Fidan, H., Ünlü, A., Koç, G., Ünlü, M. 2010 Türkiye'de Hıyar Bitkisinde Yeni Bir Virüs Hastalığı *Melon Necrotic Spot Virus* (MNSV) VIII. Sebze Tarýmý Sempozyumu 23 Haziran-26 Haziran 2010 - VAN / TÜRKİYEVan S:490-494

Türkiye'de Hıyar Bitkisinde Yeni Bir Virüs Hastalığı *Melon Necrotic Spot Virus* (MNSV)

Hakan. Fidan[1] Abdullah. Ünlü[2] Gökmen. Koç[3] Mine. Ünlu[2]

Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü[1]. Yuregir 01321 Adana Turkey

Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü[2]. BATEM Antalya Turkey

Ç.Ü. Pozantı Meslek Yüksek Okulu, Pozantı[3], Adana, Turkey

e-mail: hakanfidantr@hotmail.com

Özet

Türkiye'nin Antalya ilinde 2009 yılı sera koşullarında gerçekleştirilen ıslah çalışması sırasında hıyar (*Cucumis sativus*) bitkilerinde, sistemik nekrotik lekelere rastlanmıştır. Toplanan yapraklarda düzensiz sarımsı koyu kahverengi nekrotik lekeler gözlenmiştir. Yaprak belirtilerine paralel meyve yüzeyinde renk bozulması belirtiside kaydedilmiştir. Hastalık etmenin tanılanması için yaprak örnekleri Agdia (Elkhart, USA)'den temin edilen spesifik polyclonal antiserum ile DAS-ELISA tekniğine göre testlenmiştir. DAS-ELISA sonuçlarını desteklemek için ilave olarak 100mg yapraktan RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) yardımıyla ekstrakte edilen toplam RNA'lar RT-PCR da kullanılmıştır. Sense (MNS-C10 (-) CTCCATAAGCGCCAAGCAACC ve Antisense primerleri MNS-N40 (+) AGCGGGGGAAAACAGAAGAA sentezlenmiş, RT-PCR sonucu kılıf proteinine ait 485 bp DNA bandları %2' lik agaroz jelde gözlenmiştir. RT-PCR ürünlerinin dizilenmesi sonucu MNSV (lcl|52761) kılıf protein gen uyumuna göre sırasıyla 96%, 94% ve 92% oranlarında İspanya'dan (GenBank DQ339157), Hollanda'dan (GenBank M29671) ve Panama'dan (GenBank DQ443547) izolatlarıyla yakınlık saptanmıştır. Hastalık 2006 yılında, Türkiye'nin Trakya bölgesi kavun bitkilerinde serolojik tekniklerle saptanmıştır. Bu çalışmada, hıyardaki enfeksiyonun ve belirtilerin Melon Necrotic Spot Virus (MNSV) 'e ait olduğu serolojik ve moleküler yöntemlerle ortaya konulmuştur. Yapılan kaynak taramalarına göre bu çalışma MNSV'nin Türkiye'de hıyar bitkisindeki ilk kaydı niteliğindedir.

Anahtar kelimeler: hıyar, MNSV, ELISA, RT-PCR, Türkiye

Melon necrotic spot virus newly reported in cucumber in TURKEY

Abtract

In late spring of 2009, systemic necrotic spots were observed on cucumber (*Cucumis sativus*) plants, which are at breeding trial in greenhouse in Antalya province of Turkey. On the collected leaves, irregular yellowish dark brown necrotic spots were observed. According to leaf symptoms, discoloration of fruit surface also monitored.

To identification of the causal agent, leaf samples were tested by DAS-ELISA using a specific antiserum supplied by Agdia (Elkhart, USA). In addition and to support the positive DAS ELISA results, the occurrence of MNSV was confirmed by RT-PCR using total RNA extracted from leaves (100 mg) with the RNeasy Plant Mini kit (Qiagen). Sense (MNS-C10(-)CTCCATAAGCGCCAAGCAACC and Antisense primers MNS-N40(+) AGCGGGGGAAAACAGAAGAA were synthesized (1). A RT-PCR assay was conducted by primer pairs, amplified 485 bp bands on Coat Protein gene region of virus RNA. As a result of RT-PCR, 485 bp DNA bands were observed in 2% agarose gel. RT-PCR product from MNSV isolate (CAnTk1) was directly sequenced. This nucleotide sequence showed 96%, 94% and 92% identity to the coat protein gene of MNSV (lcl|52761) isolates from Spain (GenBank DQ339157), the Netherlands (GenBank M29671) and Panama (GenBank DQ443547) respectively. In Turkey, (2) occurrence of MNSV reported at melon field samples by serological technics from Thrace region.

In this study, infections and symptoms were associated with Melon Necrotic Spot Virus (MNSV) according to laboratory assay results. And in our knowledge this is the first report of MNSV on cucumber from West Mediterranean region of Turkey.

Keywords: cucumber, MNSV, ELISA, RT-PCR, Turkey

Giriş

Melon Necrotic Ringspot Virus (MNSV) Tombusvirus ve Necrovirus cinsleriyle birlikte Tombus viridae familyasını oluşturan Carmovirus cinsinin bir üyesidir (Van Regenmortel et al., 2000). MNSV bazı fizyokimyasal özelliklerinden dolayı tıpkı Carmovirus ve Tombus viruslarındaki gibi sınıflandırılmayan küçük izometrik viruslar grubunda yer almaktaydı (Morris and Carrington, 1988; Morris and Dodds, 1979; Fruki, 1985). Ancak mükleitid dizi bilgileri bu iki virus grubunun birbiriyle ilişkili olduğunu göstermiştir (Rochon and Tremaine, 1989). MNSV ilk kez yapraklarında nekrotik lekeler görülen bir muskmelon türünde rapor edilmiştir (Kishi, 1966).Etmen Cucurbitacea familyasıyla sınırlı az sayıda konukçu dizisine sahip olmakla beraber tohumla ve toprak kökenli bir mantar olan *Olpidium borovanus* ile taşınmaktadır (Campbell, 1996; Hibi, 1986). Necrotik spot hastalığı kavunda ilk kez Japonya'da (Kishi, 1966) ve Amerika Birleşik Devletlerinin Kaliforniya eyaletinde (Gonzalez-Garza et al., 1979) rapor edilmiştir. Hıyar bitkisindeki ilk kayıt ise Hollanda'da (Bos et al., 1984) rapor edilmiştir. Ülkemizde ise Köklü ve Yılmaz, (2006) Trakya bölgesinde yaptıkları çalışmada kavun ve karpuz türlerinde hastalık etmenini saptamışlardır.

2001 yılı geç ilk bahar döneminde gerçekleştirilen surveyler sırasında hıyar bitkisi yapraklarında düzensiz sarımsı kahverengi nekrotik lekeler ve meyvede ise yüzeysel renk bozulması belirtileri gözlenmiştir. Gerçekleştirlen testler sonucu bu belirtileri gösteren örneklerin MNSV ile infekteli olduğu sonucuna varılmıştır. Bu yayın MNSV Hıyar izolatının saptanması ve tanılanması üzerine yapılan çalışma sonuçlarını içermektedir.

Materyal ve Metot

Çalışma materyali 2009 yıllında Türkiye'nin Antalya ilindeki hıyar seralarından toplanmıştır. Hıyar örnekleri Adana Zirai Mücadele Enstitüsü Viroloji Laboratuarında serolojik ve moleküler tekniklerle testlenmiştir.

Double Antibodysandwich Enzyme Linked Immuno Sorbent assay (DAS-ELISA) testi, Clark ve Adams, (1977)'ye göre yürütülmüştür. Belirti gözlenen hıyar örnekleri havan-havan eli yardımıyla phosphate buffer solution (PBS) (8.0 g NaCl, 0.2 gKH2PO4, 2.9 g Na2HPO4.12H2O, 0.2 g KCl, 0.2 g NaN3, 20 g polyvinylpyrrolidone-25 per L, pH 7.4) içerisinde 1/5 oranında ezilmiş ve bitki öz suyu çıkartılmıştır. ELISA plateleri karbonat bufferda (1.59 g Na2CO3, 2.93 g NaHCO3, 0.2 g NaN3 per L, pH 9.6) sulandırılmış virüse özgü antiserumlarla öncelikli olarak kaplanmış ve 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben PBST buffer (8.0 g NaCl, 0.2 g KH2PO4, 2.9 g Na2HPO4.12H2O, 0.2 g KCl, 0.2 g NaN3, 0.5 mL Tween- 20 per L) ile yıkanan platelere ezilen örneklerden eklenmiş ve 4°C'de. overnight yapılmıştır. Overnight sonrası tekrar yıkanan platelere konjugat buffer (PBST + 2% polyvniylpyrrolidone-25 + 0.2% BSA (bovine serum albumin, Sigma A-4503, pH 7.4) içerisinde sulandırılmış virüse spesifik Alkalin Fosfatas ile konjuge antibody eklenmiştir. Bu işlemi 37°C'de 2 saat inkübasyon takip etmiştir. İnkübasyon sonrası tekrarlanan yıkama işleminin ardından plate çukurlarına P-nitrophenylphosphate in (97 mLdiethanolamine, 0.2 g NaN3 L-1, pH 9.8) içeren substrate buffer eklenmiş ve oda sıcaklığında karanlık koşullarda 2 saat bekletilmiştir. Test sonucu beklenen Absorbans değerleri 405 nm'de Medispec ESR 200 ELISA Reader'da ölçülmüştür. Buffer ve negatif kontrolün en az iki katı Absorbans değeri elde edilen örnekler MNSV ile enfekteli kabul edilmiştir.

***RT-PCR*;** RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) yardımıyla ekstrakte edilen toplam RNA'lar RT-PCR da kullanılmıştır**.** Sense (MNS-C10(-) CTCCATAAGCGCCAAGCAACC ve Antisense primerleri MNS-N40 (+) AGCGGGGGAAAACAGAAGAA MNSV CP (Jung et.al., 2005) genini saptamak için sentezlettirilmiştir. Revers Transcriptaz (RT) aşaması 42^{o}C'de 45 dakika ve PCR aşaması (95^{o}C, 45 sn.; 50^{o}C, 60 sn; and 72^{o}C, 60 sn) ve final uzama 72^{o}C'de 10 dakika toplam 35 döngüde gerçekleştirilmiştir. Çoğaltılan RT-PCR ürünleri %2'lik agaroz jel içerinde elektroforez edilip ethidium bromide ile boyanmıştır.

MNSV CP geni Dizi Analizi, MNSV CP genine ait cDNA örnekleri İONTEK firmasınca dizileme çalışmalarına tabi tutulmuştur. Elde edilen dizilerin Nükleotid ve amino asit dizi homoloji analizleri GenBank databasede BLAST yolu ile incelenmiştir.

.

Bulgular ve Tartışma

Survey ve DAS-ELISA, Türkiye'nin Antalya ilinde 2009 yılında gerçekleştirilen sera gözlemleri sonucu toplanan hıyar bitkisi örneklerinin % 13 oranında MNSV ile enfekteli olduğu DAS-ELISA testi sonucu saptanmıştır. MNSV ile enfekteli hıyar bitkisi yapraklarında sarımsı kahverengi nekrotik lekeler (Şekil 1) meyve ise yüzeysel renk değişimleri (Şekil 2) kaydedilmiştir. Belirtilerin genç yapraklarda klorotik sarımsı lekeler şeklinde başlayıp daha sonra geniş kahverengi nekrotik alanlara dönüştüğü gözlenmiştir. Meyve ve yaprak belirtilerinin öncelikli olarak gerçekleştirilen DAS-ELISA testi sonucu MNSV ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir (Şekil 3).

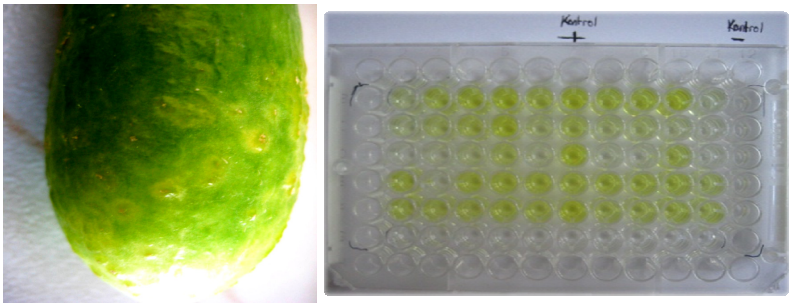
RT-PCR; sonucu kılıf protein bölgesinde yer alan 485 bp uzunluğundaki parça, %2'lik agaroz jelde elektroforez sonrası ethidium bromide ile boyanarak gözlenmiştir. (Şekil 4). MNSV İzolatının Dizi Analizi, MNSV hıyar izolatına iat 485 bp lik CP gen parçasının nükleotid dizi analizi (Şekil 5) sonucu MNSV (lcll52761) kılıf protein gen uyumuna göre sırasıyla 96%, 94% ve 92% oranlarında İspanya'dan (GenBank DQ339157), Hollanda'dan (GenBank M29671) ve Panama'dan (GenBank DQ443547) izolatlarıyla yakınlık saptanmıştır. Bu dizi analizinin GENBANK databasede blastı sonucu oluşan Filogenetik ağaç Şekil 6'da verilmiştir.



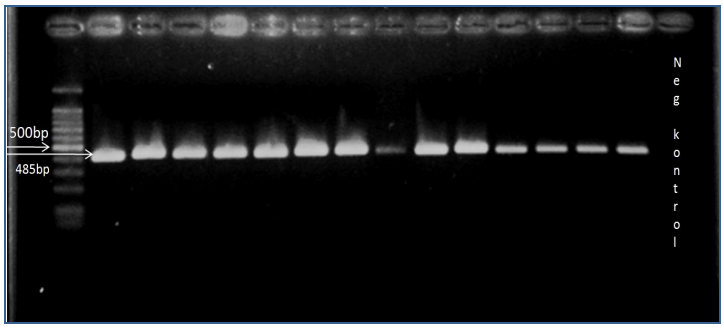
Şekil 1. Hıyar bitkisi yapraklarında klorotik nekrotik lekelenmeler



Şekil 2. Hıyar bitkisi meyvesinde klorotik beneklenmeler



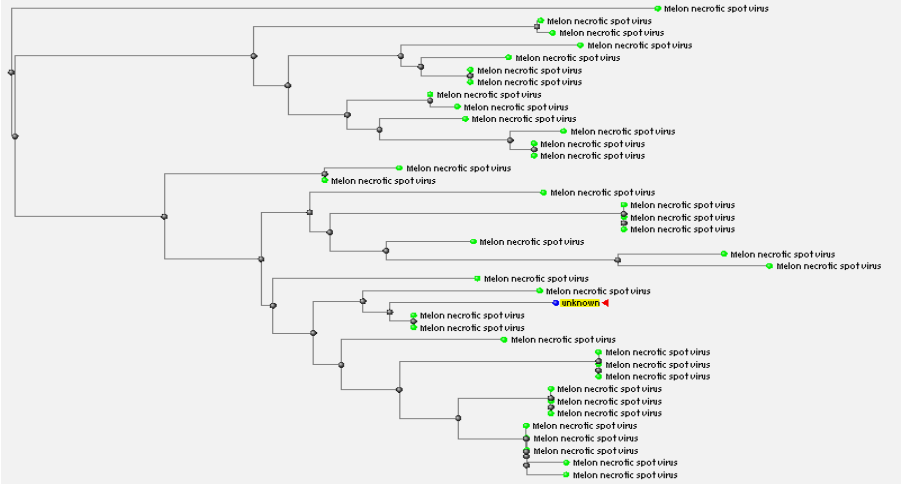
Şekil 3. Klorotik nekrotik beneklenme (solda); DAS-ELISA testi sonuçları



Şekil 4. RT-PCR sonucu elde edilen 485bp'lik MNSV CP bandları (%2 agarose jel)

```
gb|AF488692.1|  Melon necrotic spot virus isolate coat protein (CP) mRNA,
Score =  752 bits (407),  Expect = 0.0
 Identities = 447/465 (96%), Gaps = 8/465 (1%)
 Strand=Plus/Plus
Query  19    TGATCTTAGAAGCGTTGGCTTGACAATGTCCTAGTGGTTCCATGTGACAATACGTGGAGGTA  78
             ||||| |||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  567   TGATATTAGCCGCCTTGGCCTGACAATGTCCTAGTGGTTCCTTGTGACAATACGTGGAGGTA  626
Query  79    CATGAATGATACCAATGTCGTCGACCGGAAGTTGGTTGATTTTGGGCAGTTCCTTTTGC  138
             ||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  627   CATGAATGATACCAATGCCGTCGACCGGAAGTTGGTTGATTTTGGGCAGTTCCTTTTGC  686
Query  139   TACTTATTCTGGTGCTGGTGCATCCCGCCCATGGTGATCTTTACGTCGAGTATGCTGTTG  198
             ||||||||||||||||||||| |||||||| |||||||| |||||||||||||||||||
Sbjct  687   TACTTATTCTGGTGCTGGTGCACCCGCCCATGGTGATC-TTTACGTCGAGTATGCTGTTG  745
Query  199   AATTCAAGGACCCCCTAGCCTATCGCTGGCATGGTATGTATGTTTTGATCGCTCTGTTCT  258
             |||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||| |||||||| |||| |||
Sbjct  746   AATTCAAGGACCCCC-AGCCTATCGCTGGCATGGTATGTATG-TTTGATCGCTCTG-TCT  802
Query  259   CCTTCTCTCGAAGTTGCGGTCTACTATTAAGCTCAGTCAATTATATTGCCGATCATGATGT  318
             |||||||||||||| |||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  803   CCTTCTCTCGAAGTTG-GGTCTACTATTAAGC-CAGTCAATTATATTGCCGATCATGATGT  860
Query  319   CATAACCACTGGGGGCAATATTAATGTTAACATCAACATTACCGGGACTTATCTCGTTAC  378
             |||||||||||||||||||| |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||
Sbjct  861   CATAACCACTGGGGGCAATAT-AATGTTAACATCAACATTCCGGGACTTATCTCGTTAC  920
Query  379   TGATTGTTCTTAATGCCACATCGATTGGTTCCCTTCACCTTCACTGGCAATTCTAAACTT  438
               |||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  921   -GATTGTTCTTAATGCCACATCGATTGGTTCCC-TCACCTTCACTGGCAATTCTAAACTT  978
Query  439   GTAGGCAACAGTCTTAATGTTTCCAGCAGTGGTACATCTGCTCTT  483
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  979   GTAGGCAACAGTCTTAATGTTTCCAGCAGTGGTACATCTGCTCTT  1023
```

Şekil 5. RT-PCR sonucu elde edilen MNSV CP'sinin gen dizilemesi



Şekil 6. MNSV CP gen dizisinin Filogenetik ağacı (BIOEDIT)

Sonuç

Sonuç olarak bu çalışmada, hıyardaki enfeksiyonun ve belirtilerin Melon Necrotic Spot Virus (MNSV) ile bağlantılı olduğu serolojik ve moleküler yöntemlerle ortaya konulmuştur. Yapılan kaynak taramalarına göre bu çalışma MNSV'nin Türkiye'de hıyar bitkisindeki ilk kaydı niteliğindedir.

Kaynaklar

Bos, L., Van Dost, H. J. M., Huttigna, H. and Maat, D. Z. 1984. Further characterization of melon necrotic spot virus causing severe diseases in glasshouse cucumbers in the Netherlands and its control. *Neth. J. Plant Pathol.* 90:55-69.

Clark M. F. And Adams, A. N., 1977. Characteristics Of The Micro-Plate Method Of Enzime Linked Immuno Sorbent Assay For The Detection Of Plant Viruses. Journal Of General Virology. 34, 475-483.

Compbell, R. N. 1996. Fungal transmision of plant viruses. *Annu.Rev. Phytopathol*. 34:87-108.

Furuki I, D 1985. Melon necrotic spot virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No. 302. Warwick, UK: Association of Applied Biologists.

Gonzalez-Garza, R., Gumpz, D. J., Kishaba, A. N. and Bohn, G.W. 1979. Identification, seed transmission, and host range pathogenicity of a California isolate of melon necrotic spotvirus. *Phytopathology* 69:340-345.

Hibi, T. 1986. Melon necrotic spot virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, no. 302, Kew, United Kingdom.

Jung, J. A., Kim, S. M., Kim, H. R., Lee, S. H., Choi, H. S., Park, J. W. And Kim, T. W. 2005. Diagnosis of *Melon necrotic spot* carmovirus by using RT-PCR and efficiency comparison with other diagnostic methods *Plant Pathol. J.* 21:434 (abstract).

Kishi, K. 1966. Necrotic spot of melon, a new virus disease. *Ann.Phytopath. Soc. Japan* 32:138-144.

Köklü G., And Yilmaz Ö., 2006 Occurrence of cucurbit viruses on field-grown melon and watermelon in the Thrace region of Turkey Phytoprotection, vol. 87, n° 3, 2006, p. 123-130.

Van Regenmomortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L.,Carstens, E., Estes, M. K., Lemon, S., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D., Pringle, C. R. and Wickner, R. B. 2000.Virus Taxnomy. *Seventh Report of the International Committeeon Taxonomy of Viruses.* Academic Press, New York.