

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI



**ARPADA *Pyrenophora teres* f. *teres* MOLEKÜLER TESPİTİ:
ERKEN ENFEKSİYON AŞAMASINDA İZLENMESİNE
YÖNELİK RT-PCR' IN OPTİMİZASYONU**

BİTKİ KORUMA YÜKSEK LİSANS TEZİ

MÜBERRA YEKEN

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Göksel ÖZER

BOLU, OCAK 2025

KABUL VE ONAY SAYFASI

Müberra YEKEN tarafından hazırlanan “**ARPADA *Pyrenophora teres* f. *teres* MOLEKÜLER TESPİTİ: ERKEN ENFEKSİYON AŞAMASINDA İZLENMESİNE YÖNELİK RT-PCR’ IN OPTİMİZASYONU**” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Bitki Koruma Ana Bilim Dalı Bitki Koruma Programında Yüksek Lisans olarak oy birliği kabul edilmiştir. 23/12/2024

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Göksel ÖZER
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Sibel DERVİŞ
Mardin Artuklu Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Mehmet Erhan GÖRE
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu ve Şablonuna uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir
- aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin Turnitin adlı programında enstitü müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %30'u geçmemektedir.

.....

MÜBERRA YEKEN

ÖZET

ARPADA *Pyrenophora teres* f. *teres* MOLEKÜLER TESPİTİ: ERKEN ENFEKSİYON AŞAMASINDA İZLENMESİNE YÖNELİK RT-PCR' IN OPTİMİZASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MÜBERRA YEKEN
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI
BİTKİ KORUMA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. GÖKSEL ÖZER)

BOLU, OCAK - 2025
XII + 51 sayfa

Dünya' da ve Türkiye' de arpa çeşitlerinde *Pyrenophora teres* f. *teres*' in neden olduğu ağ benek hastalığı, önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Bu çalışmada, Türkiye' nin farklı bölgelerinden toplanan hastalıklı bitki örneklerinden elde edilen izolatlar, morfolojik ve moleküler teknikler kullanılarak tanımlanmış ve en agresif izolat belirlenmiştir. Daha sonra, ülkemizde yetiştirilen 92 farklı arpa çeşidi bu izolat ile değerlendirilmiş ve çeşitlerin hastalık şiddetine göre dayanıklılık durumları sınıflandırılmıştır. Moleküler tespit için SYBR Green I bazlı RT-PCR yöntemi optimize edilmiş ve *P. teres* f. *teres*' e özgü PttQ4-F/PttQ4-R primer çifti kullanılmıştır. Bu yöntemle enfekte bitki dokularında patojen DNA' sının kantitatif olarak izlenmesi sağlanmış ve 0,001 ng gibi düşük seviyelerdeki patojen DNA' sı başarıyla tespit edilmiştir. Enfeksiyon sonrası 1., 2., 3. ve 4. günlerde yapılan analizlerde, hassas ve dayanıklı çeşitler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada elde edilen bulgular, arpa çeşitlerinin hastalığa dayanıklılık düzeylerinin patojen DNA miktarına dayalı olarak sıralanmasını sağlamış, dayanıklı çeşitler olarak Harman ve Tokak 157/37, hassas çeşitler olarak ise İnce 04 ve Novasadski belirlenmiştir. Sonuç olarak, RT-PCR yöntemi, ağ benek hastalığı etmeninin erken dönemde kesin ve hızlı tespiti için güçlü bir araç olarak değerlendirilmiştir. Çalışma, dayanıklı çeşitlerin belirlenmesi ve hastalığa karşı etkili kontrol stratejilerinin geliştirilmesi sürecine katkı sağlamıştır.

ANAHTAR KELİMELER: *Pyrenophora teres* f. *teres*, Arpa, Real-Time PCR, Patojenisite

ABSTRACT

MOLECULAR DETECTION OF *Pyrenophora teres* f. *teres* IN BARLEY: OPTIMIZING RT-PCR FOR EARLY INFECTION MONITORING

MASTER THESIS

MÜBERRA YEKEN

BOLU ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION

(SUPERVISOR: PROF. DR. GÖKSEL ÖZER)

BOLU, JANUARY 2025

XII + 51 pages

Barley net blotch disease caused by *Pyrenophora teres* f. *teres* causes significant yield losses in barley varieties in the world and in Türkiye. In this study, infected plant samples collected from various regions of Türkiye were characterized using morphological and molecular methods, and the most aggressive isolate was identified. Subsequently, 92 barley varieties cultivated in Türkiye were evaluated using this isolate, and their resistance levels were classified based on disease severity. A SYBR Green I-based RT-PCR method was optimized using the PttQ4-F/PttQ4-R primer pair specific to *P. teres* f. *teres*. This method enabled the quantitative monitoring of pathogen DNA in infected plant tissues and successfully detected pathogen DNA at concentrations as low as 0,001 ng. Analyses conducted on the 1st, 2nd, 3rd and 4th days post-infection revealed statistically significant differences between resistant and susceptible varieties. Findings from the study allowed the ranking of barley varieties based on their resistance levels, identifying Harman and Tokak 157/37 as resistant varieties and İnce 04 and Novasalski as susceptible varieties. In conclusion, the RT-PCR method was shown to be a powerful tool for the rapid and accurate early detection of the net blotch pathogen. The study contributed to the identification of resistant barley varieties and the development of effective disease management strategies, supporting sustainable barley production.

KEYWORDS: *Pyrenophora teres* f. *teres*, Barley, Real-Time PCR, Pathogenicity

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ	viii
FOTOĞRAF LİSTESİ	ix
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	x
TEŞEKKÜR	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Arpa Hastalıkları Hakkında Genel Bilgiler	7
1.2 <i>Pyrenophora teres</i> ’ in Taksonomisi ve Genel Özellikleri.....	8
1.3 <i>Pyrenophora teres</i> ile İlgili Yapılmış Çalışmalar	11
1.3.1 Moleküler Çalışmalar	14
2. MATERYAL ve YÖNTEM.....	19
2.1 Materyal.....	19
2.1.1 Hastalıklı Bitki Materyalinin Eldesi	19
2.1.2 Test Edilen Arpa Çeşitlerinin Temini.....	19
2.1.3 Kullanılan Besiyeri	23
2.2 Yöntem	23
2.2.1 Patojen İzolasyonu.....	23
2.2.2 İzolatların Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu	24
2.2.3 Patojenisite Testi.....	26
2.2.4 Konukçu Dokusundan Patojen DNA Miktarının RT-PCR Analizi ile Tespiti	27
3. BULGULAR	29
3.1 <i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i> İzolatlarının Elde Edilmesi ve Teşhisi.....	29
3.2 Patojenisite Çalışmaları	32
3.2.1 Çeşit Reaksiyon Testleri	32
3.2.2 Konukçu Dokusundan Patojen DNA Miktarının RT-PCR Analizi ile Tespiti	34
4. TARTIŞMA	39
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	43
KAYNAKLAR	44

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 1.1.** 2012-2022 yılları arasında dünya arpa ekim alanı ve üretim miktarı istatistikleri 2
- Şekil 1.2.** 2012-2022 yılları arasında ortalama arpa üretiminin yapıldığı ilk 10 ülkenin istatistikleri 2
- Şekil 3.1.** *Pyrenophora teres* f. *teres* ve referans izolatlarına ait ITS ve *GAPDH* bölgelerinin birleşik sekanslarına dayalı maximum likelihood filogenetik ağacı. *Bipolaris maydis* AR5183 dış grup olarak kullanılmış ve %75' in altındaki bootstrap değerleri düğümlerde gösterilmemiştir. 31
- Şekil 3.2.** *Pyrenophora teres* f. *teres* izolatu ile gerçekleştirilen çeşit reaksiyon testi sonucunda arpa çeşitlerinde tespit edilen hastalık değerlerini gösteren ısı haritası (heatmap). Mavi renk dayanıklılığı, sarı renk ise hassaslık oranını ifade etmektedir. 34
- Şekil 3.3.** PttQ4-F/PttQ4-R primer çifti kullanılarak, farklı konsantrasyonlardaki patojen DNA serilerinin (100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, ng) bitki DNA' s1 ile seyreltilerek elde edilen standart eğrisi 35
- Şekil 3.4.** PttQ4-F/PttQ4-R primer çifti kullanılarak, farklı konsantrasyonlardaki patojen DNA serilerinin (100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, ng) bitki DNA' s1 ile seyreltilerek elde edilen amplifikasyon eğrisi 36
- Şekil 3.5.** PttQ4-F/PttQ4-R primer çifti kullanılarak, farklı konsantrasyonlardaki patojen DNA serilerinin (100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, ng) bitki DNA' s1 ile seyreltilerek elde edilen erime piki (melting peak) 37
- Şekil 3.6.** İnokulasyonu takiben farklı günlerde alınan örneklerin PttQ4-F/PttQ4-R primer çifti ile saptanan DNA miktarları. Sütundeki her harf istatistiksel olarak farklı grubu ifade etmektedir 38

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1. 2018-2023 yılları arasında Türkiye arpa ekim alanı, üretim miktarı ve verim değerleri	3
Tablo 2.1. İzolatların toplandığı arpa tarlalarına ait lokasyon bilgileri	19
Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan arpa çeşitlerine ait bilgiler	20
Tablo 3.1. İzolatlar ve hastalık indeks değerleri.....	32



FOTOĞRAF LİSTESİ

Sayfa

Fotoğraf 1.1. Ağ benek hastalığının arazi koşullarındaki belirtileri (a), kontrollü koşullardaki ilk belirtileri (b)	5
Fotoğraf 3.1. <i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i> izolatlarının PDA ortamındaki gelişimleri	30
Fotoğraf 3.2. <i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i> ' in arpa yaprağı üzerinde konidi ve konidioforları (a), konidiler (b).	30
Fotoğraf 3.3. <i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i> ' in neden olduğu farklı yoğunluktaki ağ formu yaprak lekesi belirtileri (1-10 skala serisi).	33
Fotoğraf 3.4. PttQ4-F/PttQ4-R primer çifti kullanılarak, farklı konsantrasyonlardaki patojen DNA serilerinin (100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, ng) bitki DNA'sı ile seyreltilerek elde edilen RT-PCR ürününün agaroz jel elektroforezi, M: Gene ruler 100 bp ladder plus (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, ABD).....	36

KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

%	: Yüzde işareti
°C	: Santigrat derece
bp	: Baz çifti
cm	: Santimetre
Ct, Cq	: Eşik döngüsü, kantifikasyon döngüsü
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FAOSTAT	: Gıda ve Tarım Örgütü İstatistikleri
g	: Gram
GAPDH	: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
ISSR	: Inter simple sequence repeats
ITS	: Internal transcribed spacer
kg	: Kilogram
L	: Litre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
NaCl	: Sodyum klorür
NaOCl	: Sodyum hipoklorit
NCBI	: National center for biotechnology information
NFNB	: Net form net blotch
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDA	: Patates dekstroza agarı
Ptm	: <i>Pyrenophora teres</i> f. <i>maculata</i>
Ptt	: <i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i>
R²	: Belirleme katsayısı
RAPD	: Randomly amplified polymorphic DNA
RNA	: Ribonükleik asit
RPB2	: RNA polymerase II beta subunit
rpm	: Revolutions per minute
RT-PCR	: Revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
SFNB	: Spot form net blotch

sp. : Tür
spp. : Türler
SSR : Simple sequence repeat
TAE : Tris asetat EDTA
Tris-HCl : Tris (hidroksimetil) aminometan hidroklorür
TÜİK : Türkiye İstatistik Kurumu
v/v : hacim/hacim
µg : Pikogram



TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın her aşamasında bana rehberlik eden, bilgi ve deneyimiyle yoluma ışık tutarak desteklerini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Göksel ÖZER' e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmalarımın yürütülmesi sırasında bilgi birikimi ve yol göstericiliğiyle bana destek olan saygıdeğer hocam ve abim Doç. Dr. Mehmet Zahit YEKEN' e en içten teşekkürlerimi sunarım.

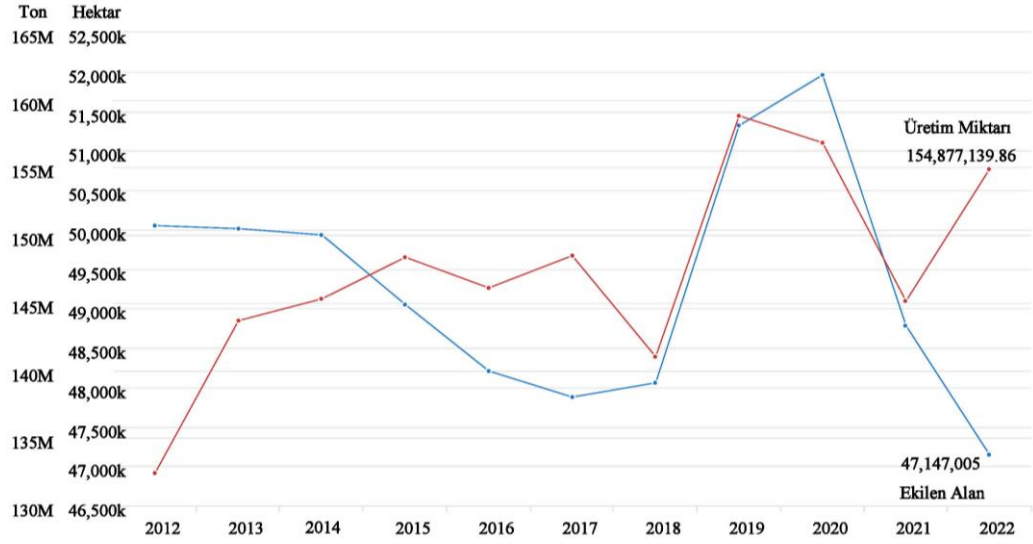
Laboratuvar çalışmalarında ekip ruhunu hissettiren ve bilimsel paylaşımlarıyla sürece katkı sağlayan kıymetli arkadaşlarım, Zir.Yük.Müh. Mehtap ALKAN ve Zir.Yük.Müh. Tuğba BOZOĞLU' na teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca maddi ve manevi her koşulda yanımda olan, sevgisini ve fedakarlığını esirgemeyen sevgili aileme; eğitimim boyunca verdikleri sonsuz destek, sabır ve anlayış için yürekten teşekkür ederim.

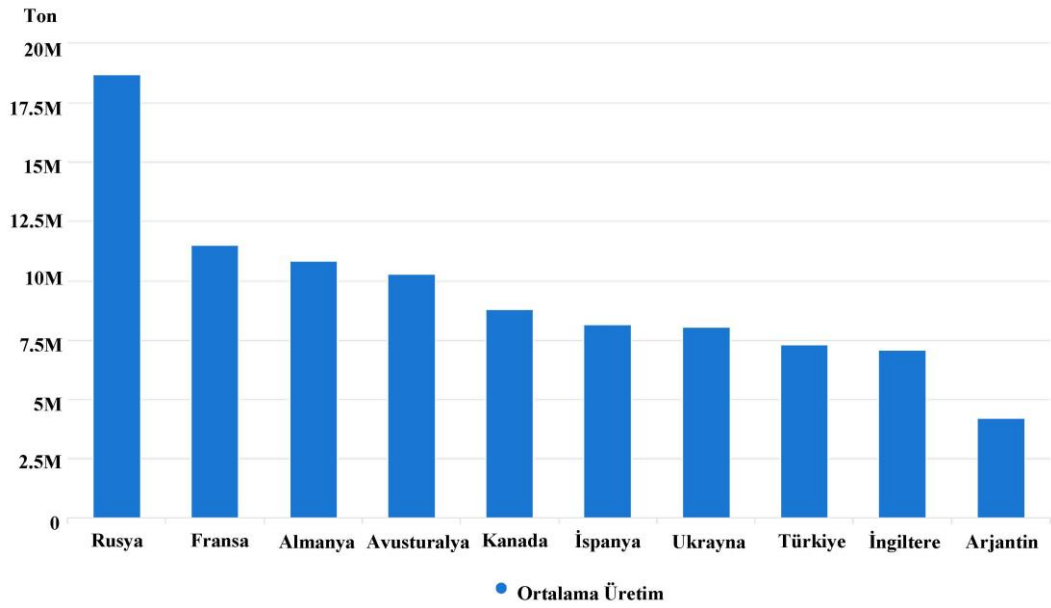
1. GİRİŞ

Poaceae familyası ve *Hordeum* cinsine ait olan arpa (*Hordeum vulgare* L.), dünyada tahıl üretiminde mısır, buğday ve çeltikten sonra dördüncü sırada yer almakta ve her yıl yaklaşık 150 milyon tonluk üretimiyle küresel tarımdaki önemini sürdürmektedir. Türkiye’ de ise buğdaydan sonra en fazla ekilişi yapılan serin iklim tahılı cinsi arpadır. Buğdaya kıyasla daha soğuk, kurak ve verimsiz topraklara adaptasyon göstererek geniş bir coğrafi dağılıma sahip olan arpa, besin değeri açısından da zengin bir tahıl olup, özellikle yüksek protein ve lif içeriği ile dikkat çekmektedir (Kün, 1996; Zohary vd., 2012). Ancak yüksek lif ve beta-glukan içeriği sindirimi zorlaştırmakta ve zayıf gluten yapısı, rengi ve tadı sebebiyle insan beslenmesinde oldukça sınırlı kalmaktadır. Bunun yanı sıra yemlik ve malt sanayii için ham madde kaynağı olarak büyük bir ekonomik öneme sahiptir.

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü’ nün (FAOSTAT, 2024) verilerine göre son yıllarda dünya genelinde arpa üretim miktarları değişiklik göstermektedir (Şekil 1.1). Özellikle Avrupa ve Avusturalya gibi önde gelen üretici ülkelerde istikrarlı bir durum söz konusuysen, Orta Doğu ve Afrika’da düşüşler gözlemlenmekte ve bunun sebebinin kuraklık ve su kısıtlamaları olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda en fazla arpa üretimine sahip olan ülkeler Şekil 1.2’ de verilmiştir. İlk on ülkenin yer aldığı sıralamada yaklaşık 18,5 milyon ton üretimle Rusya birinci sırada yer alırken, Türkiye yaklaşık 7,5 milyon ton ile sekizinci sırada yer almaktadır.



Şekil 1.1. 2012-2022 yılları arasında dünya arpa ekim alanı ve üretim miktarı istatistikleri



Şekil 1.2. 2012-2022 yılları arasında ortalama arpa üretiminin yapıldığı ilk 10 ülkenin istatistikleri

2022 yılında dünya üzerinde yaklaşık 47,1 milyon ha alanda 155 milyon ton arpa üretimi gerçekleşirken, AB %58,8 oranla bu üretimde en büyük pay sahibi olmuştur. Ülkeler bazında bakıldığında ise Rusya yaklaşık 23,4 milyon ton üretimle dünya toplam arpa üretiminin yaklaşık %15'ini karşılayarak ilk sırada yer almaktadır. Üretimde ikinci sırada 14,4 milyon ton (%9,2) ile Avusturalya yer

alırken, Türkiye’ nin ise yaklaşık 8,5 milyon ton (%5,4) ile altıncı sırada bulunmaktadır (FAOSTAT, 2024).

Türkiye’ de iklim değişikliği, tarım politikaları, pazar talepleri, su kaynaklarının yetersizliği, hastalık ve zararlı gibi faktörlerden dolayı arpa üretim, verim ve ekilen alanlarda yıllara göre dalgalanmalar yaşanmaktadır (Tablo 1.1). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2023 verilerine göre son yıllarda biralık ve diğer arpanın, üretim ve verim ortalamaları açısından en düşük seviyeleri 2021 yılında gerçekleşmiştir. 2022 yılında bir önceki yıla göre toplam arpa ekim alanlarında sadece %1 oranında artış görülürken, üretim oranı %47,8’ lik bir artış göstermiştir. 2023 yılında ise Türkiye’ de toplam tahıl üretimi yaklaşık 42,2 milyon ton olurken, toplam arpa üretimi bir önceki yıla göre %8,2 oranında artış göstererek yaklaşık 9,2 milyon ton olarak gerçekleşmiştir. Ekim alanları bir önceki yıla kıyasla %2,46 oranında artış gösterirken, verim değerlerinde ise %5,64 oranında bir artış gerçekleşmiştir (TÜİK, 2024).

Tablo 1.1. 2018-2023 yılları arasında Türkiye arpa ekim alanı, üretim miktarı ve verim değerleri

Türkiye Toplam Arpa Ekilen Alan (Dekar)			
Yıllar	Biralık	Diğer	Yeşil Ot
2018	1.336.640	24.782.763	255.517
2019	1.304.304	27.386.411	285.969
2020	1.925.254	29.046.371	313.189
2021	1.536.574	30.154.431	279.422
2022	1.138.704	30.856.172	292.728
2023	1.079.040	31.702.723	283.874
Türkiye Toplam Arpa Üretim Miktarı (Ton)			
Yıllar	Biralık	Diğer	Yeşil Ot
2018	400.000	6.600.000	416.963
2019	400.000	7.200.000	466.979
2020	600.000	7.700.000	537.066
2021	250.000	5.500.000	443.553
2022	400.000	8.100.000	482.665
2023	400.000	8.800.000	537.942
Türkiye Ortalama Arpa Verimi (kg/da)			
Yıllar	Biralık	Diğer	Yeşil Ot
2018	300	267	1.632
2019	307	264	1.633
2020	313	265	1.715
2021	173	187	1.587
2022	361	263	1.652
2023	371	278	1.895

Dünyada ve ülkemizde kültürü yapılan arpanın iki ve altı sıralı olmak üzere farklı formları mevcuttur. Bunlardan iki sıralı olan arpa çeşitleri malt sanayisinde kullanılırken, altı sıralı arpa daha çok hayvan yemi olarak tercih edilmektedir. Arkeolojik çalışmalar, kültür arpasının yaklaşık 10.000 yıl önce İsrail, Ürdün; Suriye ve batı İran' ı kapsayacak şekilde tanımlanan “Bereketli Hilal” bölgesinde, yabani atası olan *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* (C. Koch)' dan ıslah edildiğini göstermektedir (Bothmer ve Jacobsen, 1985; Badr vd., 2000; Pourkheirandish ve Komatsuda, 2007). Anadolu'da da binlerce yıldır ekimi yapılan arpanın gen merkezleri içerisinde Türkiye' de yer almaktadır (Kün, 1996).

Arpa bitkisi dünyada ve ülkemizde oldukça yaygın bir üretim alanına sahip olmasına rağmen verimi kısıtlayan ve önemli ürün kayıplarına neden olan birçok biyotik ve abiyotik stres faktörlerine maruz kalmaktadır. Abiyotik stres faktörleri kuraklık, sıcaklık, donma, ultraviyole, kuvvetli ışık, toprak tuzluluğu ve besin eksikliği gibi çevresel unsurları kapsamaktadır (Hirayama ve Shinoza, 2010). Biyotik stres faktörlerinin neden olduğu hastalıklar, böcekler ve yabancı otlar ile birlikte dünya genelinde bitkisel üretimde %31 ile %42 arasında değişiklik gösteren kayıplara neden olmakta ve bu oran gelişmiş ülkelere kıyasla gelişmekte olan ülkelerde daha yüksek seviyelerde görülmektedir (Agrios, 2005). Hastalıklar nedeniyle yaşanan verim kayıpları tarımsal sürdürülebilirlik ve gıda güvenliği açısından önemli bir tehdit unsuru olarak görülmektedir.

Biyotik hastalık etmenleri içerisinde tahıllar için en yaygın ve tahripkar olanları fungal hastalık etmenleridir. Bunlardan bazıları toprak altında taç ve kök çürüklüğüne sebep olurken, bazıları ise toprak üstü aksamda zarara sebep olarak verim ve kaliteyi olumsuz yönde etkilemektedir. Bu hastalık etmenlerinden yaygın olanların; *Fusarium* spp., *Bipolaris* spp., *Puccinia hordei*, *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*, *Rhynchosporium secalis* ve *Pyrenophora* spp. olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Singh, 2017; Saraç vd., 2019; Alkan vd., 2022).

Pyrenophora türleri içerisinde özellikle *Pyrenophora teres* (Sacc.) Drechsler, [anamorph: *Drechslera teres* (Sacc.) Shoemaker] arpada önemli bir yaprak hastalığı olan ağ benek hastalığının etmenidir. Patojen, *P. teres* f. *teres* ve *P. teres* f. *maculata* olarak adlandırılan iki forma sahiptir. Bunlar sırasıyla yaprakta ağ tipinde (net form net blotch = NFNB) ince, uzunlamasına kahverengi lezyonlar (Fotoğraf 1.1) ve nokta tipinde (spot form net blotch = STNB) klorotik bir haleyle çevrili, koyu kahverengi eliptik lezyon belirtilerine neden olmaktadır

(Smedegard Petersen, 1971). Ağ tipi belirtiler ilk başta nokta tipine benzerlik gösterse de zamanla hassas çeşitlerde ince koyu kahverengi çizgiler halinde gelişir ve bu çizgiler birleşerek yaprak yüzeyinde düzensiz desenler oluşturmaktadır (Mathre, 1982; McLean vd., 2009).



Fotoğraf 1.1. Ağ benek hastalığının arazi koşullarındaki belirtileri (a), kontrollü koşullardaki ilk belirtileri (b)

Türkiye Orta Anadolu bölgesinde yürütülen bir çalışmada hastalık etmeninin iki formu da tespit edilmiş olup yaygınlık oranları nokta tipinde %93,8 olarak görülürken, ağ tipi ise %6,2 olarak belirlenmiştir (Aktaş, 1997). Diğer bir çalışmada ise Damgacı (2014) ağ tipinin daha yaygın olduğunu tespit etmiştir.

Pyrenophora teres’ in hem eşeyli hem de eşeysiz üreme yeteneğine sahip olduğu ifade edilmiştir. Eşeysiz yaşam döngüsü, konidilerin rüzgar ve yağmur yoluyla yayılmasının yanı sıra patojenin tohumda miselyum olarak kışlamasını da içermektedir. Eşeyli üreme için ise patojenin zıt çiftleşme tiplerinin (MAT-1 ve MAT-2) konukçu üzerinde bir araya gelmesi gerekmektedir (Rau vd., 2005). Hasat sonrası artıklarda oluşan eşeyli üreme yapıları olan pseudotesyumlar da patojenin kış boyunca hayatta kalmasını sağlamakta ve sonrasında oluşan askosporlar veya tohum kaynaklı miselyum ve konidilerle primer enfeksiyona neden olmaktadır. Patojenin karmaşık bir üreme yapısının olması sonucunda genetik çeşitlilik ve patojenik varyasyonda oluşan artış, etmenin çevresel koşullara daha iyi uyum sağlamasına katkıda bulunmakta ve fungusitlere karşı hızlı bir şekilde dayanıklılık geliştirmesine yol açabilmektedir (Pütsepp vd., 2024).

Hastalığın neden olduğu verim kaybı genellikle %10 ila %40 oranında olmakla birlikte etmenin hastalandırma kabiliyeti, konukçunun hassasiyeti ve uygun çevre koşullarına göre bu oran %70' lere çıkabilmekte ve bütün ürünü de tehdit edebilmektedir (Oğuz vd., 2019; Abebe, 2021; Dahanayaka vd., 2021). Etmen yapraklarda oluşturduğu belirtilerin yanı sıra yaprak kını, gövde ve tanelerde de hasara neden olarak arpanın malthık ve yemlik kalitesini düşürmektedir (Mathre, 1997; Liu vd., 2011).

Ağ benek hastalığına karşı mücadelede fungusit uygulamaları, kültürel yöntemler ve konukçu direncini artırma gibi çeşitli stratejiler kullanılmaktadır. Sertifikalı ve sağlıklı tohumların kullanımı ile birlikte ekim nöbeti ve toprak işleme gibi uygulamalar, hastalığın primer inokulum kaynaklarını yok etmek için kullanılan temel yöntemler arasında yer almaktadır. Yeşil aksamda fungusit uygulamaları kimyasal mücadele ile hastalığı kontrol altında tutmayı mümkün kılarsa da bu yöntem ekonomik açıdan sürdürülebilir görülmemektedir. Uzun vadeli ve etkili bir kontrol için en iyi yol, dayanıklı çeşitlerin ekimi ve geliştirilmesidir (Mathre, 1997; Shipton vd., 1973). Ancak patojen popülasyonlarındaki yüksek genetik çeşitlilik ve varyasyon bu etmene karşı dayanıklı çeşit ıslahını zorlaştırmaktadır (Liu vd., 2011)

Hastalığın neden olduğu ekonomik kayıplar göz önünde bulundurulduğunda, riskleri azaltmak ve yönetmek için uygun mücadele stratejilerinin geliştirilerek hastalığın kontrol altında tutulabilmesi adına etmenin doğru ve hızlı bir şekilde tanımlanması kritik bir önem taşımaktadır.

Morfolojik karakterizasyon ve kültürel teknikler gibi geleneksel patojen tanımlama yöntemleri genellikle zaman alıcı, özgülükten yoksun ve uzman bağımlılığı yüksek olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca *P. teres*' in iki formunun yapraklardaki ilk belirtileri benzerlik gösterebilmekte olup aynı tarlada *Pyrenophora graminea* ve *Bipolaris sorokiniana*' nın da enfeksiyon zamanlarına göre *P. teres* belirtileri ile karıştırılabildiği gözlemlenmiştir (Tekauz ve Mills, 1974).

Moleküler tekniklerin gelişimi, patojen ayrımı için hızlı ve kesin bir yaklaşım sunmanın yanı sıra popülasyon genetiği, konukçu-patojen etkileşimlerinin analizi ve karantina uygulamaları gibi pek çok alanda geniş bir kullanım alanına sahip olmuştur. Bu teknikler, semptomlardan bağımsız olarak düşük düzeylerdeki

patojen tespitini sağlayabilmekte ve genetik çeşitliliğin belirlenmesine de imkan sunmaktadır.

Real-time PCR (RT-PCR), hedef DNA' nın hem kalitatif hem de kantitatif analizini gerçekleştirebilen bir yöntem olup, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artan floresan sinyalinin ölçülmesine dayanmaktadır. Bu teknikte diziye özgü probler veya diziye özgü olmayan floresan boyalar olmak üzere iki ana yaklaşım kullanılmaktadır. RT-PCR uygulamalarında bitki patojeni fungusların tespitinde en yaygın kullanılan boyalardan biri çift iplikli DNA' ya bağlanabilen SYBR Green I'dir. Bu teknoloji, polimerizasyon aşamasında hedef DNA çift sarmal hale geldikçe boyanın bağlanma miktarı artarak floresan sinyalinin güçlenmesine yol açmaktadır. Ayrıca, klasik PCR' a kıyasla daha hızlı ve hassas sonuç veren RT-PCR yöntemi, eş zamanlı izleme imkanı sağlaması ve sonuç almak için ek bir tekniğe ihtiyaç duyulmaması gibi avantajlarıyla öne çıkmaktadır (Schaad ve Frederick, 2002; Schena vd., 2004). Bu avantajları sayesinde, RT-PCR yöntemi çeşitli bitki patojenlerinin tespiti için yaygın ve etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Alkan vd., 2022; Bayraktar vd., 2016; Chen vd., 2013; Jimenez-Fernandez vd., 2011; Özer ve Bayraktar, 2019; Poudel vd., 2017; Tooley vd., 2006).

1.1 Arpa Hastalıkları Hakkında Genel Bilgiler

Türkiye' de arpa hastalıkları ile ilgili yürütülen bazı çalışmalar aşağıda yer almaktadır.

Aktaş (1987), Orta Anadolu Bölgesi' nde yapmış olduğu çalışmada 109 tarlanın 79' unda *P. teres* tespit etmiş ve hastalık yoğunluğunu %13,4 olarak belirlemiştir.

Çelik ve Oğuz (2012), Eskişehir' de farklı ilçelerden 121 arpa tarlası örneklemişler ve bunların 114' ünde ağ benek (*P. teres*), 108' inde yaprak yanıklığı (*R. secalis*), 59' unda çizgili yaprak lekesi (*P. graminea*), 33' ünde kahverengi pas (*Puccinia hordei*), 11' inde külleme (*E. graminis* f. sp. *hordei*), 9' unda kara pas (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) ve 4' ünde rastık (*Ustilago* spp.) hastalığına rastlamışlardır. İlçeler bazında bakıldığında ise sörvey gerçekleştirilen 13 ilçenin tamamında *P. teres*, *R. secalis* ve *P. graminea* tespit edilmiştir.

Damgacı (2014), 2008-2013 yıllarında Türkiye’ de 504 arpa tarlasında yaptığı sörveyler sonucunda %51,2 oranında ağ benek hastalığı tespit etmiş ve en yüksek oranın %80,2 ile Trakya bölgesinde olduğunu vurgulamıştır.

Ankara’ nın Bala ilçesinde yürütülen bir çalışmada 50 adet arpa tarlasında inceleme yapılmış ve yaygınlıkları sırasıyla olacak şekilde *P. teres* f. *maculata*, *P. teres* f. *teres*, *P. graminea*, *R. secalis* ve *E. graminis* f. sp. *hordei* etmenleri tespit edilmiştir (Ertürk vd., 2018).

Ankara’ nın Çubuk ilçesinde yürütülen diğer çalışmada da benzer şekilde 18 arpa tarlasında *P. teres* f. *teres*, *P. teres* f. *maculata*, *P. graminea*, *R. secalis*, *E. graminis* f. sp. *hordei*, *Puccinia striiformis*, *P. hordei* ve *P. graminis* f. sp. *tritici* tespit edilmiştir (İlgen vd., 2017).

Kırıkkale ilinde yapılan bir çalışmada 128 arpa tarlasında görülen yaprak hastalıkları ve çeşitli pas hastalıkları morfolojik olarak tespit edilerek ekim alanlarındaki rastlanma oranları ve olumsuz etkileri vurgulanmıştır. Hastalıkların yaygınlık oranları ortalama %5,63 *P. teres* f. *maculata*, %1,77 *P. teres* f. *teres*, %0,35 *P. graminea*, %4,37 *R. secalis*, %0,53 *E. graminis* f. sp. *hordei*, %0,06 *P. striiformis*, %0,47 *P. hordei* ve %0,03 *P. graminis* f. sp. *tritici* olarak tespit edilmiştir (Özdemir vd., 2017).

Saraç vd. (2019), Elazığ ilinde yürütmüş olduğu çalışmada 42 arpa tarlasının 23’ ünde *P. teres* f. *maculata*, 21’ inde *P. teres* f. *teres*, 19’ unda ise *R. secalis* yoğunlukta olmak üzere çeşitli yaprak hastalıkları tespit etmiştir.

Seidi vd. (2019), Edirne’ de yürüttüğü çalışmada arpa tarlalarında birçok yaprak hastalığı gözlemlenmiştir. En yaygın olarak *P. teres*’ in neden olduğu ağ benek hastalığı görülmüş ve onu *R. secalis* takip etmiştir. Bunların yanı sıra külleme (*E. graminis* f. sp. *hordei*), arpa kahverengi pası (*P. hordei*) ve Bipolaris yaprak lekesi (*B. sorokiniana*) hastalıkları da saptanmıştır.

Yukarıda verilen literatür bulguları ülkemizde arpa üretimi yapılan alanlarda hastalık çeşitliliğinin yüksek olduğunu ve ağ benek hastalığının yaygınlık gösterdiğini açıklamaktadır.

1.2 *Pyrenophora teres*’ in Taksonomisi ve Genel Özellikleri

Pyrenophora teres ağ benek hastalığının etmeni olup dünya çapında arpa ekimi yapılan tüm bölgelerde önemli ekonomik kayıplara sebep olabilen bir hastalık olarak ortaya çıkmıştır (Shipton vd., 1973). Bunun yanı sıra buğday

(*Triticum aestivum* L.), yulaf (*Avena sativa* L.), *Agropyron*, *Bromus*, *Elymus*, *Hordelymus*, *Stipa* ve diğeri *Hordeum* türleri gibi çeşitli cinslerden bitkileri de etkileyebilmektedir (Tomic vd., 2024).

Patojen; Fungi aleminden Ascomycota şubesine bağlı Pezizomycotina alt şubesi, Dothideomycetes sınıfı, Pleosporales takımı, Pleosporaceae familyasında yer almaktadır. *Pyrenophora* cinsinin 135 türü bulunmakta olup özellikle arpa ana konukçusu olarak kabul edilmektedir. Arpa hastalıkları içerisinde yer alan yaygın *Pyrenophora* türleri; *P. graminea*, *P. japonica* ve *P. teres* olarak bilinmektedir (Backes vd., 2021).

Pyrenophora teres benzer morfolojilere sahip fakat farklı hastalık belirtileri oluşturan ağ ve nokta formu olmak üzere iki farklı tipe sahiptir. *Pyrenophora teres* f. *teres* ağ tipi uzun kahverengi lezyonlar şeklinde belirtiler gösterirken, *P. teres* f. *maculata* nokta tipinde belirli klorotik alanla çevrili oval, koyu kahverengi lezyonlar şeklinde belirtilere neden olmaktadır (Smedegard-Petersen, 1976; Backes vd., 2021).

Rau vd. (2007) bu iki formun morfolojik olarak benzer olsa da genetik olarak farklılığını öne sürerek iki formun hastalandırma kabiliyeti ve konukçu direnci bakımından ayrı ayrı ele alınması gerektiğini belirtmiştir.

Pyrenophora teres' in doğada hem eşeyli hem de eşeysiz olarak çoğalabildiği fakat eşeyli üremenin patojenin genetik değişikliğine daha çok katkı sağladığı bilinmektedir (Backes vd., 2021). Eşeyli üreme için, patojenin MAT-1 ve MAT-2 çiftleşme tiplerinin konukçu üzerinde bir araya gelmesi gerekmektedir (Rau vd., 2005). Bunun sonucunda patojenin genetik çeşitliliği ve patojenik varyasyonunun artmasıyla birlikte adaptasyon yeteneğinin de gelişmesi söz konusudur. Bu şekilde karmaşık bir üreme sistemine sahip olan patojen popülasyonlarının, olumsuz koşullara karşı hızlı bir şekilde adapte olması beklenmektedir (McDonald vd., 2002).

Pyrenophora teres f. *teres*; arpa bitkilerinin yaprak, yaprak kılıfı sap ve tanelerini enfekte edebilmektedir fakat esas olarak yaprak belirtileri hastalığını tanımlamaktadır. Patojen, yaprak yüzeyinde doğrudan penetrasyon gerçekleştirmekte ve 24 saat içerisinde penetre edilen bölgede dairesel ve eliptik olmak üzere lezyonlar görülmektedir. Zamanla yaprak damarı boyunca dikey olarak büyüyen lekeler koyu kahverengi lezyonlara dönüşmektedir. Symptom yoğunluğu patojenin hastalandırma kabiliyetine, konukçu genotipine ve çevresel

koşullara bağlıdır. Hassas çeşitlerde lezyonların çevresi klorotik alanlar içerebilirken, dayanıklı çeşitlerde ise belirtiler nokta benzeri lezyonlarla sınırlı kalabilmektedir (Liu vd., 2011).

Patojenin yaşam döngüsü, onun biyotrof, nekrotrof veya hemibiyotrof olarak sınıflandırılmasına olanak tanımaktadır. Enfeksiyon süreci boyunca patojen iki ana gelişim evresinden geçmektedir. İlk aşama biyotrofik ve asemptomatik olup, epidermal hücrelere nüfuz etme ve mezofil dokusunda yayılma özellikleri ile tanımlanmaktadır. İkinci aşama ise birkaç gün sonra başlar ve patojenin nekrotrofik evreye geçtiğini gösteren kloroz ve nekroz belirtilerinin ortaya çıkmasıyla kendini belli etmektedir (Kumari vd., 2023; Tomic vd., 2024).

Yapılan araştırmalar sonucunda etmenin uygun sıcaklık ve nem koşulları sağlandığında enfekteli bitki artıkları üzerinde pseudotesyum oluşturarak ve tohum embriyosunda miselyum olarak kışlama halinde hayatta kalabildiği hem tarla hem de laboratuvar koşullarında gözlemlenmiştir (McLean vd., 2009). Pseudotesyum oluşumu için ideal sıcaklık 10-15°C olarak tespit edilmiştir (Shipton vd., 1973). Oluşan askokarp yapılarının içerisinde 30-61 μm ×180-274 μm boyutlarında askus ve her askusun da 18-28 μm ×43-61 μm ebatlarında genellikle üç veya dört enine septalı olacak şekilde sekiz adet açık kahverengi askosporlar içerdiği belirtilmiştir (Liu vd., 2011).

McLean vd. (2009), askosporların rüzgar veya yağmur yoluyla yayılarak primer enfeksiyonu sağladığını, konidilerin ise primer enfeksiyondan 14-20 gün sonra oluşarak sekonder enfeksiyonlara sebep olup uygun koşullarda primer enfeksiyonda da rol alabildiğini ifade etmiştir. Konidiler, konidioforların üzerinde tek başlarına veya ikili ya da üçlü gruplar halinde 30-174 μm ×15-23 μm boyutlarında pürüzsüz, silindirik ve düz, sarımsı kahverengi renkte oluşmaktadır. Bağıl nem, sıcaklık, yaprak ıslaklığı gibi çevresel faktörler uygun olduğu sürece bitkinin yetiştirilme dönemi boyunca hastalık şiddetini arttıracak şekilde döngü tekrarlanabilmektedir.

Smedegard-Petersen (1972), yaygın olmamasına rağmen hem konukçu üzerinde hem de kültür ortamında *P. teres*' in piknit ve piknidiosporlarını gözlemlenmiştir. Patojenin piknitlerinin küresel veya armut gibi farklı şekillerde, sarımsı kahverengi renkte 64-172 μm boyutlarında olduğu, piknidiosporlarının ise 0-1,9 μm ×1,4-3,2 μm ölçülerinde, septasız, küresel veya elipsoid şekilli olarak gözlemlendiği ifade edilmiştir (Liu vd., 2011). Jordan (1981) arpa yapraklarını

piknidiosporlar ile inoküle etme girişiminde bulunmuş fakat başarısız olmuştur. Bu sebeple piknidiosporların etmenin yaşam döngüsündeki rolü anlaşılamamıştır.

1.3 *Pyrenophora teres* ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

Smedegard-Petersen (1971), *P. teres*' in morfolojik olarak ayırt edilemeyen iki formu için *P. teres* f. *teres* (*Ptt*) ağ tipi ile *P. teres* f. *maculata* (*Ptm*) nokta tipi olarak ayrımlarını önermiş ve bu durum yaygın olarak kabul edilmiştir.

Patojen ve arpa arasındaki etkileşim, konukçu direnci, patojenin hastalandırma kabiliyeti ve çevre koşulları gibi çeşitli faktörlerden etkilendiği için karmaşık bir yapıya sahiptir. *Pyrenophora teres* popülasyonları içerisinde yapılmış olan kapsamlı çalışmalar eşeysiz üremenin baskın olduğunu ve güçlü allelik ilişkilere sahip sınırlı sayıda genotipe yol açtığını ortaya koymuştur (Leišová vd., 2005; Bouajila vd., 2013). Ancak bununla birlikte eşeyli üremenin de gerçekleşerek genetik çeşitliliğe katkıda bulunduğunu, çevresel değişikliklere olan adaptasyonu arttırarak hastalandırma kabiliyetini de yönde etkilediği ve böylelikle konukçu direncini kırmada kritik bir role sahip olduğu tespit edilmiştir (Rau vd., 2007; Oğuz vd., 2018; Dokhanchi vd., 2021). Hem eşeyli hem de eşeysiz üreme gerçekleştirebilen organizmaların gen aktarımlarıyla yüksek mutasyon oranlarına sahip olabileceği düşünülmektedir (McDonald ve Linde, 2002). Bu tip patojenler tarımsal üretimde hastalıklarla savaşım açısından endişe verici sonuçlar doğurabilmektedir.

Pyrenophora teres' in patotipik varyasyonu ile ilişkili ilk rapor Pon (1949) tarafından yayınlanmıştır. Pon çalışmasında izolatların farklı çeşitler üzerinde farklı hastalandırma kabiliyetlerine sahip olduğunu belirtmiştir. Farklı patotiplerin yaygınlığı ve varyasyonları çoğunlukla konukçulardan etkilenmekte ve yaygınlıkları coğrafi koşullara göre değişebilmektedir. Hem patojenin hem de konukçunun genetiği zaman içinde değişkenlik gösterdiği için konukçu direncini korumak oldukça güç olmaktadır. Sonrasında yapılan birçok çalışmada patojenik varyasyonun olduğunu doğrulanmıştır (Khan ve Boyd, 1969; Tekauz 1990; Tekauz Mills 1974; Arabi vd., 2003; Cromey ve Parkes 2003; Tuohy vd., 2006; Jebbouj ve El Yousfi 2010; Boungab vd., 2012; Liu vd. 2012; Akhavan vd., 2016; Wallwork vd., 2016).

Arpada ağ benek hastalığı ile ilgili ilk derleme Shipton vd. (1973) tarafından yayınlanmıştır. Çalışma; hastalığın önemi, gelişimi, dağılımı ve konukçu-patojen ilişkilerine dair önemli bilgiler içermekte olup sonraki araştırmalar için de referans niteliği kazanmıştır.

İnokulasyon sonrasında 24-48 saat gibi kısa bir sürede semptomların görülmeye başlanması patojen tarafından salgılanan toksinlerin etkisine bağlanmaktadır (Tomic vd., 2024). *Pyrenophora teres* tarafından toksin salgılanmasına yönelik ilk bulgular Smedegard-Petersen (1977) tarafından rapor edilerek bunlara toksin A ve toksin B adı verilmiştir. Bundan kısa bir süre sonra Bach vd. (1979) tarafından toksin C olarak adlandırılan yeni bir toksin daha keşfedilmiştir ve bu toksinin *P. teres* kültüründe salgılanan ana toksin olduğu anlaşılmıştır (Friis vd., 1991).

Kanada’ da 1974 yılında yapılan bir çalışmada dört arpa hattından oluşan bir diferansiyel set kullanılmış ve *P. teres* için üç biyotip tanımlanmıştır (N-tipi, VN-tipi, S-tipi). Biyotiplerden iki tanesi *Ptt*’ nin sebep olduğu NFNB’ ye karşılık gelirken, diğeri ise SFNB’ ye karşılık gelmiştir. Aynı zamanda ağ formu ve nokta formu izolatlarına karşı çeşitler arası gösterilen direnç farklılıkları tespit edilmiştir (Tekauz ve Buchannon 1977).

Tekauz (1978), daha önce tanımlanmış olan biyotiplerin dağılım ve sıklığını belirlemeyi amaçlamıştır. 114 tarlada gerçekleştirdiği çalışmada iki sıralı arpa tarlalarının (44 tarla) hepsinde ve altı sıralı arpa tarlalarının (70 tarla) %61’ inde etmenin ağ formu tespit edilirken, nokta formunun görülme sıklığı yalnızca %3 oranında olmuştur. Ayrıca her biyotipin dağılımı iller bazında farklılık göstermiştir.

1985 yılında Batı Kanada’ da 219 farklı arpa tarlası örneklenmiş ve 219 izolat toplanmıştır. 12 farklı arpa hattından oluşan bir diferansiyel set kullanılarak yapılan analizler sonucunda izolatların %82’ sini ağ formunun oluşturduğunu ve hatların fenotiplerine dayalı olarak ise 45 patotipe ayrılabilirdiği ifade edilmiştir. Bu durumla birlikte patojen popülasyonunda yüksek düzeyde bir çeşitlilik olduğu vurgulanmıştır (Tekauz, 1990).

Steffenson ve Webster (1992), yaptığı çalışmada farklı patotiplerin mevcut olduğunu ve bunların arpa çeşitleri üzerinde farklı etki derecelerine sahip olduğunu belirtmiştir. Belirli arpa çeşitlerinin ise bazı patotiplere karşı daha dirençli olduğunu ortaya koyarak tarımsal uygulamalarda dayanıklı çeşitlerin kullanılmasının önemini ifade etmiştir.

Grewal vd. (2008) yürüttüğü çalışmada, Avustralya, Kanada ve farklı kaynaklardan elde edilen 42 arpa hattının Kanada' dan sağlanan 4 nokta tipi ve 6 ağ tipi *P. teres* izolatına karşı reaksiyonları incelenmiş ve ağ tipi izolatlarının nokta tipine göre daha virülens olduğunu bildirmiştir.

Karakaya vd. (2015), Türkiye' nin Eskişehir, Diyarbakır ve Sivas illerinden izole edilen üç *Ptt* izolatına karşı 25 adet arpa çeşidinin fide dönemi reaksiyonlarını incelemiştir. En duyarlı çeşitler olarak Bülbül 89 ve İnce 04 tespit edilmiş ve bunları sırasıyla Çıldır 02, Özdemir 05 ve Hamidiye 85 çeşitleri takip etmiştir. En dayanıklı çeşit olarak Harman çeşidi bulunmuş ve bunu Lord, Yerçil 147, Erginel 90, Bilgi 91, Ünver ve Aydanhanım çeşitleri izlemiştir. İzolatlar arasında virülens farklılıkları gözlemlenirken Diyarbakır' dan elde edilen izolatın en agresif olduğu görülmüştür.

Akhavan vd. (2016), Batı Kanada' dan 39 *Ptt* ve 27 *Ptm* izolatı elde etmiş ve bunların hastalandırma kabiliyetlerini diferansiyel set kullanarak incelemiştir. Küme analizleri sonucunda izolatlardan sırasıyla 16 ve 13 farklı patotip grubu tespit etmiştir. Sonuçlar CI 5791 ve CI 9820 arpa diferansiyel hatlarının *Ptt* izolatına karşı, CI 9214 diferansiyel hattının ise *Ptm* için dirençli olduğunu göstermiş ve Kanada' nın arpa ıslah programları için potansiyel direnç kaynaklarına sahip olduğunu ortaya koymuştur.

Oğuz vd. (2019) Türkiye' nin farklı bölgelerinden elde edilen *Ptt* ve *Ptm* izolatlarının genetik çeşitliliğini inter-simple sequence repeat (ISSR) markör sistemini kullanarak incelemiştir. Sonuçlarda *Ptm* izolatlarının genetik benzerlik oranı *Ptm* izolatlarına göre daha düşük düzeyde tespit edilmiştir. Coğrafi bölgelere göre net bir ayrım olmamakla birlikte *Ptt* popülasyonlarının lokasyonlara göre daha çok kümелendiği gözlemlenmiştir. Türkiye' de *P. teres* popülasyonları üzerine ilk kez yapılmış olan bu çalışmanın hastalığın kontrol stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacağı vurgulanmıştır.

2020 yılında *Ptm* patotiplerini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, 22 adet uluslararası çeşit ve genotipten oluşan diferansiyel set ile Türkiye' de duyarlı çeşit olarak bilinen Bülbül 89, Türkiye' nin farklı bölgelerinden elde edilen 45 izolat kullanılarak test edilmiştir. Toplamda 45 izolattan 19 adet patotip belirlenmiş ve bu setin *Ptm* patotiplerini belirlemek için kullanılabileceği tespit edilmiştir (Beishenkanova vd., 2020).

Araya vd. (2022)' nin yürütmüş olduğu çalışmada Türkiye' nin farklı bölgelerini temsilen 38 adet iki sıralı arpa çeşidi ile Bülbül 89 ve Avcı 2002 çeşitlerinin fide döneminde *Ptm*' nin iki izolatına karşı gösterdiği reaksiyonlar değerlendirilmiştir. Diyarbakır' dan temin edilen 33 numaralı yerel çeşit patojene karşı yüksek dayanıklılık gösterirken, Bilecik-Söğüt' ten elde edilen 10 numaralı yerel çeşit ve Bülbül 89 çeşitleri en duyarlı olarak bulunmuştur. Diğer yerel çeşitlerin çoğu "orta derecede dayanıklı-orta derecede duyarlı" ile "orta derecede duyarlı-duyarlı" arasında sınıflandırılmıştır. 33 numaralı yerel çeşidin ağ benek hastalığının ağ formuna karşı dayanıklı çeşit ıslahında genetik potansiyel taşıdığı belirtilmiştir.

1.3.1 Moleküler Çalışmalar

Çalışmalar *Ptm* ve *Ptm*' nin genetik olarak izole olduğunu ve iki farklı tür olarak değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamıştır (Ellwood vd., 2012; Rau vd., 2007). Her iki *P. teres* formunun da doğru bir şekilde tanımlanabilmesi için çeşitli polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tabanlı primerler geliştirilmiştir.

1994 yılında Peever ve Milgroom random amplified polymorphic DNA (RAPD) markörlerini geliştirmiş, Almanya, ABD ve Kanada' dan elde ettiği beş adet *Ptt* popülasyonunun genetik çeşitliliğini incelemiştir. Sonrasında *P. teres* üzerine yapılan birçok RAPD çalışması aynı şekilde polimorfizmleri belirlemek (Peltonen vd., 1996; Johnsson vd., 2000; Campbell vd., 2002; Bakonyi ve Justesen, 2007) veya patojene özgü spesifik PCR primerleri geliştirmek (Taylor vd., 2001; Williams vd., 2001) amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Williams vd. (2001) *Ptm* ve *Ptm*' yi ayırt edebilmek için RAPD tabanlı özel bir primer seti geliştirmiştir. Keiper vd. (2008) dokuz adet diagnostik simple sequence repeats (SSR) markörü, Lu vd. (2010) ise çiftleşme tipine spesifik tek nükleotid polimorfik primerler geliştirmiştir. Bu primerler *P. teres*' in formlarını birbirinden ayırt edebilmek amacıyla tasarlanmıştır.

Zhang ve Berbee (2001), internal transcribed spacer (ITS) bölgesi ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (*GAPDH*) primerlerini kullanarak *P. teres* filogenetiğinin anlaşılmasına ve patojenin taksonomisine önemli ölçüde katkıda bulunmuşlardır. Çalışma, yapılan morfolojik sınıflandırmaların moleküler verilerle desteklenmesinin önemini vurgulamıştır. Martin-Felix vd. (2019) *Pyrenophora* türlerini teşhis etmek için başta ITS, *GAPDH* ve RNA polimerase II second largest

subunit gene (*RPB2*) olmak üzere farklı gen gruplarının çalışılması gerektiğini ileri sürmüştür.

Bates vd. (2001), arpa tohumlarında farklı *Pyrenophora* türlerinin neden olduğu enfeksiyonların doğru ve hızlı bir şekilde tespitini sağlamak amacıyla RT-PCR yöntemi geliştirmiştir. Primerler, *Pyrenophora* türlerinin ITS bölgeleri sekans verileri temelinde geliştirilmiştir. SYBR Green I teknolojisi kullanılarak enfekteli tohumlardan pikogram düzeyinde patojen DNA' sı saptanmıştır ve sonuçlar agar plaka testi ile uyumlu çıkmıştır. Fakat bu tekniğin agar plaka testine göre oldukça hızlı ve daha pratik bir yöntem olduğu vurgulanmıştır. Aynı yıl Bates ve Taylor (2001), *P. teres* ve *P. graminea*' nın arpa tohumlarında tespiti için RT-PCR yöntemi geliştirmişlerdir. Kantitatif PCR ile Sorption ARMS (amplified refractory mutation system) teknolojilerini birleştirerek tek bir nükleotid farklılığı esas alınmış ve iki patojen ayırt edilebilmiştir. Bu yöntem ile her iki patojenin de enfeksiyon seviyeleri hızlı ve doğru bir şekilde tespit edilerek, hastalıkla mücadele stratejileri için verilecek kararları desteklemektedir. Bu teknolojik yaklaşımla daha önce *P. teres* ve *P. graminea* ayırımı için iki farklı yanıt gerekirken artık tek bir reaksiyonla bunun sağlanabildiği ortaya konulmuştur.

Rau vd. (2003) İtalya' da beş bölgeden 150 adet *P. teres* izolatu toplamış ve morfolojilerine dayanarak %45' ini ağ formu, %55' ini ise nokta formu olarak ayırmıştır. Sonrasında AFLP (amplified fragment length polymorphism) primerleri kullanılarak ayrımlar doğrulanmıştır. Formlar arası ortak bantların azlığı ve ara genotiplerin yokluğu sebebiyle çalışmanın yapıldığı tarla koşullarında iki form arasındaki melezleşmenin nadir olduğu veya hiç olmadığı belirlenmiştir. Bu çalışma ile AFLP analizinin *P. teres* için teşhis amaçlı olarak kullanılabilirliği ortaya konmuştur.

Leisova vd. (2005), *P. teres*' in formlarını ve *P. teres* ile *P. graminea*' yı ayırabilmek için AFLP analizini esas alan yeni primerler geliştirmiştir. Gerçekleştirilen çalışmada 33 primer çifti ile çeşitli *Pyrenophora* türleri ve *B. sorokiniana* izolatları incelenmiş ve her iki *P. teres* formuna özgü primerler başarıyla geliştirilmiştir. Leisova vd. (2006) yine başka bir çalışmada *P. teres*' in iki formunu ayrı ayrı tespit edebilecek ve miktarını belirleyecek şekilde gerçek zamanlı PCR sistemi geliştirmiştir. Çalışma için spesifik TaqMan MGB primerleri ve problemleri tasarlanmıştır. Ct (cycle threshold) değerleri ile erken enfeksiyon

aşamasındaki semptom alanlarının büyüklüğü arasında $R^2 = 0,52$ korelasyon değeri elde edilmiştir.

Serenius vd. (2007), Kuzey Avrupa, Kuzey Amerika, Rusya ve Avustralya' dan izole edilen 278 *P. teres* izolatının genetik yapılarını, formlarının oluşumunu ve çiftleşme tiplerini incelemiştir. Bütün bölgelerden gelen *Ptt* izolatları arasında yapılan AFLP analizleri sonucunda yüksek genetik farklılaşma tespit edilmiştir. Avusturalya eyaletleri arasında tespit edilen *Ptt*' nin *Ptm* izolatlarından daha yüksek bir genetik varyasyon gösterdiği saptanırken, eyaletler içindeki lokasyonlar arasında böyle bir farklılık görülmemiştir. MAT1 ve MAT2 çiftleşme tiplerinin ikisi de Avustralya ve Finlandiya bölgelerinde eşit derecede yaygın görülürken, Rusya' nın Krasnodar şehrinde yalnızca MAT2 tipi tespit edilmiştir. Bu sonuçlar etmenin eşeyli üremesinin, formlarının oluşumunun ve coğrafi bölgeler arasındaki genetik çeşitliliğinin farklılık gösterebildiğini ortaya koymuştur.

Lehmensiek vd. (2010)' nin yapmış olduğu çalışmada, Avusturalya ve Güney Afrika' da bulunan *Ptt* ve *Ptm* izolatlarının genetik çeşitliliği ve popülasyon yapısı AFLP analizi ile incelenmiştir. *Pyrenophora tritici-repentis*, *Exserohilum rostratum* ve *B. sorokiniana* örnekleri de karşılaştırmak amaçlı analizlere dahil edilmiştir. Yapılan küme analizleri sonucunda *Ptt* ve *Ptm* izolatlarının iki farklı genetik grup oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu bölgelerde bulunan *Ptt* ve *Ptm* popülasyonlarında eşeyli üreme olasılığının düşük olduğu ve ağırlıklı olarak eşeysiz üremenin gerçekleştiği saptanmıştır.

Suriye ve Tunus' ta yürütülen çalışmada AFLP primerleri kullanılarak *Ptt* popülasyonları arasındaki genetik varyasyonlar incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda popülasyonların farklı seviyelerde genetik çeşitlilik gösterdiği ve bazılarının daha yüksek polimorfizme sahip olduğu saptanmıştır. Moleküler varyans analizleri genetik varyasyonun çoğunlukla popülasyonlar içindeki farklılıklardan ziyade, popülasyonlar arasındaki farklılıklardan oluştuğunu ortaya koymuştur (Bouajila vd., 2013).

McLean vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada, Avusturalya' nın farklı bölgelerinden izole edilen 60 *Ptm* izolatının, 16 arpa hattından oluşan ve yakın zamanda geliştirilen nokta formuna özgü diferansiyel setine karşı reaksiyonu araştırılmıştır. Toplamda 12 arpa hattı izolatlarına karşı çeşitli tepkiler gösterirken 33 farklı patotip grup saptanmış ve önemli oranda patojenik çeşitlilik gözlemlenmiştir. *Pyrenophora teres* f. *maculata* izolatları ile üç adet *Ptt* izolatı üzerinde AFLP

analizleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen bantların %40' ının polimorfik olduğu saptanmıştır. Sonuçlardan yola çıkılarak her izolatin özgün bir genotipi temsil ettiği ve iki form arasında doğal yolla eşeysel rekombinasyonun meydana gelmiş olabileceği öne sürülmüştür.

Daha önceki çalışmalarda *Ptt* ve *Ptm*' nin tanımlanması ve hibritlerinin karakterize edilmesi için PCR tabanlı markörler geliştirilmiştir (Keiper vd. 2008; Williams vd. 2001). RAPD ve AFLP teknikleri de *P. teres* hibritlerini tanımlamak amacıyla kullanılmıştır (Campbell vd., 1999, 2002; McLean vd., 2014). Ancak bu iki teknik de zahmetli ve zaman alıcı olarak değerlendirilmiş (Penner vd., 1993; Pereira vd., 2008) ve tam anlamıyla başarılı sonuçlar elde edilememiştir. Poudel vd. (2017) *P. teres*' in farklı formları ve bunların hibritlerine özgü primerler geliştirmiş ve özgüllüklerini Avustralya ve Güney Afrika' dan elde edilen çok sayıda izolat kullanarak doğrulamıştır. Bu primerler, *Ptt* için 70 ila 190 bp arasında ve *Ptm* için 140 ila 280 bp arasında değişen DNA amplikon üretmiştir.

Poudel vd. (2019) *P. teres* formları arasındaki hibridizasyonu incelemek amacıyla, Avustralya'da yetiştirilen hassas arpa çeşitlerine *Ptt* ve *Ptm* izolatlarını inoküle etmiştir. Çalışmada 317 *P. teres* izolatu ile enfekte dokulardan alınan 822 konidi ve 223 askospor, patojene özgü 12 farklı PCR markörü kullanılarak analiz edilmiştir. Hiçbir izolatin hibrit olmadığı tespit edilmiştir. Sonuçlar, iki form arasında eşeyli üremenin sık gerçekleştiğini ancak Avustralya' daki arpa yetiştirme alanlarında bu durumun tarla koşullarında nadiren görüldüğünü ortaya koymuştur.

Dokhanchi vd. (2021) İran' da bulunan *P. teres* popülasyonlarının çiftleşme tiplerini, genetik çeşitliliğini ve bir eşeyli üreme döngüsünün olup olmadığını belirlemeyi amaçlamıştır. Tarlalardan temin edilen 118 *P. teres* izolatının genetik çeşitliliği ISSR analizi ile araştırılmıştır. Analiz sonucunda *Ptt* izolatları arasında %70,83, *Ptm* izolatları arasında ise %63,89 oranında polimorfizm olduğu belirlenmiştir. Daha önceki verilerle birlikte ele alındığında örnekleme yapılan alanların çoğunda *P. teres*' in düzenli eşeysel rekombinasyon döngülerine girme potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Tini vd. (2022) İtalya' da iki yıl süreyle yürüttüğü çalışmada *Ptt*' nin yönetim stratejilerini incelemiştir. Farklı arpa çeşitlerinde *Ptt*' nin patojen formu ve biyokütlesi RT-PCR ile tespit edilerek hastalığın kontrol stratejilerinden olan fungusitlerin etkinliği değerlendirilmiştir. Araştırmada maltlık olarak üretilen arpa

eşitlerinin hastalığa karşı daha hassas olduğu ve fungusit uygulamalarının patojen birikimini azaltmada etkili olduğu belirlenmiştir.

Lhadj vd. (2022) Cezayir’ de yürüttüğü çalışmada 61 adet *P. teres* izolatu elde etmiş ve SNP primerleri kullanarak bunları formlarına ayırmıştır. Analizler sonucunda izolatların %57,38’ inin *Ptm*, %42,62’ si ise *Ptt* olduğu tanımlanmıştır. Popölasyondaki genetik çeşitliliği ve ilişkileri incelemek amacıyla ise ISSR primerleri kullanılmıştır. Benzerlik oranları *Ptt* ve *Ptm* popölasyonlarında sırasıyla 0,60 ve 0,63 olarak belirlenmiş ve sonuçlar her iki popölasyonun da eşeyli olarak çoğaldığını fakat *Ptm*’ nin eşeysiz üreme de gerçekleştirdiğini ortaya koymuştur.

Bu tez çalışmasında; Türkiye’ de farklı illerden elde edilen *P. teres. f. teres* izolatlarının morfolojik ve moleküler tekniklere dayalı tanımlanması ve patojenik karakterizasyonu ile ağ benek hastalığına karşı ölkemizde ekimi yaygın olarak yapılan arpa çeşitlerinin dayanıklılık durumlarının belirlenmesi amaçlanmaktadır. Ayrıca klasik ve gözleme dayalı patojenisite çalışmalarına alternatif olarak RT-PCR SYBR Green I teknolojisine dayalı, arpa çeşitlerinin konukçu duyarlılığının kantitatif ve daha hızlı bir şekilde saptanmasını sağlayan bir metodun geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. MATERİYAL ve YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Hastalıklı Bitki Materyalinin Eldesi

2023-2024 yılı Şubat-Mart ayları arasında Bolu, Sakarya, Kırşehir, Yalova ve Ankara'nın Kalecik ilçesinde arpa üretiminin gerçekleştirildiği alanlarda araştırmalar yapılmış ve *Ptt* etmeninin belirti gösterdiği tarlalardan hastalıklı bitki örnekleri alınmıştır (Tablo 2.1). Her tarlayı temsil eden örnekler rastgele seçilmiş bitkilerden oluşmaktadır.

Tablo 2.1. İzolatların toplandığı arpa tarlalarına ait lokasyon bilgileri

No	İzolat	Lokasyon	Koordinat
1	Pt-01	Bolu / Merkez / Köprücüler	40°41'47"N 31°35'16"E
2	Pt-02	Sakarya / Merkez / Kamışlı	40°42'52"N 30°27'21"E
3	Pt-03	Kırşehir / Merkez	39°07'12"N 34°09'10"E
4	Pt-04	Yalova / Merkez	40°38'37"N 29°17'40"E
5	Pt-05	Ankara / Kalecik	40°06'24"N 33°25'18"E

İzolasyonları yapılan bitki materyallerinden ön patojenisite testleri hassas olduğu rapor edilmiş İnce 04 çeşidi üzerinde yapılmış ve en agresif olduğu tespit edilen izolatın kullanılmasına karar verilmiştir.

2.1.2 Test Edilen Arpa Çeşitlerinin Temini

Tarım ve Orman Bakanlığı' na bağlı araştırma enstitüleri ve özel firmalardan elde edilmiş olan ve ülkemizde yaygın ekiliş alanlarına sahip olan 92 arpa çeşidi materyal olarak kullanılmıştır (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan arpa çeşitlerine ait bilgiler

No	Çeşit Adı	Sıra Tipi	Tescil Eden Kuruluş	Tescil Tarihi
1	Patina	Altı sıralı	Akçakaya Tarım Tic. ve San. Ltd. Şti.	09.04.2019
2	Khkorso	İki sıralı	Akçakaya Tarım Tic. ve San. Ltd. Şti.	09.04.2019
3	Nonius	Altı sıralı	Akçakaya Tarım Tic. ve San. Ltd. Şti.	13.04.2018
4	Erciyes	İki sıralı	Anadolu Efes Biracılık ve Malt San. A.Ş..	14.04.2006
5	Fırat	İki sıralı	Anadolu Efes Biracılık ve Malt San. A.Ş..	30.03.2005
6	Akdere	İki sıralı	Anadolu Efes Biracılık ve Malt San. A.Ş.	08.04.2011
7	Efes98	İki sıralı	Anadolu Efes Biracılık ve Malt San. A.Ş.	12.05.1998
8	Atılır	İki sıralı	Anadolu Efes Biracılık ve Malt San. A.Ş.	30.03.2005
9	Başgül	İki sıralı	Anadolu Efes Biracılık ve Malt San. A.Ş.	02.05.2003
10	Çumra2001	İki sıralı	Anadolu Efes Biracılık ve Malt San. A.Ş.	24.04.2001
11	Durusu	İki sıralı	Anadolu Efes Biracılık ve Malt San. A.Ş.	05.04.2007
12	Meriç	Altı sıralı	Anadolu Efes Biracılık ve Malt San. A.Ş.	30.03.2005
13	Toprak	İki sıralı	Anadolu Efes Biracılık ve Malt San. A.Ş.	08.04.2011
14	Toprakana	İki sıralı	Anadolu Efes Biracılık ve Malt San. A.Ş.	13.04.2018
15	Yıldız	İki sıralı	Anadolu Efes Biracılık ve Malt San. A.Ş.	05.04.2007
16	Cervoise	Altı sıralı	Ata Tohumculuk İşletmeleri San. ve Tic. A.Ş.	08.04.2011
17	Ayrancı	İki sıralı	Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal AEM	13.04.2018
18	Karatay94	İki sıralı	Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal AEM	17.05.1996
19	Kıral97	Altı sıralı	Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal AEM	06.05.1997
20	Konevi98	İki sıralı	Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal AEM	12.05.1998
21	Larende	İki sıralı	Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal AEM	14.04.2006
22	Campagne	Altı sıralı	Dirik Dış Ticaret Memduh Zafer Dirik	26.03.2015
23	Olgun	Altı sıralı	Doğu Anadolu Tarımsal AEM	08.04.2011

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan arpa çeşitlerine ait bilgiler (Devam).

No	Çeşit Adı	Sıra tipi	Tescil Eden Kuruluş	Tescil tarihi
24	Akhisar98	Altı sıralı	Ege Tarımsal AEM	12.05.1998
25	Bayrak	Altı sıralı	Ege Tarımsal AEM	11.04.2014
26	Bornova	İki sıralı	Ege Tarımsal AEM	12.05.1992
27	Egebeyi	Altı sıralı	Ege Tarımsal AEM	09.04.2019
28	Hilal	İki sıralı	Ege Tarımsal AEM	30.10.2010
29	Kaya7794	İki sıralı	Ege Tarımsal AEM	12.05.1977
30	Vamık Hoca	Altı sıralı	Ege Tarımsal AEM	-
31	Sancak	Altı sıralı	Ege Tarımsal AEM	11.04.2014
32	Altıkat	Altı sıralı	GAP Uluslararası Tarımsal Arş. ve Eğitim Merkez Müd./Diyarbakır	08.04.2011
33	Barış	İki sıralı	GAP Uluslararası Tarımsal Arş. ve Eğitim Merkez Müd./Diyarbakır	26.03.2015
34	Dara	Altı sıralı	GAP Uluslararası Tarımsal Arş. ve Eğitim Merkez Müd./Diyarbakır	13.04.2018
35	Hevsel	İki sıralı	GAP Uluslararası Tarımsal Arş. ve Eğitim Merkez Müd./Diyarbakır	13.04.2017
36	Kendal	Altı sıralı	GAP Uluslararası Tarımsal Arş. ve Eğitim Merkez Müd./Diyarbakır	12.04.2013
37	Samyeli	İki sıralı	GAP Uluslararası Tarımsal Arş. ve Eğitim Merkez Müd./Diyarbakır	08.04.2011
38	Sur93	İki sıralı	GAP Uluslararası Tarımsal Arş. ve Eğitim Merkez Müd./Diyarbakır	02.05.2002
39	Şahin91	İki sıralı	GAP Uluslararası Tarımsal Arş. ve Eğitim Merkez Müd./Diyarbakır	26.04.1991
40	Bilgi91	İki sıralı	Geçit Kuşağı Tarımsal AEM	26.04.1991
41	Erginel90	Altı sıralı	Geçit Kuşağı Tarımsal AEM	16.04.1990
42	İnce04	İki sıralı	Geçit Kuşağı Tarımsal AEM	01.04.2004
43	Keser	İki sıralı	Geçit Kuşağı Tarımsal AEM	05.04.2007
44	Özdemir	İki sıralı	Geçit Kuşağı Tarımsal AEM	30.03.2005
45	Ünver	İki sıralı	Geçit Kuşağı Tarımsal AEM	12.04.2013
46	Yerçil147	İki sıralı	Geçit Kuşağı Tarımsal AEM	13.05.1976
47	SabriBey	İki sıralı	Geçit Kuşağı Tarımsal AEM	09.04.2019
48	Novosadski	İki sıralı	İ.T.U İyi Tarım Uyg. ve Tarımsal İlaç Toh. Paz. San. ve Tic. Ltd. Şti.	09.04.2019
49	Aida	İki sıralı	ProGen Tohum A.Ş.	13.04.2018

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan çeşitlerine ait bilgiler (Devam).

No	Çeşit Adı	Sıra tipi	Tescil Eden Kuruluş	Tescil tarihi
50	Alena	İki sıralı	ProGen Tohum A.Ş.	13.04.2018
51	Ambrosia	İki sıralı	ProGen Tohum A.Ş.	09.04.2019
52	Arcanda	İki sıralı	ProGen Tohum A.Ş.	11.04.2014
53	Belinda	Altı sıralı	ProGen Tohum A.Ş.	09.04.2019
54	Finola	Altı sıralı	ProGen Tohum A.Ş.	13.04.2018
55	Sentosa	İki sıralı	ProGen Tohum A.Ş.	13.04.2018
56	Zeus	Altı sıralı	ProGen Tohum A.Ş.	11.04.2014
57	Bravo	İki sıralı	Tareks Tarım Ürünleri Araç Gereç İthalat İhracat Tic. A.Ş.	13.04.2017
58	Gazda	İki sıralı	Tareks Tarım Ürünleri Araç Gereç İthalat İhracat Tic. A.Ş.	12.04.2013
59	Lord	Altı sıralı	Tareks Tarım Ürünleri Araç Gereç İthalat İhracat Tic. A.Ş.	08.04.2011
60	Maxim	İki sıralı	Tareks Tarım Ürünleri Araç Gereç İthalat İhracat Tic. A.Ş.	13.04.2017
61	Oliver	Altı sıralı	Tareks Tarım Ürünleri Araç Gereç İthalat İhracat Tic. A.Ş.	12.04.2013
62	Akar	İki sıralı	Tarla Bitkileri Merkez AEM	17.04.2012
63	Anka04	İki sıralı	Tarla Bitkileri Merkez AEM	09.04.2019
64	Asil	İki sıralı	Tarla Bitkileri Merkez AEM	09.04.2019
65	Avcı2002	Altı sıralı	Tarla Bitkileri Merkez AEM	02.05.2002
66	Aydanhanım	İki sıralı	Tarla Bitkileri Merkez AEM	02.05.2002
67	Bozlak	İki sıralı	Tarla Bitkileri Merkez AEM	13.04.2018
68	BurakBey	İki sıralı	Tarla Bitkileri Merkez AEM	12.04.2013
69	Bülbül 89	İki sıralı	Tarla Bitkileri Merkez AEM	20.04.1989
70	Cacabey	İki sıralı	Tarla Bitkileri Merkez AEM	09.04.2019
71	Çetin2000	Altı sıralı	Tarla Bitkileri Merkez AEM	28.04.2000
72	Orza96	İki sıralı	Tarla Bitkileri Merkez AEM	16.04.1996
73	Özen	İki sıralı	Tarla Bitkileri Merkez AEM	17.04.2012
74	Tarm92	İki sıralı	Tarla Bitkileri Merkez AEM	12.05.1992
75	Tokak157/37	İki sıralı	Tarla Bitkileri Merkez AEM	07.10.1963
76	Yalın	İki sıralı	Tarla Bitkileri Merkez AEM	11.04.2014
77	Yesevi93	İki sıralı	Tarla Bitkileri Merkez AEM	13.05.1993
78	Zeynelağa	İki sıralı	Tarla Bitkileri Merkez AEM	02.05.2003
79	Barbaros	Altı sıralı	Trakya Tarım ve Vet Tic. Ltd. Şti.	14.04.2016
80	Kristal	Altı sıralı	Trakya Tarım ve Vet Tic. Ltd. Şti.	13.04.2017
81	Bolayır	İki sıralı	Trakya Tarımsal AEM	05.04.2007
82	Harman	İki sıralı	Trakya Tarımsal AEM	08.04.2011
83	Hasat	İki sıralı	Trakya Tarımsal AEM	11.04.2014
84	Hazar	Altı sıralı	Trakya Tarımsal AEM	14.04.2016
85	Helke	Altı sıralı	Trakya Tarımsal AEM	09.04.2019
86	Pınar	İki sıralı	Trakya Tarımsal AEM	13.04.2018

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan çeşitlerine ait bilgiler (Devam).

No	Çeşit Adı	Sıra tipi	Tescil Eden Kuruluş	Tescil tarihi
87	Sladoran	İki sıralı	Trakya Tarımsal AEM	12.05.1998
88	Yaba	İki sıralı	Trakya Tarımsal AEM	09.04.2019
89	Yaprak	Altı sıralı	Trakya Tarımsal AEM	13.04.2018
90	Martı	Altı sıralı	Trakya Tarımsal AEM	06.04.2009
91	Etincel	Altı sıralı	Yıldız Bitkisel Ürünler Tohumculuk ve Tarım Sanayi A.Ş.	13.04.2017
92	Scarpia	Altı sıralı	Yıldız Bitkisel Ürünler Tohumculuk ve Tarım Sanayi A.Ş.	26.03.2015

*AEM: Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü

2.1.3 Kullanılan Besiyeri

İzolatları geliştirmek için katı besiyeri olarak patates dekstrozu agar (PDA: Merck, Darmstadt, Almanya) kullanılmıştır. PDA ortamı, patates infüzyonu (4 g/l), D(+) glukoz (20 g/l) ve agar (15 g/l) bileşenlerinden oluşmaktadır. Ortamdaki glukoz ve patates infüzyonu da fungal gelişimi destekleyici bir besin kaynağı olarak tercih edilmiştir. İzolasyonunun başlangıç aşamalarında, besiyerinin bakteriler tarafından kontamine olmasını önlemek için 100 mg/l streptomisin sülfat ve 25 mg/l kloramfenikol ilave edilmiştir. Böylelikle bakteri gelişimi baskılanarak saf izolatların elde edilmesi amaçlanmıştır.

2.2 Yöntem

2.2.1 Patojen İzolasyonu

Laboratuvar ortamına getirilen bitki örneklerinden fungal izolasyon için her bir yaprak küçük parçacıklara ayrılarak %1' lik sodyum hipoklorit (NaOCl) ile 1 dakika süreyle yüzey dezenfeksiyonuna tabi tutulmuş ve ardından steril saf su ile yıkanarak kurutulmuştur. Kuruyan kesitler spor üretimi sağlanması amacıyla antibiyotikli PDA içeren 9 cm' lik Petri kaplarına aktararak inkübasyona bırakılmıştır. İki günlük oda sıcaklığındaki inkübasyondan sonra Petri kapları binoküler mikroskop ile incelenmiş, tek sporlar alınmış ve taze PDA içeren ortamlara aktararak saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bitki dokusu üzerinde hif gelişimi ve sporulasyonun gerçekleştiği görülmüş fakat saflaştırılan izolatlarda farklı besiyeri ortamlarında denenmesine rağmen sporulasyon görülememiş, sadece hifsel gelişim saptanmıştır.

2.2.2 İzolatların Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu

Elde edilen fungal izolatlar PDA ortamında 24 ± 1 °C’ de bir hafta süre ile inkübasyona bırakılmış ve sonrasında kültürel özellikleri incelenmiştir. Yapay besi ortamında sporulasyon görülmediği için spor ve spor verici yapılar bitki dokusu üzerinde gelişen misel/spor kütlesi alınarak Leica DM1000 mikroskobu (Leica Microsystems, Wetzlar, Almanya) ve Leica LAS EZ yazılımıyla 400× büyütmede incelenerek tanımlanmıştır.

İzolatin genomik DNA izolasyonu CTAB tabanlı bitki DNA izolasyon protokolü (Diversity Arrays Technology - DArT; https://ordering.diversityarrays.com/files/DaRT_DNA_isolation.pdf) izlenerek gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen kültürlerden 100 mg misel kütlesi bisturi ile kazınarak 2 ml’ lik eppendorf tüplere aktarılmış ve daha önce ısıtılmış (65 °C) 750 µL ekstraksiyon–lizis tamponu (125 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM EDTA pH 8,0, %2 CTAB, %2 PVP-40, 0,8 M NaCl, %0,5 sodyum disülfite ve %1 sarcosyl) tüpe eklenmiştir. Sonrasında steril çelik ezici yardımıyla homojen hale getirilen örnekler 65 °C’ de 60 dakika bir DB-2D model kuru blok ısıtıcıda (Techne, Cambridge, İngiltere) her 15 dk’ da bir ters düz edilerek inkübasyona bırakılmıştır. İnkübe edilen örnekler kuru blok ısıtıcıdan alınarak oda sıcaklığına gelince üzerlerine 750 µl kloroform/izoamil alkol (24:1 v/v) eklenmiş ve 10 dk süre ile yavaşça ters düz edilerek 15,000 rpm’ de 15 dk santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Süpernatantlar yeni 1,5 ml’ lik santrifüj tüplerine aktarılacak şekilde üzerlerine DNA’ yı çöktürmek amacıyla 0,6 hacim soğuk izopropanol eklenmiştir. Yeniden 15.000 rpm’ de 5 dk santrifüj işleminden sonra, süpernatantlar uzaklaştırılmış ve oluşan pelletler 2 kez %70’ lik soğuk etanolle yıkanarak oda sıcaklığında 30 dk süre ile kurutulmuştur. Elde edilen DNA 100 µl steril ultra saf steril su içinde çözülerek, konsantrasyonu bir DS-11 FX+ model nano spektrofotometre (Denovix Inc., Wilmington, DE, ABD) yardımı ile ölçülmüş ve PCR çalışmaları için 50 ng/µl’ ye ayarlanmıştır.

PCR amplifikasyonlarını gerçekleştirmek için bir T100 model thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, ABD) kullanılmıştır. Reaksiyonun gerçekleştiği karışım 1×PCR reaksiyon tamponu, her dNTP’ den 0,2 mM, 1,5 birim Ampliqon TEMPase Hot Start DNA polimeraz (Berntsen, Rdovre, Danimarka), her primerden 0,4 uM, 10 ng şablon DNA ve steril milli-Q su içerecek şekilde hazırlanmıştır. Genomik DNA’ nın (ITS) bölgesini amplifiye etmek için White vd. (1990)

tarafından tanımlanan ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') ve ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') primer çifti, *GAPDH* geninin kısmi bölgesini çoğaltmak için ise Berbee vd. (1999) tarafından tanımlanmış olan *gpd1* (5'-CAA CGG CTT CGG TCG CAT TG-3') ve *gpd2* (5'-GCC AAG CAG TTG GTT GTG-3') primer çifti kullanılmıştır. Amplifikasyon protokolü her iki lokus için de 94 °C' de 3 dakikalık bir başlangıç denatürasyonunun ardından 94 °C' de 60 saniye, 52 °C' de 60 saniye ve 72 °C' de 1 dakika süreyle 35 döngüyü içermiş, son olarak 72 °C' de 10 dakikalık bir uzatma ile sonlanmıştır.

Elde edilen tüm PCR ürünleri %1,2' lik agaroz jelde 100 V' da 2 saat süreyle elektroforetik olarak ayrılmıştır. Elektroforez tankında ve jelin hazırlanmasında 1×TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) tampon çözeltisi kullanılmıştır. PCR ürünlerinin moleküler ağırlıklarının belirlenmesinde GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır. Son olarak agaroz jel etidyum bromit (1 mg/ml) ile boyanarak ürünlerin varlığı G: BOX F3 jel görüntüleme sisteminde (Syngene, Cambridge, İngiltere) kontrol edilmiştir. Bantların varlığı anlaşılan PCR ürünlerinin kalan kısmı sekans bilgilerinin elde edilmesi amacı ile BM Labosis-Macro Gene (Ankara, Türkiye) şirketine gönderilmiştir. İzolata ait elde edilen ITS ve *GAPDH* lokuslarına ait sekans dataları MEGA X (Kumar vd., 2018) programları kullanılarak düzenlenmiş ve National Center for Biotechnology Information (NCBI)' ın GenBank nükleotit veri tabanındaki (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) sekanslara karşı BLAST analizi ile incelenmiştir. Yine NCBI' ın BankIt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub>) aracı kullanılarak elde edilen sekanslar GenBank veri tabanına sunularak erişim numaraları alınmıştır. Çalışmadan elde edilen *Pyrenophora teres* izolatlarına ait ITS ve *GAPDH* dizileri, referans izolatlarla ait kayıtlı dizilerle birlikte MAFFT v. 7.490 yazılımı (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>, erişim tarihi 19.11.2024) kullanılarak hizalanmıştır. Ardından, MEGA X yazılımı (Kumar vd., 2018) ile maksimum olasılık (maximum likelihood) yöntemi kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

2.2.3 Patojenisite Testi

İnokulum, tek spor izolasyonundan sonra PDA kullanılarak çoğaltılmış olan kültürlerden elde edilmiştir. Etmen yapay besi ortamında sporulasyon sağlamadığı için süspansiyon hazırlanmasında kültürlerdeki hifler kullanılmıştır (Tekauz, 1985; Douiyssi vd., 1998). Patojenlerin Petri kaplarındaki gelişiminde oluşan hifal yoğunluk istenilen seviyede olmadığı için inokulum miktarını arttırmak amacıyla 200 g buğday kepeği ısıya dayanıklı otoklav poşeti içerisine konularak steril saf su ile nemlendirilmiş, ardışık günlerde üç kere otoklavda steril edilmiş ve gelişmiş olan kültürlerden 10 mm' lik agar diskleri ile bulaştırılmıştır. Ağzıları steril pamukla kapatılan torbalar 20 gün boyunca 23 ± 1 °C' de 12/12 saat aydınlık/karanlık periyotta inkübasyona bırakılmıştır. Poşetler her 3 günde bir etmenin kepekte homojen şekilde gelişebilmesi için hafifçe ters düz edilmiştir. İnkübasyon sonrası kepeklerden fazla nem uzaklaştırılmış ve ardından patojenisite çalışmalarına kadar saklanması amacıyla 4 °C' ye kaldırılmıştır.

Ön patojenisite testi için daha önceki çalışmalarda hassas olarak belirlendiği tespit edilen (Karakaya vd., 2015) İnce 04 çeşidi kullanılmıştır. Tohumlar %1' lik NaOCl çözeltisinde 1 dakika yüzey dezenfeksiyonuna tabi tutulduktan sonra steril saf su ile durulanmıştır. Bütün izolatlar için 3 tekerrürlü ve bir de kontrol grubu olacak şekilde saksılara (17 cm yükseklik, 9 cm çap) 15' er tohum ekilmiş ve çimlenme sağlandıktan sonra saksı başına 10 bitki olacak şekilde seyreltilmiştir. Daha önce hazırlanmış ve 4 °C' de muhafaza edilmekte olan inokulumdan bir miktar alınarak içerisinde steril saf su bulunan behere ilave edilmiş ve manyetik balık yardımıyla karıştırılmış, sonrasında bir tülbentten süzölmüştür. İnokulum yoğunluğu bir hematosimetre (Thoma lamı; Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen, Almanya) kullanılarak, $15-20\times10^4$ miselyum parçacığı/ml olacak şekilde ayarlanmış ve içerisine inokulumun yaprak yüzeyinde yayılabilmesi amacıyla 100 µl/l Tween 20 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ABD) ilave edilmiştir (Aktaş, 1995).

İklim odasında 23 °C' de 12 saatlik fotoperiyotta ikinci yaprağı açmış olan 10 günlük fideler (Zadoks vd., 1974) hazırlanan süspansiyon ile yapraklara püskürtülerek inoküle edilmiştir. Ardından nemi muhafaza etmek amacıyla bitkilerin üzeri şeffaf bir örtü ile kapatılarak $18-23\pm2$ °C sıcaklıkta 72 saat karanlık periyotta bekletilmiştir. Sürenin sonunda örtüler kaldırılmış ve 4 gün boyunca 12

saatlik fotoperiyotta geliştirilmeye devam edilmiştir. Sonuçlar 7 günün sonunda Tekauz (1985)' da ağ formu için belirtilen skala kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu skalada kullanılan kısaltmalar; dirençli için 'R'(1), dirençli-orta derecede dirençli için 'R-MR' (2), orta derecede dirençli için 'MR' (3), orta derecede dirençli-orta derecede duyarlı için 'MR-M' (4), orta derecede dirençli-orta derecede duyarlı için 'MR-MS' (5), 'MR-MS' orta derecede dirençli-orta derecede duyarlı (6), 'MS' orta derecede duyarlı (7), 'MS-S' orta derecede duyarlı-duyarlı (8), 'S' duyarlı (9) ve 'VS' çok duyarlı (10) şeklindedir.

Yapılan ön çalışma sonucunda izolatlar arasında patojenik bir farklılık belirlenmiş ve en agresif izolat çeşit reaksiyon testlerinde kullanılmıştır. Ön patojenisite testinde olduğu gibi yüzey dezenfeksiyonu, ekim ve inokülasyon işlemleri gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Tekauz'a (1985) göre değerlendirilmeye tabi tutulmuştur. Hastalık şiddeti skorları istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

Patojenisite testinden elde edilen hastalık şiddetlerinin skorlamalarından edilen sonuçlar GraphPad Prism (GraphPad, Boston, MA, ABD; gramında Heatmap haline getirilmiştir (Şekil 3.2.).

2.2.4 Konukçu Dokusundan Patojen DNA Miktarının RT-PCR Analizi ile Tespiti

Çeşit reaksiyonu çalışmaları sonucunda en hassas ve en dayanıklı olarak tespit edilen çeşitler arasından 2' şer adet dayanıklı ve hassas çeşit seçilerek patojenisite testi benzer şekilde kurulmuştur. İnokulum verildikten sonraki 24, 48, 72 ve 96. saatlerde bütün çeşitlere ait bitkilerin ikinci yaprakları alınarak steril saf sudan geçirilmiş ve ardından kurutularak 50 ml' lik tüpler içerisine alınmıştır. Tüpler sonrasında sıvı azotla muamele edilmiş ve DNA izolasyonuna kadar -80 °C' de muhafaza edilmiştir. Çalışma sırasında enfekteli yapraklardan ve kontrol grubu yapraklarından alınan 100 mg bitki dokusunun DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) yardımı ile DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Ardından konsantrasyonları spektrofotometrik olarak DS-11 FX+ ile 260/280 nm ölçüm yapılarak belirlenmiş ve 20 ng/µl' ye ayarlanarak -20 °C' de saklanmıştır.

Kültür koleksiyonumuzda daha önce arpayla ilişkili olduğu saptanan mevcut fungus izolatları (*B. sorokiniana*, *R. secalis*) PDA ortamında 23 °C' de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda steril 2.2.2' de belirtildiği gibi DNA izolasyonları gerçekleştirilmiş ve 20 ng/µl' ye ayarlanarak -20 °C' de

saklanmıştır. Ardından primerlerin spesifikliğini kontrol amacıyla RT-PCR çalışmalarına dahil edilmiştir.

BioRad CFX96 RT-PCR sistemi (Bio-Rad) ile gerçekleştirilen çalışmalarda daha önce Poudel vd. (2017) tarafından *Ptt*’ ye spesifik olarak dizayn edilen PttQ4-F/PttQ4-R primer çifti kullanılmıştır (**Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.3.**). YBER Green I temelli yöntem kullanılarak gerçekleştirilen RT-PCR çalışmaları farklı fungus türleri ve sağlıklı bitki DNA’ ları ile optimize edilmiştir. Amplifikasyon koşulları, başlangıçta 95 °C’de 3 dakika denatürasyon, ardından 45 döngü boyunca 95 °C’de 10 saniye denatürasyon, 60 °C’de 30 saniye bağlanma (annealing), 72 °C’de 20 saniye uzatma ve okuma adımlarından oluşacak şekilde uygulanmıştır. Spesifik PCR ürünlerinin doğruluğu, erime eğrisi (melting curve) analizi ile kontrol edilmiştir. Bu analiz, 95 °C’de 60 saniye başlangıç, ardından 65 °C’de 60 saniye ve 65 °C’den 95 °C’ye kadar her 0,5 °C’lik sıcaklık artışında 5 saniyelik okumalar şeklinde programlanmıştır.

Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan *Pyrenophora teres* f. *teres*’ e özgü primerler ve sekans dizileri

Primer	Sekans Dizisi (5'→3')	Annealing (°C)	Uzunluk (baz)	Referans
PttQ4-F	CGTCCCGCCGAAATTTTGTA	60	173 bp	Poudel vd., 2017
PttQ4-R	CAAGGACTTACGCGCTCAAA			

Bitki dokularındaki patojen DNA miktarı 100 ng ila 0.001 ng arasında bilinen patojen DNA konsantrasyonları temel alınarak oluşturulan standart eğriler kullanılarak ölçülmüştür. Reaksiyonların etkinliği ve doğruluğu slope ve R² değerleri ile değerlendirilmiştir. Reaksiyon veriminin %90 ile %100 (–3.6>slope değeri>3.1) arasında olması beklenmiştir (Palacioğlu vd., 2021) Ayrıca çalışmaya dahil edilen farklı funguslara ait DNA’ lar da kullanılarak erime eğrisi analizi gerçekleştirilerek spesifik olmayan bağlanmalar kontrol edilmiştir. Bu kapsamda hedef PCR ürünlerinin aynı erime sıcaklığına sahip olması beklenmiş, farklı erime sıcaklıkları tespit edilmesi durumunda dimer oluşumları veya olası bulaşmalar değerlendirilmiştir.

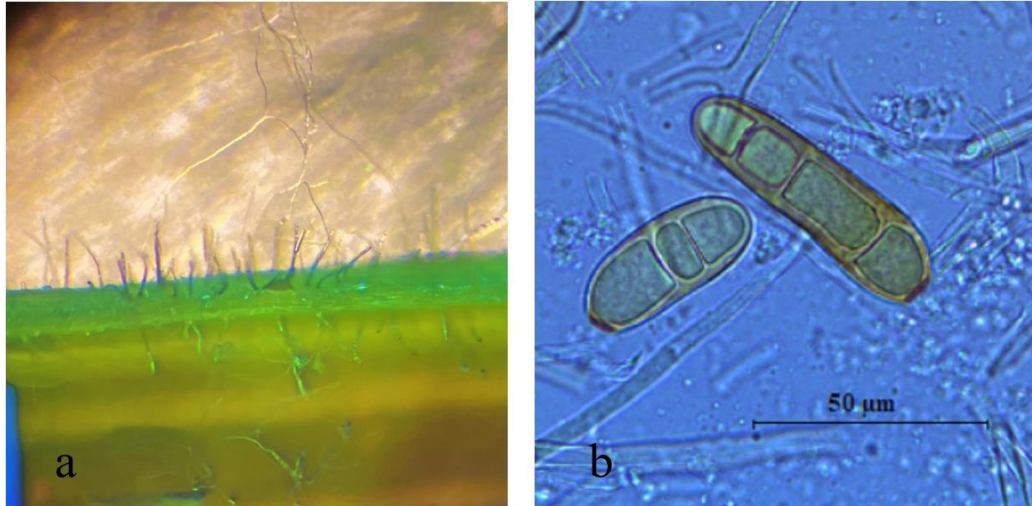
3. BULGULAR

3.1 *Pyrenophora teres f. teres* İzolatlarının Elde Edilmesi ve Teşhisi

İzolatların elde edilmesi amacıyla arpa üretiminin yapıldığı 5 ilde araştırmalar gerçekleştirilmiş ve belirlenen her bir tarladan tipik ağ benek lekesi belirtileri gösteren yapraklardan örnekler alınmıştır. İzolasyonları yapılan izolatların kültür ortamında *P. teres* benzeri gelişim gösterdiği görülmüş ve saflaştırıldıktan sonra yapılan morfolojik ve mikroskopik gözlemler etmenlerin *Ptt* olduğunu doğrulamıştır. İzolatlar başlangıçta beyazımsı veya açık gri renkte olurken gelişim sürecinde kahverengimsi veya zeytuni renkte kadifemsi pamuksu bir dokuya sahip olmuştur. Koloni üzerinde yelpaze ve sopa benzeri dik tutamlar oluştuğu gözlemlenmiştir (Fotoğraf 3.1.). Konidioforların üzerinde tek veya ikili üçlü gruplar halinde oluşan konidilerin $64,54 \pm 12,40 \times 19,63 \pm 2,84 \mu\text{m}$, ($n = 50$) boyutlarında sarı ila kahverengi, pürüzsüz, silindirik ve düz, her iki ucu yuvarlak şekilde genellikle 3-4 bölmeli olduğu görülmüştür (Fotoğraf 3.2.). Elde edilen verilerin daha önceki çalışmalarda tanımlanmış olan *P. teres* teşhis kriterleri ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (Shoemaker, 1962; Smedegard-Petersen, 1971; Sivanesan, 1987; Liu vd., 2011).

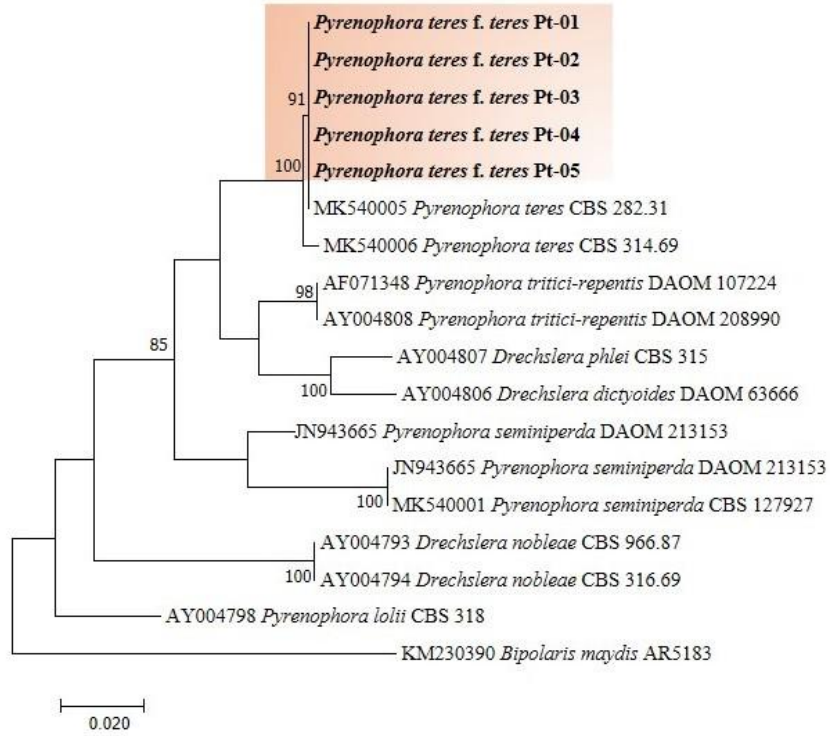


Fotoğraf 3.1. *Pyrenophora teres* f. *teres* izolatlarının PDA ortamındaki gelişimleri



Fotoğraf 3.2. *Pyrenophora teres* f. *teres*' in arpa yaprağı üzerinde konidi ve konidioforları (a), konidiler (b).

İzolatların DNA izolasyonları DArT-CTAB yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve gpd1/gpd2 ile ITS1/ITS4 primer çiftleri aracılığıyla sırasıyla *GAPDH* ve ITS genlerinin kısmi bölgelerine ait 594 ve 524 bp uzunluğunda dizi verileri elde edilmiştir. BLAST analizi gerçekleştirilen izolatların dizi verilerinin daha önce farklı araştırmacılar tarafından GenBank nükleotit veri tabanına kaydedilen *Ptt* sekanslarıyla %100 nükleotit benzerliği gösterdiği tespit edilmiştir. NCBI BankIt yazılımı aracılığıyla izolatların ITS lokusuna ait sekans verileri erişim numaraları, *GAPDH* geninin kısmi sekans verileri ise erişim numaraları ile GenBank veri tabanında kaydedilmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen sekanslar ile referans izolatlara ait GenBank'ta kayıtlı sekansların evrimsel geçmişi, General Time Reversible modeline dayanan maximum likelihood yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir (Şekil 3.1.)



Şekil 3.1. *Pyrenophora teres* f. *teres* ve referans izolatlara ait ITS ve *GAPDH* bölgelerinin birleşik sekanslarına dayalı maximum likelihood filogenetik ağacı.

Bipolaris maydis AR5183 dış grup olarak kullanılmış ve %75' in altındaki bootstrap değerleri düğümlerde gösterilmemiştir.

3.2 Patojenisite Çalışmaları

Ön patojenisite çalışmaları sonucunda izolatların İnce 04 çeşidinde oluşturduğu hastalık boyutları Tekauz (1985)' un skalasına göre değerlendirilmiş ve elde edilen verilerle yapılan istatistiki analiz sonucunda Yalova' dan elde edilen Pt-04 izolatının en agresif olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.1.).

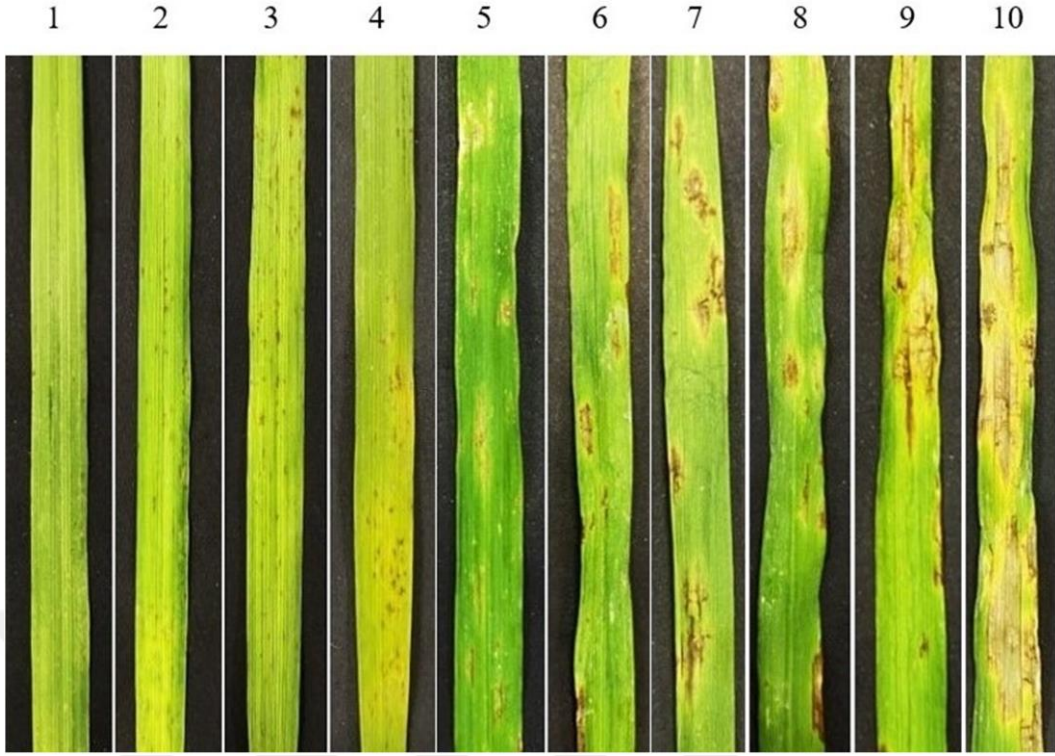
Tablo 3.1. İzolatlar ve hastalık indeks değerleri

İzolat	Hastalık İndeks Değeri
Pt-04	8,53 ^a
Pt-02	6,13 ^b
Pt-01	4,47 ^c
Pt-03	3,07 ^d
Pt-05	2,93 ^d

3.2.1 Çeşit Reaksiyon Testleri

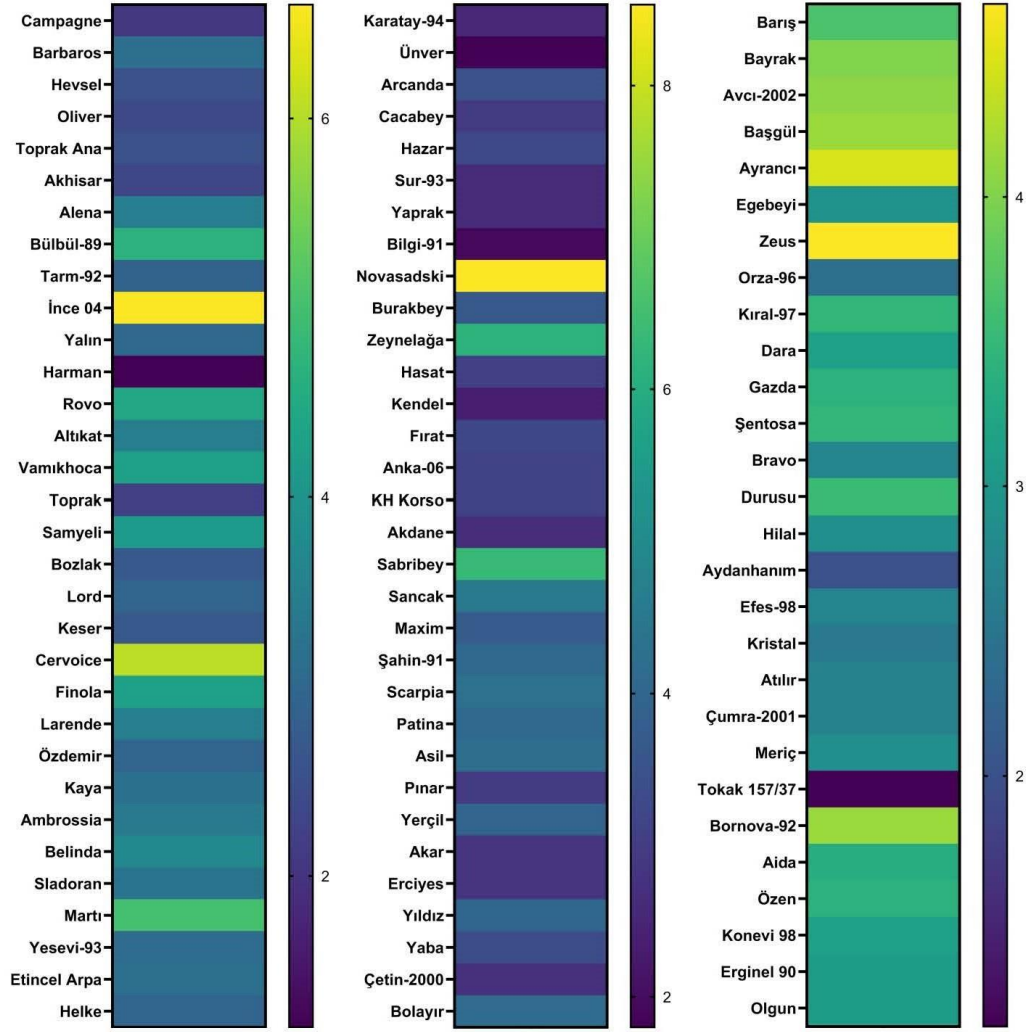
Ön patojenite değerlendirmeleri sonucunda en agresif olarak seçilen ırk ile çeşit reaksiyon testleri gerçekleştirilmiştir. Ülkemizde tescil edilmiş 92 arpa çeşidine ait tohumlar '2.2.3 Patojenisite Çalışmaları' kısmında ifade edilen yüzey dezenfeksiyonu, ekim ve inokülasyon işlemlerine tabi tutulmuş ve Tekauz (1985) 1-10 skalasına göre değerlendirilmiştir.

Hastalık şiddeti oranları, küçük nekrotik lezyonlar için 1, 2 ve 3, orta büyüklükte nekrotik lezyonlar için 4, 5 ve 6, büyük nekrotik lezyonlar için 7, 8 ve 9, çok büyük nekrotik lezyonlar için ise 10 olarak belirlenerek skorlama yapılmıştır (Fotoğraf 3.3.).



Fotoğraf 3.3. *Pyrenophora teres* f. *teres*' in neden olduğu farklı yoğunluktaki ağ formu yaprak lekesi belirtileri (1-10 skala serisi).

Değerlendirmeler sonucunda, dayanıklı çeşitler olarak Harman ve Tokak 157/37, hassas çeşitler olarak ise İnce 04 ve Novasadski belirlenmiş ve daha sonraki çalışmalar bu çeşitler üzerinde devam etmiştir.



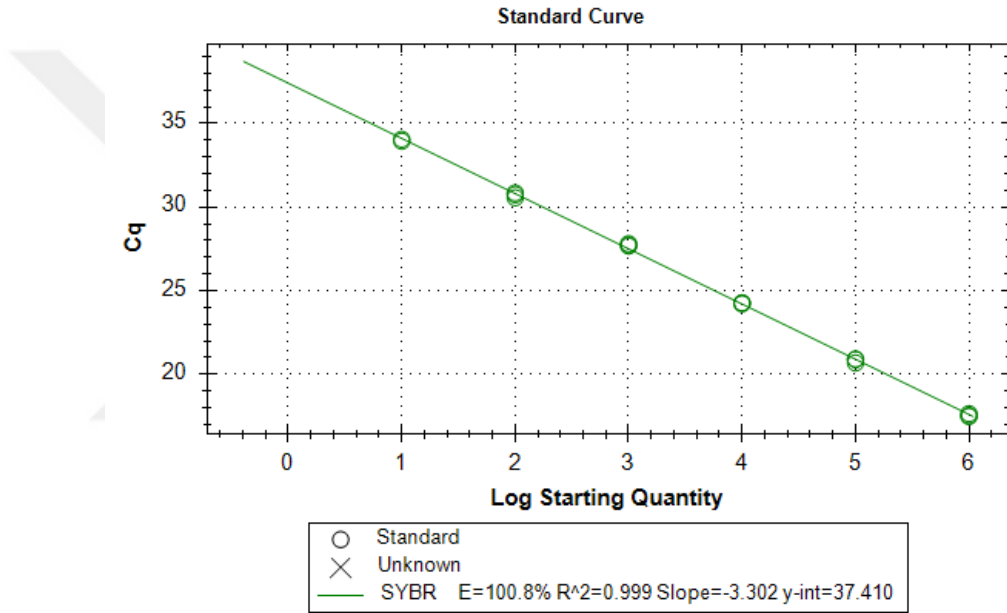
Şekil 3.2. *Pyrenophora teres f. teres* izolatu ile gerçekleştirilen çeşit reaksiyon testi sonucunda arpa çeşitlerinde tespit edilen hastalık değerlerini gösteren ısı haritası (heatmap). Mavi renk dayanıklılığı, sarı renk ise hassaslık oranını ifade etmektedir.

3.2.2 Konukçu Dokusundan Patojen DNA Miktarının RT-PCR Analizi ile Tespiti

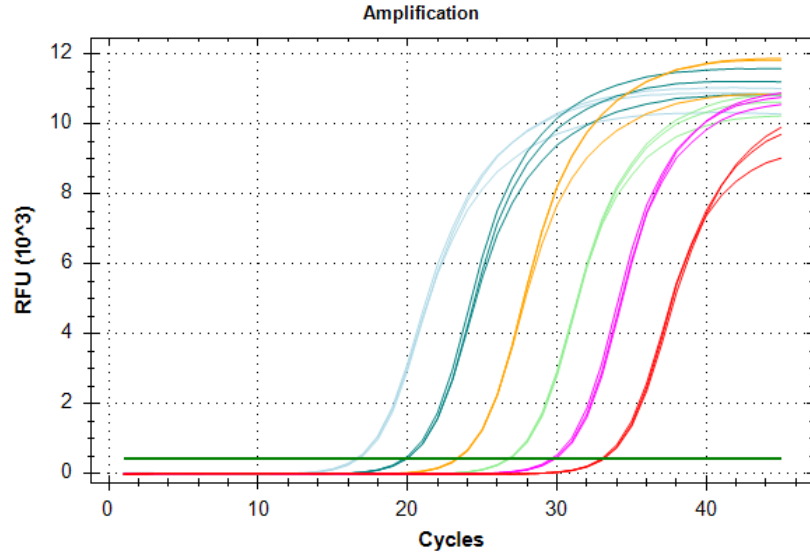
Real-time PCR yöntemiyle enfekteli bitki dokularından patojen miktarını belirlemek amacıyla, öncelikle bilinen konsantrasyonlardaki saf patojen DNA' ları kullanılarak bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu kapsamda, steril saf su ve bitki DNA' sı (100 ng/µl) kullanılarak, başlangıçta 100 ng olan patojen DNA' sından 10' ar kat seyreltilmiş şekilde toplam 6 seyreltme (100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 ng) yapılmış ve standart eğri elde edilmiştir (Şekil 3.3.). Elde edilen standart

eğrideki slope değeri 3,30, R^2 değeri ise 0,9 olarak tespit edilmiş ve PCR etkinliği için iyi olarak değerlendirilmiştir.

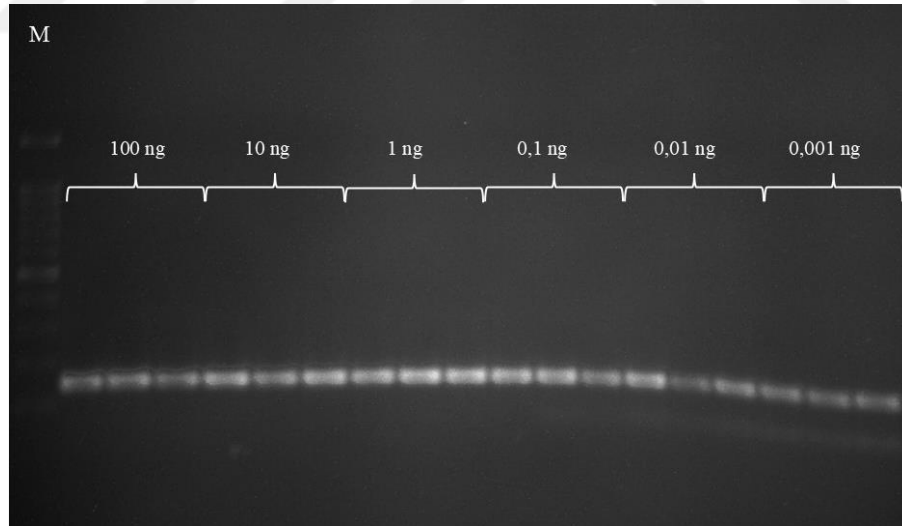
Seyreltme serisinin amplifikasyon eğrileri incelendiğinde üç tekerrürlü olarak test edilen patojene ait tüm DNA konsantrasyonlarında tekerrürlerin yakın döngülerde ışıma yapmaya başladığı gözlemlenmiştir (Şekil 3.4.). PttQ4-F/PttQ4-R primer çifti ile 100 ng patojen DNA' sı içeren örneklerde ilk ışıma 17,55 Cq değerinde başlamış ve en düşük konsantrasyondaki (0,001 ng) örnekte Cq değeri 34,06 olarak belirlenmiştir. Oluşturulan seyreltme serisinin etkinliği jel elektroforez ile 3 tekerrürlü olacak şekilde görüntülenmiştir (Fotoğraf 3.4.).



Şekil 3.3. PttQ4-F/PttQ4-R primer çifti kullanılarak, farklı konsantrasyonlardaki patojen DNA serilerinin (100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, ng) bitki DNA' sı ile seyreltilerek elde edilen standart eğrisi



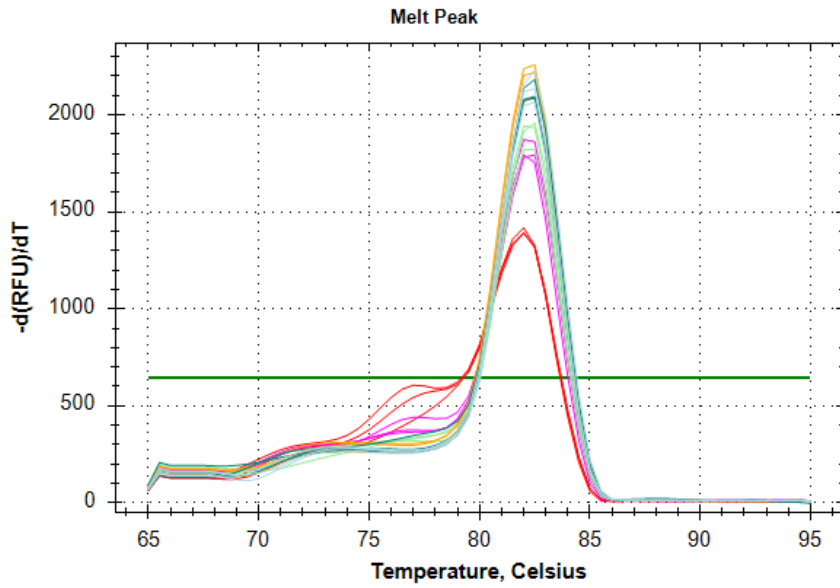
Şekil 3.4. PttQ4-F/PttQ4-R primer çifti kullanılarak, farklı konsantrasyonlardaki patojen DNA serilerinin (100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, ng) bitki DNA' sı ile seyreltilerek elde edilen amplifikasyon eğrisi



Fotoğraf 3.4. PttQ4-F/PttQ4-R primer çifti kullanılarak, farklı konsantrasyonlardaki patojen DNA serilerinin (100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, ng) bitki DNA'sı ile seyreltilerek elde edilen RT-PCR ürününün agaroz jel

elektroforezi, M: Gene ruler 100 bp ladder plus (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, ABD)

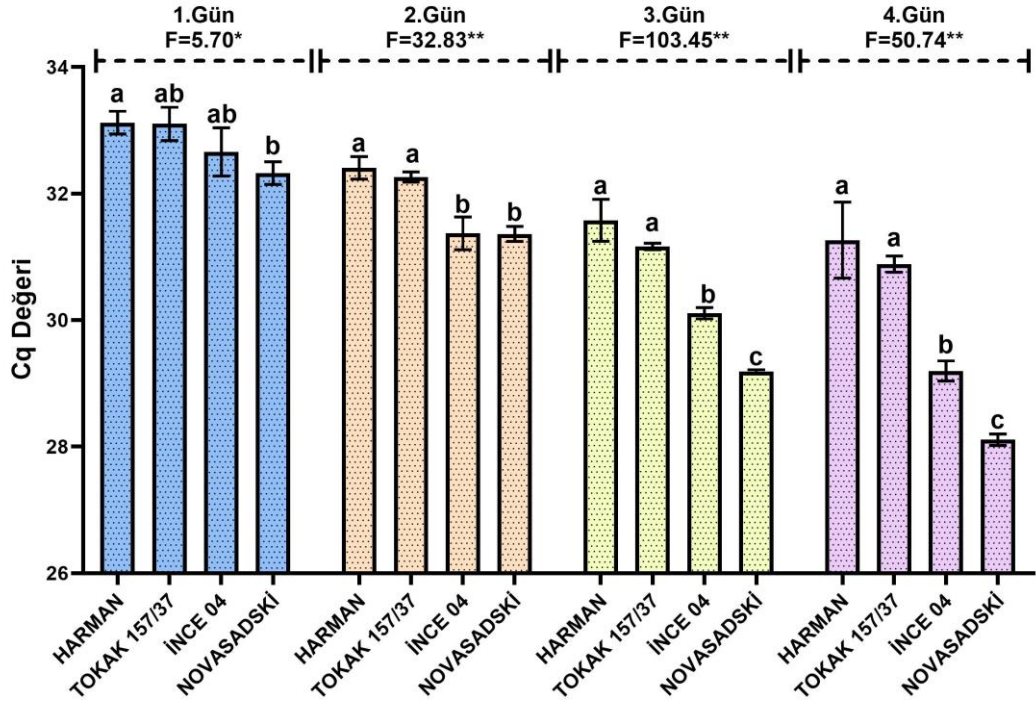
PCR amplifikasyonları sonrasında elde edilen ürünün hedef DNA' ya ait olduğunu doğrulamak ve başka bir PCR ürünü veya primer dimeri oluşup oluşmadığını saptamak amacıyla erime eğrisi analizi yapılmıştır. PttQ4-F/PttQ4-R primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen analiz sonucunda, tüm patojen DNA örneklerinin yaklaşık 82 °C' de bir erime piki oluşturduğu ve analizi etkileyecek başka herhangi bir PCR ürünü veya primer dimeri varlığına rastlanmadığı tespit edilmiştir (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. PttQ4-F/PttQ4-R primer çifti kullanılarak, farklı konsantrasyonlardaki patojen DNA serilerinin (100, 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001, ng) bitki DNA' sı ile seyreltilerek elde edilen erime piki (melting peak)

Arpa çeşitlerinin patojen miktarına bağlı olarak gösterdiği reaksiyonların RT-PCR ile görüntülenmesi için, yapılan ön çalışmalarda dayanıklı olduğu belirlenen Harman ve Tokak 157/37 çeşitleri ile hassas olarak belirlenen İnce 04 ve Novasadski çeşitlerine patojen inoküle edilmiştir. İnokulasyonu takiben 1., 2., 3. ve

4. günlerde alınan örnekler PttQ4-F/PttQ4-R primer çifti ile patojen DNA' sının erken enfeksiyon aşamasında konukçu dokusundaki tespitine yönelik RT-PCR çalışmaları gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Tukey testi ile analiz edilmiştir (Şekil 3.6.) Elde edilen sonuçlarda dayanıklı ve hassas çeşitler arasında ikinci günden itibaren istatistiki olarak farklılıklar olduğu ve dokudaki patojen DNA' sının her gün kademeli olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 3.6. İnokulasyonu takiben farklı günlerde alınan örneklerin PttQ4-F/PttQ4-R primer çifti ile saptanan DNA miktarları. Sütundeki her harf istatistiksel olarak farklı grubu ifade etmektedir

4. TARTIŞMA

Arpa üretiminde dünyada ve ülkemizde ciddi verim kayıplarına neden olan *P. teres* ağ benek hastalığı, arpa yapraklarında oluşturduğu ağ benzeri lezyonlar ile bitkinin fotosentez oranını, büyümesini ve ürün kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Patojen, yaprakta oluşturduğu belirtilere göre *Ptt* ağ tipi ve *Ptm* nokta tipi olarak iki forma ayrılmıştır. Ağ tipi belirtileri daha uzun ve kahverengi lezyonlar şeklinde olurken, nokta tipinde ise oval ve koyu kahverengi lezyonlar oluşmaktadır (Smedegård-Petersen, 1976; Backes vd., 2021). Çeşitli araştırmalar hastalık sebebiyle oluşan verim kayıplarının çevresel faktörlere de bağlı olarak %10-70 arasında değişebildiğini fakat duyarlı bir çeşitte tamamen ürün kaybı görülebileceğini saptamıştır (Oğuz vd., 2019; Abebe, 2021; Dahanayaka vd., 2021). Hastalıklara karşı uygun mücadele yöntemlerinin geliştirilebilmesi için patojenin doğru tanımlanması kritik bir önem taşımaktadır. Tahıllarda hastalığa neden olan fungal patojenlerin %70' i fungusit uygulamaları ile kontrol edilmektedir (Backes vd., 2021) fakat diğer birçok hastalıkta olduğu gibi bu hastalık etmenine karşı mücadelede de dayanıklı çeşitlerin kullanımı üreticiler açısından hem düşük maliyetli hem de ekolojik sürdürülebilirliği destekleyen etkili bir kontrol yöntemi sunmaktadır. Sadece dayanıklı çeşitlerin tercih edilmesi, kimyasal uygulama gereksinimini kısmen ya da tamamen ortadan kaldırabilmektedir (McLean ve ark., 2009). Ancak *P. teres* formlarında görülen yüksek patojenik çeşitlilik ve ırk gelişimleri dayanıklı çeşit geliştirilmesini zorlaştırmakta ve sürekli ıslah çalışmalarını zorunlu kılmaktadır (Liu, 2011). Bu çalışmada, ilgili alandaki eksikliklerin giderilmesi amacıyla ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen arpa çeşitlerinin, hastalığın görüldüğü farklı bölgelerden elde edilen *Ptt* izolatlarına karşı konukçu tepkilerinin belirlenmesi ve konukçu dokularında patojen DNA' sının kantitatif olarak saptanmasına yönelik patojenisite tekniğinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Türkiye' nin beş farklı ilinden elde edilen ve ağ benek belirtileri gösteren yapraklardan patojen izolasyonları gerçekleştirilmiştir. *Pyrenophora teres* f. *teres* şüphesi bulunan izolatlar PDA ortamında kültüre alınarak morfolojik ve moleküler karakterizasyon yöntemleriyle doğrulanmıştır. Morfolojik verilerin; Shoemaker (1962)' in farklı *Pyrenophora* türleri üzerinde yapmış olduğu morfolojik ve taksonomik analizleriyle, Smedegård-Petersen, V. (1971)' in *P. teres*' in iki farklı

formunu saptamaya yönelik yapmış olduğu çalışmasıyla, farklı buğdaygiller üzerinde hastalığa neden olan *Pyrenophora*, *Setosphaeria*, *Cochliobolus* türleri ve bunların anamorf dönemlerini içeren 182 türün ayrıntılı olarak tanımlandığı Sivanesan (1987)' in çalışma sonuçlarıyla, Liu vd. (2011)' nin *P. teres*' in morfolojik ve mikroskopik özelliklerini, biyolojisini ve genetik yapısını incelediği çalışmasından elde edilen verilerle ve Zhang vd. (2012)' nin 174 *Pleosporales* cinsini ele aldığı çalışmanın verileriyle uyumlu olduğu görülmektedir.

Patojen popülasyonları içerisinde izolatların doğru bir şekilde tespit edilmesi ve genetik varyasyonlarının incelenmesi, hastalık yönetim stratejilerini ve yetiştirme yöntemlerini belirlemek amacıyla oldukça önem taşımaktadır. Bu çalışma kapsamında elde edilen izolatlara ait genomik DNA, gpd1/gpd2 ve ITS1/ITS4 primer setleri kullanılarak analiz edilmiştir. Benzer şekilde Zhang ve Berbee (2001), *Pyrenophora* türlerini ve onun anamorfı olan *Drechslera*' nın taksonomisini incelemek amacıyla ITS ve *GAPDH* gen bölgelerinin DNA dizilerini analiz etmiştir. Çalışma, 39 adet *Pyrenophora* ve *Drechslera* izolatı ile 32 adet beş dış grup ile yapılmış ve daha önce yanlış tanımlandığı belirlenen dört izolat *Bipolaris* türleri olarak yeniden sınıflandırılmıştır. Çalışılan *GAPDH* ve ITS bölgelerinin türün ayırımında yeterli çözünürlüğe sahip olduğu, bununla birlikte NCBI GenBank veri tabanında bireysel olarak sekans bölgelerinde bazı yanlış uyuşmaların da gözlendiği ve bu durumun multilokus filogenetik analizler ile konfirme edilmesi gerekliliği anlaşılmıştır.

Patojenisite çalışmaları Tekauz (1985) tarafından yapılan araştırmalara dayandırılarak gerçekleştirilmiş ve izolatların hastalandırma kabiliyetleri arasında farklılıkların olduğu gözlemlenmiştir. Daha önce yapılmış birçok çalışmada, etmen *P. teres*' in denemede kullanılan genotip/çeşitlere karşı patojenik varyasyon gösterdiğini bildirmiştir (Pon, 1949; Khan ve Boyd, 1969; Tekauz 1990; Arabi vd., 2003; Tuohy vd., 2006; Boungab vd., 2012; Liu vd. 2012; Akhavan vd., 2016; Wallwork vd., 2016). Patojenisite testi sonucu görülen bu farklılıklar da izolatlar arasındaki genetik çeşitliliğin bir sonucu olarak değerlendirilebilir.

Tarım ve Orman Bakanlığı' na bağlı araştırma enstitüleri ile özel firmalardan temin edilen 92 arpa çeşidi üzerinde yapılmış olan çeşit reaksiyonu testleri sonucunda her çeşitte semptom oluşumu gözlenmiş fakat çeşitlerin patojene karşı gösterdiği reaksiyonlar arasında belirgin farklılıklar tespit edilmiştir. İnce 04, Novasadski, Cervoice, Zeynelağa ve Sabribey çeşitleri en hassas olarak

belirlenirken, Harman, Bilgi 91, Ünver, Aydanhanım ve Tokak 157/37 en dayanıklı çeşitler arasında yer almıştır. Diğer çeşitler ise orta derecede dirençli, orta derecede dirençli-orta derecede duyarlı olacak şekilde tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar, arpa çeşitlerine göre konukçu yanıtının ve patojenin hastalandırma kabiliyetinin değişebildiğini göstermiştir (Liu vd., 2011). Karakaya ve Akyol (2006), kontrollü koşullar altında yapmış oldukları çalışmada 15 yerel arpa çeşidinin 4 adet *P. teres* izolatına karşı gösterdikleri fide dönemi reaksiyonlarını incelemiş ve çeşitlerin patojene karşı gösterdikleri tepkilerde belirgin farklılıklar tespit etmiştir. Benzer şekilde Karakaya vd. (2015), 25 arpa çeşidinin 3 *Ptt* izolatına karşı gösterdiği fide dönemi tepkilerini değerlendirmiş ve bu çalışmada bulunan sonuçlara benzer şekilde İnce 04' ü hassas çeşitler arasında belirlerken, Harman, Bilgi 91, Ünver ve Aydanhanım çeşitlerini en dayanıklı olarak tespit etmiştir. Taşkoparan ve Karakaya (2009), Doğan vd. (2013) ve Usta vd. (2014)' de arpa çeşitlerinin *Ptm* izolatlarına karşı fide dönemi reaksiyonlarını incelemiş ve çeşitler arası farklılıkları gözlemlemişlerdir. Daha önce yapılmış olan araştırmaların sonuçları, bu çalışmanın sonuçlarıyla uyum sağlamak ve ülkemizde bulunan konukçu çeşitleri ile patojen izolatlarında yüksek genetik çeşitlilik olduğunu göstermektedir. Hastalığa dayanıklı arpa çeşitlerinin tercih edilmesi, etmenin neden olduğu verim ve kalite kayıplarını sınırlama açısından katkı sağlayacaktır.

Etmen *Ptt* DNA' sının erken enfeksiyon aşamasında konukçu dokusundan tespitine yönelik SYBR Green I temelli RT-PCR' a dayalı çalışma PttQ4-F/PttQ4-R primer çifti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Primerin özgülüğü, enfekte olmamış bitki dokularına ve diğer ilişkili mantar türlerine karşı test edilmiş ve doğruluğu onaylanmıştır. Ayrıca, bu spesifik primerin patojen DNA' sını 1 pg düzeyinde saptayabildiği belirlenmiş ve spesifik olarak 173 bp büyüklüğünde bant vermiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçların Poudel vd. (2017)' nin bulguları ile örtüştüğü belirlenmiştir. İnokulasyondan sonraki 1., 2., 3. ve 4. günlerde yaprak dokularından elde edilen sonuçlar, hastalık şiddeti değerlendirmeleri ile arpa çeşitlerindeki patojen DNA miktarları arasında güçlü bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Hassas çeşitlerde, dayanıklı çeşitlere kıyasla daha yüksek seviyelerde patojen DNA' sı tespit edilmiş ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İnokulasyonun 4. gününde çeşitlerin dayanıklılık düzeyleri Harman, Tokak 157/37, İnce 04 ve Novasalski olarak sıralanmıştır. Bu sonuçlar, *Ptt*' nin erken enfeksiyon aşamasında bitki dokusundan RT-PCR yöntemiyle tespit

edilmesinin mümkün olduğunu göstermektedir. Ayrıca, bu yaklaşımın hassas ve dayanıklı arpa çeşitlerinin ayırımında önemli bir potansiyele sahip olabileceği tespit edilmiştir.

Arpa tohumunlarında *Pyrenophora* türlerinin tespiti ve miktarını belirlemek amacıyla Bates vd. (2001), SYBR Green I kullanarak RT-PCR tekniği kullanmış ve enfekteli tohumdan izole edilen patojen DNA' sını pikogram seviyesine kadar ölçebilmiştir. *Ascochyta rabiei*, *Alternaria burnsii*, *A. solani*, *A. alternata*, *B. sorokiniana* gibi farklı patojenlerin aynı yöntemle enfeksiyon düzeylerini izlemeye yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Leiminger vd., 2015; Bayraktar vd., 2016; Özer ve Bayraktar, 2019; Alkan vd., 2022). Alkan vd. (2022) buğday yaprak dokularında *B. sorokiniana*' nın tespitine yönelik benzer bir çalışma gerçekleştirmiştir. Çalışmada SSU, ITS ve *GAPDH* bölgelerine özgü spesifik primerler dizayn edilmiş ve etmen DNA' sı, 0,01 pg 0,1 pg ve 1 pg düzeylerinde başarıyla tespit edilmiştir. Dayanıklı ve hassas olarak belirlenen çeşitlerde hastalık ilerlemesi, inokülasyondan sonra 3., 5. ve 8. günlerde yaprak dokularından elde edilen DNA miktarları ile istatistiksel olarak farklılık göstermiştir. Reaksiyonun klasik değerlendirilmesi sonucu ve enfekteli bitki dokularındaki patojen miktarı arasında yüksek düzeyde bir korelasyon olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların bu çalışma verileriyle uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan bu tekniğin görsel hastalık değerlendirmesine alternatif olarak enfeksiyonun erken aşamalarında dirençli yetiştirme materyalinin etkin seçiminde kullanılabileceği, ayrıca etmenin varlığının tespiti ve miktarının ölçümünde de yararlı olacağı düşünülmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Arpada zarara neden olan fungal hastalık etmenleri içerisinde bulunan *P. teres f. teres*' in neden olduğu ağ benek hastalığı ülkemizde ve dünyada arpa üretimini sınırlayan önemli bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Diğer birçok hastalıkta olduğu gibi mücadele stratejileri açısından en çevreci, pratik ve ekonomik olan yöntem dayanıklı çeşitlerin kullanımıdır. Bu nedenle hastalıklara karşı dayanıklı çeşitlerin belirlenerek kullanılması, sürdürülebilir üretim açısından da büyük önem taşımaktadır. Bu çalışma kapsamında Türkiye' de yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan arpa çeşitlerinin, kontrollü koşullar altında ağ benek hastalığı etmenine karşı gösterdiği reaksiyonlar açısından farklılık gösterdiği görülerek dayanıklı ve hassas çeşitler tespit edilmiştir.

RT-PCR yöntemi, patojenlerin teşhisinde klasik PCR' lara göre oldukça hassas ve hızlı bir yaklaşım sunmaktadır. Ayrıca konukçu dokudaki patojen miktarının zamanla kantitatif olarak izlenmesi konukçunun dayanıklılık durumunu değerlendirmede başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Bu çalışmada, patojen DNA' sının enfekteli dokulardan tespiti amacıyla SYBR Green I temelli Real-Time PCR kullanılmış ve alınan uygun Cq değerleri ile sigmoidal eğriler, gerçekleştirilen yöntemlerin doğruluğunu göstermiştir. PCR özgüllüğü enfekte olmamış bitki dokuları ve ilişkili diğer fungus türleri üzerinde test edilmiş, primerin sadece hedeflenen türe bağlandığı görülerek doğrulanmıştır. Aynı zamanda patojen DNA' sı 1 pg düzeyine kadar tespit edilebilmiştir. *Pyrenophora teres f. teres*' in erken enfeksiyon aşamasında bitki dokusundan tespitine yönelik gerçekleştirilen RT-PCR analizleri sonucunda hassas çeşitlerde daha yüksek seviyelerde patojen DNA' sı tespit edilmiştir. Hassas ve dayanıklı çeşitler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, patojenin genetik çeşitlilik gösterme potansiyeli dayanıklı ıslah çalışmalarını sürekli ve zorunlu kılmaktadır. Bu çalışma kapsamında kullanılan RT-PCR yönteminin klasik teşhis yöntemlerine alternatif bir yaklaşım sunarak arpa üretiminde hastalığa karşı dayanıklı çeşitlerin erken dönemde ayırt edilmesine olanak sağlayacağı ve hastalıkla mücadelede uygun stratejilerin belirlenmesi süreçlerine katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abebe, W. (2021). Barley net blotch disease management: A review. *Int. J. Environ. Agric. Res*, 7(9), 69-81.
- Agrios, G.N. (2005). Plant pathology, 5th edn. Academic, Amsterdam.
- Ahmed Lhadj, W., Bounagab, K., Righi Assia, F., Çelik Oğuz, A., Karakaya, A., & Ölmez, F. (2022). Genetic diversity of *Pyrenophora teres* in Algeria. *Journal of Plant Pathology*, 104(1), 305. <https://doi.org/10.1007/s42161-021-01010-0>
- Akhavan, A., Turkington, T. K., Askarian, H., Tekauz, A., Xi, K., Tucker, J. R., ... & Strelkov, S. E. (2016). Virulence of *Pyrenophora teres* populations in western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 38(2), 183-196. <https://doi.org/10.1080/07060661.2016.1159617>
- Aktaş, H. (1997). Investigation of net blotch disease (*Drechslera teres* Shoem. f. sp. *teres* Smedeg. *D. teres* Shoem. f. sp. *maculata* Smedeg.) of barley. *Journal of Turkish Phytopathology*, 26(1), 17-22.
- Aktas, H. (1987). Investigation of the physiological variation of *Drechslera teres*(Sacc.) Shoemaker at the middle growth of barley and the establishment of the reactions of the barley against this agitation). *Journal of Turkish Phytopathology*, 16(2), 53-65.
- Alkan, M., Bayraktar, H., İmren, M., Özdemir, F., Lahlali, R., Mokrini, F., ... & Özer, G. (2022). Monitoring of host suitability and defense-related genes in wheat to *Bipolaris sorokiniana*. *Journal of Fungi*, 8(2), 149 <https://doi.org/10.3390/jof8020149>
- Arabi, M. I. E., Al-Safadi, B., & Charbaji, T. (2003). Pathogenic variation among isolates of *Pyrenophora teres*, the causal agent of barley net blotch. *Journal of Phytopathology*, 151(7-8), 376-382. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00734.x>
- Araya, A., Karakaya, A., Oğuz, A. Ç., & Akdoğan, G. (2022). Determination of The Seedling Reactions of Some Two-Rowed Barley Landraces Maintained at Osman Tosun Gene Bank to *Pyrenophora teres* f. *teres*. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 36(1), 20-26. <https://doi.org/10.15316/SJAFS.2022.004>
- Bach, E., Christensen, S., Dalgaard, L., Larsen, P. O., Olsen, C. E., & Smedegård-Petersen, V. (1979). Structures, properties and relationship to the aspergillomarasmine of toxins produced by *Pyrenophora teres*. *Physiological Plant Pathology*, 14(1), 41-46. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(79\)90023-7](https://doi.org/10.1016/0048-4059(79)90023-7)
- Backes, A., Guerriero, G., Ait Barka, E., & Jacquard, C. (2021). *Pyrenophora teres*: taxonomy, morphology, interaction with barley, and mode of control. *Frontiers in Plant Science*, 12, 614951. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.614951>
- Badr, A., Sch, R., Rabey, H. E., Effgen, S., Ibrahim, H. H., Pozzi, C., ... & Salamini, F. (2000). On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*). *Molecular Biology and Evolution*, 17(4), 499-510. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026330>
- Bakonyi, J., & Justesen, A. F. (2007). Genetic relationship of *Pyrenophora graminea*, *P. teres* f. *maculata* and *P. teres* f. *teres* assessed by RAPD analysis. *Journal of Phytopathology*, 155(2), 76-83. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01192.x>
- Bates, J. A., & Taylor, E. J. (2001). Scorpion ARMS primers for SNP real-time PCR detection and quantification of *Pyrenophora teres*. *Molecular Plant Pathology*, 2(5), 275-280. <https://doi.org/10.1046/j.1464-6722.2001.00074.x>
- Bates, J. A., Taylor, E. J. A., Kenyon, D. M., & Thomas, J. E. (2001). The application of real-time PCR to the identification, detection and quantification of *Pyrenophora* species in barley seed. *Molecular Plant Pathology*, 2(1), 49-57. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2001.00049.x>

- Bayraktar, H., Özer, G., Aydoğan, A., & Palacioğlu, G. (2016). Determination of Ascochyta blight disease in chickpea using real-time PCR. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 123, 109-117. <https://doi.org/10.1007/s41348-016-0017-0>
- Beishenkanova, B., Karakaya, A., & Oğuz, A. Ç. (2020). The Use of an Alternative Differential Set for Determination of *Pyrenophora teres* f. *maculata* Pathotypes. *Journal of Agricultural Sciences*, 26(4), 395-405. <https://doi.org/10.15832/ankutbd.504961>
- Bouajila, A., Zoghalmi, N., Murad, S., Baum, M., Ghorbel, A., & Nazari, K. (2013). Genetic differentiation in *Pyrenophora teres* f. *teres* populations from Syria and Tunisia as assessed by AFLP markers. *Letters in Applied Microbiology*, 56(6), 389-400. <https://doi.org/10.1111/lam.12029>
- Boungab, K., Belabid, L., Fortas, Z., & Bayaa, B. (2012). Pathotype diversity among Algerian isolates of *Pyrenophora teres* f. *teres*. *Phytopathologia Mediterranea*, 577-586. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-10561
- Campbell, G. F., Crous, P. W., & Lucas, J. A. (1999). *Pyrenophora teres* f. *maculata*, the cause of *Pyrenophora* leaf spot of barley in South Africa. *Mycological Research*, 103(3), 257-267. <https://doi.org/10.1017/S0953756298007114>
- Campbell, G. F., Lucas, J. A., & Crous, P. W. (2002). Evidence of recombination between net-and spot-type populations of *Pyrenophora teres* as determined by RAPD analysis. *Mycological Research*, 106(5), 602-608. <https://doi.org/10.1017/S0953756202005853>
- Cromey, M. G., & Parkes, R. A. (2003). Pathogenic variation in *Drechslera teres* in New Zealand. *New Zealand Plant Protection*, 56, 251-256. <https://doi.org/10.30843/nzpp.2003.56.6020>
- Çelik, A. O., Ölmez, F., & Karakaya, A. (2018). Mating type idiomorphs of *Pyrenophora teres* in Turkey. *Zemdirbyste-Agriculture*. <https://doi.org/10.13080/z-a.2018.105.035>
- Çelik, E., & Karakaya, A. (2015). Determination of the prevalence and severity of fungal foliage and head diseases occurring in the barley growing areas of Eskişehir province of Turkey. *Plant Protection Bulletin*, 55(2).
- Dahanayaka, B. A., Vaghefi, N., Knight, N. L., Bakonyi, J., Prins, R., Seress, D., ... & Martin, A. (2021). Population structure of *Pyrenophora teres* f. *teres* barley pathogens from different continents. *Phytopathology*, 111(11), 2118-2129. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-20-0390-R>
- Damgacı, E. (2014). Arpa ağbenek (*Pyrenophora teres* Drechs.) hastalığının yayılış durumu, neden olduğu verim kaybı ve verim bileşenlerine etkisi üzerinde araştırmalar. *Plant Protection Bulletin/Bitki Koruma Bülteni*, 54(4).
- Damgacı, E. (2014). Investigations on the prevalence of barley net blotch (*Pyrenophora teres* Drechs.) the yield losses caused by disease and the relationships between disease and yield components. *Plant Protection Bulletin*, 54(4).
- Doğan, D. A., Karakaya, A., Oğuz, A. Ç., Ergün, Z. M. Ğ. S. N., & Aydoğan, S. Bazı arpa genotiplerinin *Drechslera teres* f. *maculata* (Smed.-Pet., 1971)'ya karşı fide dönemi reaksiyonlarının belirlenmesi.
- Dokhanchi, H., Arzanlou, M., & Abed-Ashtiani, F. (2021). Sexual recombination and genetic diversity in Iranian populations of *Pyrenophora teres*. *Journal of Phytopathology*, 169(7-8), 447-460. <https://doi.org/10.1111/jph.13001>
- Ellwood, S. R., Syme, R. A., Moffat, C. S., & Oliver, R. P. (2012). Evolution of three *Pyrenophora* cereal pathogens: recent divergence, speciation and evolution of non-coding DNA. *Fungal Genetics and Biology*, 49(10), 825-829. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.07.003>

- Ertürk, H., Karakaya, A., & Oğuz, A. Ç. (2018). Leaf diseases occurring on barley plants in Bala district of Ankara province, Turkey. *Ecological Life Sciences*, 13(4), 204-207. <https://doi.org/10.12739/NWSA.2018.13.4.5A0110>
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT database. <http://www.fao.org/faostat/en/#data> adresinden 2 Kasım 2024 tarihinde alınmıştır.
- Friis, P., Olsen, C. E., & Møller, B. L. (1991). Toxin production in *Pyrenophora teres*, the ascomycete causing the net-spot blotch disease of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Biological Chemistry*, 266(20), 13329-13335.
- Grewal, T. S., Rossnagel, B. G., & Scoles, G. J. (2008). The utility of molecular markers for barley net blotch resistance across geographic regions. *Crop Science*, 48(6), 2321-2333. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.01.0046>
- Hirayama, T., & Shinozaki, K. (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *The Plant Journal*, 61(6), 1041-1052. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04124.x>
- İlgen, M. Z., Karakaya, A., & Oğuz, A. Ç. (2017). Leaf diseases occurring on barley and wheat fields in Çubuk District of Ankara, Turkey.
- Jebbouj, R., & El Yousfi, B. (2010). An integrated multivariate approach to net blotch of barley: virulence quantification, pathotyping and a breeding strategy for disease resistance. *European Journal of Plant Pathology*, 127, 521-544. <https://doi.org/10.1007/s10658-010-9617-x>
- Jonsson, R., Sail, T., & Bryngelsson, T. (2000). Genetic diversity for random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in two Swedish populations of *Pyrenophora teres*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22(3), 258-264. <https://doi.org/10.1080/07060660009500473>
- Jordan, V. W. L. (1981). Aetiology of barley net blotch caused by *Pyrenophora teres* and some effects on yield. *Plant Pathology*, 30(2), 77-87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1981.tb01232.x>
- Karakaya, A., & Akyol, A. (2006). Determination of the seedling reactions of some Turkish barley cultivars to the net blotch. *Plant Pathology Journal (Faisalabad)*, 2006, 5(1), 113–114.
- Karakaya, A., Oğuz, A. Ç., & Mert, Z. (2015). Determination of the seedling reactions of some barley cultivars to *Drechslera teres* f. *teres*. *Plant Protection Bulletin*, 55(3).
- Keiper, F. J., Grcic, M., Capio, E., & Wallwork, H. (2008). Diagnostic microsatellite markers for the barley net blotch pathogens, *Pyrenophora teres* f. *maculata* and *Pyrenophora teres* f. *teres*. *Australasian Plant Pathology*, 37, 428-430. <https://doi.org/10.1071/AP08035>
- Khan, T. N., & Boyd, W. J. R. (1969). Physiologic specialization in *Drechslera teres*. *Australian Journal of Biological Sciences*, 22(5), 1229-1236. <https://doi.org/10.1071/B19691229>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kumari, R., Kumar, A., Kumar, P., & Jakhar, D. S. (2023). Advances in plant-pathogen interactions in terms of biochemical and molecular aspects. In *Plant-Microbe Interaction-Recent Advances in Molecular and Biochemical Approaches* (s. 111–122). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91875-6.00021-9>
- Kün, E. (1996). Tahıllar-1 (Serin İklim Tahılları). Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Yayın No:1451. Ankara. 332 s.
- Lehmensiek, A., Bester-Van Der Merwe, A. E., Sutherland, M. W., Platz, G., Kriel, W. M., Potgieter, G. F., & Prins, R. (2010). Population structure of South African and Australian

- Pyrenophora teres* isolates. *Plant Pathology*, 59(3), 504-515. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02231.x>
- Leiminger, J., Bäßler, E., Knappe, C., Bahnweg, G., & Hausladen, H. (2015). Quantification of disease progression of *Alternaria* spp. on potato using real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 141, 295-309. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0542-2>
- Leisova, L., Kucera, L., Minarikova, V., & Ovesna, J. (2005). AFLP-based PCR markers that differentiate spot and net forms of *Pyrenophora teres*. *Plant Pathology*, 54(1), 66-73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01117.x>
- Leisova, L., Minarikova, V., Kucera, L., & Ovesna, J. (2006). Quantification of *Pyrenophora teres* in infected barley leaves using real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 67(3), 446-455. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.04.018>
- Liu, Z. H., Zhong, S., Stasko, A. K., Edwards, M. C., & Friesen, T. L. (2012). Virulence profile and genetic structure of a North Dakota population of *Pyrenophora teres* f. *teres*, the causal agent of net form net blotch of barley. *Phytopathology*, 102(5), 539-546. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-11-0243>
- Liu, Z., Ellwood, S. R., Oliver, R. P., & Friesen, T. L. (2011). *Pyrenophora teres*: profile of an increasingly damaging barley pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 12(1), 1-19. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00649.x>
- Lu, S., Platz, G. J., Edwards, M. C., & Friesen, T. L. (2010). Mating type locus-specific polymerase chain reaction markers for differentiation of *Pyrenophora teres* f. *teres* and *P. teres* f. *maculata*, the causal agents of barley net blotch. *Phytopathology*, 100(12), 1298-1306. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-10-0135>
- Marin-Felix, Y., Hernández-Restrepo, M., Iturrieta-González, I., García, D., Gené, J., Groenewald, J. Z., ... & Crous, P. W. (2019). Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 3. *Studies in Mycology*, 94, 1-124. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2019.05.001>
- Martin, A., McLean, M. S., Snyman, L., & Lopez-Ruiz, F. J. (2021). Advances in understanding the epidemiology, molecular biology and control of net blotch and the net blotch barley interaction. *Achieving Durable Disease Resistance in Cereals*, 477-523.
- Mathre, D. E. (1982). Compendium of Barley Diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. *American Phytopathological Society*.
- Mathre, D. E. (1997). Compendium of barley diseases (Vol. 90). D. E. Mathre (Ed.). St. Paul, MN: APS press. *American Phytopathological Society*.
- McDonald, B. A., & Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1), 349-379. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443>
- McLean, M. S., Howlett, B. J., & Hollaway, G. J. (2009). Erratum to: Epidemiology and control of spot form of net blotch (*Pyrenophora teres* f. *maculata*) of barley: A review. *Crop and Pasture Science*, 60(5), 499-499.
- McLean, M. S., Martin, A., Gupta, S., Sutherland, M. W., Hollaway, G. J., & Platz, G. J. (2014). Validation of a new spot form of net blotch differential set and evidence for hybridisation between the spot and net forms of net blotch in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 43, 223-233. <https://doi.org/10.1007/s13313-014-0285-8>
- Oğuz, A. Ç., Ölmez, F., & Karakaya, A. (2019). Genetic diversity of net blotch pathogens of barley in Turkey. *International Journal of Agriculture and Biology*, 5, 1089-1096. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0998>

- Oğuz, A. Ç., Rahimi, A., & Karakaya, A. (2019). Seedling response of Iranian barley landraces to *Pyrenophora teres* f. *teres* and *Pyrenophora teres* f. *maculata*. *Journal of Agricultural Sciences*, 25(1), 86-92. <https://doi.org/10.15832/ankutbd.539006>
- Özdemir, H. Y., Karakaya, A., & Çelik Oğuz, A. R. Z. U. (2017). Kırıkkale ilinde buğday ve arpa ekim alanlarında görülen fungal yaprak hastalıklarının belirlenmesi. *Bitki Koruma Bülteni*, 57(2), 89-112. <https://doi.org/10.16955/bitkorb.322368>
- Özer, G., & Bayraktar, H. (2019). Development of conventional and real-time PCR assays to detect *Alternaria burnsii* in cumin seed. *Gesunde Pflanzen*, 71(3), 205-212. <https://doi.org/10.1007/s10343-019-00466->
- Palacioğlu, G., Özer, G., & Bayraktar, H. (2021). Some molecular techniques based on polymerase chain reaction in detection of plant pathogen fungi. *Bilim ve Teknoloji Enstitüsü Dergisi*, 2021, 11(3), 1831-1845. <https://doi.org/10.21597/jist.826047>
- Peever, T. L., & Milgroom, M. G. (1994). Genetic structure of *Pyrenophora teres* populations determined with random amplified polymorphic DNA markers. *Canadian Journal of Botany*, 72(7), 915-923. <https://doi.org/10.1139/b94-116>
- Peltonen, S., Jalli, M., Kammiovirta, K., & Karjalainen, R. (1996). Genetic variation in *Drechslera teres* populations as indicated by RAPD markers. *Annals of Applied Biology*, 128(3), 465-477. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1996.tb07107.x>
- Penner, G. A., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., ... & Fedak, G. (1993). Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *Genome Research*, 2(4), 341-345. <https://doi.org/10.1101/gr.2.4.341>
- Pereira, F., Carneiro, J., & Amorim, A. (2008). Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences (Discontinued)*, 2(3), 187-200. <https://doi.org/10.2174/187221508786241738>
- Pon, D. S. (1949, January). Physiologic specialization and variation in *Helminthosporium-teres*. In *Phytopathology* (Vol. 39, No. 1, pp. 18-18). 3340 Pilot Knob Road, St Paul, Mn 55121: *American Phytopathological Society*.
- Poudel, B., Ellwood, S. R., Testa, A. C., McLean, M., Sutherland, M. W., & Martin, A. (2017). Rare *Pyrenophora teres* hybridization events revealed by development of sequence-specific PCR markers. *Phytopathology*, 107(7), 878-884. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-16-0396-R>
- Poudel, B., Vaghefi, N., McLean, M. S., Platz, G. J., Sutherland, M. W., & Martin, A. (2019). Genetic structure of a *Pyrenophora teres* f. *teres* population over time in an Australian barley field as revealed by Diversity Arrays Technology markers. *Plant Pathology*, 68(7), 1331-1336. <https://doi.org/10.1111/ppa.13035>
- Pourkheirandish, M., & Komatsuda, T. (2007). The importance of barley genetics and domestication in a global perspective. *Annals of Botany*, 100(5), 999-1008. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm139>
- Pütsepp, R., Mäe, A., Põllumaa, L., Andresen, L., & Kiiker, R. (2024). Fungicide Sensitivity Profile of *Pyrenophora teres* f. *teres* in Field Population. *Journal of Fungi*, 10(4), 260. <https://doi.org/10.3390/jof10040260>
- Rau, D., Attene, G., Brown, A. H., Nanni, L., Maier, F. J., Balmas, V., ... & Papa, R. (2007). Phylogeny and evolution of mating-type genes from *Pyrenophora teres*, the causal agent of barley “net blotch” disease. *Current Genetics*, 51, 377-392. <https://doi.org/10.1007/s00294-007-0126-1>
- Rau, D., Brown, A. H., Brubaker, C. L., Attene, G., Balmas, V., Saba, E., & Papa, R. (2003). Population genetic structure of *Pyrenophora teres* Drechs. the causal agent of net blotch in Sardinian landraces of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 947-959. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1173-0>

- Rau, D., Maier, F. J., Papa, R., Brown, A. H., Balmas, V., Saba, E., ... & Attene, G. (2005). Isolation and characterization of the mating-type locus of the barley pathogen *Pyrenophora teres* and frequencies of mating-type idiomorphs within and among fungal populations collected from barley landraces. *Genome*, 48(5), 855-869. <https://doi.org/10.1139/g05-046>
- Saraç, İ., Karakaya, A., & Oğuz, A. Ç. (2019). Elazığ ilinde arpalarda görülen yaprak hastalıkları. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 28(1), 1-6.
- Schaad, N. W., & Frederick, R. D. (2002). Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24(3), 250-258. <https://doi.org/10.1080/07060660209507006>
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A., & Gallitelli, D. (2004). Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 893-908. <https://doi.org/10.1007/s10658-004-4842-9>
- Seidi, M., Oğuz, A. Ç., & Karakaya, A. Edirne İlinde Buğday ve Arpa Bitkilerinde Görülen Yaprak Hastalıkları. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 38(1), 13-26. <https://doi.org/10.20479/bursauludagziraat.1341703>
- Serenius, M., Manninen, O., Wallwork, H., & Williams, K. (2007). Genetic differentiation in *Pyrenophora teres* populations measured with AFLP markers. *Mycological Research*, 111(2), 213-223. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.11.009>
- Shipton, W. A., Khan, T. N., ve Boyd, W. J. R. (1973). Net blotch of barley. *Review of Plant Pathology*, 52, 269-290.
- Shoemaker, R. A. (1962). Drechslera Ito. *Canadian Journal of Botany*, 40(6), 809-836. <https://doi.org/10.1139/b62-075>
- Singh, D. P. (2017). "Host resistance to spot blotch (*Bipolaris sorokiniana*) in wheat and barley," *Management of Wheat and Barley Diseases* (Florida, ABD: Apple Academic Press), (s. 327-339).
- Sivanesan, A. (1987). Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological Research*, 158, (s. 1-261).
- Smedegård-Petersen, V. (1971). *Pyrenophora teres* f. *maculata* f. nov. and *Pyrenophora teres* f. *teres* on barley in Denmark. Aktaş, H. (1997). Investigation of net blotch disease (*Drechslera teres* Shoem. f. sp. *teres* Smedeg. D. *teres* Shoem. f. sp. *maculata* Smedeg.) of barley. Kgl. Vet. Landbohojsk. Arsskr., (s. 124-144).
- Smedegard-Petersen, V. (1972). The perithecial and pycnidial stages of *Pyrenophora teres* and *P. graminea* in Denmark.
- Smedegard-Petersen, V. (1976). Pathogenesis and genetics of net-spot blotch and leaf stripe of barley caused by *Pyrenophora teres* and *Pyrenophora graminea*. DSR Verlag, Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, (s. 1-76)
- Smedegård-Petersen, V. (1977). Isolation of two toxins produced by *Pyrenophora teres* and their significance in disease development of net-spot blotch of barley. *Physiological Plant Pathology*, 10(3), 203-211. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(77\)90024-8](https://doi.org/10.1016/0048-4059(77)90024-8)
- Steffenson, B. J., & Webster, R. K. (1992). Pathotype diversity of *Pyrenophora teres* f. *teres* on barley. *Phytopathology*, 82(2), 170-177.
- Taşkoparan, H., & Karakaya, A. (2009). Assessment of the seedling reactions of some barley cultivars to *Drechslera teres* f. *maculata*. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 23(50), 60-62.

- Taylor, E. J. A., Stevens, E. A., Bates, J. A., Morreale, G., Lee, D., Kenyon, D. M., & Thomas, J. E. (2001). Rapid-cycle PCR detection of *Pyrenophora graminea* from barley seed. *Plant Pathology*, 50(3), 347-355. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00563.x>
- Tekauz, A. (1978). Canadian prairies in 1976'. *Plant N des maladies Disease des plantes*, 58(1), 9.
- Tekauz, A. (1985). A numerical scale to classify reactions of barley to *Pyrenophora teres*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 7(2), 181-183. <https://doi.org/10.1080/07060668509501499>
- Tekauz, A. (1990). Characterization and distribution of pathogenic variation in *Pyrenophora teres* f. *teres* and *P. teres* f. *maculata* from western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 12(2), 141-148. <https://doi.org/10.1080/07060669009501017>
- Tekauz, A., & Buchannon, K. W. (1977). Distribution of and sources of resistance to biotypes of *Pyrenophora teres* in Western Canada. *Canadian Journal of Plant Science*, 57(2), 389-395. <https://doi.org/10.4141/cjps77-056>
- Tekauz, A., & Mills, J. T. (1974). New types of virulence in *Pyrenophora teres* in Canada. *Canadian Journal of Plant Science*, 54(4), 731-734. <https://doi.org/10.4141/cjps74-123>
- Tini, F., Covarelli, L., Ricci, G., Balducci, E., Orfei, M., & Beccari, G. (2022). Management of *Pyrenophora teres* f. *teres*, the causal agent of net form net blotch of barley, in a two-year field experiment in central Italy. *Pathogens*, 11(3), 291. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030291>
- Tomić, A., Trkulja, V., Matić, S., Trkulja, N., Iličić, R., Scortichini, M., & Popović Milovanović, T. (2024). Net blotch (*Pyrenophora teres* Drechsler): An increasingly significant threat to barley production. *Plant Protection Science*, 60(1), 1-30. <https://doi.org/10.17221/122/2023-PPS>
- Tooley, P. W., Martin, F. N., Carras, M. M., & Frederick, R. D. (2006). Real-time fluorescent polymerase chain reaction detection of *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora pseudosyringae* using mitochondrial gene regions. *Phytopathology*, 96(4), 336-345. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0336>
- Tuohy, J. M., Jalli, M., Cooke, B. M., & O'Sullivan, E. (2006). Pathogenic variation in populations of *Drechslera teres* f. *teres* and *D. teres* f. *maculata* and differences in host cultivar responses. *European Journal of Plant Pathology*, 116, 177-185. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9001-z>
- TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu). (2023). Bitkisel üretim istatistikleri 2023. Erişim adresi: <https://www.tuik.gov.tr> adresinden 2 Kasım 2024 tarihinde alınmıştır.
- Usta, P., Karakaya, A., Oğuz, A., Mert, Z., Akan, K., & Çetin, L. (2014). Determination of the seedling reactions of twenty barley cultivars to six isolates of *Drechslera teres* f. *maculata*. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 29(1), 20-25. <https://doi.org/10.7161/anajas.2014.29.1.20>
- Von Bothmer, R., & Jacobsen, N. (1985). Origin, taxonomy, and related species. *Barley*, 26, 19-56. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr26.c2>
- Wallwork, H., Butt, M., & Capio, E. (2016). Pathogen diversity and screening for minor gene resistance to *Pyrenophora teres* f. *teres* in barley and its use for plant breeding. *Australasian Plant Pathology*, 45, 527-531. <https://doi.org/10.1007/s13313-016-0433-4>
- Williams, K. J., Smyl, C., Lichon, A., Wong, K. Y., & Wallwork, H. (2001). Development and use of an assay based on the polymerase chain reaction that differentiates the pathogens causing spot form and net form of net blotch of barley. *Australasian Plant Pathology*, 30, 37-44. <https://doi.org/10.1071/AP00063>

- Zadoks, J. C., Chang, T. T., & Konzak, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14(6), 415-421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1974.tb01084.x>
- Zhang, G., & Berbee, M. L. (2001). *Pyrenophora* phylogenetics inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia*, 93(6), 1048-1063. <https://doi.org/10.1080/00275514.2001.12063240>
- Zhang, Y., Crous, P. W., Schoch, C. L., & Hyde, K. D. (2012). Pleosporales. *Fungal Diversity*, 53, 1-221. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0117-x>
- Zohary, D., Hopf, M., & Weiss, E. (2012). Domestication of Plants in the Old World: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, *Europe, and the Mediterranean Basin*. Oxford University Press.

