



Samsun ilinde mısır (*Zea mays* L.) üretim alanlarında enfeksiyon oluşturan virüslerin belirlenmesi

Yusuf Toksöz, Nazlı Dide Kutluk Yılmaz*

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

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: nazlik@omu.edu.tr

Geliş/Received 27/01/2016

Kabul/Accepted 07/06/2016

ÖZET

Samsun ilinde 184 farklı mısır tarlasında 2009-2010 yıllarında survey çalışmaları gerçekleştirilmiştir. I. üretim alanlarından toplanan 290 yaprak örneğinin, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi ile test edilmesi sonucunda, %4.8'inin Maize dwarf mosaic virus (MDMV) ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Bu örneklerde Sugarcane mosaic virus (SCMV) ve Sorghum mosaic virus (SrMV)'e rastlanılmamıştır. Farklı bölge ve semptomları yansıtacak şekilde 290 örnek içerisinde seçilen 130 örneğin ELISA ile testi sonucunda ise, %7.7'sinin Maize mosaic virus (MMV) ve %3.1'inin Barley yellow dwarf virus (BYDV)-PAV ırkı ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Ancak, testlenen 130 örnekte BYDV-MAV ırkına ve Maize stripe virus (MSpV)'e rastlanmamıştır. Silajlık olarak yetiştirilen II. üretim mısır alanlarında ise toplam 111 adet yaprak örneği ELISA yöntemi ile test edilmiş olup, bu örneklerin %55'inin MMV, %0.9'unun BYDV-PAV ve %0.9'unun MDMV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Sadece 1 örnekte MDMV+MMV ikili virüs enfeksiyonu (%0.9) tespit edilmiştir. Bu mısır alanlarında SCMV, SrMV, MSpV ve BYDV-MAV ile enfekteli örnek tespit edilmemiştir. Ayrıca, bölgede MDMV'nin varlığı, reverse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile de teyit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler:

BYDV-PAV
ELISA
MDMV
Mısır
MMV
RT-PCR

Determination of viruses causing infection in corn (*Zea mays* L.) fields in Samsun province

ABSTRACT

Survey studies were carried out in 184 corn fields in Samsun province in 2009-2010. A total of 290 leaf samples collected from the first-crop corn planted areas were tested by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method, and 4.8% of these samples were found to be infected with for Maize dwarf mosaic virus (MDMV). Sugarcane mosaic virus (SCMV) and Sorghum mosaic virus (SrMV) were not detected in these samples. A hundred-thirty samples out of 290 were selected according to different symptom appearance and various locations where surveys were performed. Result of serological tests showed that 7.7% and 3.1% of these samples were infected with MMV (Maize mosaic virus) and BYDV-PAV (Barley yellow dwarf virus), respectively. However, BYDV-MAV and Maize stripe virus (MSpV) were not determined in these samples. A total of 111 leaf samples collected from the second-crop corn planted for silage production were tested by ELISA, and 55%, 0.9% and 0.9% were found to be infected with MMV, BYDV-PAV and MDMV, respectively. In only one sample, double infections of MDMV and MMV were determined (0.9%). None of the samples collected from the second-crop corn fields in Samsun were infected with SCMV, SrMV, MSpV and BYDV-MAV. Additionally, MDMV infection was confirmed by using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in the region.

Keywords:
BYDV-PAV
ELISA
MDMV
Maize
MMV
RT-PCR

© OMU ANAJAS 2016

1. Giriş

Mısır (*Zea mays* L.) doğrudan insan tüketiminde, hayvan beslenmesinde, sanayinin değişik alanlarında hammadde olarak ve tohumluk endüstrisinde kullanılan bir kültür bitkisidir. Hemen hemen tüm bölgelerimizde mısır yetiştirilmesine rağmen, ekonomik anlamda başta

Akdeniz Bölgesi olmak üzere, Karadeniz ve Marmara Bölgeleri'nde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Karadeniz Bölgesi'nin ülkemiz mısır ekim alanları içerisindeki payı %33.3'tür. Samsun ili ise toplam 414.669 da ekiliş alanı ve 534.635 ton üretimi ile Karadeniz Bölgesi'ndeki payı yaklaşık %26'dır (TUİK, 2009). Samsun ilinde ise özellikle Çarşamba ve Terme

ilçelerinde mısır ekim alanları yoğunluk kazanmıştır. Ayrıca, kıyıya yakın alçak düzlükler ile ilin genelinde mısır yetiştiriciliği yapılmaktadır. Öte yandan, bölgede Bafra ve Ondokuzmayıs ilçelerinde ikinci ürün olarak silajlık amacıyla yetiştirilmektedir.

Mısır üretiminde verimi olumsuz etkileyen sebepler arasında virüs hastalıkları büyük önem taşımaktadır. Ulusumuzun tahıl üretimine dayalı beslenme alışkanlığı ve bölgede geniş çiftçi kitlesinin yıllık gelirinin büyük oranda bu ürüne bağlı olması, bu bitkinin veriminin artırılmasını daha da zorunlu hale getirmektedir. Mısrda bugüne kadar enfeksiyon oluşturan 40'dan fazla virüs hastalığı saptanmıştır (Shurtleff, 1980). Bu virüs hastalıkları arasında önemli ürün kayıplarına sebep olan Maize dwarf mosaic virus (Mısır cüce mozayik virüsü, MDMV; Baloğlu ve ark., 1991), Maize mosaic virus (Mısır mozayik virüsü, MMV), Maize stripe virus (Mısır çizgi virüsü, MSpV), Barley yellow dwarf virus (Arpa sarı cücelik virüsü, BYDV) (Fidan ve Yılmaz, 2004), Sugarcane mosaic virus (Şeker kamışı mozayik virüsü, SCMV) ve Johnson grass mosaic virus (Kanyaş mozayik virüsü, JGMV) (İlbağı ve ark., 2006)'ün varlığı ülkemiz mısır üretim alanlarında tespit edilmiştir. Bu virüslerden; MDMV, SCMV, SrMV ve JGMV Potyviridae familyasının Potyvirus cinsi içerisinde yer almakta (Mohammedi ve Hajjehgari, 2009; Petrik ve ark., 2010; Wang ve ark., 2010) ve afit vektörlerle non-persistent olarak taşınmaktadır (Teakle ve Grylls, 1973; Koike ve Gillaspie, 1976; Ford ve ark., 2004). Luteoviridae familyasının Luteovirus cinsinin üyeleri olan BYDV-MAV ve -PAV ırkları ise afit vektörler ile persistent olarak doğada etkili bir şekilde enfekteli bitkiden sağlıklı bitkilere nakledilmektedir (Waterhouse ve ark., 1988; Mayo ve D'Arcy, 1999). MMV (Rhabdoviridae familyası, Nucleorhabdovirus cinsi) ve MSpV (Tenuivirus cinsi)'ün taşınması ise bir bitki piresi türü olan *Peregrinus maidis* (Ashmead) vasıtası ile olmaktadır (Tsai, 2008). Günümüzde virüs hastalıkları ile savaşta kimyasal mücadele etkili bir kontrol sağlayamamakta, en etkili ve pratik yöntem dayanıklı çeşitlerin yetiştiriciliği ile olmaktadır. Bu da hastalıkların belirlenmesi ve epidemiyolojilerinin iyi bilinmesi esasına dayanmaktadır.

Ülkemizde mısır virüs hastalıkları ve bu hastalıkların mısrda yapmış olduğu kayıplar üzerine sınırlı sayıda araştırma olmakla birlikte (Baloğlu ve ark., 1991; Fidan ve Yılmaz, 2004; İlbağı ve ark., 2006; Değirmenci ve ark., 2013; İlbağı ve Geyik, 2014); bugüne kadar Samsun ilinde mısrda enfeksiyon oluşturan virüs türleri konusunda bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada Samsun ili dane ve silajlık mısır üretim alanlarında, üretimi tehdit eden virüs türlerinin saptanması hedeflenmiştir.

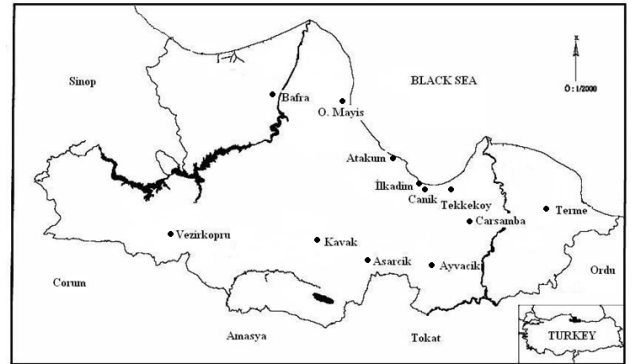
2. Materyal ve Yöntem

2.1. Sürvey çalışmaları

Samsun ilinde mısır, hem I. ve hem de II. ürün

olarak yetiştirilmektedir. Bu sebeple, sürvey çalışmaları iki farklı zamanda gerçekleştirilmiştir. II. üretim için sürveyler, toplam üretimin %90.9'unun yapıldığı Bafra ve Ondokuzmayıs ilçelerine ait köylerde, 2009 yılı Ağustos ayında; I. üretimde ise Samsun ili mısır üretimin alanlarının %90.4'ünü kapsayan Çarşamba, Merkez, Terme, Bafra, Ayvacık, Tekkeköy, Kavak, Asarcık ve Vezirköprü ilçelerine ait köylerde, 2010 yılı Haziran-Temmuz aylarında yapılmıştır (Çizelge 1). Her ilçede mısır yetiştiriciliği bakımından öneme sahip olan köyler; Gıda, Tarım ve Hayvancılık İlçe Müdürlükleri yardımı ile belirlenmiştir. Daha sonra her köyden en az 1 alan şansa bağlı olarak sürvey kapsamına alınmıştır. Örnekleme yapılan ilçeler Şekil 1'de gösterilmiştir.

Sürveylerde her alanda tarlanın tümünü temsil edecek şekilde ortalama her 2 metrede bir bitkilerde cüceleşme, yapraklarda mozaiik, şerit şeklinde çizgilenme, kızarma, leke ve buruşma gibi virüs benzeri simptom gösteren bitkilerin üst yapraklarından 3-4 adedi alınmıştır (Nault ve ark., 1979). Daha sonra toplanan bu örnekler etiketlenip polietilen torbalara konularak laboratuara getirilmiş, laboratuarda belirtilerine göre gruplandırıp, her bir gruba ait örnek sayıları kayıt edildikten sonra, tekrar etiketlenip, çalışmalara kadar -20°C'deki derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.



Şekil 1. Samsun ili I. ve II. mısır üretim alanlarında sürveyler sırasında örnekleme yapılan ilçeler

2.2. Serolojik çalışmalar

Serolojik testlemelerde MMV, MSpV, BYDV-PAV, BYDV-MAV (Adgen, İskoçya), MDMV, SCMV (Bioroba, İsviçre) ve SrMV (DZMS, Almanya)'e spesifik poliklonal antiserumlar kullanılmıştır. 2009 yılında II. mısır üretim alanlarından virüs benzeri simptom gösteren 111 adet; 2010 yılında ise I. üretimin yapıldığı toplam 12 ilçeden 290 adet mısır yaprak örneği toplanmıştır. II. üretim alanlarında, ekim yapılan ilçe sayısı 2 ile sınırlı olduğundan (Bafra ve Ondokuzmayıs), ilçelerin ekim alanları dikkate alınmaksızın, araziden alınan her bir simptom grubuna ait (mozayik, şerit, kızarma, şerit+mozayik, kloroz vb.) bitki örnekleri, tüm virüsler (7 adet) için ELISA ile test edilmiştir. Böylelikle, bölgede dominant olan virüslerin hangi simptom gruplarında yoğunlaştığı konusunda fikir

sahibi olunmak istenmiştir. Ancak, I. ürün mısır üretim alanlarından elde edilen örneklerde, tüm örneklerin ELISA ile testlenebilmesi için, her bir virüse ait yeterli miktarda antiserum mevcut olmadığından (MMV, MSpV, BYDV-PAV ve MAV ırkları için), bu virüsler için testlenecek örnek sayısında bir miktar sınırlandırma

yoluna gidilmiştir. Bu amaçla, öncelikle toplanan yaprak örnekleri semptomlarına göre alt gruplara ayrılmış; sürvey yapılan ilçelerin ekim alanı miktarları da dikkate alınarak, bu gruplardan şansa bağlı olarak seçim yapılmış ve testlenecek örnek sayıları belirlenmiştir (Çizelge 1).

Çizelge 1. Samsun ili mısır üretim alanlarında örnek alınan ilçeler, bu ilçelerin toplam mısır üretim alanları ile test edilen örnek sayıları (Samsun Gıda, Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü, 2007 Yılı Verileri)

İlçe adı	I. Ürün		II. Ürün	
	Ekim alanı (da)	Testlenen örnek sayısı	Ekim alanı (da)	Testlenen örnek sayısı
Merkez (İlkadım, Canik, Atakum)	30.000	10* (4)**	-	-
Asarcık	12.000	13 (3)	-	-
Ayvacık	30.000	30 (15)	-	-
Bafra	20.000	22 (8)	20.000	55
Çarşamba	62.000	60 (26)	-	-
Kavak	30.000	30 (15)	-	-
Ondokuzmayıs	-	-	10.000	56
Tekkeköy	30.000	30 (15)	-	-
Terme	63.000	63 (32)	-	-
Vezirköprü	10.000	12 (3)	-	-
Toplam	287.000	290	30.000	111

*MDMV, SCMV ve SrMV için ELISA ile testlenen örnek sayıları,

**Parantez içerisinde verilen sayısal değerler MMV, MSpV, BYDV-PAV ve MAV ırkları için ELISA ile testlenen örnek sayılarını ifade etmektedir

2.2.1. DAS-ELISA

MMV, MSpV, MDMV ve SCMV için DAS-ELISA yöntemi Clark ve Adams (1977) ve antiserumların temin edildiği firmanın önerileri izlenerek uygulanmıştır. Bitki yaprak örnekleri ekstraksiyon tampon çözeltisinde ezildikten sonra (1g bitki örneği: 9 ml örnek tampon çözeltisi), önceden kaplama tampon çözeltisinde MMV ve MSpV için 1/200, SCMV ve MDMV için ise 1/1000 oranında sulandırılarak hazırlanan antiserum ile kaplanmış ELISA mikroplyetlerine 100 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Bir gece 4°C'de buzdolabında bekletilen mikroplyetler, yıkama tampon çözeltisi ile 5 defa yıkandıktan sonra, konjugat tampon çözeltisinde MMV ve MSpV için 1/200, SCMV ve MDMV için ise 1/1000 oranında sulandırılan konjugat'tan 100 µl mikroplyetin her bir çukuruna ilave edilmiştir. Konjugat inkübasyonu MDMV, SCMV için 30°C'de 5 saat ve MMV, MSpV için oda sıcaklığında (25°C) 2 saat olarak yapılmıştır.

2.2.2. TAS-ELISA

SrMV için TAS-ELISA yöntemi, antiserumun temin edildiği firmanın önerileri göz önüne alınarak uygulanmıştır. ELISA mikroplyetleri kaplama tampon çözeltisi ile 1:1000 oranında sulandırılarak hazırlanan antiserum ile kaplanmış ve bu kaplama işleminden 2 saat sonra mikroplyet 3 defa üçer dakika aralıklarla yıkama tampon çözeltisi ile yıkayıp protein bloklaya

işlemi yapılarak (10 ml yıkama + 0.2 g süt tozu) 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bitki yaprak örnekleri ekstraksiyon tampon çözeltisinde homojenize edildikten sonra, bloklanan ELISA mikroplyetlerine 100 µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Bir gece +4°C'de buzdolabında bekletilmiş olan mikroplyetler, yıkama tampon çözeltisi ile 3 defa yıkandıktan sonra, konjugat tampon çözeltisinde 1:1000 oranında sulandırılan Mab'tan 100 µl mikroplyetin her bir çukuruna ilave edilmiştir. İki saat 37°C'de inkübasyondan sonra yıkama işlemi yapılan kuyulara 1/1000 oranında sulandırılan rat-anti-mouse (RAM)-AP konjugattan, 100 µl her bir çukura ilave edilerek tekrar 37°C'de 2 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

2.2.3. COMPOUND-ELISA

BYDV'nin -PAV ve -MAV ırkları için uygulanan Compound ELISA yöntemi antiserumların temin edildiği firmanın önerileri izlenerek gerçekleştirilmiştir. Bu prosedüre göre; 1:200 oranında kaplama tampon çözeltisi ile sulandırılan antiserum (BYDV-PAV, BYDV-MAV) ile ELISA mikroplyetleri kaplanmış ve oda sıcaklığında 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre dolduğunda, mikroplyetler yıkama tamponu ile 5 defa yıkanarak, bitki örnekleri GEB tampon çözeltisinde ezildikten sonra, her bir kuyuya 100 µl ilave edilmiştir. Bir gece +4°C'de buzdolabında bekletilen mikroplyetler, yıkama işlemi takiben, A (antibody belirleme) ve B (alkalin fosfataz enzim konjugat)

solüsyonları konjugat tampon çözeltisinde (ECI buffer) 1:200 oranında sulandırılmıştır. Daha sonra, mikropleytin her bir çukuruna 100 µl ilave edilerek, oda sıcaklığında 2 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

DAS-, TAS- ve Compound-ELISA'da, bu basamaklardan sonra, yapılan işlemler benzer şekilde devam etmiştir. Mikropleytlerin çukurları yıkama tampon çözeltisi ile yıkandıktan sonra, substrat tampon çözeltisi içerisinde 1 mg/ml olacak şekilde hazırlanan substrattan (p-nitrofenil fosfat, Sigma) mikropleytlerin çukurlarına 100'er µl ilave edilmiş ve bu mikropleytler oda sıcaklığında 30-120 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar; ELISA mikropleyt okuyucusunda (Tecan Spectra II) 405 nm dalga boyunda absorbans değerlerinin alınmasıyla elde edilmiştir. Her iki virüs için negatif kontrollerin absorbans değerlerinden 2 katı ve daha fazla değer veren örnekler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Geering ve ark., 2004).

2.3. RNA ekstraksiyonu ve RT-PCR (Reverse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu)

MDMV ile enfekteli (2 örnek) ve sağlıklı mısır bitkilerinin yapraklarından toplam RNA'lar RNeasy RNA Ekstraksiyon kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak, kit protokolüne göre ekstrakte edilmiştir. Elde edilen RNA'lar MDMV'ün kılıf protein (CP) genine spesifik primerler (MDMV-F:CAACCAGGGCYGAATTTGATAG ve MDMV-R: GTGCAAGGCTRAAGTCGGTTA) (Geering ve ark., 2004) kullanılarak, tek basamaklı RT-PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Kullanılan spesifik primerlerden beklenen bant büyüklüğü 336 bp'dir. RT-PCR reaksiyon karışımı; 2 µl RNA, 5 µl 5X Qiagen One Step RT-PCR buffer, her bir primerden 0.25 µl (0.6 µM), 1 µl dNTPs mix (400 µM), 1 µl Qiagen One Step RT-PCR Enzyme mix ve 15.5 µl RNase enzimi içermeyen su ilave edilerek toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır. Amplifikasyonlar Bio-Rad MJ Mini PCR Thermocycler'da, 50°C'de 30 dk, 95°C'de 15 dk, 35 döngü olacak şekilde 94°C'de 30 s, 50°C'de 30 s ve 72°C'de 1 dk ve 1 döngü 72°C'de 5 dk ile tamamlanmıştır.

RT-PCR sonrası oluşan DNA fragmentlerinin görüntülenmesi için % 1'lik Agaroz jel kullanılmıştır. 0.7 g Agaroz (Merck, Almanya) 70 ml 1x TBE tampon çözeltisi (Tris base, Borik asit, EDTA) içerisinde karıştırılarak, mikrodalga fırında eritilmiştir. Karışım 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra boya olarak Ethidium Bromür (0.5 µl/ml) ilave edilmiş ve yatay tipteki jel elektroforez cihazının (Wide-mini Gel, Biorad, USA) jel hazırlama tabağına dökülmüştür. Jel tamamen katılaşması sağlandıktan sonra, içerisinde 1xTBE tampon çözeltisi bulunan elektroforez cihazının tankına yerleştirilmiştir. PCR tüpleri içerisindeki reaksiyon karışımından 10'ar µl alınarak 2 µl yükleme

tamponu ile karıştırılmış ve jeldeki hücelere yerleştirilmiştir. İlk hüreye DNA Marker 1 kb Ladder (Promega, ABD) konulduktan sonra cihaz 90 V'a ayarlanmış ve 1 saat çalıştırılmıştır. UV transilluminatör (GelDoc 2000, Biorad) üzerinde jelde oluşan DNA bantları görüntülenmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. ELISA yöntemi ile mısırdaki enfeksiyon oluşturan virüslerin saptanması

Samsun ili mısır üretim alanlarında gerçekleştirilen sürveylerde; gerek I. ürün olarak mısır üretiminin yapıldığı ilçeler, gerekse silajlık mısır elde etmek amacı ile II. üretimin yoğunlaştığı bölgelerde, mısır bitkilerinde farklı tipte virüs benzeri semptomlara rastlanılmıştır. Bitkilerde görülen en yaygın semptomlar; cüceleşme, yapraklarda mozayik, şerit şeklinde çizgilenme, morarma, kloroz ve buruşma şeklindedir. Bu farklı semptomlara sahip mısır yaprak örneklerinin laboratuvarında test edilmesi sonucunda, bu semptomların bazılarının hangi virüs ya da virüsler tarafından oluşturulduğu saptanmıştır.

Samsun ili I. ürün mısır üretim alanlarından (Çarşamba, Terme, Bafra, Ayvacık, Tekkeköy, Kavak, Asarcık, Vezirköprü, Canik, Atakum ve İlkadım ilçeleri) toplanan 290 yaprak örneğinin ELISA yöntemi ile test edilmesi sonucunda; örneklerin % 4.8'inin MDMV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Bu örneklerde, SCMV ve SrMV'e rastlanılmamıştır. Örneklerin tümünün testlenebilmesi için yeterli miktarda antiserum mevcut olmadığından, farklı bölge ve semptomları yansıtacak şekilde 290 örnek içerisinde seçilen 130 örneğin ELISA ile testi sonucunda ise, örneklerin %7.7'sinin MMV ve %3.1'inin BYDV'ün PAV ırkı ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Ancak, testlenen 130 örnekte BYDV-MAV ırkına ve MSPV'ye rastlanılmamıştır. Sonuç olarak, dane mısır üretim alanlarında en yaygın virüsün MMV (%7.7) olduğu ve bunu sırası ile; MDMV (%4.8) ve BYDV-PAV (%3.1)'in izlediği saptanmıştır (Çizelge 2). Elde edilen bu sonuçlara göre; Samsun ilinde MMV'ün en yoğun görüldüğü ilçenin %26.7 oran ile Kavak ilçesi olduğu, bu oranı %25 ile Bafra, %16.7 ile Atakum, %7.7 ile Çarşamba ve %6.7 oran ile de Tekkeköy ilçelerinin takip ettiği belirlenmiştir. Bölgede tespit edilen bir diğer virüs olan MDMV ise; %13.3 oran ile en fazla Ayvacık ilçesinde belirlenmiş olup, Çarşamba (%11.7), İlkadım (%10), Atakum (%8.3) ve Bafra (%4.5) ilçelerinde de bu virüs ile enfekteli örnekler tespit edilmiştir. İlde yaygınlık açısından 3. sırada bulunan BYDV-PAV enfeksiyonuna ise, Atakum (%33.3), Çarşamba (% 3.9) ve Terme (%3.1) ilçelerinde rastlanılmıştır (Şekil 1 ve Çizelge 2).

Çizelge 2. Samsun ili I. ürün olarak ekilen mısır üretim alanlarında sürvey yapılan ilçeler, ELISA ile testlenen örnek sayıları ve bu örneklerde belirlenen virüslerin dağılımı

İlçe	Örnek alınan tarla no	Testlenen örnek no*	Test edilen virüsler							
			MDMV	SCMV	SrMV	Testlenen örnek no**	MMV	MSPV	BYDV-PAV	BYDV-MAV
Asarcık	7		0	0	0	3	0	0	0	0
Atakum	20	12	1	0	0	6	1	0	2	0
Ayvacık	11	30	4	0	0	15	0	0	0	0
Bafra	11	22	1	0	0	8	2	0	0	0
Canik	13	8	0	0	0	3	0	0	0	0
Çarşamba	17	60	7	0	0	26	2	0	1	0
İlkadım	14	10	1	0	0	4	0	0	0	0
Kavak	13	30	0	0	0	15	4	0	0	0
Tekkeköy	13	30	0	0	0	15	1	0	0	0
Terme	18	63	0	0	0	32	0	0	1	0
Vezirköprü	6	12	0	0	0	3	0	0	0	0
Toplam	143	290	14	0	0	130	10	0	4	0
% Enf.			4.8	0	0		7.7	0	3.1	0

*MDMV, SCMV ve SrMV için ELISA ile testlenen örnek sayısı

**MMV, MSPV, BYDV-PAV ve -MAV ırkları için ELISA ile testlenen örnek sayısı

II. üretim mısır üretiminin yoğun olduğu Bafra ve Ondokuzmayıs ilçelerine ait, 41 farklı tarladan alınan 111 yaprak örneğinin ELISA ile testlenmesi sonucunda; silajlık mısır üretim alanlarında en yaygın virüsün % 55 oran ile MMV olduğu belirlenmiştir. Buna ilave olarak, MDMV (%0.9) ve BYDV-PAV (%0.9) enfeksiyonları da tespit edilmiştir (Çizelge 3). Bu çalışmada, MMV'ün bulaşıklık oranının Bafra ilçesinde (%80), Ondokuzmayıs ilçesine (%35.7) göre oldukça yüksek

olduğu saptanmıştır. MDMV Bafra ilçesine ait örneklerde (%1.8), BYDV-PAV ise Ondokuzmayıs ilçesi örneklerinde (%0.9) tespit edilmiştir. MDMV+MMV ikili virüs enfeksiyonuna; Bafra ilçesinde tek bir tarlada rastlanılmıştır. Ancak, II. üretim alanlarında SCMV, SrMV, MSPV ve BYDV-MAV ile enfekteli örnek tespit edilmemiştir (Çizelge 3 ve Şekil 1).

Çizelge 3. Samsun ili II. ürün (silajlık) olarak ekilen mısır üretim alanlarında sürvey yapılan ilçeler, testlenen örnek sayıları ve bu örneklerde belirlenen virüslerin dağılımı

İlçe	Örnek alınan tarla no	Testlenen örnek no	Test edilen virüsler							
			MDMV	SCMV	SrMV	MMV	MSPV	BYDV-PAV	BYDV-MAV	MDMV +MMV
Bafra	23	55	1	0	0	41	0	0	0	1
Ondokuzmayıs	18	56	0	0	0	20	0	1	0	0
Toplam	41	111	1	0	0	61	0	1	0	1
% Enf.			0.9	0	0	55	0	0.9	0	0.9

Her iki ürünün genel toplamında, Samsun ilinde MMV (%31.1) en yaygın virüs olarak ortaya çıkmaktadır. Bunu, MDMV (%4) ve BYDV-PAV (%2.1) izlemektedir (Çizelge 2 ve Çizelge 3).

Ülkemizde mısırdaki enfeksiyon oluşturan viral hastalıklar konusunda oldukça sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Türkiye'de mısır üretim alanlarında ilk kayıt edilen virüs; Ege Bölgesi'nde Myzus persicae (Sulz.) [Homoptera: Aphididae] ile taşınan MDMV'tür (Bremer ve Raatikainen, 1975). Daha sonra, Baloğlu ve ark. (1991), bu virüsün Çukurova Bölgesi'nde varlığını ortaya koymuşlardır. Aynı bölgede yürütülen bir diğer araştırmada; Fidan ve Yılmaz (2004), mısır bitkisi, yabancı otlar, afit ve Cicadellidae familyasındaki vektörlere uyguladıkları RT-PCR yöntemi ile MDMV, MMV, MSPV ve BYDV'ün tekli ve ikili

enfeksiyonlarını belirlemişlerdir. Bölgede, MDMV %8.04 bulunma oranı ile ilk sırayı alırken, bunu BYDV (%4.8), MSPV (%1.8) ve MMV (%1.6) izlemiştir. Trakya Bölgesi'nde ise, 2004 yılında gerçekleştirilen sürvey çalışmaları sonucu, mısır üretim alanlarında en yaygın virüs olarak MDMV (%50.7) belirlenmiş, BYDV-PAV ise az sayıda örnekte tespit edilmiştir (%1.4). Aynı bölgede, 2005 yılı sürveyleri sonucunda ise; MDMV incelenen örneklerde %5 oranında saptanmış olup, JGMV (%4), SCMV (%3) ve BYDV-PAV (%2) enfeksiyonlarının da varlığı belirlenmiştir. İki yılın sonuçları toplu olarak değerlendirildiğinde; Trakya Bölgesi üretim alanlarında MDMV (%31.8)'ün en yaygın virüs olduğu dikkat çekmektedir. Bunu BYDV-PAV (%1.65), JGMV (%1.65) ve SCMV (%1.24) izlemektedir (İlbağ ve ark., 2006). Samsun ili

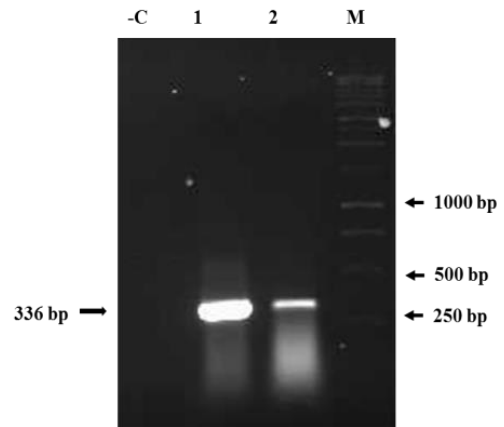
sonuçları, diğer bölgelerde yapılan çalışmalar ile kıyaslandığında; MDMV'nin enfeksiyon oranının Trakya (%31.4) ve Akdeniz (%8.04) Bölgeleri'nden daha düşük olduğu görülmektedir. MMV enfeksiyon oranının (%31.1) ise Türkiye'de bu virüs ile ilgili inceleme yapılan tek bölge olan Çukurova Bölgesi'nden (%1.6) oldukça yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Samsun ilinde mısır üretim alanlarında tespit edilen bir diğer virüs olan BYDV-PAV (%2.1)'in ise Trakya Bölgesi'ne (%1.65) benzer oranda yaygınlık gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, diğer çalışmalarda tespit edilen MSpV, SCMV ve JGMV (Fidan ve Yılmaz, 2004; İbbağı ve ark., 2006) ise Samsun ilinde saptanmamıştır. Öte yandan, Samsun ilinde genellikle mısır ve buğday üretim alanları yan yana bulunmaktadır. Daha önce yürütülen bir çalışmada, Samsun ili buğday üretim alanlarında Wheat spindle streak mosaic virus (WSSMV), MDMV ve BYDV-PAV'a ilaveten, düşük oranda BYDV-MAV enfeksiyonuna da rastlanılmıştır (Erkan ve Kutluk Yılmaz, 2009). Nitekim, İbbağı ve Çıtır (2004), Türkiye genelinde tahıl virüs hastalıkları üzerinde yaptıkları çalışmada BYDV'nin PAV, RMV, SGV, MAV ve RPV olmak üzere beş farklı virüs türünden ileri geldiğini ve bunlar arasında BYDV-PAV'ın dominant olduğunu saptamışlardır. Benzer şekilde, bu çalışma ile Samsun ilinde mısır üretim alanlarında BYDV-MAV belirlenmemesine rağmen, düşük oranda BYDV-PAV'ın varlığı tespit edilmiştir. MDMV 20'den fazla afit türü ile non-persistent olarak taşınmasına rağmen (Ford ve ark., 2004); BYDV-PAV özellikle *Rhopalosiphum padi* L. ve *Sitobion avenae* (F.) (Homoptera: Aphididae) ile persistent olarak taşınmaktadır (Mayo ve D'Arcy, 1999). Araştırmada afit ile taşınma özelliğinde olan MDMV'nin 16, BYDV-PAV'ın ise sadece 5 örnekte tespit edilmesi, bu virüslerin taşınmasında etkili olan uygun vektörlerin bölgede az oranda bulunduğunu düşündürmektedir. Diğer taraftan, bölgede I. ve II. mısır üretim alanlarında en yaygın olarak saptanan MMV ise bir bitki piresi türü olan *P. maidis*'in hem nimf, hem de ergin bireyleri tarafından taşınmakta, ayrıca vektörün bünyesinde de çoğalabilmektedir (Tsai, 2008). Elde edilen bu sonuç, bölgede viruliferous (virüs taşıyan) vektör popülasyonunun yüksek oranda bulunduğunu akla getirmekle birlikte; ayrıca yörede yetiştirilen yerel ve ticari mısır çeşitlerinin de MMV'ye duyarlı olabileceği kanısını uyandırmaktadır. Öte yandan, MMV, II. ürün mısırda I. ürüne kıyasla oldukça yüksek oranda belirlenmiştir. Bunun nedeni; I ürün örneklerinin 2009, II. ürün örneklerinin ise 2010 yılına ait olması ve yıllar arasında iklimsel şartlara bağlı olarak hem vektör popülasyonunda hem de virüs ile enfekteli bitki sayısındaki farklılık olabilir. Ayrıca, I ürün örnekleri Haziran-Temmuz aylarında, II. ürün örnekleri ise Ağustos ayında toplanmıştır. Bölgede vejetasyon dönemi sonuna doğru vektör popülasyonunda önemli bir artış gözlenmektedir. Bu durum, enfekteli bitki oranını da etkileyebilmektedir. Gelecekte vektör türlerin bu bölgedeki varlığı ve hangilerinin yaygın olduğu

konusunda detaylı çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Ayrıca, yetiştiriciliği yapılan mısır çeşitlerinin virüs hastalıklarına karşı reaksiyonlarının belirlenmesi ve üreticilerin dayanıklı ve toleranslı çeşitleri tercih etmelerinin sağlanması, virüsler sebebiyle oluşabilecek kayıpların azaltılmasına yardımcı olacaktır.

Sürveyler ile toplanan virüs benzeri semptom sergileyen örneklerin yaklaşık 400 adetinin ELISA ile testlenmesi sonucunda, sadece 96 tanesi (%23.9) enfekteli olarak bulunmuştur. Yaprak örneklerinin ELISA testi sonucunda negatif olması ve de arazide tespit edilen virüsler ile enfekteli örneklerin sergilediği semptomlardan daha farklı belirtilere de rastlanması; örneklerin diğer mısır virüsleri ile enfekteli olabileceğini veya olumsuz çevre ve toprak faktörleri sebebi ile örneklerin virüs benzeri semptomlara sahip olduğunu düşündürmektedir.

3.2. MDMV'nin RT-PCR testi ile belirlenmesi

ELISA testi ile MDMV ile enfekteli olduğu belirlenen mısır bitkisi yapraklarından RNA ekstraksiyonu yapılmıştır. Daha sonra, MDMV kılıf protein genine spesifik primerler kullanılarak RT-PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Buna göre; her iki örnekte de beklenen moleküler büyüklükte (336 bp) band elde edilmiştir (Şekil 2). Böylelikle, MDMV için elde edilen ELISA sonuçları, RT-PCR yöntemi ile moleküler olarak da teyit edilmiştir. Benzer şekilde, Değirmenci ve ark. (2013)'da Sakarya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne ait bazı mısır hatlarında aynı primerleri kullanarak, gerçekleştirdikleri RT-PCR çalışmaları ile MDMV'nin varlığını 5 örnekte tespit etmişlerdir.



Şekil 2. Maize dwarf mosaic virus (MDMV)'ün kılıf protein (CP) geninin RT-PCR ile belirlenmesi [-C: Negatif kontrol, 1 ve 2: MDMV ile enfekteli mısır yaprak örnekleri, M: 1 kb DNA ladder (Promega)]. Gri ok MDMV'nin CP'ye spesifik 336 bp'lik DNA fragmentini göstermektedir.

3.3. Belirlenen virüslerin semptom gruplarına göre dağılımları

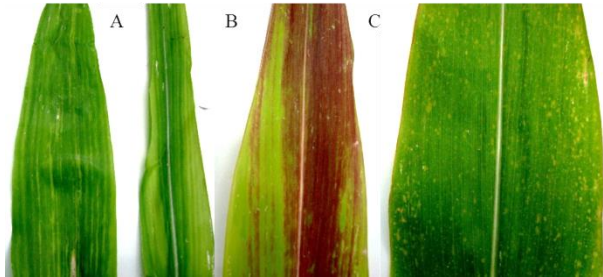
Samsun ili mısır üretim alanlarında yapılan araştırmalarda; gerek I. üretim, gerekse II. üretim alanlarında mısır bitkilerinde farklı tipte virüs benzeri semptomlara rastlanılmıştır. Bu bitkilerde görülen en

yaygın semptomlar; yapraklarda şerit şeklinde çizgiler, kızarma, mozayik, kloroz, buruşma vb. şeklindedir. Araştırmalar sırasında arazide belirlenen bu semptom gruplarına ait örneklerin ELISA ile test edilmesi sonucunda, bu semptomların hangi virüs ya da virüsler tarafından oluşturulduğu saptanmıştır (Çizelge 4).

Çizelge 4. Mısır yapraklarındaki semptom gruplarına göre belirlenen virüslerin dağılımları

Semptom	Belirlenen virüsler				% Enfeksiyon oranı
	MMV	MDMV	BYDV-PAV	MMV+MDMV	
Mozayik	14	5	1	0	21.7
Şerit	25	8	1	1	38
Kızarıklık	20	1	3	0	26
Mozayik+şerit	2	1	0	0	3.3
Şerit+kızarıklık	2	0	0	0	2.2
Kloroz	2	0	0	0	2.2
Şerit+kloroz	1	0	0	0	1.1
Şekil bozukluğu	1	0	0	0	1.1
Buruşma	4	0	0	0	4.3
Toplam	71	15	5	1	

Çizelge 4 incelendiğinde; MMV'nin tespit edildiği 71 örnekte en yaygın olarak şerit şeklinde çizilenme (%35.2), kızarıklık (%28.2) ve mozayik (%19.7) tipi semptomların görüldüğü belirlenmiştir (Şekil 3). MDMV ile enfekteli bitkilerde (15 adet) rastlanan semptomlar ise; şerit şeklinde çizilenme (%53.3) (Şekil 4), mozayik (%33.3), kızarıklık (%6.7) ve mozayik+şerit şeklinde çizilenme (%6.7)'dir. BYDV-PAV (5 adet) ile ise en yoğun olarak kızarıklık (%60), şerit şeklinde çizilenme (%20) ve mozayik (%20) şeklinde semptomlar tespit edilmiştir. MMV+MDMV ikili virüs enfeksiyonuna sahip tek bitki örneğinin ise mısır bitkisinde şerit şeklinde semptom oluşturduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 3. MMV'nin mısır bitkisinde yapraklarında oluşturduğu şerit (A), kızarıklık (B) ve mozayik (C) şeklinde semptomlar



Şekil 4. MDMV'nin mısır bitkisinde yapraklarında oluşturduğu şerit şeklinde çizgi semptomu

İspanya'da 2001 yılında yapılan araştırmalarda sistemik semptom gösteren 784 mısır yaprak örneğinin ELISA ile testlenmesi sonucunda; %13.9'unun MDMV, %3'ünün Maize rough dwarf virus (MRDV) ile enfekteli olduğu saptanmıştır (Achon ve ark., 2008). Aynı ülkede 2002 yılı araştırmaları sonucunda ise; ELISA ile testlenen 982 yaprak örneğinin (sistemik semptom gösteren) %13.7'i MDMV, %1.8'i SCMV ve %3'ü MRDV; 2004 yılında ise, mozayik semptomu gösteren 566 örneğin %79.85'i MDMV, %1.94'ü SCMV ve %3'ü MRDV ile bulaşık olarak saptanırken; küçükleme ve enasyon semptomu gösteren 157 örnekte 3'ü MDMV (%1.91), 2'si SCMV (%1.27) ve 112'si MRDV

(%71.79) ile enfekteli olarak belirlenmiştir (Achon ve ark., 2008). Bu çalışma sonucunda; mozayik simptomu gösteren örneklerin (20 adet) büyük bir kısmının MMV (%70) ile enfekteli olduğu, MDMV'ün ise şerit şeklinde simptom sergileyen bitki örneklerinde (%53.3) dominant olarak görüldüğü ortaya konulmuştur. Macaristan'da yürütülen bir araştırmada, bu çalışmada elde edilen verilere benzer şekilde, MDMV'e hassas mısır çeşitlerinde en yaygın görülen simptomlar; mozayik ve şerit şeklinde olmuştur (Sum ve ark., 1979). Macaristan'da 2002 yılında yürütülen bir diğer çalışmada ise, yapraklarda klorotik leke belirtisi sergileyen mısır örneklerinin SCMV, BYDV ve MDMV'e spesifik antiserumlar ile testlenmesi sonucunda, bu örneklerde sadece MDMV'ün varlığı tespit edilmiştir (Tobias ve Palkovics, 2004). Samsun ilinde yürütülen bu çalışmada ise; mozayik simptomu gösteren örneklerin ancak %20'i MDMV ile enfekteli olarak belirlenirken, %70'i MMV ve %5'i ise BYDV-PAV ile enfekteli olarak saptanmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada, Samsun ilinde hem I. ürün ve hem de II. ürün olarak yetiştirilen mısır bitkisinde MMV, MDMV ve BYDV-PAV'ın varlığı tespit edilmiştir. Ancak, bölgede mısırdaki enfeksiyon oluşturan diğer virüslerin daha kapsamlı bir çalışma ile araştırılması gerekmektedir.

Teşekkür

Bu araştırma projesi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (PYO.ZRT.1904.09.012).

Kaynaklar

- Achon, M.A., Serrano, L., Alonso-Duenas, N., Porta, C., 2008. Complete genome sequences of maize dwarf mosaic virus and sugarcane mosaic virus isolates coinfecting maize in Spain. *Archives of Virology*, 152: 2073–2078.
- Baloğlu, S., Aktura, T., Yılmaz, M.A., 1991. Çukurova Bölgesinde yetiştirilen I. ve II. ürün mısırdaki mekanik olarak taşınabilen virüslerin saptanması. VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 7- 11 Ekim, İzmir, s: 329-332.
- Bremer, K., Raatikainen, M., 1975. Cereal disease transmitted or caused by aphids and leafhoppers in Turkey. *Annales Academiae Scientiarum Fennicae, IV. Biologica*, 203: 1-14.
- Clark, M.F., Adams, A.N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475- 483.
- D'Arcy, C.J., Itnyre, R.L., Nass, P.H., Cheng, S., 1995. Barley yellow dwarf at Illinois: Progress and prospects. *Züchtungsfor schung- Berichte aus der Bundesanstalt für Züchtungsforschung an Kulturpflanzen*, 1: 59-62.
- Değirmenci, K., Akbaş, B., Cengiz, R., Ertunç, F., 2013. Bazı mısır hatlarına ait tohumlarda maize dwarf mosaic virus (MDMV)'nün varlığının belirlenmesi ve termoterapi uygulaması ile tohumdan arındırılması. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 22 (2): 69-73.
- Erkan, E., Kutluk Yılmaz, N.D., 2009. Samsun İli buğday Üretim Alanlarında Enfeksiyon Oluşturan Virüslerin Saptanması. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 24(2): 67-75.
- Fidan, H., Yılmaz, M.A., 2004. Çukurova Bölgesi mısır ekim alanlarında zararlı spiroplasma ve önemli virüs hastalık etmenlerinin saptanması. *Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri*, 8-10 Eylül 2004, Samsun, 210.
- Ford, R.E., Tosic, M., Shukla, D.D., 2004. Maize dwarf mosaic virus. *Descriptions of Plant Viruses Online*, No: 341.
- Geering, A., Thomas, J., Persley, D., 2004. A national diagnostic protocol for the identification of Maize dwarf mosaic virus. 19-28.
- İlbağı, H., Çıtır, A., 2004. Türkiye'de tahıl virüs hastalıkları ve yayılış alanları. *Türkiye I. Bitki Kongresi Kong.* 8-10 Eylül, Samsun, 176.
- İlbağı, H., Rabenstein, F., Habekuss, A., Ordon, F., Citir, A., 2006. Incidence of virus diseases in maize fields in the Trakya region of Turkey. *Phytoprotection*, 87 (3): 115-122.
- İlbağı, H., Geyik, S., 2014. Türkiye'de Bursa İli mısır (*Zea mays* L.) tarlalarında görülen virüs hastalıklarının saptanması. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 11 (1): 122-125.
- Jiang, J.X., Zhou X.P., 2002. Maize dwarf mosaic disease in different regions of China is caused by Sugarcane mosaic virus. *Archives of Virology*, 147: 2437-2443.
- Koike, H., Gillaspie, A.G., 1976. Strain M. A new strain of sugarcane mosaic virus. *The Plant Diseases Reporter*, 60: 50-54.
- Mohammadi, M.R., Hajieghrari, B., 2009. Sugarcane mosaic virus: The causal agent of mosaic disease on sorghum (*Sorghum bicolor* L.) in Tehran province of Iran. *African Journal of Biotechnology*, 8(20): 5271-5274.
- Mayo, M.A., D'Arcy, C.J., 1999. Family Luteoviridae: A reclassification of Luteoviruses, 15- 22.
- Nault, L.R., Gordon, D.T., Gingery, R.E., Bradfute, O.E., Castillo Loayza, J., 1979. Identification of maize viruses and mollicute and their potential insect vectors in Peru. *Phytopathology*, 69: 824-828.
- Petrik, K., Sebestyen, E., Gell, G., Balazs, E., 2010. Natural insertions within the N terminal region of the coat protein of Maize dwarf mosaic potyvirus (MDMV) have an effect on the RNA stability. *Virus Genes*, 40: 135-139.
- Shurtleff, M.C., 1980. Compendium of corn diseases. St. Paul, M.N. American Phytopathological Society, 60-63.
- Sum, I., Sebestyen, E., Papp, I., Liszt, A., 1979. Növénytermeles. *Crop Production*, 28: 309-315.
- Teakle, D.S., Grylls, N.E., 1973. Four strains of sugarcane mosaic virus infecting cereals and other grasses in Australia. *Australian Journal of Agricultural Resesearch*, 24: 465-477.
- Tobias, I., Palkovics, L., 2004. An unusual feature at the N-terminal end of the coat protein of Maize dwarf mosaic virus isolated in Hungary. *Journal of Phytopathology*, 152: 445-447.
- Tsai, J.H., 1975. Occurrence of a corn disease in Florida transmitted by *Peregrinus maidis*. *The Plant Disease Reporter*, 59: 830-833.
- TÜİK, 2009. <http://www.tuik.gov.tr> (06.12.2010)
- Wang, J.G., Zheng, H.Y., Chen, H.R., Adams, M.J., Chen, J.P., 2010. Molecular diversities of sugarcane mosaic virus and sorghum mosaic virus isolates from Yunnan province, China. *Journal of Phytopathology*, 158: 427-432.