

A.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Kürsüsü
Prof. Dr. Selahattin Gürtürk

TÜRKİYE'DE BUĞDAYLARDA GÖRÜLEN VİRÜSİ ENFEKSİYONUN ELEKTRON MİKROSKOP İLE ETİYOLOJİK TEŞHİSİ

Selahattin Gürtürk*

Seyhan Kurçman**

Etiological identification of virus infection of wheat by electron microscop in Turkey

Summary: *Wheat plants from the infected and steril soil were used for source plants in the experiment in November. Examination of root-dip preparations in the electron microscope indicated that all the plants from infected soil were infected. Rods of soil-borne wheat mosaic virus found in roots of wheat in the fall, 3-5-7 weeks after sowing. The average length of the virus particles were 500 m μ . Such particles were not found from healthy plants.*

Morphological properties determined by electron microscopical examination and the disease symptoms in the field were shown that the disease was soil-borne wheat mosaic virus in Eskişehir.

Özet: *Bu çalışmada materyal olarak enfekte ve steril toprakta yetiştirilen buğday bitkileri kullanılmıştır.*

Kök-Batırma yöntemi uygulanarak ekim tarihinden 3-5-7 hafta sonra Kasım ayında yapılan elektron mikroskop incelemelerinde, enfekte toprakta yetiştirilen bütün bitkiler bulaşık bulunmuş ve buğday köklerinde, toprakta taşınan Buğday mozayik virusu çubukları saptanmıştır. Bu parçacıkların boyları ortalama 500 m μ olarak ölçülmüştür. Steril toprakta yetiştirilen buğday bitkilerinin köklerinden yapılan preparatlarda virus çubuklarına rastlanmamıştır.

Virusun elektron mikroskop ile incelenen morfolojik özellikleri ve tarladaki hastalık belirtileri, Eskişehir'de buğdaylarda görülen hastalık etkeninin toprakla taşınan Buğday Mozayik Virusuna olabileceği kanısını vermiştir.

* Prof. Dr. A.Ü. Veteriner Fakültesi Viroloji Kürsüsü, Ankara, Türkiye.

** Uzman, Bölge Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü, Virus Hastalıkları Laboratuvar Şefi, Ankara, Türkiye.

Giriş

Buğday Orta Anadolu köylüsünün yegane geçim kaynağı olup, bu bölgede 4 733 951 hektarda üretimi yapılmaktadır. Eskişehir'de buğday üretim alanı ise 186 716 hektardır (1).

İlk defa 1973 yılında Eskişehir'in merkeze bağlı köylerinde (Gökçeoğlu, Fevziye, Kireçköy, Ağapınar, Karaçay) ilkbaharda buğday bitkilerinde, yapraklarda başlangıçta hafif mozayığa benzer birbirini takip etmeyen sarı lekeler, tarlada öbek öbek rozetlenme, cüceleşme, daha sonra rozetlenmiş kısımlarda koyu yeşil renklenme görülmüştür. 1977 yılında başlayan çalışmalarda her yıl Nisan ayında, buğday hasadına kadar enfekte tarlalarda yapılan gözlemlerde, buğday bitkilerinde rozetlenme, bodurlaşma ve renk değişikliğinin yanında kurumalar olduğu ve bu tip bitkilerin başak vermediği, verenerin de çok zayıf başak verdiği ve bu belirtilerin 28 000 dekarlık alana yayıldığı saptanmıştır. Bitkilerdeki bu belirtiler ve tarlada hastalığın öbek öbek, daha çok tarla girişinden başlayarak tarla içerisine doğru ilerlemesi, hastalığın toprak ile bulaşan Buğday mozayık virusu (Soil-borne wheat mosaic virus) olabileceği kanısını uyardırıştır.

1977-1979 yıllarında tarlada yapılan incelemelerde, hastalığın % 100 e kadar çıkan zararlara sebep olduğu ve hatta bazı ekili alanların, hasadı beklenmeden çiftçi tarafından sürüldüğü izlenmiştir. Aynı yıllarda yapılan saksı denemeleri hastalığın toprakla bulaştığını göstermiş, ancak serada yapılan bulaştırma denemelerinden yeterli sonuç alınamamıştır.

Yukarıda belirtilen hastalık bulgularına göre Buğday mozayık virusundan şüpheli materyaldeki virus partiküllerinin morfolojik özelliklerini saptamak amacı ile bu çalışma yapılmıştır.

Hebert ve Coleman (5) Soil-borne wheat mosaic virusu ile enfekte edilmiş buğday bitkilerinin ekstraktından yapmış oldukları elektron mikroskop çalışmalarında çubuk şeklinde partiküllerin varlığını saptamışlardır. Aynı şekilde hastaliksız buğday ekstraktlarında yaptıkları incelemelerde bu partiküllere rastlamamışlardır. Araştırmacılar elektron mikroskop preparatlarını, bitki ekstraktını 10 000 g de 10 dakika santrifüj ederek kaba parçalardan temizledikten sonra üst kısmı 25 000 g de 1 saat santrifüj etmiş ve çökteltiyi distile su içerisinde süspansiyon yaparak hazırlamışlardır.

Bu şekilde hazırlanan preparatların elektron mikroskopta yapılan incelemelerinde çubuk şeklindeki partiküllerin 400-700 m μ boyunda ve 28 m μ eninde olduğu saptanmıştır.

Saito ve arkadaşları (9) tarafından Soilborne wheat mosaic virusunun elektron mikroskopi ve prufikasyonu üzerinde yapılan çalışmada, prufiye edilmiş olan ekstraktın elektron mikroskop muayenesinde virusun düz çubuk şeklinde 120-180 m μ boyunda ve 25 m μ eninde partiküller şeklinde olduğu bildirilmiştir.

Brandes ve arkadaşları (3) tarafından Soil-borne wheat mosaic virusunun elektron mikroskopisi üzerinde yapılmış olan çalışmada virusun prufikasyonu için hastalıklı taze yapraklar toplanmış, polyethylen torbalar içinde 196°C' da likit nitrojen ile dondurulmuştur. Dondurulmuş yapraklar kullanılana kadar -20°C' da saklanmıştır. Daha sonra 250 gr hastalıklı yaprak sert lastik döveçle iyice dövülerek ezilmiştir. Üzerine 0.2 M Sucros, 0.1 M Potassium phosphat, 0.05 M Natrium diethyldithiocarbamate ve 0.05 Natrium dithionate kapsayan 3 litre PH 7 soğuk saf su ilave edilerek 30 saniye blenderde parçalanmıştır. Eriyiğin pH sı 1.0 M KOH ile 8.5'a ayarlanmış, önce bezden sonra da cam pamuktan, daha sonra da basınçla celit filtreden süzlmüştür. Bakteri ve benzeri büyük parçalardan temizlenmiş olan takriben 2500 ml.lik şeffaf açık kahve rengi sıvı 1.0 M HCL ile pH 7.5'a ayarlanmış ve aşağıdaki şekilde santrifüj edilmiştir. Birincisi 20 000 g de 10 dakika, ikincisi 44 000 g de 4 saat ve üçüncüsü de 100 000 g de 2 saat olmak üzere 3 ayrı fraksiyonda santrifüj yapılmıştır. İkinci santrifüjden sonraki çökelti sakkarozsuz pH 7.5 pufferde süspansiyon yapılmıştır. Son çökelti pH 7.5 da (% 10,20, 30, 40) dereceli sakkaroz solüsyonları ilave edildikten sonra 50 000 g de 2 saat santrifüj edilmiştir. Sakkarozlu solüsyonlarda içerisinde görülebilir bulanıklık olan 1 ml fraksiyondan 260-280 m μ büyüklükte partiküllerin bulunduğu saptanmıştır. Bu partikülleri kapsayan birer ml.lik iki fraksiyon bir araya toplanmış ve 100 000 g de 2 saat santrifüj edilmiştir. Çökelti, partiküllerin ölçülmesi ve virus partiküllerinin elektron mikroskopta incelenmesi için 0.5 ml. taze distile su içerisinde süspansiyon yapılmıştır.

Elektron mikroskop preparatları formvar ile kaplanmış bakır lamalarda hazırlanmıştır. Preparat hazırlanırken hastalıklı taze buğday yaprağı kesilerek batırma metodu uygulanmış ve oda ısısında kurumaya bırakılmıştır.

Prufiye edilmiş sıvı uygun sayıda partikül elde etmek için distile su ile 10^{-3} sulandırıldıktan sonra bu süspansiyondan laklı elek-

ron mikroskop lamı üzerine bir damla konmuş ve oda ısısında kurutmadan sonra preparat palladium ile gölgelenmiştir.

Kısmen prüfiye edilmiş olan virusun negatif boyanması Nixon ve Harrison (6) yöntemi ile yapılmıştır. 1/10 sulandırılmış 1 ml. virus süspansiyonu % 1'lik phosphostungstic asit solüsyonu ile 2 ml'ye (pH 6.5) tamamlanmıştır. 4.5 saat sonra bu karışımın üst kısmı preparatın üzerine püskürtülmüştür. Bazı araştırmacılar boyamanın daha muntazam olması için % 1 lik serum albumini katmışlardır.

Araştırmacılar sadece belirti gösteren bitkilerden yapılan preparatlarda virus partiküllerini gördüklerini ve bu partiküllerin % 59 uzun 159 m μ (125-200 m μ arasında), % 65 inin de 160 m μ (100-225 m μ arasında) olduğunu, ayrıca 300 m μ luk uzunluğa sahip partiküllerin de bulunduğunu bildirmişlerdir. Çeşitli büyüklükteki virus partiküllerine değişik yoğunluktaki sakkaroz kapsayan tüplerdeki çeşitli tabakalarda rastlanmıştır. Bu çalışmada virus prufikasyonu esnasında 300 m μ boyundaki partiküllerin parçalandığı da bildirilmektedir. Virusun kalınlığı da takriben 20 m μ , yani bütün mozayık virusundan kalın olarak saptanmıştır.

Virus partiküllerinin ultrastruktürlerinin incelenmesinde, negatif boyanmış partiküllerde çomak boyunca uzanan takriben 5 m μ eninde bir iç yapının bulunduğu ve partiküllerin dış yüzünün intizamsız olduğu, bazı partiküllerin de spiral yapı gösterdiği bildirilmiştir.

Brandes (4) tarafından çubuk şeklinde patojen bitki viruslarının morfolojik olarak identifiye edilmeleri üzerine yapılan çalışmada, bandırma yöntemi ile hazırlanan preparatlarda, kalın ve etli yaprakların kısa, graminelerin ise preparat hazırlanırken daha uzun süre batırmada tutulması önerilmiştir. Aynı çalışmada A. Canova tarafından kullanılan bir izolattaki Buğday Mozayık Virüsü partiküllerinin 160-290 m μ boyunda olduğu bildirilmiş ve Tobacco rattle virus grubu içinde gösterilmiştir.

Brakke ve arkadaşları (2) tarafından soil-borne wheat mosaic virusunun transmissionu üzerinde yapılan çalışmada, hastalıklı yaprak ve köklerden bandırma metodu ile hazırlanmış ve tungsten oxidle gölgelendirilmiş preparatlarda, bulaşık tarlaya ekilmiş olan buğday bitkilerinden ekim tarihinden takriben 2-3 hafta sonra yapılan preparatlarda virus partiküllerinin bulunduğu saptanmıştır.

Elektron mikroskopta yapılan incelemede ekimden 5 hafta sonra yapılan preparatlarda adet olarak virus partiküllerinin daha sık, 7 hafta sonra yapılan preparatlarda da her preparatta virus partiküllerinin bulunduğu saptanmıştır.

Pacumbaba ve arkadaşları (7) tarafından Soil-borne wheat mosaic virusunun özellikleri üzerinde yapılan araştırmada fosforik asit ile boyanmış yada platinle gölgelenmiş prufiye Buğday Mozayık virusu partiküllerinin elektron mikroskopta çubuk şeklinde, ortalarının oyuk olup, boylarının 350-442 m μ ve enlerinin 24-28 m μ bulunduğu ve ortalama boylarının da 161 m μ , enlerinin ise 26 m μ olduğu saptanmıştır.

Rolle ve Mayr (8) tarafından bildirilen taksonomide Buğday Mozayık Virus (Weizen Mosaic Virus) Rhabdoviruslar grubu içerisinde yer almaktadır.

Materyal ve Metot

Eskişehir'den hastalık belirtilerinin görüldüğü tarladan alınan toprak, saksılara doldurularak saksıların bir kısmı otoklavda sterilize edilmiş, geri kalanlar ise hiç bir muameleye tabi tutulmadan Enstitü bahçesinde birbirinden tecrit edilerek toprağa gömülmüştür. Bu topraklarla hazırlanan 10'ar saksıya Köse 220/39 (Hastalığa hassas), Ak 702 (hastalığa dayanıklı) ve test bitkisi olarak *Triticum spelta* buğday çeşidi 12 Ekim 1979 da ekilmiştir.

Elektron mikroskopta ilk inceleme ekim tarihinden takriben 3.5 hafta sonra 7 Kasım 1979 da, ikinci inceleme 12 Kasım 1979 da ve üçüncü inceleme de ekim tarihinden 5 hafta sonra olmak üzere 22 Kasım 1979 da enfekte ve sterilize edilmiş topraklarda yetiştirilen Köse 220/39 buğday bitkileri kullanılarak yapılmıştır. Bunun için steril ve enfekte toprakta yetiştirilen Köse buğdayları kökleri ile birlikte sökülmüş, kökler akar su altında yıkanarak temizlenmiş ve kurutma kağıdı ile fazla suları bitkiyi zedelemekten alandıktan sonra, kök keskin bir bistüri ile kesilmiş, formvarlı elektron mikroskop lamı üzerine öze ile bırakılan damıtık su damlacığına kısa bir süre batırılmıştır.

Çalışmalar AEG Zeiss EM 10 elektron mikroskop ile yapılmıştır.

Sonuçlar

Steril toprağa ekilmiş bulunan buğdaylardan yapılan preparatların elektron mikroskopik incelemelerinde virus partiküllerine ben-

zer çomak şeklindeki herhangi bir partiküle rastlanmadığı halde, enfekte toprağa ekili bitkilerden hazırlanan preparatların, yoğun olmamakla beraber hemen hepsinde çomak şeklinde virus partiküllerinin bulunduğu saptanmıştır. Ekimden beş hafta sonra alınan bitkilerin elektron mikroskopik muayenelerinde daha kısa sürede alınan bitkilere nazaran virus partikülleri daha fazla, ortalama her sahada 3-5 olmak üzere görülmüştür (Şekil 1, 2, 3).

Tartışma

Hebert ve Coleman (5) tarafından yapılan elektron mikroskop ölçümlerinde Buğday Mozayık Virusunun 400-700 m μ boyunda ve 28 m μ eninde olduğu bildirilmiştir.

Saito ve arkadaşları (9) prüfiye ekstraktta virusun boyunun 120-180 m μ olduğunu, Brandes ve arkadaşları (3) ise Buğday Mozayık Virusu partiküllerinin 125-300 m μ boyunda olduğunu bildirmişlerdir.

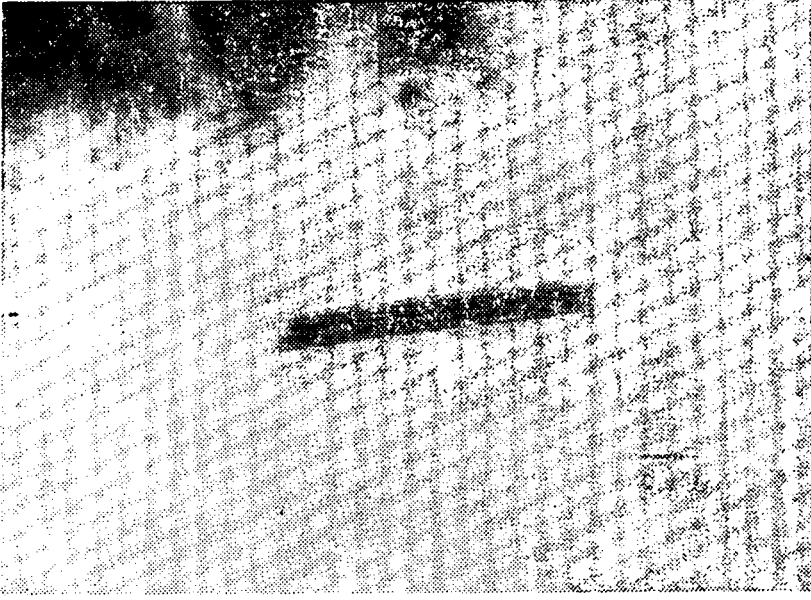
Biz de yapmış olduğumuz elektron mikroskop incelemelerinde Buğday Mozayık virusunun Hebert ve Coleman (5) tarafından belirtildiği üzere 400-700 m μ arasında, ortalama 500 m μ boyunda olduğunu ve şekillerinin de Brandes ve arkadaşları (3) ile Pacumbaba ve arkadaşları (7) tarafından bildirildiği üzere çubuk şeklinde olduğunu, ortalarında partikül boyunca uzanan bir özün bulunduğunu ve dış kenarlarının intizamsız, genel olarak uçlarının gayri muntazam olduğunu saptamış bulunuyoruz.

Gerek hastalığın bulguları, gerekse morfolojik özelliklerine göre bu virusun toprakla taşınan Buğday mozayık virüsü olabileceği kanısına varılmıştır.

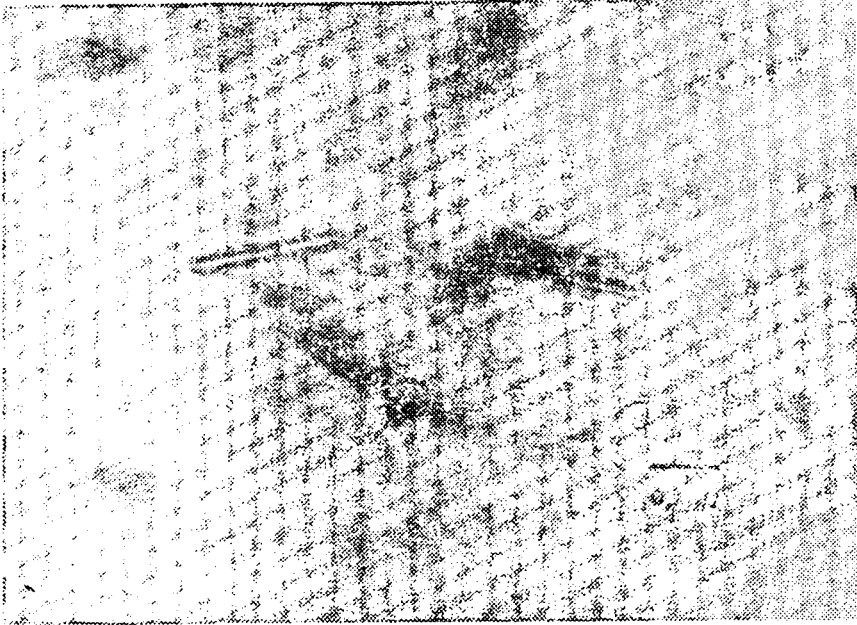
Literatür

- 1- **Anonymus**, (1972): *Tarimsal Yopı ve Üretim Devlet İstatistik Enstitüsü*. Türkiye.
- 2- **Brakke, K. M., Estes, A. P. and Schuster, M. L.** (1965): *Transmission of Soil-Borne Wheat Mosaic Virus*. *Phytopath.* 55, 79-86.
- 3- **Brandes, G. Philippe, R. M. and Thornberry H. H.** (1964): *Electron Microscopy of particles associated with Soil-Borne Wheat Mosaic*. *Phytopath. w.* 50, 181-190.

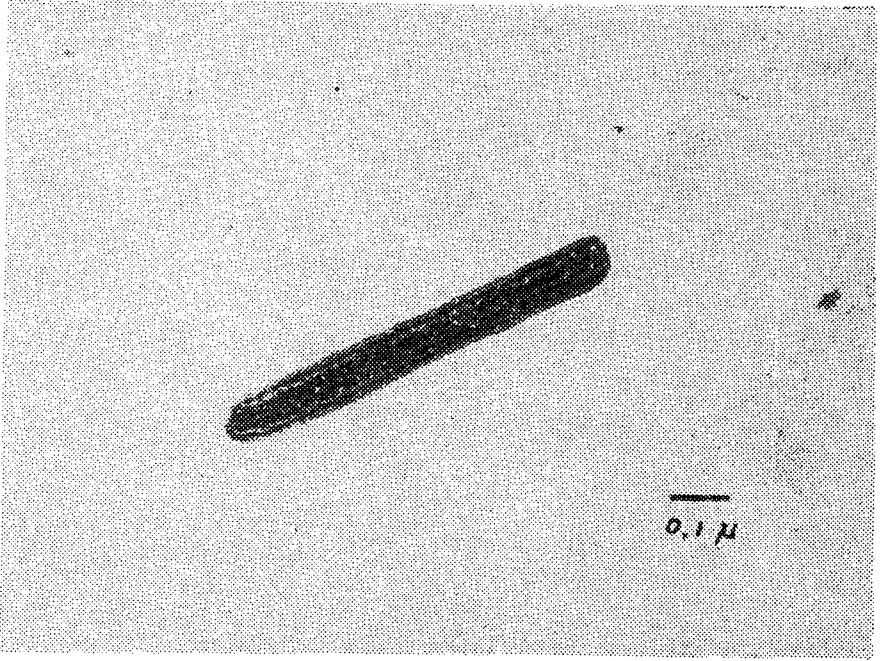
- 4- **Brandes, G.** (1964): *Identifizierung von gestreckten Pflanzenpathogenen Viren auf Morphologischer Grundlage*. Mitt. aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem. Hcft 110.
- 5- **Hebert, T. T. and Coleman N. T.** (1955): *Rod-shaped particles associated with Soil-borne wheat mosaic*. Phytopath. (Abst.). 45, 348.
- 6- **Nixon, H. L., and Harrison, B. D.** (1959): *Electron microscopic evidence on the structure of the particles of tobacco rattle virus*. J. gen. Microbiol. 21, 582-590.
- 7- **Pacumbaba, R. P., Sill Jr, W. H. and Dickerson, O. J.** *Properties of Soil-Borne wheat mosaic virus*. Phytopath. 61, 341.
- 8- **Rolle M. und Mayr. A.** (1978): *Microbiologie Infektions-und Seuchenlehre*. Ver. Stuttgart. 478.
- 9- **Saito, Y., Takanashi, K. and Iweta, Y.** (1961): *Electron microscopy and purification of Soil-borne wheat mosaic viruses*. Ann. Phytopath. Soc. Japan 26. pp. 16-18. (Rev. Appl. Mycol, 1962.22).



Şekil 1. Batırma Yöntemi ile hazırlanmış Buğday mozayık virusunun elektron mikroskop-
ta görünüşü Büyütme 1x76 000



Şekil 2. Batırma Yöntemi ile hazırlanmış Buğday mozayık virusunun elektron mikroskop-
ta görünüşü. Büyütme 1x95 000



kil 3. Batırma Yöntemi ile hazırlanmış Buğday mozayık virusunun elektron mikroskopta görünüşü. Büyütme. 1x76 000