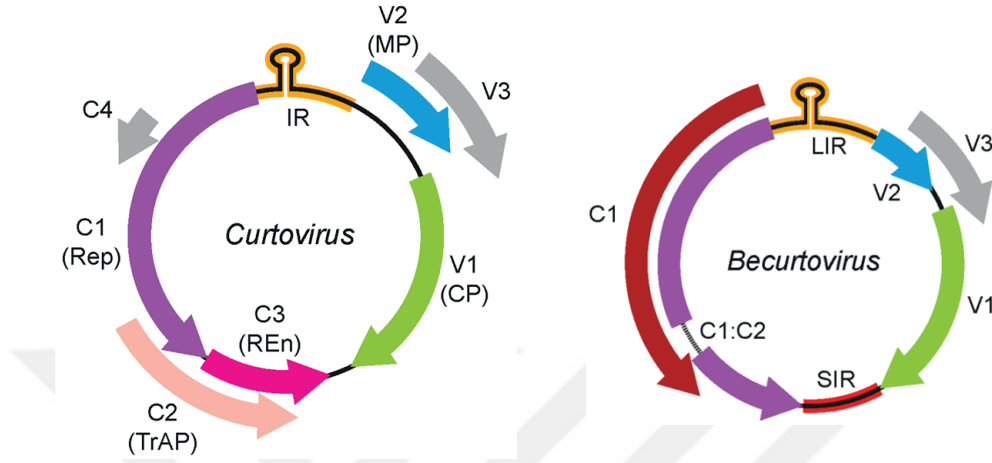
Bu virüslerden; *Beet curly top virus* (BCTV)'ün neden olduğu hastalık şeker pancarında ekonomik olarak zarara neden olan en önemli viral hastalıktır (Bennett, 1971).

3.1.1. Şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı virüsü iki cins altında toplanmıştır; *Curtovirus ve Becurtovirus*

Şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı hastalığını yaratan virüsün ilk olarak Amerika'da keşfedilmesinden sonra, virüsün en yaygın konukçu bitkisi olması nedeniyle, resmi olarak pancar tepe kıvrıcıklığı virüsü (BCTV) olarak adlandırılmıştır (Strausbaugh et al., 2008). *Curtovirus* cinsi içerisine yerleştirilen bu virüsler, Geminiviridae ailesine ait yaprak zararlıları ile bulaşan tek parçalı DNA virüsleridir (Strausbaugh and Eujaly, 2017). BCTV, ssDNA genomuna sahip olup 3kb nükleotid uzunluğundadır (Büchen-Osmond, 2006). BCTV'nin monopartit genomu viral yönde (V1 – V3) üç açık okuma çerçevesini (ORF) ve tamamlayıcı yönde (C1 – C4) dört tane kodlamaktadır (Hormuzdi and Bisaro, 1993; Stanley and Latham, 1992; Stanley et al., 1986; Stanley et al., 1992). Viral DNA'nın replikasyon orijini oluşturulan 450 bp intergenik bölgede ssDNA sentezinin başlatıldığı bir korunmuş nonanükleotid sekans TAATATT | AC içeren potansiyel bir kök-halka yapısı vardır (Baliji et al., 2004; Briddon et al., 1998; Klute et al., 1996; Stanley et al., 1986; Stenger, 1994; Gilbertson et al., 2019). İntergenik bölge (IR), *Curtovirus* cinsi üyeleri arasında çeşitlilik göstermekte ve DNA replikasyonu sırasında Rep bağlayıcılarına aracılık eden, türe spesifik tekrarlı iteron adı verilen diziler içermektedir (Arguello-Astorga et al., 1994; Hanley-Bowdoin et al., 1999; Soto et al., 2005; Stenger, 1998). Amerika'daki *Curtovirus* cinsine ait BCTV olarak birçok varyant ve tür tanımlanmıştır.

Iran'da yapılan genomik çalışmalar hem tarla hem de sera koşullarında şeker pancarı, domates ve biberde yıkıcı hasara neden olan bu virüslerin *Beet curly top Iran Virüsü (BCTIV)* olduğunu ortaya koymuştur. (Gharouni Kardani et al., 2013; Tahan et al., 2020). BCTIV'in biyolojik özellikleri ve semptomatik özellikleri *Curtovirus* cinsine çok benzediğinden ilk olarak bu cins içerisinde farklı bir tür olduğuna karar verilmiştir. Ancak BCTIV türleri BCTV türlerinden genom çapında (<%60 genomik benzerlik) oldukça farklı olduğu ortaya konmuştur (Varsani et al., 2014a). BCTIV genomunun kapsit proteini, *Curtovirus* cinsi benzeri iken, replikasyonla ilişkili protein (Rep) dizisi Mastrevirus cinsine daha yakındır. Viral ve tamamlayıcı zincir açık okuma çerçevelerinin büyük ve küçük intergenik bölgelerle ayrılması BCTIV'lerin bir başka genomik özelliğidir (Varsani et al., 2014b). Bitki enfeksiyonu sırasında semptomatik benzerliğe rağmen, iki cins genom dizisi,

organizasyonu ve açık okuma çerçevelerinin sayısı bakımından farklıdır. *Curtovirus* üyeleri tamamlayıcı oryantasyonda dört açık okuma çerçevesine (C1-C4) sahipken, *Becurtovirus* cinsi aynı oryantasyonda sadece iki açık okuma çerçevesine (C1-C2) sahiptir (Heydarnejad et al., 2013).



Şekil 3.1. Şeker pancarında benzer semptomlarla tepe kıvrıcılığı hastalığını yaratan *Curtovirus* cinsinde bulunan BCTV ile *Becurtovirus* içerisinde bulunan BCTIV genomik olarak birbirinden farklıdır. MP (V2, movement-hareket proteini), CP (V1 capsit-kılıf proteini) ve Rep (C1 replikasyon proteini).

Virüs taksonomisinde yapılan revizyonlar ile bu karışıklığın önüne geçmek için *Curtovirus* cinsi içerisinde bulunan virüslerden %94'ten fazla genomik dizi benzerliği sahip türlerin aynı türün varyantları olarak kabul edilmesine, %77 veya daha az dizi benzerliği olan virüslerin ise farklı türler olarak kabul edilmesi gündeme gelmiştir. (Varsani et al., 2014). Bu şekilde *Curtovirus* türleri Adams ve Carstens (2013) ile Varsani et al., (2014) önerisiyle genomik olarak yeniden değerlendirilmeye alınmıştır. Bunun sonucunda şeker pancarı tepe kıvrıcık hastalığının viral etmenlerinin iki cins içerisine sınıflandırılması kararlaştırılmıştır: *Geminiviridae* ailesinden *Curtovirus* ve *Becurtovirus* üyesi olarak tanımlanan bu virüsler şeker pancarı üzerinde damar şişmesi (enasyon), yaprak kıvrılması, yaprak esneksizliği ve bodur büyüme gibi aynı hastalık semptomlarına sahiptir (Strausbaugh and Eujaly, 2017; Kardani et al., 2013).

Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV) sınıflandırmasına göre, *Curtovirus* cinsi Pancar tepe kıvrıcılığı virüsü (BCTV), ıspanak şiddetli tepe kıvrıcılığı virüsü (SpSCTV) ve Yaban turpu tepe kıvrıcılığı virüsü (HCTV) olmak üzere üç farklı türü kapsamaktadır. Bu yeniden sınıflandırmadan sonra, daha önce

farklı *Curtovirus* türleri (Kaliforniya/Logan, Kolorado; Hafif; Şiddetli; biber tepe kıvrıcıklığı; ispanak tepe kıvrıcıklığı ve Kolorado) olarak tanımlanan virüslerin BCTV türünün altsuşları olduğu kabul edilmiştir.

3.2. Dünyada ve Türkiye’de Şeker Pancarı (*Beta vulgaris* L.) Bitkisinde Tepe kıvrıcıklığı hastalığının Yayılışı ve Yarattığı Ekonomik Zarar

Şeker pancarını en çok etkilediği bilinen virüs kaynaklı tepe kıvrıcıklığı hastalığı ilk olarak 1888 yılında Nebraska’da Kırmızı pancarlarda görülmüştür. Şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı virüsü olarak da bilinen hastalık, ABD’de en tahripkar virüs hastalıklarından biri olup, zarar düzeyi yıllara göre değişim göstermektedir (Murphy, 1946). Hastalık özellikle kurak ve yarı kurak iklim kuşaklarında bulunan birçok coğrafyada etkili olup global ısınmadan dolayı her geçen yıl virüse bağlı hastalık şiddetinin artacağı öngörülmektedir (Harveson, 2015). Nitekim hastalık, dünyanın kurak ve yarı kurak iklimin hüküm sürdüğü Afrika, Avrupa, Asya; Kuzey, Güney ve Orta Amerika ile Akdeniz Havzası’nda görülmeye başlanmış olup şiddetini her geçen gün artırmaktadır. Bugüne kadar İspanya, İtalya, Türkiye, Kıbrıs, Mısır, İran, Hindistan, Kanada, ABD, Meksika, Kostarika, Portoriko, Arjantin, Bolivya, Brezilya ve Uruguay’da varlığı belirlenmiş hastalığın ilerleyen zamanlarda küresel ısınma ile çok daha büyük alanları etkileyeceği rapor edilmiştir (Büchen-Osmond, 2006). Amerikada hastalık şiddetinin yüksek olduğu yıllarda, tarlaların birçoğunda şeker pancarının tamamı zarar gördüğü için hasat yapılamamıştır. ABD’nin batı eyaletlerinde bazı yerlerde şeker pancarı üretimine son verilmiş ve fabrikalar kapanmıştır. Ancak, 1934 yılında dayanıklı şeker pancarı çeşitleri geliştirilmiş ve bu kayıplar belli bir seviyeye indirilmiştir (Bennett and Leach, 1977). 1950’li yıllara göre, 1970’li yıllarda ABD’de Şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı virüsünün şiddeti artmıştır. Idaho’nun batısında hastalığın şiddetli seyrettiği bölgelerde, şeker pancarı veriminin %27 oranında düştüğü rapor edilmiştir (Mumford and Peay, 1970). Aynı yıllarda Kaliforniya’da oldukça şiddetli seyreden hastalık, bitkilerde bodurlaşma ve ölümlere yol açarak, verimin azalmasına sebep olmuştur. Hastalığın şiddetli seyrettiği durumlarda, dayanıklı şeker pancarı çeşitlerinin %72’sinde dahi belirtiler görüldüğü ve %13’ü aşan verim kayıplarına yol açtığı belirlenmiştir. Virulent izolatların, duyarlı ve dayanıklı şeker pancarı çeşitlerinin şeker varlığı üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Duffus and Skoyen, 1977). Strausbaugh et al. (2006), virüsün şeker pancarının kök veriminde %48, şeker

varlığında %15 ve şeker veriminde ise %55'e varan oranlarda kayıplara yol açtığını ortaya koymuştur. Hastalığın şiddeti arttıkça, şeker pancarının kök verimi doğru orantılı olarak düşmektedir. Hastalık oranında her birim artış, kök veriminde 5.76-6.93 t/ha arasında düşüşe yol açmaktadır (Strausbaugh et al., 2007). Şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı hastalığı, son yıllarda ABD'nin batısında geniş bir alanda yeniden ortaya çıkmış, şeker pancarı, domates ve biber bitkilerine büyük zararlar vermiştir (Harveson, 2015). Hastalık esas olarak şeker pancarında zararlara neden olsada aynı hastalığın domates, ıspanak, kavun, kabak, biber, salatalık, kereviz, fasulye gibi birçok tarımsal üründe ciddi kayıplara sebep olduğu bildirilmiştir (Strausbaugh et al., 2006).



Şekil 3.2. Şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı hastalığı

Amerika'daki bu virüslere çok benzer hastalık semptomu gösteren ve başta şeker pancarı olmak üzere biber, patlıcan, domates gibi bir çok tarımsal bitkide ciddi verim kayıplarına sebep olan tepe kıvrıcıklığı hastalığı son yıllarda İran'da da rapor edilmiştir (Heydarnejad et al., 2007; Yazdi et al., 2008; Kardani et al., 2013; Heydarnejad et al., 2013; Süleymani et al., 2013; Eini et al., 2016; Kamali et al., 2017; Tahan et al., 2020).

Şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı hastalığının yirmi yılı aşkın süredir Türkiye'nin şeker pancarı üretiminde önemli verim azalmasına neden olduğu bildirilmiştir. Şeker pancarı tarlalarında tepe kıvrıcıklığı virüsünün semptomatik olarak saptanması ülkemizde ilk kez 1960'larda bildirilmiştir (Bennett ve Tanrısever, 1958; Tanrısever, 1961; Bennett, 1971). Küresel ısınmanın artmasıyla birlikte hastalık insidansının son on yılda daha sık ve şiddetli olduğu bildirilmiştir. Kaya vd., (2013), Türkiye'nin özellikle bazı orta bölgelerinde her yıl tepe kıvrıcıklığı hastalığının ortaya çıkmaya başladığını ve bazı şeker pancarı tarlalarında %50 verim azalmasına neden olduğunu belirtmişlerdir.

Türkiye’de Şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı hastalığına ilk defa 1955 ve 1956 yıllarında Eskişehir civarında rastlanmıştır (Tanrısever, 1961). Hastalık daha sonra, 1994’te Ankara, 2001’de Konya (Özgür, 2003) ve 2004’te Kırşehir (Kaya, 2004)’de bazı şeker pancarı ekim alanlarında görülmüştür. Global ısınmanın etkisinin hissedilmeye başlandığı son yıllarda Orta Anadolu Bölgesi’nde her yıl görülmeye başlamıştır. Şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı, 2006 yılında Konya, Karaman ve Aksaray’da; 2007 yılında Kırşehir ve Aksaray’da; 2008 yılında Afyon, Ankara, Kırşehir ve Nevşehir ili şeker pancarı ekim alanlarında da ortaya çıkmıştır (Kaya ve Gürkan, 2006, 2007, 2008 ve 2009). 2008 yılında Ankara’nın Şereflikoçhisar ve Nevşehir’in Kozaklı ilçelerinde ve 2009 yılında Ankara’nın Haymana ilçesinde bazı tarlalarda %50’ye varan verim kayıplarına yol açmıştır (Kaya ve Gürkan, 2008 ve 2009). Türkiye’de hastalık giderek yaygınlaşmakta olup yıllara ve bölgelere bakıldığında, hastalığın, özellikle ilkbahar döneminin kurak geçtiği yıllarda ve illerde çok yoğun bir şekilde ortaya çıktığı ve ekonomik zarara yol açtığı rapor edilmiştir (Kaya ve Gürkan, 2006, 2007, 2008 ve 2009). Bu hastalığı yaratan virüsler esas olarak şeker pancarında zararlara neden olsa da aynı virüsün domates, ıspanak, kavun, kabak, biber, salatalık, kereviz, fasulye gibi birçok tarımsal üründe ciddi kayıplara sebep olduğu bilinmektedir (Kaya, 2013).

Türkiye'nin şeker pancarı üretim alanlarındaki tepe kıvrıcıklığı virüsünün türleri ve varyantları, şeker pancarı üretimi üzerindeki olumsuz etkilere rağmen henüz genetik olarak karakterize edilmemiştir. Bu tür genetik ve moleküler tanımlamalar, virüslerin türünü belirlemek ve şeker pancarı çeşitlerinin bu viral hastalığa karşı performansını test etmek için oldukça önemlidir. Bu çalışmada, öncelikle virüs taşıyan şeker pancarı örneklerinin ülkemizde en yoğun ekim yapılan 14 ilinde toplanması hedeflenmiştir. Toplanan örneklerde yaygın tepe kıvrıcıklığı virüs türünün ve suşlarının PCR-primer bazlı tespiti amaçlanmıştır. PCR temelli tarama ve genom sekanslama ile ülkemizde yayılım gösterilen tepe kıvrıcıklığı virüs izolatları tespit edildikten sonra virüsün agrobakterium içerisine klonlanarak şeker pancarında hastalığın kontrollü olarak yaratılmasında hedeflenmiştir. Böylece ülkemiz şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı hastalık etmenlerinin ilk defa genetik olarak tanımlanması ve bu virüslerin ıslah programlarında şeker pancarının dayanım ve hassasiyetini test etmek için kullanılması amaçlanmıştır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Enfekte Bitki Örneği Toplama

Tepe kıvrıkcık hastalığı semptomları taşıyan şeker pancarı bitkisi örnekleri, 2017-2018 yılları arasında ticari alanlardan rastgele toplanmıştır. Şeker pancarı bitkilerinin yapraklarında tepe kıvrıkcık virüsünün varlığını belirlemek için yaprak kıvrılması, enasyonlar, damar sertliği ve yaprak bodurluğu ile kalınlaşma gibi hastalık semptomları kullanılmıştır. Türkiye’de en yoğun şeker pancarı ekiminin yapıldığı Kırşehir, Kütahya, Ankara, Konya, Afyon, Aksaray, Çorum, Kayseri, Yozgat, Amasya, Kastamonu, Burdur, Tokat ve Eskişehir illerinde şeker pancarı tarlalarında yapılan arazi çalışması ile *Curtovirus* cinsi virüsleri taşıdığı tespit edilen toplamda 628 enfekte bitki örneği, 14 Orta Anadolu şehrinden 32 farklı tarım arazisinden toplanmıştır.



Şekil 4.1. Türkiye’de enfekte şeker pancarının toplandığı iller ve miktarları

Şeker pancarı bitkileri kökleriyle birlikte alınarak topraktan tamamen arındırılmış ve DNA izolasyonuna kadar -80 °C’de saklanmıştır.

4.2. Enfekte Şeker Pancarı Genomik DNA İzolasyonu

Dondurulmuş yaprak örnekleri havan içerisinde sıvı nitrojen ile havaneli yardımıyla ezilerek 2 ml santrifüj tüplerinde -80 °C’de bekletilmiştir.

Derin dondurucuda saklanan ezilmiş örneklere 1500 µl CTAB ekstraksiyon tamponu ve 10µl β-merkaptotanol eklenerek, vortekslenmiştir. Karışım 65 °C’ta 10 dk aralıklarla vortekslenerek 60 dakika bekletilmiştir. 8000 rpm’de 5 dk santrifüjlenmiştir. Supernatant yeni eppendorf tüpe aktarılmıştır. Eş hacim

fenol/kloroform/izoamilalkol eklenmiştir ve emülsiyon oluşması için tüpler iyice vortekslenmiştir. 13000 rpm' de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Supernatant yeni tüpe aktarılmıştır. Eş hacim soğuk (-20 °C'de bekletilmiş) izopropanol eklenmiştir ve buzdolabında (4-6 °C'de) DNA iplikçikleri belirginleşene kadar bekletilmiştir. 4 °C'de 13000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir. Supernatant döküldükten sonra pellet 0-4 °C'de bekletilmiş ve 1ml %70' lik etanol ile yıkanmıştır. 13000 rpm'de 5dk santrifüjlenmiştir. 37 °C'de 20-30 dakika ters çevrilerek pellet DNA kurutulmadan etanolun uzaklaştırılması sağlanmıştır. Pellet DNA 50 µl H₂O'da çözülmüştür (Yıldırım vd., 2012).

DNA miktarı ve kalitesi, A260 ve A280'de absorbanslı NanoDrop 2000 spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Aynı şehirden toplanan şeker pancarı bitkilerinden eşit miktarda ekstrakte edilmiş DNA, virüs türlerinin ve varyantlarının primer bazlı tanımlanması için karıştırılmıştır. Bu şekilde 14 farklı ili temsil eden 14 DNA örneği oluşturulmuş ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testlerinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Pancar Tepe Kıvırcıklığı Virüsünün (BCTTV) Primer Bazlı Tanımlanması

Türkiyedeki tarım arazilerinde şeker pancarı tepe kıvırcıklığı virüsü türlerinin veya suşlarının moleküler tanımlaması daha önce yapılmamıştır. Bu nedenle, Türk şeker pancarı koleksiyonunda virüs türlerinin ve varyantlarının genomik tespiti için polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) hem *Curtovirus* (BCTV) hem de *Becurtovirus* (BCTIV) spesifik primerler (Tablo 4.1) kullanılmıştır. *Curtovirus* sp. Strausbaugh ve Eujayl (2017) tarafından tasarlanan suş bazlı primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *Curtovirus* pozitif örneklerinin, tüm *Curtovirus* suşları için genetik olarak korunmuş kapsid protein geninden (BCTV-CP-F/R) tasarlanmış bir primer set ile tanımlanması planlanmıştır. PCR testlerinde replikasyonla ilişkili protein (Rep) geninden tasarlanan diğer primerler, *Curtovirus* sp.'nin suşa spesifik amplifikasyonu için kullanılmıştır. (SVR, Ca / LOGAN ve WOR)(Tablo 4.1). *Becurtovirus* sp. genomik tespiti BCTIV suşlarının kapsid proteini için önceden özel olarak tasarlanmış primerlerle gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.1) (Heydarnejad et al., 2013; Eini et al., 2016; Anabestani et al., 2017).

Tablo 4.1. BCTTV'nin moleküler tanımlanmasında kullanılan Curtuvirus cinsi ve Becurtovirus cinsine özgü spesifik primerler.

	Forward (F) - Reverse (R) PRIMERLER	Sekans (5'-3')	Uzunluk (bp)	Referans
<i>BECURTOVIRUS</i>	BCTIV-1F	AGGTTGTTCTTCAGTAGGCTG	878	Heydarnejad et al.,(2013)
	BCTIV-1R	TCCTCGTCCAACCTGGCCGGAG		
	BCTIV-2F	TACAAGAAGTATGGCGGTTC	682	Anabestani et al.,(2017)
	BCTIV-2R	AAGAATAGCATTCTCCTTCAC		
	BCTIV-3F	TACAAGTATGGCGGTTC	700	Eini et al.,(2016)
	BCTIV-3R	GAGTAAAGCATTCTCCTTCAC		
<i>CURTOVIRUS</i>	BCTV-CP-F	GTGGATCAATTTCCAGACAAT	496	Strausbaugh and Eujayl (2017)
	BCTV-CP-R	TATC CCCATAAGAGCCATATCAAA CTTC		
	BCTV-SVR-REP-F	CGGAATCCAAACCAAAATAA	426	Strausbaugh and Eujayl (2017)
	BCTV-SVR-REP-R	GAATC AAGTCCAGATTCGTAATGCC GT		
	BCTV-WOR-REP-F	GGCATCCACCCGAAATAAG	397	Strausbaugh and Eujayl (2017)
	BCTV-WOR-REP-R	AATC CGACATCACTCATCCTTCCTC AAGC		
	BCTV-CA/LOGAN-REP-F	TGCTCCAATAAGGTGCTTCCA	291	Strausbaugh and Eujayl (2017)
	BCTV-CA/LOGAN-REP-R	GTG TTTCCTCTGTCCTCATTCA AACG		

İlk olarak, optimum bağlanma sıcaklığını belirlemek için genomik DNA ile bir gradient PCR gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle PCR amplifikasyonu ilk olarak 14 şehir bazlı karışık DNA'nın tümü için 47 °C, 51 °C, 55 °C, 57 °C, 61 °C ve 65 °C'de gerçekleştirilmiştir. BCTV ve BCTIV suşlarının saptanması için primer bazlı PCR testleri 20 ml reaksiyon karışımı içinde gerçekleştirilmiştir: 2 µl (yaklaşık 50-60 ng DNA) kalıp DNA, 4 µl 10X Taq Tamponu (25 mM MgCl₂ içeren), 0.4 µl 10 mM dNTP (Promega Corp.), her bir primerden 2 µl (3 mM), 0.2 µl (1.5 U) Taq DNA polimeraz (Santa Cruz Biotech) ve 8.6 µl moleküler kalitede su ile reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

Tablo 4.2. BCTTV'nin moleküler tanımlanmasında kullanılan PCR döngü basamakları.

Basamaklar	Sıcaklık °C	Zaman	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	3 dk	1
Denatürasyon	95	45sn	
Annealing (Bağlanma)	55-57	30sn	35
Extension (Uzama)	72	1dk	
Final Uzama	72	5dk	1

Sağlıklı bitkilerden ekstrakte edilen DNA'lar ve kalıp DNA'sız reaksiyonların her ikisi de tüm PCR deneylerinde negatif kontroller olarak kullanılmıştır. PCR ürünleri %1'lik agaroz jele yüklenmiştir ve 1 saat 100 V'de ayrılmıştır. Jeller, etidyum bromür ile boyanmıştır ve Kodak Gel görüntüleme sistemi (Şekil 5.1/A-B) kullanılarak UV ışığı altında görüntülenmiştir. Şehir bazlı taramadan sonra, virüs varlığını doğrulamak ve bitki numunesi toplamada enfeksiyon oranını tahmin etmek için 628 enfekte bitki numunesi için büyük ölçekli PCR deneyleri de yapılmıştır.

4.4. Pancar tepe kıvrıkcılığı Türk virüsü (BCTTV) izolatlarının kısmi ve tüm genom dizilemesi

BCTIV-2F/R primerlerine sahip 14 virüs izolatının amplifiye kapsit protein bölgesi (Anabestani et al., 2017) ilk olarak Macrogen Inc.'de (Güney Kore) aynı primerler ile çift yönlü olarak dizilenmiştir.

Türk izolatlarının kısmi kapsit gen dizilerinin veritabanlarında depolanan diğer *Curtovirus* ve *Becurtovirus* dizileri ile genomik benzerliğini öngörmek için MEGA programında çoklu dizi hizalaması yapılmıştır. Evrimsel ve filogenetik analizler, MEGA X'de Maksimum Olabilirlik yöntemi ve Tamura-Nei modeli kullanılarak yapılmıştır (Tamura and Nei, 1993; Kumar et al., 2018). Bulgusal arama için filogenetik ağaç, Maksimum Bileşik Olabilirlik (MCL) yaklaşımı kullanılarak tahmin edilen ikili mesafeler matrisine Neighbor-Joining ve BioNJ algoritmaları uygulandıktan sonra, üstün log olabilirlik değerine sahip topolojinin seçilmesiyle otomatik olarak elde edilmiştir. Bu analizde, 38 nükleotit dizisi ve nihai veri setinde toplam 716 pozisyon yer almıştır (Şekil 5.2). 14 PCR pozitif örneğin tüm genomu da Shepherd et al., (2008) tarafından tanımlandığı üzere yuvarlanma (rolling-circle) amplifikasyonu (RCA) kiti (TempliPhi, GE Healthcare, ABD) ile amplifiye edilmiştir. Bu deneyde, dairesel viral genomlar ilk olarak RCA amplikonları üretmek için phi29DNA polimeraz ile çoğaltılmıştır. Daha sonra her replikon Hind-III restriksiyon endonükleaz ile kesilmiş ve viral genom elde etmek için jel elektroforezi ile incelenmiştir (Şekil 1/C). Jeldeki diğer küçük amplikonlarla birlikte kesilmiş ve doğrusallaştırılmış viral genomlar (yaklaşık 2.8 kb), jelden saflaştırılmış ve ayrıca Hind-III enzimiyle kesilmiş olan PUC57 (Promega Biotech) plazmid vektörüne ayrı ayrı klonlanmıştır. Klonlanmış PUC57+viral yapı daha sonra ısı şoku ile *E.coli* Dh5α suşuna transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Tranforme bakteriler, 900 µl SOC besiyerinde 37°C'de bir saat süreyle yetiştirildikten sonra 3000 rpm'de 5 dakika

santrifüj edilmiştir. Pelet, 100 µl LB içerisinde çözülerek 100 mg/L Ampisilin, 100mM IPTG ve 120 µl X-Gal içeren aynı ortamda kültüre alınmıştır. Petri kapları 37 °C'de 17 saat inkübatörde bekletilerek tek koloniler elde edilmiştir. Transforme bakteriler, mavi-beyaz tarama ile seçilmiş ve koloni PCR ile test edilmiştir. Transforme bakteriler, sıvı LB ortamında kültüre alınmış ve 37°C'de çalkalayıcıda bir gece OD600=0.6 ulaşana kadar yetiştirilmiştir. Filogenetik ağaç ve ikili mesafeye göre Afyon, Ankara, Adapazarı, Yozgat ve Aksaray'dan elde edilen en farklı beş virüs izolatu, tüm genom dizi analizi için seçilmiştir. Bu viral suşlara ait plazmidler, NucleoSpin Plasmid Miniprep kiti (Macherey Nagel) ile izole edilmiş ve MacroGen Inc.'de dizilenmiştir. Beş farklı Türk tepe kıvrıcıklığı virüsü genom dizisi, MT459415'ten MT459433'e erişim numarası altında Gen-Bank'a verilmiştir.

4.5. BCTTV İzolatının Enfeksiyöz Klonunun Oluşturulması

BCTTV izolatlarının plazmid transformasyonu ve dizilenmesinden sonra, bulaşıcılığı test etmek ve Koch'un genom varsayımlarını doğrulamak için Ankara'dan elde edilen virüsün bir enfeksiyöz klonu da oluşturulmuştur. BCTTV izolatının dimeri In-Fusion® HD Klonlama Kiti (TAKARA) ile gerçekleştirilmiştir. Bu kit, DNA fragmanlarını (örneğin, PCR ile çoğaltılmış insert DNA ve linearize vektörler) uçlarında 15-bp örtüşmelerini tanıyarak verimli ve hassas bir şekilde kaynaştıran bir In-Fusion Enzime sahip herhangi bir vektöre bir veya daha fazla DNA fragmanının hızlı ve yönlü klonlanması için tasarlanmıştır. Deneylede, laboratuvarımızda tasarlanan *Agrobacterium* bitki ekspresyon vektörü Hind-III restriksiyon enzim kesimi ile doğrusallaştırılmıştır. Reaksiyon inkübatörde 37°C'de 6 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Doğrusallaştırılmış vektörün uçlarını tamamlayan 15-bp uzantılı (5') virüsün Ankara izolatu için dört PCR primeri tasarlamak için İnternet-tabanlı Takara İnfüzyon Klonlama Aracı kullanılmıştır (Şekil 8.1). Virüs izolatu, daha önce klonlanmış PUC57 plazmidinden iki kez, bu tasarlanmış primerler ile insert -1 ve 2 oluşturmak üzere amplifiye edilmiştir (Tablo 8.2-8.3). PCR ürünlerinin amplifikasyonu ve bütünlüğü bir agaroz jel üzerinde doğrulanmıştır. Spin-kolon saflaştırmasından sonra, iki virüs eklentisi tablo 8.4'te açıklandığı üzere bitki ekspresyon vektörü ile ligasyonu inkübatörde 50°C'de 15 dakika süreyle gerçekleştirilmiştir. Nihai yapı, bir Gene Pulser aparatı (Bio-Rad, Almanya) kullanılarak elektroporasyon ile *Agrobacterium* suşu C58'e tranforme edilmiştir. BCTTV-2.0 (pancar tepe kıvrıcıklığı Türk virüsü 2.0) barındıran *A. Tumefaciens*

hücreleri, 28°C'de 48 saat süreyle 100 mg/L Ampisilin içeren bir ortamda yetiştirilmiştir. Virüs pozitif numuneler, koloni PCR ile doğrulanmıştır (Tablo 8.5).

4.6. BCTTV İzolatının Şeker Pancarı Üzerinde Agroiokülasyonu ve Bulaşıcılığın Doğrulanması

Serenada (30 fidan/çeşit) olarak adlandırılan bir şeker pancarı çeşidinin iki yaprağı, Heydarnejad et al. (2013) göre hazırlanan 10 µl bakteriyel süspansiyon (OD600 =1) ile iğne enjeksiyonu yoluyla BCTTV-2.0 ile agroioküle edilmiştir. Agroioküle bitkiler, 25±2°C'de tam kontrollü bir serada 14:10 h fotoperiyotta yetiştirilmiş ve aşılardan 15 gün sonra hastalık belirtisi görünümü açısından izlenmiştir. Semptomatik ve asemptomatik şeker pancarı bitkilerinden (üst aşılammamış ve alt aşılammış yapraklar) aşılardan 6 hafta sonra örnek toplanmıştır. Agroioküle bitkilerde BCTTV enfeksiyonunu doğrulamak için tipik tepe kıvrıcık hastalık semptomları, PCR ve RT-qPCR analizlerinin görsel görünümü kullanılmıştır. PCR reaksiyonu, BCTIV-2F/R primerleri ile gerçekleştirilmiştir. Virüsün (Acc. No. JQ707949.1) RT-qPCR deneyleri için primerler Primer 3 programı ile tasarlanmıştır.

Tablo 4.3. BCTTV'nin moleküler tanımlanmasında kullanılan *Becurtovirus* cinsine özgü Primer 3 programı ile tasarlanan spesifik primerler

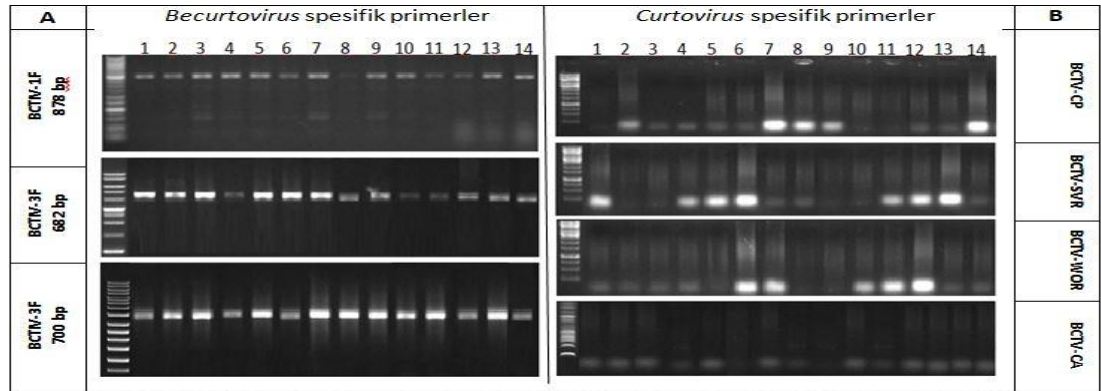
	Sekans(5'→3')	Uzunluk
F primer	AGTGGTGTCGGCCTAGAGAT	20
R primer	CAACAGACCAGTCCGACCAA	20

Her örnek için reaksiyon, 10 µL QuantiTect SYBR Green (Qiagen), 8.6 µL ddH₂O, 1 µL seyreltilmiş kalıp DNA ve gene özgü primerin her birinden (F ve R primerler) 0.2 µL içeren 20 µL hacimde gerçekleştirilmiştir. PCR döngü basamakları şu şekildedir: Denatürasyon için 95°C'de 30 s, bağlanma 55°C'de 30 s ve uzama için 72°C'de 30 s'lik 35 döngüdür. Amplifikasyon sonrası başlangıç sıcaklığı 65°C olan erime eğrisi döngüsü 0.5°C'lik artış ile gerçekleştirilmiş ve 95°C'lik sıcaklık ile sonlandırılmıştır. Agroioküle yapraklarda virüs replikasyonunu ve şeker pancarında bir yapraktan diğerine taşınımını görmek için PCR ve Real-Time PCR analizi kullanılmıştır (Şekil 5.3).

5. BULGULAR

5.1. Pancar Tepe Kıvrıklığı Türk Virüsü İzolatlarının PCR Bazlı Tanımlanması

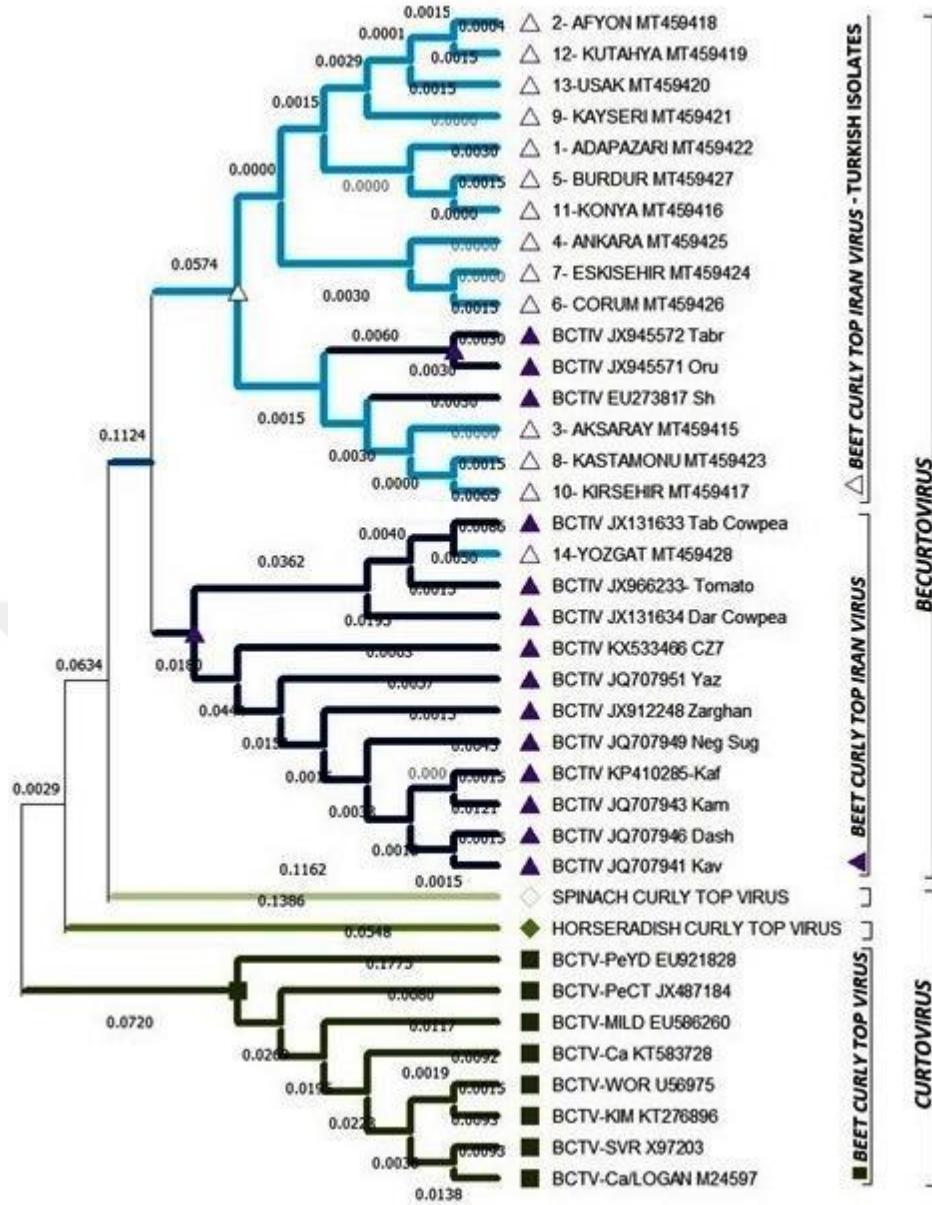
Bu çalışmada, Türkiye'nin başlıca şeker pancarı ekim alanı olan 14 Orta Anadolu kentinin tarlalarında tepe kıvrıklık hastalığı semptomlarına sahip toplam 628 şeker pancarı bitkisi toplanmıştır. Kısa yaprak düğümleri (nod) ve yukarı doğru yaprak kıvrılması toplanan bitki yaprakları için baskın semptomlar olarak saptanmıştır. Bu baskın semptomlara ek olarak, bazı tarlalarda sararma da bazı kültürler için başka bir görsel semptom olarak belirlenmiştir. Bu tarlalarda, şiddetli enfekte bitkiler marjinal yaprak nekrozu ile yoğun yaprak klorozu göstermiştir. Toplanan şehirlere göre 628 enfekte bitkiden ekstrakte edilen DNA'lar 14 farklı tüpte eşit olarak karıştırılmıştır. Bu şehir bazlı karma DNA'lar, PCR ürünlerini *Becurtovirus* ve *Curtovirus* cinslerine özgü primer çiftleri ile amplifiye etmek için kullanılmıştır (Tablo 5.1). Jel elektroforezi üzerinde PCR ürünlerinin görselleştirilmesi, şeker pancarı tepe kıvrıklığı Türk virüsü izolatlarının, pancar tepe kıvrıklığı İran virüsü (BCTIV) türlerinin birkaç suşunu içeren sadece *Becurtovirus* cinsine ait olduğunu açıkça göstermiştir. *Becurtovirus* cinsinin kapsit proteinini hedefleyen tüm primerler, 14 farklı Türk şehrinde toplanan semptomatik şeker pancarı bitkileri için beklenen PCR ürününü amplifiye etmiştir. Öte yandan, Türk şeker pancarı tarlalarında bu tür tepe kıvrıklık virüslerle virüs enfeksiyonu olmadığını gösteren *Curtovirus* cinsine özgü primerlerden amplifiye PCR ürünleri elde edilmemiştir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. *Becurtovirus* (A) ve *Curtovirus* (B) spesifik primerler ile enfekte şeker pancarı Türk koleksiyonunun PCR taraması

Şehir bazlı PCR amplifikasyon testine ek olarak, toplanan 628 şeker pancarı, sonuçları doğrulamak ve enfekte bitkilerin kesin sayısını belirlemek için PCR ile ayrı ayrı taranmıştır. Tüm koleksiyon arasında 582 örnek (%92) *Becurtovirus* cinsine özgü PCR amplifikasyonunu beklenen boyutlarla temsil ederken, şeker pancarlarının %8'i jel üzerinde herhangi bir PCR bandı üretmemiştir. Dizi benzerliğini görmek amacıyla BCTIV2F/R primerlerine sahip on dört virüs izolatının amplifiye kapsit protein bölgesi (Tablo 5.1) (Anabestani et al., 2017) aynı primerler ile çift yönlü dizilenmiştir. Pancar tepe kıvrıcıklığı Türk virüsü izolatlarının diğer *Becurtovirus* ve *Curtoovirus* türleri ile kısmi kapsit protein gen dizisinin analizi ile filogenetik dendrogramı elde edilmiştir (Şekil 6.2).





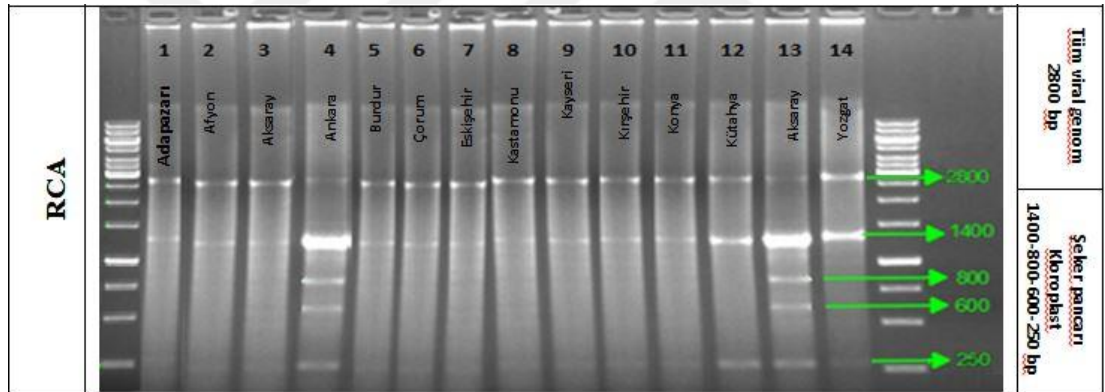
Şekil 5.2. BCTIV-Türk izolatlarının *Becurtovirus* ve *Curtovirus* cinslerinde bulunan diğer türlerle filogenik ilişkisi

Filogenetik analiz sonuçları dört ana grubu ortaya çıkarmıştır. Bunlar, *Curtovirus* cinsine özgü virüsleri (BCTV, SpSCTV ve HCTV), BCTIV suşları ile pancar tepe kıvrıcıklığı Türk virüsü izolatlarını içermektedir. Bu evrimsel ve filogenetik analiz, pancar tepe kıvrıcıklığı Türk virüsü koleksiyonunun *Becurtovirus* cinsine ait olduğunu açıkça doğrulamıştır. Toplanan bölgelere göre Türk pancar tepe kıvrıcıklığı virüs izolatları beş alt gruba ayrılmıştır. Birinci alt grup (Şekil 5.2) Orta Anadolu'nun güney bölgesinden izolatlarla içerirken, kuzey ve orta bölgeler ikinci ve üçüncü alt grupta kümelenmiştir. Üçüncü alt grup, Türk pancar tepe kıvrıcıklığı virüslerinin kökenini gösteren üç BCTIV suşu (JX945572, JX945571 ve EU273817)

ile başka bir merkezi şehri kapsamaktadır. Yozgat'tan toplanan virüslerin kısmi genomu, bu Türk şeker pancarı tepe kıvrıcık virüs suşunun konukçu aralığını ortaya çıkaran daha önce börülce, (JX131633), domates (JX966233) ve şeker pancarında (JX945569) bildirilen BCTIV suşları ile oluşturulmuştur. Bu 14 viral izolatin birbirleriyle >%98 çift yönlü nükleotit dizi özdeşliği bulunmakta ve bu koleksiyondaki kapsit protein geni tabanlı varyasyon, İran'da daha önce bildirilen BCTIV suşlarıyla güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir.

5.2. Pancar Tepe Kıvrıcıklığı Türk Virüslerinin Tüm Genom Analizi

Pancar tepe kıvrıcıklığı Türk virüsü izolatlarının tüm genomları, yuvarlanma PCR amplifikasyonu ve Hind-III enzimatik kesimi ile de elde edilmiştir. Jel elektroforezi, 14 şehir bazlı karma DNA'lar için yaklaşık 2.8 kb'de tam uzunluklu viral genomları temsil etmektedir. Tüm viral genomlara (2.8 kb) ek olarak, jel üzerinde 250, 600, 800 ve 1400 bp boyutunda dört küçük ampikon görüntülenmiştir.



Şekil 5.3. Pancar tepe kıvrıcıklığı Türk virüsü izolatlarının tüm genomları, yuvarlanma PCR amplifikasyonu ve Hind-III enzimatik kesiminin jel elektroforez görüntüsü

Pancar tepe kıvrıcıklığı Türk virüsü izolatları, filogenetik ağaçta görüldüğü gibi (Şekil 5.2) 5 farklı alt-kümeye ayrılmış ve bu nedenle koleksiyonu temsilen Afyon, Adapazarı, Ankara, Aksaray ve Yozgat'tan elde edilen tüm virüs genomları seçilmiştir. Beş şehirde ve dört küçük ampikonda toplanan tüm viral genomlar jelden saflaştırılmış, pUC57 vektörüne klonlanmış ve çift yönlü dizilenmiştir.

Tablo 5.1. Beş Türk pancar tepe kıvrıcıklığı virüsü izolatının tüm genomu ve kodlama dizisi ve bunların daha önce bildirilen *Becurtovirus* suşları ile genomik benzerlikleri

PANCAR TEPE KIVIRCIKLIĞI TÜRK VİRÜSÜ İZOLASYONLARI NCBI ERIŞİM NUMARALARI	KONUĞU	TÜM GENOM %	V3-SSDNA REG. %	V2-MP %	V1-CP %	C2-REP-B %	C1-REP-A %	NCBI Accession	Referans
YOZGAT (MT459433)									
BCTIV IR:Dar:128:Cowpea	Börülce	97.40	98.15	98.36	98.27	99.02	95.93	JX131634	Kardani et al. (2013)
BCTIV-IR:Mash:Pep1:Pep	Biber	97.23	98.15	98.36	98.01	99.35	95.82	MH751505	Tahan ve Heydarnejad (2018)
BCTIV IR:Tab:90:Cowpea	Börülce	97.19	98.15	98.36	97.74	99.35	95.82	JX131633	Kardani et al. (2013)
BCTIV IR:Toro:1B:Sug	Şeker pancarı	97.12	98.15	98.36	97.61	98.69	95.93	JX945569	Kardani et al. (2013)
BCTIV IR:Sabz:134T:Tomato	Domates	97.12	97.78	97.81	97.88	99.35	95.71	JX966233	Kardani et al. (2013)
BCTIV IR:Boj:3Beet:Sug	Şeker pancarı	97.05	98.15	98.36	98.14	99.35	95.49	JX945570	Kardani et al. (2013)
BCTIV -Siv	Şeker pancarı	90.85	92.59	92.35	91.66	93.79	91.87	JX082259	Soleimani et al. (2013)
AFYON (MT459430)									
BCTIV IR:Oru:7Beet:Sug	Şeker pancarı	98.21	97.78	98.91	97.76	99.40	98.57	JX945571	Kardani et al. (2013)
BCTIV IR:Tabr:8RB:Red beet	Kırmızı pancar	98.17	97.41	98.91	97.63	99.10	98.57	JX945572	Kardani et al. (2013)
BCTIV -[Sh2]	Şeker pancarı	90.98	90.77	93.72	96.44	93.11	90.88	EU273817	Yazdi et al. (2008)
ANKARA (MT459431)									
BCTIV IR:Oru:7Beet:Sug	Şeker pancarı	97.82	98.52	98.91	98.15	99.02	98.13	JX945571	Kardani et al. (2013)
BCTIV IR:Tabr:8RB:Red beet	Kırmızı pancar	97.61	98.15	98.91	98.01	98.69	98.13	JX945572	Kardani et al. (2013)
BCTIV -[Sh2]	Şeker pancarı	91.29	91.11	93.72	96.82	92.48	91.97	EU273817	Yazdi et al. (2008)
AKSARAY (MT459429)									
BCTIV IR:Oru:7Beet:Sug	Şeker pancarı	98.00	98.52	98.91	98.15	99.40	98.57	JX945571	Kardani et al. (2013)
BCTIV IR:Tabr:8RB:Red beet	Kırmızı pancar	97.96	98.15	98.91	97.63	99.10	98.57	JX945572	Kardani et al. (2013)
BCTIV -[Sh2]	Şeker pancarı	91.29	91.11	93.72	96.44	93.11	90.88	EU273817	Yazdi et al. (2008)
ADAPAZARI (MT459432)									
BCTIV IR:Oru:7Beet:Sug	Şeker pancarı	98.42	97.78	98.91	98.55	99.33	98.67	JX945571	Kardani et al. (2013)
BCTIV IR:Tabr:8RB:Red beet	Kırmızı pancar	98.21	97.41	98.91	97.01	98.34	97.53	JX945572	Kardani et al. (2013)
BCTIV -[Sh2]	Şeker pancarı	91.04	90.77	93.72	96.92	92.55	90.88	EU273817	Yazdi et al. (2008)

BLAST analizi sonucunda, pancar tepe kıvrıcıklığı Türk virüs izolatlarının genomik dizisi daha önce belirtilen BCTIV izolatları ile %90,85-98,42 dizi özdeşliği paylaşmaktadır (Tablo 6.1) (Kardani et al., 2013; Tahan et al., 2020; Yazdi et al., 2008; Heydarnejad et al., 2013; Eini et al., 2016; Kamali et al., 2017). Afyon, Adapazarı, Ankara ve Aksaray'dan elde edilen virüs izolatları, İran'ın Azerbaycan eyaletlerinden toplanan BCTIV'in şeker pancarı ve kırmızı pancar izolatlarına %98,2 homoloji göstermiştir (Acc. No. JX945571 ve JX944572) (Karmani et al., 2013). Aynı Türk virüsleri, İran'ın Şiraz ilinden %90,0 homoloji ile BCTIV'in bir şeker pancarı izolatı ile de uzaktan ilişkili olduğu saptanmıştır (Tablo 5.1). Yozgat'tan elde edilen bir pancar tepe kıvrıcıklığı Türk virüsü izolatı, börülceyi (Acc. No. JX131634 ve JX131633), biberi (MH751505), domatesi (JX966233) ve şeker pancarını (JX945570 ve JX945569) enfekte eden BCTIV izolatları ile >%97 benzerlik göstermiştir. Yozgat izolatları da BCTIV izolatı JX082259 ile %90 uzak benzerlik göstermiştir. Daha önce bildirilen tüm bu BCTIV izolatları (Kardani et al., 2013; Tahan ve Heydarnejad, 2018), İran'ın Türkiye'ye sınırı olan kuzey kesiminden araştırmacılar tarafından toplanmıştır.

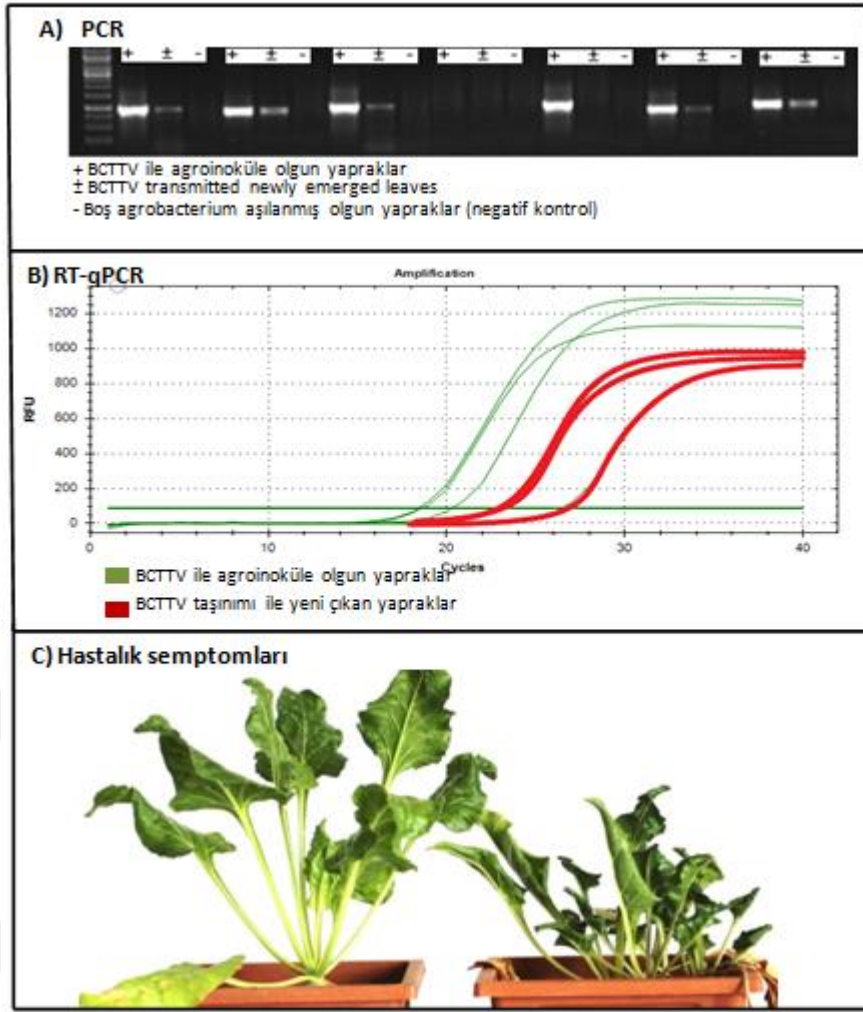
Pancar tepe kıvrıcığı Türk viral genomlarının eksprese edilen kısmı, tamamlayıcı zincirdeki açık okuma çerçevesini (C1 ve C2) ve virion zincirdeki üç açık okuma çerçevesini kapsayan (V3-V2 ve V1), daha önce raporlanan BCTIV izolatları ile de benzerliğe sahiptir. Pancar tepe kıvrıcıklığı Türk virüsü izolatlarının büyük intergenik bölgesi (IR-296 nt), RCA başlangıcı için tipik TAAGATT/CC nükleotit dizisine sahip bir gövde döngüsü yapısını temsil etmektedir. Pancar tepe kıvrıcıklığı Türk virüsü izolatlarının ürünlerinin diğer BCTIV izolatları ile karşılaştırılması, tüm açık okuma çerçeveleri (%90,77-99,4) için stabil ve yüksek bir korumayı temsil etmektedir. Türk izolatlarının tüm genom benzerliği, BCTIV ürünlerden her zaman daha düşüktür. Bu durum, Türk virüslerinin ana değişkenliğinin IR bölgelerine bağlı olduğunu açıkça göstermektedir. Tüm bu karşılaştırmalara ve ICTV kriterlerine göre pancar tepe kıvrıcıklığı Türk virüsü izolatları BCTIV'lerin bir suşu olarak sınıflandırılmıştır.

Becurtovirus türlerinin, şeker pancarı kısmi genomları ile hibrit mini döngüler oluşturduğu ve viral enfeksiyona paralel olarak enfekte bitkilere sistemik olarak yayıldığı bilinmektedir (Catoni et al., 2018). Bu nedenle, RCA reaksiyonu sırasında elde edilen küçük amplikonların bu mini halkasal yapılar olabileceği

düşünülmektedir. Bununla birlikte, farklı boyutlardaki küçük ampikonların genom dizisi üzerindeki BLAST analizi, şeker pancarı kloroplast genomu ile hizalanmıştır. Şeker pancarı kloroplast genomunun halkasal doğası nedeniyle, RCA genomik DNA'yı da kopyalamış ve Hind-III kesimi ile dört küçük ampikona ayrılmıştır.

5.3. Şeker Pancarı Tepe Kıvrıcıklığı Türk Virüsü İzolatlarının Klonlanması

Şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı Türk virüslerine ait bir klon yaratmak için Ankara izolatu (BCTTV-2.0) ile dimerik bir enfeksiyöz *Agrobacterium* plazmidi oluşturulmuştur. Şeker pancarı (Serenada) fidanlarının yaprakları, dört yaprak aşamasında 10µl bakteriyel süspansiyon (OD600=1) ile agroinoküle edilmiştir. Genel olarak, yaprak kenarlarının içe doğru kıvrılması, genç yaprakların boyutunun azalması ve bitki büyümesi ile 6 hafta sonra tipik semptomlar gösteren agroinoküle bitkiler arasında %84 (42/50) enfeksiyon başarısı tespit edilmiştir (Şekil 5.4-C). Yaprakların şişmesi ve damarların omurga benzeri çıkıntıları, agroinoküle bitkilerde temsil edilen diğer beklenen semptomlardır. Aşılanan virüsün replikasyonu ve bir yapraktan diğerine hareketi, PCR ve RT-qPCR analizi ile takip edilmiştir. İnokülasyondan beş hafta sonra, agroinoküle olgun ve yeni çıkan yapraklardan toplam ekstrakte edilen DNA'larda PCR taraması, virüs replikasyonunu ve yapraklar arasında bulaşmayı açıkça ortaya koymaktadır. Şekil 5.4-A'da görüldüğü gibi, agroinoküle olgun yapraklarda elde edilen PCR bandının genç yapraklara göre daha yoğun olması, agroinoküle yapraklarda ve genç yapraklarda virüs varlığının bolluğuna dair bir kanıt olduğunu göstermektedir. Bu durum RT-qPCR sonuçları ile de doğrulanmıştır. Yaşlı agroinoküle yaprakların Ct değerleri, genç yapraklara göre çok daha küçüktür, bu da yeni çıkan yapraklara kıyasla agroinoküle olgun yapraklarda virüs miktarının daha fazla olduğunu göstermektedir (Şekil 5.4). Hem semptomlar hem de moleküler analiz, şeker pancarının virüsle yapay aşılmasının ve yapraklar ve tüm bitki boyunca hareketinin başarısını göstermektedir.



Şekil 5.4. Aşılanmış şeker pancarı yapraklarında Şeker pancarı tepe kıvrıklığı Türk virüsü (BCTTV) amplifikasyonunun PCR (A), Real-Time PCR (B) doğrulanması ve hastalık semptomları (C)

6. TARTIŞMA

Şeker pancarı tepe kıvrıcık hastalığı, ilk olarak 60 yıl önce Türk şeker pancarı tarlalarında semptomatik olarak tespit edilmiştir. Bennett ve Tanrısever (1958), ilk olarak 1955 yılında Eskişehir çevresinde bir tarlada şeker pancarı tepe kıvrıcık hastalığının varlığını %31,2 enfeksiyon ile bildirmişlerdir. Hastalık, Türkiye'nin 7 farklı yerinde de takip eden iki yıl boyunca kaydedilmiştir. Türk virüslerinin ortaya çıkardığı semptomlar, Kuzey Amerika tepe kıvrıcık virüs suşlarının semptomlarına çok benzer bulunmuştur. Bu kanıtlar, araştırmacıların Akdeniz bölgesinin pancar tepe kıvrıcık virüsünün kökeni olabileceği ve virüsün muhtemelen vektörü *Circulifer tenellus* ile birlikte Kuzey Amerika'ya götürüldüğü sonucuna varmalarını sağlamıştır. Amerikan pancarı tepe kıvrıcık hastalığı, 1888'de keşfedilmiştir ve 1930'ların ortasında dirençli şeker pancarı kültürleri ortaya çıkana kadar ABD'nin birçok bölgesinde şeker pancarı üretimini neredeyse durmuştur (Strausbaugh et al., 2008). Bu tarihsel deneyim, Bennett ve Tanrısever'in (1958), Türkiye'nin şeker pancarı tarlalarında viral enfeksiyon olasılığının arttığını öne sürmelerini sağlamıştır. Bölgede şeker pancarlarının yaygın olarak yetiştirilmesinin, Türkiye'de veya komşu bölgelerde tarla enfeksiyonu için virüs kaynaklarında artışa neden olduğu tahmin edilmektedir. Bu tahmin, Gibson (1967) tarafından İran'da (Türkiye'nin komşu ülkesi) pancar tepe kıvrıcık viral hastalığının ilk kez tanımlanmasından on yıl sonra doğrulanmıştır. Bu viral hastalığın, ülkedeki diğer ekinlerle şeker pancarı üretiminin performansının geçtiğimiz 60 yılda azalmasından sorumlu olduğu bildirilmiştir (Heydarnejad et al., 2013; Kardani et al., 2013; Kamali et al., 2017). Benzer şekilde, pancar tepe kıvrıcık virüsünün zaman zaman Türkiye'de önemli mahsul verim azalmasına neden olduğu ve şeker pancarı yetiştiriciliğine zarar verdiği bildirilmiştir. Türkiye'nin orta bölgesinde hastalık şiddetinin 2001 ve 2004 yıllarında arttığı görülmüştür (Kaya, 2004). Küresel ısınmanın artmasıyla birlikte pancar tepe kıvrıcık hastalığının, genel olarak Orta Anadolu'da bulunan ana şeker üreticisi şehirlerde hemen her yıl daha önemli hasarlara neden olduğu bildirilmiştir (Kaya ve Gürkan, 2006, 2007, 2008 ve 2009). Özellikle 2008 ve 2009 yıllarında pancar tepe kıvrıcık virüsünün Türkiye'nin aynı bölgelerinde şeker pancarı üretiminde %50 verim azalmasına neden olduğu bildirilmiştir. Kaya vd., (2013), tepe kıvrıcıklığı hastalığın özellikle kurak yıllarda şeker pancarı üretimi için ana yıkıcı etkenlerden biri haline

geldiğini ve bu nedenle küresel ısınmanın artmasıyla gelecekte daha agresif olabileceğini vurgulamışlardır.

Türkiye üzerine önceki raporlarda, bölgede bulunan pancar tepe kıvrıcıklığı virüslerin *Curtovirus* cinsinin suşu olduğu varsayılmıştır (Bennett ve Tanrısever, 1958; Bennett, 1971; Kaya, 2013). Bununla birlikte, *Curtovirus* cinsine biyolojik ve semptomatik benzerliklerine rağmen, *Becurtovirus* cinsine genom çapında nükleotit dizisinin (pancar tepe kıvrıcıklığı İran virüsleri - BCTIV) *Curtovirus* cinsinden (<%60 genomik benzerlik) oldukça farklı olduğu son on yıldaki yoğun moleküler çalışmalarda gösterilmiştir. BCTIV genomunun kapsit proteini, *Curtovirus* benzeri iken, replikasyonla ilişkili protein (Rep) dizisi *Mastrevirus* cinsine daha yakındır. Viral ve tamamlayıcı iplik açık okuma çerçevelerinin büyük ve küçük intergenik bölgelerle ayrılması BCTIV'lerin bir başka genomik özelliğidir. Virüsün, İran'ın orta ve güney illerinde şeker pancarı, domates, ıspanak, şalgam ve bazı yabancı ot türlerini enfekte eden *Circulifer haematceptis* (Anabestani et al., 2017) tarafından bulaştırıldığı bildirilmiştir (Heydarnejad et al., 2007; Yazdi et al., 2008; Kardani et al., 2013; Heydarnejad et al., 2013; Süleymani et al., 2013; Eini et al., 2016; Kamali et al., 2017; Tahan et al., 2020). Tüm bu genomik yaklaşımlar ile şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı hastalığının viral nedensel etkenlerinin *Geminiviridae* ailesinden *Curtovirus* ve *Becurtovirus* olarak adlandırılan iki farklı cinste sınıflandırılabilceği sonucuna varılmıştır.

İran ve ABD'de pancar tepe kıvrıcıklığı virüsün moleküler karakterizasyonundaki tüm bu ilerlemelere rağmen, bu virüslerin Türk varyantları moleküler ve genetik yaklaşımlarla tanımlanmamıştır. Bu çalışma kapsamında, 14 büyük şeker pancarı üreticisi şehirden enfekte bitki koleksiyonu (628 bitki) elde edilmiştir. Kapsit protein nükleotit dizisi tarihsel olarak *Geminiviridae* türleri arasında kategorize edilmiştir ve nükleotit dizisi, viral türler arasında iyi bir ayırıcı olarak kabul edilmiştir (Varsani et al., 2014). Şeker pancarı koleksiyonu üzerindeki kapsit proteinine özgü PCR taraması, şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı Türk virüsü izolatlarının *Becurtovirus* suşları olduğunu açıkça göstermiştir. *Curtovirus* cinsine özgü primer çiftleri için PCR amplifikasyonu saptanmamıştır. Tüm koleksiyon arasında 582 örnek (%92) *Becurtovirus* cinsine özgü PCR amplifikasyonunu beklenen boyutlarla temsil etmiştir. Dizi benzerliği analizi ve filogenetik ağaç, pancar tepe kıvrıcıklığı Türk virüsü izolatlarının, İran'ın Türkiye sınırında daha önce

tanımlanan iki BCTIV suşu ile >%98 özdeşliğe sahip olduğunu ortaya koymuştur. Türkiye’de yaygın olan ana suşun, daha önce Urmiye’de (İran) toplanan bir BCTIV suşu (JX945571.1) gibi görünmektedir. Bu suş, 13 Türk ilinde toplanan kısmi kapsit protein dizisi ile en yüksek özdeşliği (>%98) vermiştir. Yozgat kentinde elde edilen bir virüs izolatu, daha önce börülce (JX131633), domates (JX966233), biber (MH751505) ve şeker pancarında (JX945569) bildirilen BCTIV suşları ile >%97 genetik benzerlik göstermiştir. Bu virüs izolatu, Türkiye’de hem tarla hem de sera bitkilerinde önemli hasara neden olabilecek dikotiledon ürünlerde geniş konukçu aralığına sahiptir. Türk virüs izolatlarının RCA'sının ve tüm genom analizinin, primer bazlı PCR taraması yoluyla tanımlanan aynı suşlarla en yüksek dizi özdeşliğine sahip olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, Türk şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı virüs izolatları *Becurtovirus* cinsinin üyesidir ve İran’da daha önce tanımlanmış BCTIV suşları ile güçlü genetik benzerliklere sahiptir. Bu suşlar, genellikle Türkiye sınırına en yakın bölge olan İran’ın kuzey kesimlerinde tespit edilmiştir. Bu nedenle, bu virüs suşlarının yaprak zararlısı vektörü olan *Circulifer haematceptis* aracılığıyla Türkiye’ye bulaştığı tahmin edilmektedir.

Bu çalışmada, Koch'un virüs varsayımlarını doğrulamak için pancar tepe kıvrıcıklığı Türk virüsünün dimeri, *Agrobacterium* plazmidine klonlanmıştır. Agroinoküle şeker pancarlarının %84’ünde hastalık semptomları başarıyla oluşturulmuş ve bitki gövdesinde virüs yayılımları PCR ve RT-qPCR bazlı tekniklerle doğrulanmıştır. Böcek ilacına dayalı kontrol ile yapılan neonikotinoid tohum işlemlerinin tepe kıvrıcık insidansı ve şiddetini azaltmada oldukça etkili olduğu daha önce bildirilmiştir (Strausbaugh et al., 2016). Bununla birlikte, bu virüslere karşı konukçu direnci, şeker pancarı üreticileri için birincil kontrol olmaya devam etmektedir. Bu nedenle, tepe kıvrıcık suşlarına karşı dirençli şeker pancarı kültürlerinin izlenmesi ve değerlendirilmesi giderek önem kazanmaktadır. Bu nedenle, ıslah programlarında ticari kültürlerin viral direnci veya duyarlılığını taramak için virüslerden bir enfeksiyöz klon hazırlamak oldukça önemli olacaktır. Bu tür agrobakteri temelli viral uygulamalar, virüs-bitki etkileşimi ve genetik araştırmalar için de oldukça önemli olabilmektedir.

Şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı virüslerin yeni suşlarının doğal ve yapay seçilim baskısına yanıt olarak sürekli gelişmesi beklenmektedir. Karışık enfeksiyonlar ve küresel ısınma sebebiyle suşlar arasında rekombinasyon, yeni viral salgınlara bir

diğer kaynağı olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, sadece düşük ve orta direnç içeren Türk ticari kültürlerinin performansını etkileyebilecek değişiklikleri ele almak için Türkiye'nin şeker pancarı üretim alanlarında suşların ve varyantların ortaya çıkışı periyodik olarak izlenmelidir. EPPO Küresel Veritabanı, şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı virüsünün sadece İtalya ve Kıbrıs'ta bildirildiğini belirtirken, virüs şu anda diğer tüm Avrupa lkeleri için mevcut değil olarak işaretlenmiştir (Jeger et al., 2017). Türkiye'de *Becurtovirus* türlerinin istilasđ da Avrupa şeker pancarı üretimi için başka bir tedavi oluşturmuştur. Bu nedenle, Avrupa'da semptomatik şeker pancarı bitkileri izlenmeli ve şeker pancarı tarlalarında viral yayılımın erken tespiti ve kontrolü için moleküler karakterizasyon çalışmaları yapılmalıdır. Yeni keşfedilen CRISPR/Cas9 genom düzenleme tekniği, bitkilerde pancar tepe kıvrıcık virüslerinin genetik kontrolü için umut verici bir sonuç vadetmektedir (Ali vd., 2015; Ji et al., 2015; Zaidi et al., 2016; Yıldırım vd., 2019). Bu tür genetik mühendisliği yaklaşımları, viral salgınlara karşı dirençli şeker kültürleri geliştirmek için de izlenebilir ve kullanılabilir.

7. KAYNAKÇA

- Adams, M. J., King, A. M. Q., & Carstens, E. B. (2013). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013). *Archives of virology*, 158(9), 2023-2030.
- Agrios, G. N. (2005). Plant diseases caused by viruses. *Plant Pathology*, 723–824. doi:10.1016/b978-0-08-047378-9.50020-8 .
- Akbay, A. Ö. (2003). Türkiye’de Şeker Üretiminin Ekonomik ve Sosyal Karlılığının Değerlendirilmesi. *Ankara: Tarım Ekonomisi Araştırma Enstitüsü*.
- Ali, Z., Abulfaraj, A., Idris, A., Ali, S., Tashkandi, M., & Mahfouz, M. M. (2015). CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. *Genome biology*, 16(1), 1-11.
- Anabestani, A., & Behjatnia, S. A. A; Izadpanah, K; Tabein, S. and Accotto, GP 2017. *Seed transmission of beet curly top virus and beet curly top iran virus in local cultivar of petunia in Iran. Viruses*, 9(10), 299-311. doi:10.3390/v9100299
- Anonim, (2020). Türkşeker Yerli Üretimde Milli Değer , 2019 Sektör Raporu. https://www.turkseker.gov.tr/data/dokumanlar/2019_Sektor_Raporu.pdf (Erişim Tarihi: 20.12.2020)
- Argüello-Astorga, G. R., Guevara-Gonzalez, R. G., Herrera-Estrella, L. R., & Rivera-Bustamante, R. F. (1994). Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: a model for replication. *Virology*, 203(1), 90-100.
- Baliji, S., Black, M. C., French, R., Stenger, D. C., & Sunter, G. (2004). Spinach curly top virus: A newly described Curtovirus species from southwest Texas with incongruent gene phylogenies. *Phytopathology*, 94(7), 772-779.
- Benett, C.W. and Leach, L.D. (1977). Hastalıklar ve mücadelesi. Şeker pancarı üretimindeki gelişmeler: Prensipler ve uygulamalar. Bilgen, T., Erel, K., Onat, G. (çev.). Johnson, R.T., Alexander, J.T., Rush, G.E., Hawkes, G.R., T.(eds.) Şeker Fabrikaları A.Ş. Yay. No.205: 240- 307.
- Bennett, C. W. (1971). The curly top disease of sugarbeet and other plants, Monograph No. 7. *The American Phytopathological Society, St. Paul, MN*.
- Bennett, C. W., & Tanrisever, A. Z. I. Z. (1958). Curly top disease in Turkey and its relationship to curly top in North America. *Journal of American Society of Sugar Beet Technologists*, 10, 189-211.
- Biancardi, E. and Lewellen, R. T. (2016). Introduction: Pest and Diseases. Rhizomania. Biancardi, E. Tamada, T. (eds.), Switzerland, Springer.
- Briddon, R. W., Stenger, D. C., Bedford, I. D., Stanley, J., Izadpanah, K., & Markham, P. G. (1998). Comparison of a beet curly top virus isolate originating from the old world with those from the new world. *European Journal of plant pathology*, 104(1), 77-84.
- Brown J. K., Fauquet C. M., Briddon R. W., Zerbini M., et al., (2011) Geminiviridae. In: King A. M. Q., Adams M. J., Carstens E. B., Lefkowitz E. J. (eds.), *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp 251–374.
- Büchen-Osmond, C. (2006). Beet curly top virus in: ICTVdB –The Universal Virus Database, version 4., Columbia University, New York.
- Catoni, M., Noris, E., Vaira, A. M., Jonesman, T., Matic, S., Soleimani, R., ... & Accotto, G. P. (2018). Virus-mediated export of chromosomal DNA in plants. *Nature communications*, 9(1):5308, 1-8.

- Chen, L. F., Brannigan, K., Clark, R., & Gilbertson, R. L. (2010). Characterization of curtoviruses associated with curly top disease of tomato in California and monitoring for these viruses in beet leafhoppers. *Plant disease*, 94(1), 99-108.
- Cook, W. C. (1967). *Life history, host plants, and migrations of the beet leafhopper in the western United States* (No. 1365, pp. 122). Agricultural Research Service, US Department of Agriculture.
- Creamer, R., Luque-Williams, M., & Howo, M. (1996). Epidemiology and incidence of beet curly top geminivirus in naturally infected weed hosts. *Plant disease (USA)*, 80:533-535.
- Creamer, R. (2020). Beet curly top virus transmission, epidemiology, and management. In *Applied Plant Virology* (pp. 521-527). Academic Press. doi:10.1016/b978-0-12-818654-1.00037-2.
- Creamer, R., Carpenter, J., & Rascon, J. (2003). Incidence of the beet leafhopper, *Circulifer tenellus* (Homoptera: Cicadellidae) in New Mexico chile. *Southwestern Entomologist*, 28(3), 177-182.
- Creamer, R. and Velasquez-Valle, R. (2015). Curtovirus infection of peppers in Mexico and New Mexico. In: *Virus y Fitoplasmas de Chile: Una Perspectiva Regional*. Libro Tecnico No 10. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC-INIFAP, pp. 239 -256.
- DeLong D. M. (2013). Homopteran, Erişim: 07 Kasım 2020, <https://www.britannica.com/animal/homopteran>
- Dorst, H. E., & Davis, E. W. (1937). Tracing long-distance movements of beet leafhopper in the desert. *Journal of Economic Entomology*, 30(6), 948-954.
- Duffus, J. E., & Skoyen, I. O. (1977). Relationship of age of plants and resistance to a severe isolate of the beet curly top virus. *Phytopathology*, 67(2), 151-154.
- Eddy, D. (2013). Virus slams California tomatoes. *Growing Produce*. August 14, 2013.
- Eini, O., Sahraei, G. E., & Behjatnia, S. A. A. (2016). Molecular characterization and construction of an infectious clone of a pepper isolate of Beet curly top Iran virus. *Molecular Biology Research Communications*, 5(2), 101-113.
- Erdinç, Z. (2017). Türkiye’de Şeker Sanayinin Gelişimi ve Şeker Sanayinde İzlenen Politikalar. *Anadolu Üniversitesi Sosyal Bilimler Dergisi*, 17(3), 9-26.
- Fujii, R. (2013). San Joaquin tomato crop damaged by pests. *The Record*. August 10, 2013.
- Fauquet, C. M., Maxwell, D. P., Gronenborn, B., & Stanley, J. (2000). Revised proposal for naming geminiviruses. *Archives of Virology*, 145(8), 1743-1761.
- Geçit, H. H., Çiftçi, C. Y., Emeklier, H. Y., İkincikarakaya, S., Adak, M. S., Kolsarıcı, Ö., ... & Kendir, H. (2011). Tarla Bitkileri (Düzeltilmiş İkinci Baskı). *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 1588, Ders Kitabı: 540, Ankara*.
- Kardani, S. G., Heydarnejad, J., Zakiaghl, M., Mehrvar, M., Kraberger, S., & Varsani, A. (2013). Diversity of Beet curly top Iran virus isolated from different hosts in Iran. *Virus Genes*, 46(3), 571-575.
- Gibson, K. E. (1967). Possible incidence of curly top in Iran: A new record. *Plant Dis. Rep*, 51, 976-977.
- Gilbertson, R. L., Melgarejo, T. A., Rojas, M. R., William M. Wintermantel, & Stanley, J. (2019). Beet Curly Top Virus (Geminiviridae). Reference Module in Life Sciences. doi:10.1016/b978-0-12-809633-8.21238-7
- Glick, E., Levy, Y., & Gafni, Y. (2009). The viral etiology of tomato yellow leaf curl disease—a review. *Plant Protection Science*, 45(3), 81-97.

- Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S. B., Orozco, B. M., Nagar, S., & Robertson, D. (1999). Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(1), 71-106.
- Harkins, G. W., Delport, W., Duffy, S., Wood, N., Monjane, A. L., Owor, B. E., ... & Varsani, A. (2009). Experimental evidence indicating that mastreviruses probably did not co-diverge with their hosts. *Virology Journal*, 6(1), 1-14.
- Harveson, R. M. (2015). Beet curly top: America's first serious disease of sugar beets. *Online publication. APS Features*. doi:10.1094/APSFeature-2015-02.
- Heydarnejad, J., Hosseini Abhari, E., Bolok Yazdi, H. R., & Massumi, H. (2007). Curly top of cultivated plants and weeds and report of a unique curtovirus from Iran. *Journal of Phytopathology*, 155(6), 321-325.
- Heydarnejad, J., Keyvani, N., Razavinejad, S., Massumi, H., & Varsani, A. (2013). Fulfilling Koch's postulates for beet curly top Iran virus and proposal for consideration of new genus in the family Geminiviridae. *Archives of virology*, 158(2), 435-443.
- Hormuzdi, S. G., & Bisaro, D. M. (1993). Genetic analysis of beet curly top virus: evidence for three virion sense genes involved in movement and regulation of single-and double-stranded DNA levels. *Virology*, 193(2), 900-909.
- ICTV (2020). ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae , *Journal of General Virology*. Erişim: 10 Aralık 2020, https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/geminiviridae
- EFSA Panel on Plant Health (PLH), Jeger, M., Bragard, C., Caffier, D., Dehnen- Schmutz, K., Gilioli, G., ... & Candresse, T. (2017). Pest categorisation of Beet curly top virus (non- EU isolates). *EFSA Journal*, 15(10), e04998.
- Ji, X., Zhang, H., Zhang, Y., Wang, Y., & Gao, C. (2015). Establishing a CRISPR-Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. *Nat Plants* 1: 15144.
- Kamali, M., Heydarnejad, J., Pouramini, N., Masumi, H., Farkas, K., Kraberger, S., & Varsani, A. (2017). Genome sequences of Beet curly top Iran virus, Oat dwarf virus, Turnip curly top virus, and Wheat dwarf virus identified in leafhoppers. *Genome announcements*, 5(8)..
- Kaya, R. (2013). şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı (Beet curly top virüs) hastalığı. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 28(1), 52-58.
- Kaya, R. (2004). Kırşehir, Bor ve Ereğli şeker fabrikası ekim alanlarında Rhizomania incelemesi, şeker Enstitüsü Raporu, s: 1.
- Kaya, R., Gürkan, ř., 2006. Ereğli şeker Fabrikası Karaman Bölgesinin bazı pancar ekim alanlarının incelenmesi, şeker Enstitüsü Raporu, s: 1-6.
- Kaya, R., Gürkan, ř., 2007. Kırşehir şeker Fabrikasının bazı pancar ekim alanlarında hastalık incelemesi. şeker Enstitüsü Raporu, s: 1-4.
- Kaya, R., Gürkan, ř., 2008. Kırşehir şeker Fabrikası şeker pancarı ekim alanlarında şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı hastalığının incelenmesi, şeker Enstitüsü Raporu, s: 1-4.
- Kaya, R., Gürkan, ř., 2009. Ankara şeker Fabrikası şeker pancarı ekim alanlarında şeker pancarı tepe kıvrıcıklığı hastalığının incelenmesi, şeker Enstitüsü Raporu, s:1-3.
- Klute, K. A., Nadler, S. A., & Stenger, D. C. (1996). Horseradish curly top virus is a distinct subgroup II geminivirus species with rep and C4 genes derived from a subgroup III ancestor. *Journal of general virology*, 77(7), 1369-1378.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547-1549.

- Lazarowitz, S. G., & Shepherd, R. J. (1992). Geminiviruses: genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 11(4), 327-349.
- Montazeri, R., Shams-Bakhsh, M., Mahmoudi, S. B., & Rajabi, A. (2016). Evaluation of sugar beet lines for resistance to beet curly top viruses. *Euphytica*, 210(1), 31-40.
- Monteiro, F., Romeiras, M. M., Batista, D., & Duarte, M. C. (2013). Biodiversity assessment of sugar beet species and its wild relatives: linking ecological data with new genetic approaches. *American Journal of Plant Sciences*, 4, 21-34.
- Moriones, E., & Navas-Castillo, J. (2000). Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus research*, 71(1-2), 123-134.
- Mumford, D. L., & Peay, W. E. (1970). Curly top epidemic in Western Idaho. *Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists*, 16(3), 185-187.
- Murphy, A. M. (1946). Sugar beet and curly top history in Southern Idaho 1912–1945. In *Proc. Am. Soc. Sugar Beet Technol* (Vol. 4, pp. 408-412).
- Nash, T. E., Dallas, M. B., Reyes, M. I., Buhrman, G. K., Ascencio-Ibañez, J. T., & Hanley-Bowdoin, L. (2011). Functional analysis of a novel motif conserved across geminivirus Rep proteins. *Journal of virology*, 85(3), 1182-1192.
- Özgür, O. E. (2003). *Türkiye şeker pancarı hastalıkları*. Türkiye Şeker Fabrikaları. Yayın No: 219, Ankara, s. 192.
- Pooggin, M. M. (2013). How can plant DNA viruses evade siRNA-directed DNA methylation and silencing?. *International journal of molecular sciences*, 14(8), 15233-15259.
- Raccach, B. and Fereres, A. (2009). “Plant Virus Transmission by Insects”. In: *Encyclopedia of Life Science (ELS)*. Raccach, B. (Ed.). John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, pp. 1-9.
- Severin, H. H. (1921). Summary of Life-history of Beet Leafhopper (*Eutettix tenella*, Baker). *Journal of Economic Entomology*, 14(5), 433-436.
- Shepherd, D. N., Martin, D. P., Lefeuvre, P., Monjane, A. L., Owor, B. E., Rybicki, E. P., & Varsani, A. (2008). A protocol for the rapid isolation of full geminivirus genomes from dried plant tissue. *Journal of virological methods*, 149(1), 97-102.
- Soleimani, R., Matic, S., Taheri, H., Behjatnia, S. A. A., Vecchiati, M., Izadpanah, K., & Accotto, G. P. (2013). The unconventional geminivirus Beet curly top Iran virus: satisfying Koch's postulates and determining vector and host range. *Annals of Applied Biology*, 162(2), 174-181.
- Soosaar, J. L., Burch-Smith, T. M., & Dinesh-Kumar, S. P. (2005). Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 789-798.
- Soto, M. J., Chen, L. F., Seo, Y. S., & Gilbertson, R. L. (2005). Identification of regions of the Beet mild curly top virus (family Geminiviridae) capsid protein involved in systemic infection, virion formation and leafhopper transmission. *Virology*, 341(2), 257-270.
- Stanley, J., Markham, P. G., Callis, R. J., & Pinner, M. S. (1986). The nucleotide sequence of an infectious clone of the geminivirus beet curly top virus. *The EMBO journal*, 5(8), 1761-1767.
- Stanley, J., Latham, J. R., Pinner, M. S., Bedford, I., & Markham, P. G. (1992). Mutational analysis of the monopartite geminivirus beet curly top virus. *Virology*, 191(1), 396-405.
- Stenger, D. C. (1994). Complete nucleotide sequence of the hypervirulent CFH strain of beet curly top virus. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 7, 154-157.

- Strausbaugh, C. A., Eujayl, I. A., & Wintermantel, W. M. (2017). Beet curly top virus strains associated with sugar beet in Idaho, Oregon, and a Western US Collection. *Plant disease*, 101(8), 1373-1382.
- Strausbaugh, C. A., Wintermantel, W. M., Gillen, A. M., & Eujayl, I. A. (2008). Curly top survey in the western United States. *Phytopathology*, 98(11), 1212-1217.
- Strausbaugh, C. A., Wenninger, E. J., & Eujayl, I. A. (2012). Management of severe curly top in sugar beet with insecticides. *Plant disease*, 96(8), 1159-1164.
- Strausbaugh, C. A., Wenninger, E. J., & Eujayl, I. A. (2014). Control of curly top in sugar beet with seed and foliar insecticides. *Plant disease*, 98(8), 1075-1080.
- Strausbaugh, C. A., Wenninger, E. J., & Eujayl, I. A. (2016). Length of efficacy for control of curly top in sugar beet with seed and foliar insecticides. *Plant disease*, 100(7), 1364-1370.
- Strausbaugh, C. A., Gillen, A. M., Camp, S., Shock, C. C., Eldredge, E. P., & Gallian, J. J. (2007). Relationship of beet curly top foliar ratings to sugar beet yield. *Plant disease*, 91(11), 1459-1463.
- Strausbaugh, C. A., Gillen, A. M., Gallian, J. J., Camp, S., & Stander, J. R. (2006). Influence of host resistance and insecticide seed treatments on curly top in sugar beets. *Plant disease*, 90(12), 1539-1544.
- Sunulu, S., & Sunulu, A. (2016). Şeker Pancarında Cercospora Yaprak Lekesi Hastalığı. *Pankobirlik*, 27(108), 34.
- Tahan, V., Heydarnejad, J., & Jafarpour, B. (2020). Characterization of Beet curly top Iran virus infecting eggplant and pepper in north-eastern Iran. *Indian Phytopathology*, 1-5. <https://doi.org/10.1007/s42360-020-00218-x>
- 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(3), 512-526.
- Tanrısever, A. (1961). Türkiye Şeker Pancarı Hastalık ve Haşereleri, T. *Şeker Fabrikaları AŞ Yay*, (77).
- Tennant, P., Gubba, A., Roye, M., & Fermin, G. (2018). Viruses as Pathogens: Plant Viruses. *Viruses: Molecular Biology, Host Interactions, and Applications to Biotechnology*, 135-156.
- Varsani, A., Martin, D. P., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., ... & Brown, J. K. (2014). Revisiting the classification of curtoviruses based on genome-wide pairwise identity. *Archives of virology*, 159(7), 1873-1882.
- Varsani, A., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., Brown, J. K., ... & Martin, D. P. (2014). Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus. *Archives of virology*, 159(8), 2193-2203.
- Yazdi, H. B., Heydarnejad, J., & Massumi, H. (2008). Genome characterization and genetic diversity of beet curly top Iran virus: a geminivirus with a novel nonanucleotide. *Virus genes*, 36(3), 539-545.
- Yildirim, K., Boylu, B., Atici, E., Kahraman, T., & Akkaya, M. S. (2012). In Turkish wheat cultivars the resistance allele of LR34 is ineffective against leaf rust. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 119(4), 135-141.
- Yıldırım, K., Seçgin, Z., Şenyer A., Can, C., Kavas, M. (2019). Conferring Multiple Resistance to DNA Viruses in Plants with the CRISPR Cas9 Genome Editing Technology, presented at the 1st PlantEd Conference Plant Genome Editing - State of the Art, Novisad/Serbia.

- Zaidi, S. S. E. A., Mansoor, S., Ali, Z., Tashkandi, M., & Mahfouz, M. M. (2016). Engineering plants for geminivirus resistance with CRISPR/Cas9 system. *Trends in plant science*, 21(4), 279-281.
- Zaitlin, M., & Palukaitis, P. (2000). Advances in understanding plant viruses and virus diseases. *Annual review of phytopathology*, 38(1), 117-143.
- Zerbini, F. M., Briddon, R. W., Idris, A., Martin, D. P., Moriones, E., Navas-Castillo, J., ... & Consortium, I. R. (2017). ICTV virus taxonomy profile: Geminiviridae. *The Journal of general virology*, 98(2), 131-133.



8. EKLER

8.1. In-Fusion® HD Klonlama Kiti (TAKARA) ile bulaşıcı BCTTV klonunun oluşturulması



Şekil 8.1. Bitki ekspresyon vektörüne BCTTV dimerinin eklenmesi için Takara infüzyon aracı ile klonlama primerlerinin tasarlanması

Tablo 8.1. *Agrobacterium* bitki ifade vektörünün HindIII enzimi ile kesimi.

Reaksiyon Bileşenleri	µl
PLASMİD (269 ng)	5 µl
10X HindIII Reaction Buffer	5 µl
HindIII enzim	2 µl
dH ₂ O	8 µl
TOPLAM	20 µl

Tablo 8.2. İnsert 1 için BCTTV-1.0 genomunun PCR amplifikasyonu

Reaksiyon Bileşenleri	μl	PCR koşulları
CloneAmp™ HiFi PCR Premix	12.5	98 °C 10 s
Mastermix		
Template DNA (250ng)	1	68 °C 1 min 20 s
(pUC57+BCTTV)		
Insert 1 F primer (10 μM)	1	} X 34
Insert 2 R primer (10 μM)	1	
DMSO	1	
dH ₂ O	8.5	
TOPLAM	25	

Tablo 8.3. İnsert 2 için BCTTV-2.0 genomunun PCR amplifikasyonu

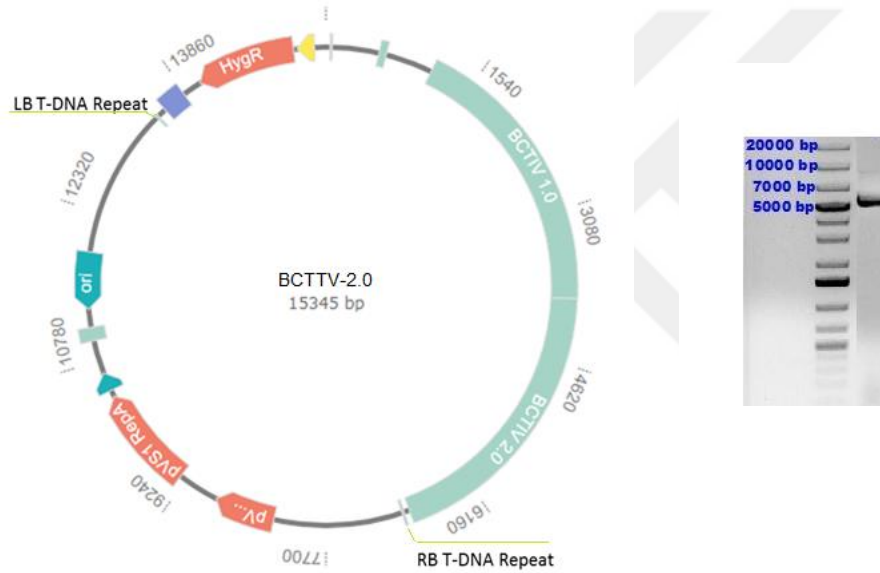
Reaksiyon Bileşenleri	μl	PCR koşulları
CloneAmp™ HiFi PCR Premix	12.5	98 °C 10 s
Mastermix		
Template DNA (250ng)	1	68 °C 1 min 20s
(pUC57+BCTTV)		
Insert 3 F primer (10 μM)	1	} X 34
Insert 4 R primer (10 μM)	1	
DMSO	1	
dH ₂ O	8.5	
TOPLAM	25	

Tablo 8.4. İki BCTTV klonunun bitki ekspresyon vektörüne ligasyonu

Ligasyon Reaksiyon Bileşenleri	μl
Insert 1 (61.3 ng/ μl)	2 μl
Insert 2 (61.7 ng/ μl)	2 μl
Linear Agrobacterium plasmid (25.5 ng/ μl)	4 μl
5X In-Fusion HD Enzyme Premix	2 μl
dH ₂ O	0 μl
TOPLAM	10 μl

Tablo 8.5. Koloni PCR reaksiyonu ile ligasyonun doğrulanması

Reaksiyon Bileşenleri	μl	PCR koşulları
2x Taq Master mix	12.5	} X30 98 °C 10 s 68 °C 2 min
BCTTV-2.0 plasmid	1	
Insert 1 F primer (10 μM)	1	
Insert 4 R primer (10 μM)	1	
DMSO	1	
dH ₂ O	8.5	
TOPLAM	25	



Şekil 8.2. BCTTV bulaşıcı klon oluşturulması ve koloni PCR ile doğrulanması.