

Bazı Mısır Hatlarına Ait Tohumlarda *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV)'nin Varlığının Belirlenmesi ve Termoterapi Uygulaması ile Tohumdan Arındırılması

*Kemal DEĞİRMENCİ¹ Birol AKBAŞ² Rahime CENGİZ³ Filiz ERTUNÇ⁴

¹Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara

²Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Ankara

³Mısır Araştırma İstasyonu Müdürlüğü, Sakarya

⁴Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Ankara

*Sorumlu yazar e-posta (Corresponding author; e-mail): k_degirmenci@hotmail.com

Geliş Tarihi (Received): 30.06.2013

Kabul Tarihi (Accepted): 03.12.2013

Öz

Bu çalışma 2008-2009 yılları arasında Sakarya Tarımsal Araştırma Enstitüsü mısır ıslah parsellerinde yürütülmüştür. Yapılan sürvey ve laboratuvar çalışmalarında 10 adet mısır ıslah hattından 5 tanesinin *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) ile bulaşık olduğu belirlenmiştir. Enfeksiyon kaynağını belirlemek amacıyla, bulaşık bulunan bu hatların hem bu hasat döneminde hem de geçmiş yıllara ait tohumları, DAS-ELISA testi ile test edilerek virüsün tohumla taşınma durumu ve virüsün tohumun hangi kısmında yer aldığı belirlenmiştir. Yapılan DAS-ELISA testlerine göre, sadece 1 hatta ait tohumların MDMV ile bulaşık olduğu ve virüsün de tohumun embriyosunda yer aldığı belirlenmiştir. MDMV enfeksiyonu RT-PCR yöntemi kullanılarak moleküler olarak da teyit edilmiştir. Ayrıca enfekteli bulunan bu tohumlara 40°C, 50°C ve 65°C'de 48 saat süreyle termoterapi uygulaması yapılarak, tohumların virüsten arındırılmasına çalışılmıştır. Bu uygulamalar tohumun çimlenme oranını etkilememiş fakat çimlenmeyi geciktirmiştir. Termoterapi uygulamalarının, MDMV'yi elemine etmediği ancak tohumlardaki virüs konsantrasyonunu düşürdüğü belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: MDMV, Mısır, RT-PCR, Termoterapi

Determination of *Maize Dwarf Mosaic Virus* (MDMV) in Seeds of Some Maize Breeding Lines and Virus Elimination by Thermotherapy Treatments

Abstract

This study was carried out in inbred line maize trial fields of Sakarya Agricultural Research Institute in 2008 and 2009 years. Eighteen leaf samples of 10 inbredmaize lines were collected for detection of *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV). It was detected in 5 out of 10 inbredmaize lines by DAS-ELISA. These results were confirmed by RT-PCR. Seeds of infected 5 inbred maize lines belong to 2006, 2007 and 2008 years were tested by DAS-ELISA for determination of infection source. According to the results of seeds showed that only one inbredmaize lines was found to be infected with MDMV. Seeds of infected inbredmaize line were dissected to their parts (endosperm and embryo) and was detected MDMV in the embryos by DAS-ELISA. Infected seeds were treated to dry heat treatments for elimination of virus at 40°C, 50°C and 65°C temperatures for 48 hours. The titer of MDMV decreased significantly, especially at 50 °C and 65 °C, but virus was not completely eliminated.

Key words: MDMV, maize, RT-PCR,thermotherapy

Giriş

Mısır (*Zea mays* L.) içerdiği önemli besin maddeleri nedeniyle değerli bir besin kaynağıdır. Dünyanın birçok ülkesinde dane ürünü, yeşil yem ve endüstri hammaddesi olarak üretilmektedir. Ülkemizde 2005 yılında 800 000 ha mısır ekimi yapılmış ve yaklaşık 4 000 000 ton mısır hasat edilmiştir (Anonim 2005). Mısır bitkisinde çevre şartlarına bağlı olarak, kök, sap, yaprak ve koçanda farklı

yoğunluklarda fungus, bakteri ve virüslerden kaynaklanan hastalıklar meydana gelmektedir (Bawden 1964). Mısırdaki bugüne kadar 40' tan fazla virüs hastalığı saptanmıştır. Bu virüs hastalıkları arasında önemli ürün kayıplarına sebep olan potyvirus grubuna ait; *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Johnson grass mosaic virus* (JGMV) gibi virüs hastalıkları bulunmaktadır (Seifers et al. 2000). Bu virüslerin içerisinde MDMV enfeksiyonu ilk olarak ABD' de William

and Alexander (1965) tarafından tanımlanmıştır. Bu virüs yaklaşık 250 Graminae türünde enfeksiyon yapmaktadır. Bunun yanında MDMV mısırdaki en şiddetli hastalıklara sebep olan etmenlerden biridir. MDMV hastalığı mısırlarda %45'e kadar ürün kaybına sebep olabilmektedir. MDMV tohumla (%0.5'e kadar), mekanik olarak ve büyük oranda afitler ile taşınmakta, çok yıllık çayırlarda ve mısır tohumlarında canlılığını devam ettirebilmekte aynı zamanda bu materyaller MDMV'ünün yayılması için uygun inokulum kaynağı olarak görülmektedir (Tsai and Brown 1989).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda Marmara ve Akdeniz bölgelerinde varlığı tespit edilmiş (Baloğlu et al., 1991; İbbağı et al., 2006) olan MDMV, ülkemiz mısır alanlarında en yaygın görülen virüs hastalıklarından bir tanesidir.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Bitkisel materyal olarak Sakarya Tarımsal Araştırma Enstitüsü' nün ıslah çalışma alanlarında 10 farklı hattın 2008 yılında toplanarak laboratuvara getirilen 18 yaprak örneği kullanılmıştır. Ayrıca yaprak örneklerinin alındığı hatların 2006, 2007 ve 2008 yıllarına ait aynı enstitüden temin edilen tohum örnekleri kullanılmıştır.

Sakarya Tarımsal Araştırma Enstitüsü ıslah çalışma alanlarından 10 hatta ait 18 adet yaprak örneği toplanmıştır. Çalışmada özellikle virüs symptomuna benzer symptomlar gösteren bitkilerden örnekler alınmıştır. Pozitif sonuç veren 11 örneğin 2006, 2007 ve 2008 yıllarına ait tohumları aynı enstitüden temin edilmiştir.

Ayrıca yaprak ve tohum örneklerinin testlendiği MDMV' ne ait DAS-ELISA kitleri, RT-PCR çalışmalarında kullanılan primerler ve testlemede kullanılan bazı sarf malzemeleri kimyasal materyali oluşturmuştur.

DAS-ELISA Testleri

Alınan örnekler MDMV' ne karşı DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiştir. Pozitif sonuç veren 11 örneğin 2006, 2007 ve 2008 yıllarına ait tohumları da aynı metot ile test edilmiştir. Ayrıca enfekteli tohumların embriyo ve endospermeleri de ayrı ayrı DAS-ELISA ile test edilmiştir (Clark and Adams 1977). DAS-ELISA test çalışmalarında Agdia firmasından temin edilen MDMV'e spesifik antiserumlar kullanılmıştır.

RT-PCR Çalışmaları

Total RNA ekstraksiyonu 100 mg bitki dokusu kullanılarak Foissac et al. (2001) e göre yapılmıştır. Elde edilen RNA' lar MDMV' e spesifik forward 5'-3' CAACCAGGGCYGAATTTGATAG ve reverse 5'-3' GTGCAAGGCTRAAGTCGGTTA primerler kullanılarak tek aşamalı olarak RT-PCR ile amplifiye edilmiştir. Kullanılan spesifik primerlerden beklenen bant büyüklüğü 336 bp dir. PCR reaksiyon karışımı 2.5 µl 10x reaksiyon buffer (fermentas), 1 mM dNTP, 3 mM MgCl₂, 2.5 U reverse transcriptaz enzim, 2.5 U TaqDNA polimerase enzim, her bir primerden 20 pmol ve 1' er µl olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR program 37 °C' de 50 dk, 94 °C' de 5 dk, 94 °C' de 45 s – 57 °C' de 1 dk – 72 °C' de 1 dk 35 döngü ve 72 °C' de 10 dk olarak optimize edilmiştir. PCR ürünleri %1,5 lik agaroz jelde yürütüldükten sonra etidium bromide ile boyanarak UV ışık da görüntülenmiştir (Anonim 2013).

Termoterapi Çalışmaları

MDMV ile enfekteli bulunan A hattına ait 200 adet tohum 50' şerli dört gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan birisine ısı uygulanmayarak kontrol olarak değerlendirilmiştir. Diğer gruplar 40, 50 ve 65 °C' ler de 48 saat bekletilmiştir. Sonra bu tohumlar 5' er petriye 10' ar tohum olacak şekilde ekilmiştir. Ekim yapılan tohumlar petrilere 1 hafta oda sıcaklığında inkübasyona alınmıştır. Bir hafta sonra kontrol ve termoterapi uygulanmış olan tohumların çimlenme oranları değerlendirilmiştir. Aynı zamanda farklı sıcaklıklarda termoterapi uygulanan bu tohumlar çimlendikten sonra, DAS-ELISA yöntemi ile MDMV' ne karşı testlenmiştir. Testleme sonuçlarında elde edilen DAS-ELISA virüs konsantrasyon değerleri karşılaştırılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

MDMV Enfeksiyon Durumu

2008 yılında Sakarya Tarımsal Araştırma Enstitüsü' nün ıslah çalışma alanlarından toplanarak laboratuvara getirilerek MDMV' ne karşı DAS-ELISA yöntemi ile testlenen 10 ıslah hattına ait 18 yaprak örneğinden 11 örnek MDMV ile enfekteli bulunmuştur. Bu enfekteli örneklerin A, B, C, D ve E hatlarına ait olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca enfekteli

yaprak örneklerinden rastgele seçilen 5 tanesinde MDMV enfeksiyonu, spesifik primerler kullanılarak RT-PCR testi ile de teyit edilmiştir. RT-PCR çalışmalarında beklendiği gibi 336 bp de bantlar elde edilmiştir (Şekil 1). Geriye kalan 5 hatta ait yaprak örneklerinde MDMV enfeksiyonu tespit edilmemiştir. Bu durum bu hatların MDMV' ne karşı dayanıklı olabileceğini veya bitki bünyesinde virüs konsantrasyonu düşük olduğundan DAS-ELISA ile tespit edilemediğini düşündürmektedir. Enfekteli bulunan hatların 2006, 2007 ve 2008 yıllarına ait tohumları da aynı virüse karşı testlenmiştir. Bu hatlardan sadece A hattına ait 2006, 2007 ve 2008 tohumları MDMV ile enfekteli bulunmuştur. Yapılan DAS-ELISA testinde negatif kontrolden 0.150, A hattının 2006, 2007 ve 2008 yılına ait tohumlardan ise sırasıyla

0.470, 0.890 ve 0.475 virüs konsantrasyon değerleri elde edilmiştir. Özellikle A hattına ait her üç yıla ait tohumların yüksek konsantrasyonda pozitif sonuç vermesi, MDMV' nün literatürlerde belirtildiği gibi tohumla taşındığını göstermektedir (Boothroyd 1977). A hattının dışındaki hatlarda yeşil aksam örnekleri enfekteli bulunmasına rağmen tohumlarında virüs enfeksiyonu tespit edilememiştir. Bu sonuç çalışılan mısır alanında enfeksiyon kaynaklarından bir tanesinin A hattına ait tohumlar olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu sonuçlara göre tohumlarında enfeksiyon tespit edilemeyen hatlara vejetasyon döneminde virüsün afitler tarafından bulaştırıldığı anlaşılmaktadır (Zitter 1984; Patakyet et al. 1990).



Şekil 1. RT-PCR ürünlerinin jel görüntüsü M, marker; 1, A hattına ait izolat; 2, B hattına ait izolat; 3, E hattına ait izolat; 4, D hattına ait izolat; 5, I hattına ait izolat

Figure 1. Gel electrophoresis of RT-PCR products of Maize dwarf mosaic virus (MDMV) with specific primers. Lane M, marker; lane 1, isolate of maize line A, lane 2, isolate of maize line B; lane 3, isolate of maize line E; lane 4, isolate of maize line D; lane 5, isolate of maize line I

Embriyo ve Endosperm Testlemeleri

Enfekteli bulunan bu tohumların embriyo ve endospermeleri birbirinden ayrılarak ayrı ayrı DAS-ELISA test yöntemi ile testlenmiştir. Testleme sonucunda sadece embriyo örneği pozitif sonuç vermiştir. DAS-ELISA sonucunda negatif kontrolden 0.100, endosperm örneğinden 0.150 ve embriyo örneğinden 0.350 virüs konsantrasyon değerleri elde edilmiştir. Bu sonuç MDMV' nün mısır tohumunun embriyosunda taşındığını düşündürmektedir. 2007 yılında mısırlarda yapılmış bir çalışmada *Sugarcane mosaic*

virüs (SCMV)' ün mısır tohumlarının embriyosunda bulunduğu tespit edilmiştir. MDMV' nün, SCMV virüsü ile serolojik olarak akraba olduğu düşünüldüğünde, bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızın sonuçlarını teyit etmektedir (Li et al. 2007).

Termoterapi Çalışmaları

A hattına ait tohumlara farklı sıcaklıklarda uygulanan termoterapi sonucunda yapılan DAS-ELISA testinde sırasıyla kontrol olarak kullanılanlarda 0.306, 40°C ısı uygulamasında 0.270, 50°C ısı uygulamasında 0.251 ve 65°C

ısı uygulamasında ise 0.251 virüs konsantrasyon değerleri elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre 50 ve 65 °C ısı uygulamalarında kademeli olarak kontrol ve 35 °C ısı uygulamalarına göre tohumdaki virüs konsantrasyonunun düştüğü görülmüştür. Ancak 50 ve 65 °C ısı uygulamalarının kendi aralarında tohumdaki virüs konsantrasyonunda herhangi bir değişiklik olmamıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Termoterapi çalışmalarının DAS-ELISA test sonuçları

Table 1. DAS-ELISA results of thermotherapy applies

Uygulamalar	MDMV Negatif (-) Kontrol	MDMV Pozitif (+) Kontrol	Ortalama Değerler
Kontrol	0.108	0.310	0.306
40°C	0.108	0.310	0.270
50°C	0.108	0.310	0.251
65°C	0.108	0.310	0.251

Bu sonuçlar farklı sıcaklıklarda uygulanan termoterapinin tohumlarda virüs konsantrasyonunu düşürdüğünü göstermektedir. 2007 yılında domateslerde yapılan bir çalışmada da araştırmacılar 75 °C'lik ısı uygulamasının domates tohumlarında ToMV'yi eradike ettiğini tespit etmişlerdir (Rastand Stijger 2007). Petrilere ekilen tohumların çimlenme oranlarının değerlendirilmesi kontrol petrilere ile karşılaştırmalı olarak, petrilere ekilen tohumların sayılması suretiyle yapılmıştır. Bu değerlendirmede tohumların farklı sıcaklıklarda termoterapiye tabi tutulmaları sonucu farklı ısı uygulamalarının petrilere ekilen tohum çimlenme oranını etkilemediği tespit edilmiştir. Ancak yapılan değerlendirmede termoterapi uygulanan petrilere ekilen tohumların çimlenmesine bağlı olarak tohumlarda çimlenme gücünün zayıf olduğu görülmüştür.

Sonuç

Sonuç olarak bu çalışmada Sakarya ilinde MDMV'ün varlığı tespit edilmiştir. MDMV enfeksiyonu serolojik ve moleküler yöntemlerle teyit edilmiştir. Yaprak örnekleri enfekteli bulunan hatların geçmiş üç yıla ait tohumları da MDMV'ye karşı test edilmesi sonucunda A hattına ait stoklardaki tohumların MDMV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. A hattına ait ardışık üç yıla ait

tohumların MDMV ile enfekteli bulunması MDMV'ün enfeksiyon kaynağının enfekteli tohumlar olduğu kanatını uyarmıştır. Ayrıca MDMV'nün tohumun neresinde bulunduğunu belirlemek için embriyo ve endosperm testlemeleri yapılmıştır. En önemlisi enfekteli tohumlarda virüsün eradikasyonu için farklı sıcaklık uygulamaları ile termoterapi çalışmaları yürütülmüştür. Uygulanan termoterapi sonucunda MDMV konsantrasyonunda önemli düşüş tespit edilmiştir.

Kaynaklar

- Anonim, 2004. <http://www.planthealthaustralia.com.au/wp-content/uploads/2013/03/Maize-dwarf-mosaic-virus-DP-2004.pdf> (Erişim tarihi: 20.11.2013)
- Anonim 2005. Tarımsal Yapı Üretim, Fiyat, Değer 2003, TC Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü Matbaası, ANKARA. Yayın No: 2949,
- Baloglu S., Aktura T. and Yılmaz, M.A. 1991. Identification of mechanically transmissible viruses in maize growing fields in the Çukurova region of Turkey. Page 329-332 in Proceedings of the 6th Congress of the Phytopathological Society. İzmir, Turkey, 7-11 October.
- Bawden, F.C., 1964. Plant viruses and virus diseases. The Ronald Pres Co., New York, 361p.
- Boothroyd, C.W.1977. Seed transmission of *Maize dwarf mosaic virus* in sweet corn and yield reduction in plants from an infected seed lot (Abstract) Proc. Am. Phytopathol. Soc. 4: 184.
- Clark M.F., and Adams A.N.. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475-483.
- Foissac X, Svanella-Dumas L, Dulucq M.J. Candresse T, Gentit P and Clark M.F. 2001. Polyvalent detection of fruit treetricho, capillo and fove aviruses by nested RT-PCR using degenerate dandinosine containing primers (PDO RT-PCR). ActaHorticulturae 550:37-43.
- İlbağ H., Rabenstein F., Habekuss A., Ordon F., and Çitir A. 2006. Incidence of virus diseases in maize fields in the Trakya region of Turkey. Phytoprotection 87:115-122.
- Li L., WangX.and Zhou G., 2007. Analyses of maize embryo invasion by *Sugarcane mosaic virus*. Plant Science Volume 172, Issue 1, Pages: 131-138.

- Pataky J.K., Murpy J. F., and D'Arcy C.J., 1990. Resistance to *Maize dwarf mosaic virus*, severity of symptoms, titer of virus and yield of sweet corn. *Plant. Dis.* 74: 359-364.
- Rast A.Th.B., Stijger C.C.M.M., 2007. Disinfection of pepper seed infected with different strains of capsicum mosaic virus by trisodium phosphate and dry heat treatment. *Plant Pathology*. Volume 36 Issue 4, Pages: 583 - 588
- Rosenkranz E. and Scott G.E., 1984. Determination of the number of genes for resistance to *Maize dwarf mosaic virus* strain A in five corn inbred lines. *Phytopathology* 74:71-76.
- Seifers, D.L., Salomon, R., Marie-Jeanne, V., Alliot, B., Signoret, P., Haber, S., Loboda, A., Ens, W., She, Y.M., Standing, K.G. (2000): Characterization of a novel poty virus isolated from maize in Israel. *Phytopathology*, 90: 505-513.
- Tsai J.H, and Brown L.G, 1989. *Maize dwarf mosaic virus*. *Plant Pathology Circular* No.320.
- Zitter T.A., 1984. Virus diseases of sweet corn. Dept. of Plant Pathology Cornell University. Fact sheet Page, 727.
- Williams L.E and Alexander L.J. 1965. Maize dwarf mosaic, a new corn disease. *Phytopathology* 55:802-804.