



MAKÜ FEBED  
ISSN Online: 1309-2243  
<http://febed.mehmetakif.edu.tr>

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 3 (2): 12-15 (2012)

Araştırma Makalesi / Research Paper

## Burdur Çine Ovası Fasulye Alanlarında Hıyar Mozaik Virüsü

Handan Çulal Kılıç, Nejla Yardımcı

Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 32260 Isparta

Geliş Tarihi (Received): 09.11.2012, Kabul Tarihi (Accepted): 23.12.2012

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): [handankilic@sdu.edu.tr](mailto:handankilic@sdu.edu.tr) (H. Çulal Kılıç)

☎ 0 246 211 48 61 📠 0 246 237 16 93

### ÖZET

Bu çalışma, Burdur'un Çine ovasındaki fasulyelerde hıyar mozaik virüsünün (CMV) belirlenmesi amacıyla gerçekleştirildi. 2011 yılında fasulye alanlarında virüs şüpheli bitkilerden alınan yaprak örnekleri CMV yönünden Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) ve Immunocapture Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction (IC-RT-PCR) yöntemi ile incelendi. Toplanan 50 yaprak örneğinin tamamına DAS-ELISA yöntemi uygulandı. Ayrıca ELISA testinde pozitif çıkan veya pozitif olduğundan şüphe edilen 12 örneğe ise PCR testi uygulandı. Örneklerin serolojik testlerinde CMV'ye spesifik antiserumlar kullanıldı. DAS-ELISA testi sonucunda 50 örnekten 25'inde (%50) CMV enfeksiyonu belirlendi. IC-RT-PCR yönteminde kılıf protein geninin yaklaşık 678 bp'lik bir kısmı amplifiye edildi ve 12 örneğin tamamında CMV'ye özgü beklenen seviyede bant gözlemlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Fasulye, CMV, DAS-ELISA, IC-RT-PCR

### *Cucumber mosaic Virus in Bean Growing Areas of Çine Plain, Burdur, Turkey*

#### ABSTRACT

The presence of *Cucumber mosaic virus* (CMV) on the leaves of fresh beans grown in the Çine Plain of Burdur, Turkey was determined. Leaf samples from the plants with suspected virus infection in 2011 were analyzed by the CMV by Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) and Immunocapture Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction (IC-RT-PCR) methods. Fifty samples in total were tested by DAS-ELISA. Furthermore, 12 samples, which were positive or suspected samples in DAS-ELISA tests, were used for IC-RT-PCR for the identification of CMV. For serological testing of the samples, antisera specific to CMV were used. As a result of DAS-ELISA, 25 out of 50 samples (50%) were infected with CMV. Immunocapture RT-PCR assay was carried out using specific primer which amplified a 678 bp fragment of coat protein of CMV in suspected samples. A unique band size, as expected for CMV, was observed in 12 leaf samples.

**Key Words:** Bean, CMV, DAS-ELISA, IC-RT-PCR

#### 1. GİRİŞ

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) besin değeri çok yüksek olan, hemen hemen tüm dünyada bol miktarda tüketilen önemli bir kültür bitkisidir. Fasulye taze

sebze, kuru dane ve konserve gibi değişik şekillerde değerlendirilebilmektedir (Bozoğlu, 1995).

*Leguminosae* familyasının üyesi olan fasulyenin anavatanı Orta ve Güney Amerika ülkeleridir. Anadolu'ya 250-300 yıl önce Avrupa'dan gelerek

yayılım gösterdiği tahmin edilmektedir (Şehirli, 1988). Dünya da taze fasulye üretimi 26 milyon hektar alanda 4.310.733 ton'dur. 2011 yılı verilerine göre Türkiye'de toplam 799.379 hektar (ha) baklagil alanının 528.931 ha alanında taze fasulye üretimi yapılmış ve 614.948 ton taze fasulye üretilmiştir (Web 1, 2011).

Burdur, Göller Bölgesi olarak da adlandırılan Batı Akdeniz Bölgesinde yer almaktadır. İklim olarak hem İç Anadolu'nun hem de Akdeniz bölgesinin iklimini yansıtmaktadır. İklim faktörleri ile birlikte son yıllarda yapılan çalışmalarla sulama olanaklarının geliştirilmesi bölgede sebze üretimini daha da önemli hale getirmiştir. Burdur ili ekonomisi temel olarak tarım ve hayvancılığa dayanmaktadır. Taze fasulye üretiminin yapıldığı en verimli ovalardan biri olan Çine ovası Türkiye'nin taze fasulye üretiminin yüzde 22'sini karşılamaktadır (Web 2, 2012). Burdur ilinde 56.644 dekar sebze üretim alanında, 21.213 ton taze fasulye üretimi yapılmaktadır (Web 1, 2011).

Fasulye bitkisi cansız hastalık etmenlerinin yanı sıra birçok bakteriyel, fungal ve viral hastalık etmenlerinden olumsuz etkilenmektedir (Nyvall, 1989).

Bunların içinde en önemli virus hastalıklarının; *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Bean common mosaic virus* (BCMNV), *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV), *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Southern bean mosaic virus* (SBMV), *Tobacco streak virus* (TSV) ve *Tomato aspermy virus* (TAV) olduğu bildirilmektedir (Kumar ve ark., 1994; Güzel ve Arlı-Sökmen, 2003; Ghorbani ve ark., 2010).

Ülkemizde fasulye virüsleri konusunda [CMV, AMV, BCMNV, CABMV, BCMNV, BYMV, *Tobacco black ring virus* (TRRV), *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV)] birçok araştırma yapılmıştır (Açıkgöz, 1984; Yılmaz ve Özaslan, 1987; Fidan ve Yorgancı, 1990; Gümüş ve ark., 2001; Güzel ve Arlı-Sökmen, 2003).

Bitkilerde hastalık oluşturan virüsler ile ilgili kimyasal bir mücadele imkanının bulunmaması bu hastalıkların önemini giderek arttırmaktadır. Üretim alanlarında sorun olan bu viral hastalıkların kontrolünde kültürel yöntemlerin uygulanması, dayanıklı çeşitlerin ve temiz üretim materyalinin kullanılması ve vektörlerle mücadele etmenin önemi oldukça büyüktür. Virüsler ile mücadelede uygun teşhis ve gerekli önlemlerin alınması oldukça önem arz etmektedir. Bu çalışmada, Burdur'un önemli fasulye üretim alanlarından olan Çine ovasında yetiştirilen fasulyelerde CMV'nin serolojik ve moleküler teşhis metotları ile belirlenmesi amaçlandı.

## 2. MATERYAL ve METOT

Bu çalışmanın ana materyalini, 2011 yılında Burdur'un Çine ovası fasulye alanlarından toplanan yaprak materyalleri oluşturdu. Örneklemeler yaprak deformasyonu, yapraklarda kıvrıkcıklaşma, damarlarda çekilme, yaprak renginde açılmalar, yaprakta nekroz

oluşumları, mozaik, bitkide bodurluk simptomu gösteren bitkilerden yapıldı.

Etiketlenerek buz kutusu içerisinde laboratuvara getirilen örnekler serolojik ve moleküler çalışmalarda kullanılmaya kadar derin dondurucuda (-18°C) muhafaza edildi. Çalışmada CMV DAS-ELISA (BIOREBA AG, Switzerland) ticari kiti kullanıldı. IC-RT-PCR çalışmalarında CMV'ye spesifik primer çiftleri ile kılıf protein geninin yaklaşık 678 bp'lik bir kısmı amplifiye edildi. Bu primer çifti (F-5-TTGAGTCGAGTCATGGACAAATC-3; R-5-AACACGGAATCAGACTGGGAG-3) Han-Xin ve ark. (2004)'larına göre sentezletti.

DAS-ELISA yönteminde; örnekler ilgili ticari firmanın test prosedürüne göre incelendi.

IC- RT-PCR yönteminde; RNA izolasyonuna gerek kalmadan virüse özgü spesifik antiserum'lar kullanıldı. Uygulama, ilgili ticari firmanın (BIOREBA AG, Switzerland) test prosedürüne göre yapıldı. IC-RT-PCR reaksiyonu tek aşamalı olarak TAKARA Bio Inc. (Japan) firmasının önerdiği şekilde 50 µL hacimde gerçekleştirildi. Amplifikasyon aşaması 50°C 30 dakika, 94°C 2 dakika, 94°C 30 saniye, 55°C 30 saniye 30 döngü, 72°C 1 dakika ve +4°C ∞ olarak gerçekleştirildi. Çoğaltılan RT-PCR ürünleri %1'lik agaroz jel içerisinde elektroforez (Bio-Rad, Fransa) edilip ethidium bromide ile boyandı ve görüntüleme Doc-It (UVP, UK) görüntüleme sisteminden yararlanıldı.

## 3. BULGULAR ve TARTIŞMA

Araştırmanın yürütüldüğü Burdur Çine ovası mevkiinde yapılan gözlemler sırasında fasulye üretim alanlarında bitkilerde mozaik, kloroz, damar bantlaşmaları, damar çekilmesi, damarlarda renk açılmaları, bitki boyunda kısalma, yapraklarda deformasyon gibi hastalık belirtileri gözlemlendi (Şekil 1.)

Diğer pek çok virüs hastalığında olduğu gibi fasulyede de zarar oluşturan virüslerin teşhisi ile ilgili yapılan çalışmalarda DAS-ELISA yöntemi yaygın olarak kullanılmıştır (Açıkgöz, 1984; Gümüş ve ark. 2001; Güzel ve Arlı-Sökmen, 2003; Kutluk-Yılmaz ve ark., 2002).

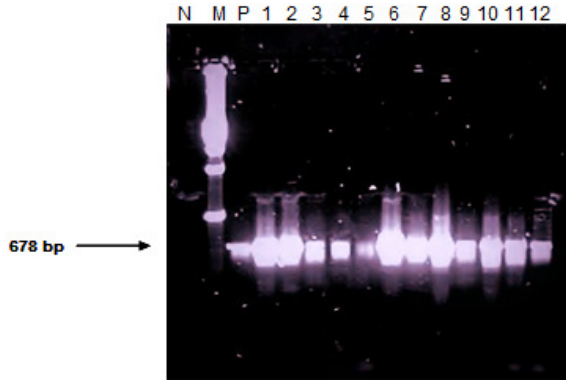
Bu çalışmada CMV'nin teşhisinde serolojik yöntemlerin diğer yöntemlere göre daha ekonomik, güvenilir ve sonuçların kısa sürede alınması gibi avantajlarından dolayı DAS-ELISA testi kullanıldı. Virüs belirtisi gösteren toplam 50 örneğin hepsine DAS- ELISA yöntemi uygulandı. Örneklerden 25 adedinin (% 50) CMV ile enfekteli olduğu belirlendi. 405 nm dalga boyunda okunan absorban değerlerine göre negatif kontrol değerinin en az iki katı ve daha yukarı okuma değeri veren örnekler pozitif olarak kabul edildi (Naghavi ve ark., 2008). Ayrıca kolorimetrik değerlendirmede bu örneklerin bulunduğu çukurlarda sarı renk oluşumunun meydana geldiği görüldü.

Samsun ilinde yapılan bir çalışmada, fasulye alanlarından toplanan 499 yaprak örneğinin % 10.8'inin CMV, % 36'sının BCMV, % 2.8'inin BCMNV, % 2'sinin BYMV ile enfekteli olduğu ve üreticilerden ve tohum bayilerinden alınan 53 farklı tohum örneğinin ise % 18.9'unun BCMV, % 17'sinin BCMNV ve % 17'sinin CMV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir (Güzel ve Arlı-Sökmen, 2003).

ELISA testlerinde pozitif çıkan veya pozitif olduğundan şüphelenilen 12 örnek IC-RT-PCR çalışmalarında kullanıldı. IC-RT-PCR çalışmalarında CMV' nin kılıf protein geninin yaklaşık 678 bp'lik bir kısmı amplifiye eden spesifik primer çiftleri kullanıldı. 12 örneğin tamamının beklenen seviyede bant verdiği ve CMV ile enfekteli olduğu PCR çalışması ile de teyit edildi (Şekil 2.). Negatif kontrolde ise herhangi bir bant oluşumu gözlenmedi.



Şekil 1. Fasulye yapraklarında damar çekilmesi ve kloroz simptomsu



Şekil 2. IC-RT-PCR sonucu elde edilen 678 bp'lik CMV bantları M. Marker (1 kb DNA Ladder); N. Negatif Kontrol; P. Pozitif Kontrol; 1. İnsuyu-262; 2. İnsuyu-264; 3. Çine ovası-283; 4. Çine ovası 221; 5. İnsuyu-55; 6. İnsuyu-56; 7. İnsuyu-59; 8. İnsuyu-57; 9. İnsuyu-61; 10. İnsuyu-54; 11. İnsuyu-253; 12. İnsuyu-263)

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, Han-Xin ve ark., (2004) ve Naghavi ve ark. (2008)'nin, CMV'ye spesifik primer çiftleri ile yaptıkları çalışma ile uygunluk göstermektedir. Aynı araştırmacılar, RT-PCR

çalışmalarında 678 bp büyüklükte bant elde etmişlerdir.

Ülkemizde fasulyedeki virüslerin moleküler yöntemler ile belirlenmesi ile ilgili olarak sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (Arlı-Sökmen ve ark., 2011). Yapılan bu çalışma fasulyede CMV'nin serolojik ve moleküler düzeyde tespiti konusunda Burdur ilinde yapılan ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Elde edilen sonuçlar bilimsel açıdan bundan sonra yapılacak çalışmalara basamak teşkil edecek niteliktedir.

#### 4. SONUÇ

Çalışmanın yapıldığı Çine Ovası sebze yetiştiriciliği için uygun iklim koşullarına ve ekonomik yapıya sahiptir. Ürün çeşidinin çok geniş olduğu bu bölgede birçok zararlı ve hastalık etmeni büyük kayıplara yol açmaktadır. Sebzelere zarar veren virüs hastalıkları içerisinde en önemlilerinden biri CMV'dir.

Fasulye üretiminde önemli verim kayıplarına yol açan CMV, yaprak bitleri ve tohumla yaygın olarak bulaşma sağlamaktadır (Makkouk ve Azzam, 1986). Bundan dolayı etkin bir savaşım yöntemi bulunmayan virüslerin yayılmasında rol oynayan vektörlerle mücadele edilmesi, dayanıklı çeşitlerin ıslahı ve temiz üretim materyalinin kullanılması ve enfekteli bitkilerin yok edilmesi gibi işlemlerin bölgede yaygınlaştırılması virüs hastalıkları ile mücadelede etkili olacaktır.

Yapılan surveylerde 50 bitki örneği toplanmış ve ELISA testine tabi tutulmuştur. Testlenen örneklerden 25 adedinde CMV saptanmıştır. ELISA testlerinde pozitif çıkan veya pozitif olduğundan şüphelenilen 12 örnek total RNA izolasyonuna gerek kalmadan spesifik antiserumlarla immunolojik olarak yakalanarak RT-PCR çalışmalarında kullanıldı ve beklenen büyüklüklerde bantlar elde edildi. Böylece, bu çalışma ile CMV'nin Çine Ovasındaki varlığı ELISA testi ile belirlenmiş ve son yıllarda rutin olarak kullanılan moleküler bir yöntem ile de desteklenerek bulaşıklık ortaya konulmuştur.

Virüs simptomsu gösteren bazı yaprak örneklerinin CMV'ye özgü spesifik kitlerle yapılan tanılama çalışmalarında negatif sonuç vermesi; bunların dışında farklı virusların bulunabileceğini de tahmin etmekteyiz. Bölgede CMV'nin ve fasulye üretim alanlarında bulunması muhtemel diğer virüslerin örnek sayısı artırılarak daha kapsamlı bir çalışma ile araştırılması gerektiği kanaatini taşımaktayız.

#### 5. KAYNAKLAR

- Açıkgöz, S., (1984). Erzinca ve Erzurum yörelerinde *Phaseolus vulgaris* Üzerinde Virüslerin Tanılanması, Yayılışları Ve Zararları Üzerinde Araştırmalar. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Doktora Tezi, Erzurum.
- Arlı-Sökmen, M., Deligöz, I., Kutluk-Yılmaz, N.D. (2011). Türkiye'de *Bean common mosaic virus* (BCMV) ve *Bean common mosaic necrosis virus* izolatlarının streyn düzeyinde ayrımı ve

- BCMV'nin yeni nekrotik izolatlarının belirlenmesi. Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi, Haziran 28-30, 2011, Kahramanmaraş, 54s.
- Bozoğlu, H. (1995). Kuru Fasulyede Bazı Tarımsal Özelliklerin Genotip X Çevre İnteraksiyonu Ve Kalıtım Derecelerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. 19 Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Samsun 99s.
- Fidan, Ü., Yorgancı, Ü. (1990). Investigation on the detection and seed transmission of the virus diseases occurring on the pulse crops in Aegean Region. Seed transmission of virus diseases by grower seeds and seeds of artificial infected pulse crops. Journal of Turkish Phytopathology, 19(1), 1-6.
- Ghorbani, S.G.M., Shahraeena, N., Elahinia, S.A. (2010). Distribution and impact of virus associated diseases of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in northern Iran. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 43(12), 1183–1189
- Gümüş, M., Erkan, S., Yorgancı, Ü., Duman, I. (2001). Bazı sebzelerin tohumlarında bulunan viral etmenlerin saptanması üzerine araştırmalar. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi, Eylül 3-8, Tekirdağ, 190-197.
- Güzel, Ö., Arlı-Sökmen, M. (2003). Determination of some viruses infecting common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and their incidences in seed lots in Samsun Province. Journal of Turkish Phytopathology, 32(2), 99-106.
- Han-Xin, L., Rubi, L., Smythe, A.B., Bryce, W.F. (2004). Molecular population genetics of *Cucumber Mosaic Virus* in California: Evidence for founder effects and reassortment. Journal of Virology 78(12), 6666-6675
- Kumar, C.A., Khetarpal, R.K., Parakh, D.B., Singh, S., Nath, R. (1994). Check list on seed transmitted viruses: Leguminous hosts. National Bureau of Plant Genetic Resources, New Delhi.
- Kutluk-Yılmaz, N.D., Gümüş, M., Erkan, S. (2002). Tokat ilinde fasulye tohumlarındaki viral etmenlerin saptanması üzerinde araştırmalar. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 38(3), 49-55.
- Makkouk, K.M., Azzam, O.I. (1986). Detection of broad bean stain virus in lentil seed groups. Lens Newsletter 13(2), 37–38.
- Naghavi, A., Habibi, M.K., Firouzabadi, F.N. (2008). Detection and Identification of some soybean viral mosaic viruses, using molecular techniques in Lorestan Province, Southwest of Iran. Asian Journal of Plant Sciences, 7(6), 557-562.
- Nyvall, R.F. (1989). Field Crop Diseases Handbook. New York: Van Nostrand Reinhold. 791.
- Şehirali, S. (1988). Yemelik Dane Baklagiller. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları:1089, Ders Kitabı:314.
- Web 1. TÜİK. Bitkisel üretim istatistikleri. İnternet Sitesi. <http://tuikrapor.tuik.gov.tr/reports>. (Erişim tarihi: 15.08.2012).
- Web 2. İnternet Sitesi. <http://www.baka.org.tr/ekonomi-S80.html>. (Erişim tarihi: 12.09.2012).