

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

EGE BÖLGESİ BUĞDAY ÜRETİM ALANLARINDA

BYDV (*Barley yellow dwarf virus*)’NİN

BULUNMA DURUMUNUN VE

MOLEKÜLER ÖZELLİKLERİNİN

BELİRLENMESİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

Deniz ÇAPKAN

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. İsmail Can PAYLAN

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 28.12.2015

Bornova-İZMİR

2015

Zir. Müh. Deniz ÇAPKAN tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak sunulan “**Ege Bölgesi Buğday Üretim Alanlarında BYDV (*Barley yellow dwarf virus*)’nin Bulunma Durumunun ve Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi Üzerinde Araştırmalar**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve **28.12.2015** tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oy birliği/~~oy çokluğu~~ ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Yrd. Doç. Dr. İsmail Can PAYLAN

Raportör Üye : Prof. Dr. Semih ERKAN

Üye : Prof. Dr. Emin ONAN

İmza



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Ege Bölgesi Buğday Üretim Alanlarında BYDV (*Barley yellow dwarf virus*)’nin Bulunma Durumunun ve Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi Üzerinde Araştırmalar**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

28/12/2015



Deniz ÇAPKAN

ÖZET**EGE BÖLGESİ BUĞDAY ÜRETİM ALANLARINDA
BYDV (*Barley yellow dwarf virus*)’NİN BULUNMA DURUMUNUN VE
MOLEKÜLER ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ
ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR**

ÇAPKAN, Deniz

Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. İsmail Can PAYLAN

Aralık 2015, 50 sayfa

Buğday (*Triticum aestivum* spp. L.) insan beslenmesi için değerlendirilen kültür bitkileri arasında ekiliş ve üretim bakımından ilk sırada yer almaktadır. *Barley yellow dwarf luteovirus*, dünyadaki tahıl üretim alanlarında en yaygın ve önemli derecede verim kayıplarına neden olan tahıl virüs hastalığıdır. Bu çalışmada BYDV etmeninin Ege Bölgesi’nde buğday yetiştiriciliği yapılan alanlarda saptanması ve bulunma durumunun belirlenmesi amaçlanmıştır. TÜİK 2013 verilerinde yer alan ekili alan miktarları ile orantılı olarak 214 buğday örneği toplanmıştır ve örneklerde DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri kullanılarak bu etmenin varlığı araştırılmıştır. Enfeksiyon oranı %9.8 olarak saptanmıştır. Enfekteli iki izolatın (Aydın ve İzmir izolatları) gen dizilimlerindeki benzerlikler Türkiye ve Dünya izolatlarının gen dizilimleri ile kıyaslanmıştır. Dizi analizi ve filogeneik çalışmalar sonucunda, Aydın izolatının Türkiye izolatları ile %100 (KJ816648.1) ve %99 (KJ816646.1, KJ816649.1, KJ816645.1 ve KJ816643.1), Amerika (EF521828.1), Fas (AJ007922.1), Fransa (AY167109.1) ve Tunus (JX402453.1) izolatları ile %99; İzmir izolatının ise Amerika (DQ631850.1), Azerbaycan (JX275852.1), Brezilya (JX067837.1), Çin (EU332309.1), Fas (AJ007929.1), İsveç (EF521841.1), Mısır (KM046987.1) ve Türkiye (KJ816660.1; KJ816655.1) izolatları ile %99 oranında benzerlik taşıdığı saptanmıştır. Bu çalışma, Ege Bölgesi’nde buğday üretim alanlarında BYDV varlığının saptandığı bir çalışma olması açısından önem taşımaktadır.

Anahtar sözcükler: Buğday, BYDV, DAS-ELISA, RT-PCR, Filogenetik.

ABSTRACT**THE INVESTIGATIONS ON THE DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BYDV (*Barley yellow dwarf virus*) ON WHEAT PRODUCTION AREAS IN THE AEGEAN REGION OF TURKEY**

ÇAPKAN, Deniz

MSc in Department of Plant Protection

Supervisor: Assis. Prof. Dr. İsmail Can PAYLAN

December 2015, 50 pages

Wheat (*Triticum aestivum* spp. L.), among the crop plants for human nutrition assessment, is in the first place in terms of cultivation and production. *Barley yellow dwarf luteovirus* is the most prevalent viral disease on grain areas in the world and cause loss yield significantly. This study was conducted to determine the presence of BYDV on grain area in the Aegean region. Totally 214 samples were collected, proportionally with cultivated land according to TUIK 2013, and were tested by DAS-ELISA and RT-PCR. Infection rate was found as 9.8%. Sequences of infected two isolates (Aydin and Izmir) were compared similarities with other Turkey and world isolates. As a result of sequence analysis and phylogenetic methods, Aydin isolate showed 100% (KJ816648.1) and 99% (KJ816646.1, KJ816649.1, KJ816645.1 ve KJ816643.1) similarity with Turkey isolates, 99% similarity with USA (EF521828.1), Morocco (AJ007922.1), France (AY167109.1) ve Tunis (JX402453.1) isolates; Izmir isolate showed 99% similarity with USA (DQ631850.1), Azerbaijan (JX275852.1), Brazil (JX067837.1), China (EU332309.1), Morocco (AJ007929.1), Sweden (EF521841.1), Egypt (KM046987.1) and Turkey (KJ816660.1; KJ816655.1) isolates. This study is important for being a study in the Aegean region about the detection BYDV on grain areas.

Keywords: Wheat, BYDV, DAS-ELISA, RT-PCR, Phylogenetic.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam süresince yardımını ve desteğini eksik etmeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. İsmail Can PAYLAN'a ve deneyimlerini benimle paylaşan Zir. Yük. Müh. Müge ERGÜN'e teşekkür ederim. Ayrıca, desteğinden dolayı Dr. Süleyman TÜRKSEVEN'e, hem yardımcı olan hem de yanımda olan değerli arkadaşlarım Zir. Müh. Şükran YAYLA'ya, Zir. Müh. Gizem ERYİĞİT'e, Zir. Müh. Büşra CEYHAN'a ve her zaman yanımda olup beni destekleyen aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLERSayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1.GİRİŞ	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
3.MATERYAL VE METOD	15
3.1. Materyal	15
3.1.1. Bitki örnekleri	15
3.1.2. Serolojik testlerde kullanılan materyaller	16
3.1.3. Moleküler testlerde kullanılan materyaller	17
3.1.4. Çalışmada kullanılan diğer materyaller	18
3.2. Metod	18
3.2.1. Bitkilerin incelenmesi	18

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

3.2.2. Serolojik çalışmalar	18
3.2.3. Moleküler çalışmalar	20
4.BULGULAR	25
4.1. Bitki Örneklerinde Gözlenen Belirtiler	25
4.2. Serolojik Testlerin Sonuçları	26
4.3. Moleküler Testlerin Sonuçları	27
4.3.1. RT-PCR testlerinin sonuçları	27
4.3.2. Dizi analizi ve filogenetik sınıflandırma sonuçları	30
5.TARTIŞMA	35
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	40
KAYNAKLAR DİZİNİ	42
ÖZGEÇMİŞ	50
EKLER.....	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Arazi çalışmalarından toplanan örneklerden bir görünüm.	16
3.2. BYDV için yapılan DAS-ELISA testlerinden bir görünüm	20
3.3. TNA ekstraksiyonu aşamalarından görüntüler	21
3.4. PCR aşamalarından görüntüler	23
3.5. Agaroz jel elektroforezi aşamalarından görüntüler.....	23
4.1. Toplanan bitki örneklerinde görülen belirti tipleri	26
4.2. DAS-ELISA testinde pozitif sonuç veren örneklerden görünüm.....	27
4.3. TNA'sı çıkarılan örneklerden bir görünüm	28
4.4. BYDV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümünden bazıları	29
4.5. İllere göre toplanan örneklerde sağlıklı ve BYDV-PAV ile enfekteli örnek sayıları.....	30
4.6. Dizi analizi ve filogenetik çalışmalardan görüntüler	33
4.7. Aydın ve İzmir izolatlarının Türkiye ve Dünya izolatları ile akrabalık durumunu gösteren filogenetik ağaç	34

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Dünya’da buğday üretimi yapan ülkeler ve üretim miktarları	2
1.2. Türkiye’de 2013 yılında buğday üretimi yapılan bölgeler ve üretim miktarları	3
1.3. Ege Bölgesi’nde 2013 yılında buğday üretimi yapan iller ve üretim miktarları	3
3.1. Ege Bölgesi illerinde buğday ekilen alanlar ile orantılı olacak şekilde örnekleme yüzdeleri ve miktarları	15
3.2. BYDV’nin teşhisinde kullanılan primerlerin bilgileri	17
4.1. Ege Bölgesi illerinden toplanan örneklerde BYDV-PAV etmeninin bulunma durumu ve enfeksiyon oranları.....	30
4.2. Bu çalışma sonunda dizilimi yapılmış izolatların akrabalık ilişkilerinin karşılaştırıldığı Türkiye ve Dünya izolatları	31

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
-----------------	-----------------

μl	Mikrolitre
----	------------

g	Gram
---	------

mg	Miligram
----	----------

ml	Mililitre
----	-----------

bp	Base pair
----	-----------

V	Volt
---	------

nM	Nanometre
----	-----------

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
--------------------	-----------------

BSMV	<i>Barley stripe mosaic virus</i>
------	-----------------------------------

BYDV	<i>Barley yellow dwarf virus</i>
------	----------------------------------

CYDV	<i>Cereal yellow dwarf virus</i>
------	----------------------------------

JGMV	<i>Johnson grass mosaic virus</i>
------	-----------------------------------

MDMV	<i>Maize dwarf mosaic virus</i>
------	---------------------------------

MMV	<i>Maize mosaic virus</i>
-----	---------------------------

ONMV	<i>Oat necrotic mottle virus</i>
------	----------------------------------

SCMV	<i>Sugarcane mosaic virus</i>
------	-------------------------------

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
WDV	<i>Wheat dwarf virus</i>
WSMV	<i>Wheat streak mosaic virus</i>
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik asit
DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid Tri Fosfat
ddNTP	Dideoksinükleotid Tri Fosfat
EtBr	Ethidium Bromür
FAO	Food And Agriculture Organization of the United Nations
IgG	Immunoglobulin G
NaI	Sodyum İyodür
NCBI BLAST	National Center for Biotechnology Information, Basic Local Alignment Search Tool
RNA	Ribonükleik asit
RNAse	Ribonükleaz enzim
rpm	Revolutions per Minute (Dakikadaki devir sayısı)

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction
TAE	Tris-Asetik Asit-EDTA
TNA	Total Nükleik Asit
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu

1. GİRİŞ

Tahıllar, dünyadaki tarımsal üretimdeki insan beslenmesinde doğrudan veya dolaylı olarak kullanılan temel ürünlerdendir. İnsanların sağladıkları günlük kaloringin %50'sinden fazlası tahıllarla karşılanmaktadır. Hayvansal besinlerin günlük kalori sağlamadaki payı %20'dir. Hayvanlar da çoğunlukla bitkisel yemlerle beslendiklerine göre, insanlar günlük beslenmesinin yaklaşık $\frac{3}{4}$ 'nü tahıllardan sağlamaktadır (Kün, 1998; İlbağı, 2003).

İnsan beslenmesinde kullanılan tahıllar, hayvan beslemede ve hayvan endüstrisinde de yaygın biçimde kullanılmaktadır. Tahılların yeryüzünde bu kadar yaygın olmasının nedenlerinden en önemlisi, tarımın tarihsel gelişimi içinde tahılların en eski kültür bitkileri oluşları olabilir. Kazı çalışmaları buğday, arpa gibi tahılların çok eski bir geçmişi olduğunu ve insanlığın en erken kültüre aldığı bitkiler olduğu sonucunu göstermektedir. Tahılların geniş bir tür, çeşit ve ekotip zenginliğine sahip oluşları tahıl kültürünün dünyada yaygın oluşunun başka nedenlerindendir. Ayrıca, yetiştirilmelerinin kolay ve ürünün taşıma, depolama ve bekletilmeye elverişli olmaları da yayılımlarında etken olmuştur (Kün, 1998; İlbağı, 2003).

Tahıl üretimi, ticareti ve tüketimi günümüzün en önemli konuları arasında yer almaktadır. Dünyada ve ülkemizde hızla artan insan nüfusu ve hayvan varlığının beslenme sorunu, tahılların üretimine ayrı bir önem kazandırmaktadır. Nüfus ve beslenme sorunlarıyla ilgili kuruluşlar, nüfus artış hızıyla tahıllardaki verim artış hızı arasındaki ilişkileri izleyerek, artan tüketimi karşılayabilecek seviyede bir üretimin gerçekleşmesine çalışmaktadırlar. Tarımda kullanılabilir alanların daha fazla artırılmayacağı gerçeği de göz önüne alındığında, üretimin artırılması ancak verimin artışı ile mümkün olacaktır (Anonymous, 1999; İlbağı, 2003).

Tahıl cinslerinin hepsi *Poaceae* syn. *Gramineae* familyasına ait bitkilerdir. Buğday, arpa, yulaf, çavdar, çeltik, mısır, darı ve kuşyemi gibi önemli kültür bitkileri bu familya içinde yer almaktadır (Kün, 1994; İlbağı, 2003). Bugün dünyadaki tarım alanlarının büyük çoğunluğu tahıl grubu bitkilerden

oluşmaktadır. Türkiye’de işlenen alanın yaklaşık %80’inde tahıl üretimi yapılmaktadır. Ekolojik koşullar, nadas haricindeki tahıl tarımına ayrılan alanın %95’inde serin iklim tahıllarının yetiştirilmesini zorunlu kılar (Günen, 2007).

Çizelge 1.1’de görüldüğü gibi 2013 yılında dünya toplam buğday üretimi 713.217.069 ton olarak gerçekleştirilmiştir. Ülkelere göre dağılımda dünya buğday üretimindeki en büyük katkıyı Çin, Hindistan ve Amerika sağlamıştır. Dünya toplam buğday üretiminde Türkiye’nin payı % 1.3’dür. 2013 yılı itibariyle, 22.050.000 ton üretimi ile dünya tahıl üretiminde Türkiye 11. sırada yer almaktadır (FAO, 2013).

Çizelge 1.1 Dünya’da buğday üretimi yapan ülkeler ve üretim miktarları (FAO, 2013)

Ülkeler	Üretim Miktarları (ton)				
	2009	2010	2011	2012	2013
Çin	115.115.364	115.186.178	117.414.034	121.029.859	121.726.500
Hindistan	80.679.400	80.803.600	86.874.000	94.880.000	93.510.000
ABD	60.365.730	60.062.410	54.413.310	61.677.387	57.966.658
Rusya	61.739.750	41.507.580	56.239.990	37.719.640	52.090.797
Fransa	38.332.198	38.207.000	35.994.000	40.300.800	38.613.900
Türkiye	20.600.000	19.674.000	21.800.000	20.100.000	22.050.000
Diğerleri	309.887.837	293.884.676	326.654.166	295.789.186	327.259.214
Toplam	686.720.279	649.325.444	699.389.500	671.497.390	713.217.069

Tahıllar yurdumuzda tarım ürünleri içinde ekiliş ve üretim yönünden ilk sırada yer almaktadır. Özellikle buğday, insan beslenmesi için gerekli olan ekmeğin ham maddesidir ve bu nedenle ayrı bir öneme sahiptir (Kün, 1998; İlbaşı, 2003). Özellikle Orta ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri tahıl yetiştiriciliğinin ön planda olduğu bölgelerdir. Ege ve Akdeniz bölgelerinde polikültür tarım yapıldığı halde küçümsenmeyecek düzeyde tahıl yetiştiriciliği yapılmaktadır. Yıllardan yıla değişmekle birlikte 2013 yılı verilerine göre (Çizelge 1.2) Ege Bölgesi’nde 6.618.188 dekarlık bir alanda buğday ekimi yapılmış olup, bölgenin ortalama buğday verimi 536 kg/da’dır (TÜİK, 2013).

Çizelge 1.2 Türkiye'de 2013 yılında buğday üretimi yapılan bölgeler ve üretim miktarları (TÜİK, 2013)

Bölgeler	Ekilen alan (dekar)	Hasat edilen alan (dekar)	Üretim (ton)	Verim (kg/da)
Güneydoğu Anadolu	12.739.815	12.737.983	4.337.014	689
Orta Anadolu	12.241.273	12.237.033	3194077	539
Batı Anadolu	10.105.782	12.442.123	3.678.704	600
Akdeniz	7.825.090	7.822.038	2.535.628	652
Batı Karadeniz	7.473.960	7.470.793	1.847.275	492
Ege	6.618.188	6.603.579	1.770.668	536
Batı Marmara	6.170.506	6.156.268	2.107.507	342
Doğu Marmara	4.203.468	4.169.295	1.193.950	985
Ortadoğu Anadolu	3.799.741	3.732.347	635.488	350
Kuzeydoğu Anadolu	3.780.988	3.768.074	695.128	461
Doğu Karadeniz	363.189	363.189	54.561	255

Ege Bölgesi ürün desenini hububat, mısır, pamuk, patates, zeytin, bağ ve meyve oluşturmaktadır. Afyon ve Kütahya'da ağırlıklı olarak yetiştirilen tahıl grubu (Çizelge 1.3); Aydın, Manisa, Denizli ve İzmir'de daha çok ikinci ürün olarak yetiştirilmektedir.

Çizelge 1.3 Ege Bölgesi'nde 2013 yılında buğday üretimi yapan iller ve üretim miktarları (TÜİK, 2013)

İller	Ekilen alan(dekar)	Hasat edilen alan(dekar)	Üretim(ton)	Verim(kg/da)
Afyon	1.645.349	1.643.498	432.353	536
Kütahya	1.452.441	1.452.441	288.284	413
Manisa	1.050.476	1.050.476	296.370	547
Denizli	794.965	794.965	291.470	731
Uşak	709.127	709.127	166.860	486
Aydın	406.300	393.542	275.668	1.482
Muğla	400.014	400.014	82.534	379
İzmir	333.292	333.292	125.962	757

Wiese (1987) tahıl verimini düşüren ve ürün kalitesini olumsuz yönde etkileyen abiyotik stres faktörlerinin yanında patojenik hastalıkların varlığını da işaret etmektedir. Buğday verimi, çevre koşullarının olumsuz etkileri, uygulamadaki teknik yetersizlikler, hastalıklar, zararlılar ve diğer stres faktörlerinin etkileri ile önemli ölçüde azalmaktadır (Cook and Veseth, 1991; İlbağı, 2003). Oldukça geniş alanlarda tarımı yapılan tahılların üretimini sınırlayan ve verimde azalmalara neden olan faktörlerin arasında hastalıklar ilk sırada yer almaktadır (Yorgancı, 1989). Kültür bitkilerinin üretiminde ürün kayıplarına neden olan nicel ve nitel faktörler arasında ise viral kaynaklı etmenlerin ayrı bir önemi vardır.

Virüs hastalıkları, tahıllardan elde edilecek üründe verim ve kaliteyi etkilemektedir. Bu etkilerin derecesi bazen çok hafif olabilirken bazen de aşırı düzeyde olabilmektedir (Yorgancı, 1989). Diğer patojen gruplarının önlenmesi için sıkça başvurulan kimyasal savaş yönteminin bu etmenlere karşı uygulanamıyor oluşu ve diğer kontrol yöntemlerinin de üretici tarafından yeterli düzeyde bilinmemesi, virüs kaynaklı kayıpların artmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda pazar değeri düşmekte ve önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Özellikle arpa sarı cücelik hastalığını meydana getiren BYDV, tahıl ürünlerindeki verimi büyük derecede azaltmaktadır (Beuve et al., 1999).

Dünyadaki buğday alanlarında en yaygın ve önemli virüs hastalık etmeni olan BYDV-PAV üzerine birçok araştırma yürütülmüştür. Ülkemizde ise bu konuda yapılan sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu araştırmayla, bulaşık olduğu tarlalarda önemli derecede verim düşüklüğüne neden olan hastalık etmeni *Barley yellow dwarf virus*'ün Ege Bölgesi illerinin buğday üretim yapılan alanlarından gerçekleştirilen surveyleri ile bulunma durumu saptanmıştır. Toplanan bitki örneklerinde viral etmenin serolojik ve moleküler yöntemlerle tanınması gerçekleştirilmiştir. Dizi analizleri ve ardından filogenetik analizler ile bölgemizdeki izolatların Türkiye ve Dünya izolatları ile karşılaştırılması yapılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Arpa sarı cücelik hastalığı, ilk kez 1950'lerin başında arpa bitkilerinin fizyolojik bozukluğuna dayalı olarak gözlemlenmiştir ve Kaliforniya'da *Avena sativa*, *Hordeum vulgare* ve *Triticum aestivum*'da (Oswald and Houston 1951, 1953a; 1953b; PVO, 2014) rapor edilmiştir. *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) dünya çapında yayılım göstermektedir (D'Arcy and Domier, 2000).

BYDV, *Poaceae* familyasına ait çok sayıda bitki türlerinde rapor edilmiştir (Chain et al., 2006). Mera alanlarında, çim alanlarda, yabancı otlarda ve kültüre alınmış 150'den fazla tür üzerinde enfeksiyon yapabilen BYDV için arpa, yulaf, buğday, mısır ve çeltik önemli konukçular arasındadır (D'Arcy and Domier, 2000). BYDV, özellikle buğday, yulaf ve arpanın en ciddi ve yaygın olan viral hastalığıdır (Koev et al., 1998).

Bazı enfekteli konukçular, görünebilir belirti göstermeyebilir. Ancak, çoğu konukçusunda boğum arası uzunluğun kısalması nedeniyle gelişme geriliği görülmektedir. En çok göze çarpan belirti yapraklardaki yeşil rengin kaybı olup bu durum enfekteli konukçuların yaşlı yapraklarında daha belirgindir. Renk değişimi, tipik olarak enfeksiyondan 1-3 hafta sonra başlamaktadır (D'Arcy and Domier, 2000).

Enfekteli bitkilerde yapraklarda uçtan başlayarak klorotik çizgiler, lekeler gelişebilir ve suda ıslanmış görünüm olabilir (DPV, 2015). BYDV, sararma, cüceleşme, çizgi mozaik, sürgünlerde nekroz, benek ve tahıl ürünlerinde verim kaybı sergileyerek hüküm sürmektedir (Ilbagi et al., 2005). Yapraklarda sararmaya ve bitkide cüceleşmeye neden olan virüs enfeksiyonudur (Ilbagi et al., 2008). BYDV, yapraklarda sararmaya, kırmızılaşmaya ve cüceleşmeye neden olur. (Miller and Rasochová, 1997). Dik, sert yapraklar ve tırtıklı yaprak kenarları, verim kayıpları ile ilgili olarak da çiçeklenme ve kardeşlenme azalması, daha az ve küçük çekirdeklerin oluşması, diğer enfeksiyon belirtilerini içermektedir (D'Arcy and Domier, 2000).

BYDV'nin belirtileri yulafa göre arpada daha az şiddetlidir ve buğdaylarda ılımlıdır. Yaprak sararması arpada parlak sarı, yulafda kırmızı veya mor olarak kendini gösterebilir. Özellikle yulaf floretlerinde patlama yaygındır (DPV, 2015). Buğday yaprakları genel olarak sarı ya da kırmızı renkte olmaktadır (D'Arcy and Domier, 2000).

Belirgin simptomların gelişmesi için serada düşük sıcaklık ve ek aydınlatma gereklidir (DPV, 2015). Çevresel koşullar ve virüsün ırkları kadar konukçu bitkinin fizyolojik durumu, yaşı ve genotipi de belirtileri etkilemektedir (D'Arcy and Domier, 2000).

Nancarrow et al. (2014), buğdaylarda yoğun olarak bulunan BYDV-PAV için sıcaklığın etkisini araştırmıştır. Araştırmacılar yüksek sıcaklıkta yetiştirilen bitkilerdeki BYDV-PAV'ın yoğunluğunun normal sıcaklıkta yetiştirilen bitkilerden önemli ölçüde yüksek olduğunu tespit etmişler ve ayrıca, yüksek sıcaklıkta yetiştirilen bitkilerde, normal sıcaklıkta yetiştirilen bitkilere göre BYDV-PAV ile ilişkili simptomların daha erken görüldüğünü saptamışlardır.

Arpa sarı cücelik hastalığına *Barley yellow dwarf virus*-PAV (BYDV-PAV, familia *Luteoviridae*, genus *Luteovirus*) türünü içeren viral türler neden olur (Chain et al., 2006). BYDV, sarılık oluşturan virüsleri içeren ve ciddi verim kaybına neden olan viral hastalık etmenidir (Hershman and Johnson, 2011). Tahıl ürünlerinin dünya genelindeki en önemli hastalıklarından biri olan arpa sarı cücelik hastalığına, *Luteoviridae* familyasına ait virüs türleri neden olmaktadır (Lister and Ranieri, 1995; Mar et. al., 2013).

Virüs partikülleri, tek iplikli ve pozitif uçlu RNA genomu içermekte olup izometrik ($\varnothing$ 25-30 nm) yapıdadır (Miller and Rasochová, 1997). Virüs parçacıkları bitki dokularının floemi ile sınırlı görünmektedir (Jensen, 1969; Miller and Rasochová, 1997). BYDV etmeni, enfekteli bitkinin floem dokusunda sınırlıdır (Gray, 1996).

BYDV izolatları 6 ayrı virüs olarak sınıflandırılmaktadır. Virülenslik, konukçu aralığı ve vektör özgülüğü temeline göre varyantlar tanımlanmıştır. Hem

serolojik çalışmalar hem de karışık enfeksiyon ve çapraz koruma testleri, varyantların farklı virüsler olarak düşünölmesi gerektiğini göstermektedir (Gill, 1969; DPV, 2015).

İrklar iki alt grupta sınıflandırılmıştır: Altgrup I (carmoviruses – like polymerase); *Barley yellow dwarf virus*-PAV (BYDV-PAV), BYDV-MAV, ve BYDV-SGV içerirken Alt grup II (sobemoviruses – like polymerase) BYDV-RMV, *Cereal yellow dwarf virus*-RPV (CYDV-RPV), BYDV-GPV içermektedir (Koonin and Dolja, 1993; Miller and Rasochová, 1997).

Son yıllarda gen dizilimine göre; *Luteovirus* cinsinde 3 tür (BYDV-PAV, BYDV-MAV ve BYDV-PAS); *Polerovirus* cinsinde 2 tür CYDV-RPV ve CYDV-RPS) şeklinde sınıflandırılmış ve 3 tür ise herhangi bir cinste sınıflandırılmaya tabi tutulmamıştır (D'Arcy and Domier, 2000; D'Arcy and Domier, 2005).

Luteoviridae familyasına ait olan ve yaprak bitleri ile taşınan virüsler bu hastalığa neden olurlar (Miller and Rasochová, 1997). BYDV'nin sararma belirtisi gösteren diğler birçok bitki virüs hastalıklarından farkı mekanik olarak, temasla, polenle ve tohumla taşınmayıp yaprak bitleri tarafından taşınmasıdır. BYDV, en az 25 farklı yaprak biti türü tarafından bitkiden bitkiye taşınmaktadır (D'Arcy and Domier, 2000).

Bu virüsün tahıllarda ve yabancı otlarda beslenen ve taşınmada görev alan önemli vektörleri vardır (Rochow, 1963; PVO, 2014). En etkili yaprak biti vektörlerine göre, *Rhopalosiphum padi* ve *Sitobion avenae* (PAV), *Macrosiphum* (*Sitobion*) *avenae* (MAV), *Rhopalosiphum padi* (RPV), *Rhopalosiphum maidis* (RMV) ve *Schizaphis graminum* (SGV) virüs ırkları ayırt edilmiştir (Rochow, 1969a; Rochow and Muller, 1971; Siddiqui et al., 2011).

Sadece persistent, sirkülatif ve non-propagatif özellikteki yaprak bitleriyle taşınabilir (Gildow, 1987). Yaprak bitleri tarafından sirkülatif (persistent) virüs taşınım mekanizmasının aydınlatılması, bitkilerde sararma belirtisi gösteren viral hastalıklara dair yürütölcek çalışmalarda katkı sağlayacaktır (D'Arcy and

Domier, 2000). BYDV'nin taşınımı persistent (sirkülatif) şekildedir ve virüs vektörde 2-3 hafta kalabilir. Virüs taşınması sonraki nesile geçmez. 1 günden az süren virüsü alma süresi olan bir latent periyod görülmektedir (Rochow, 1963; PVO, 2014). Fakat virüsü alma ve iletme süresi 1-2 dakika olduğunda taşınım kolayca gerçekleşir (Watson and Mulligan, 1960; PVO, 2014). Yaprak biti türü, virüs izolatu, sıcaklık, test bitkisi türü, bitki kaynağının yaşı gibi faktörler, iletme büyük ölçüde bağlıdır (Rochow, 1969b).

Hastalığın hızlı yayılması, hızlı vektör popülasyonları ve aktivitesiyle ilişkilidir (Makkouk et al., 2009). Sonbaharda ekilen tahıllarda *Barley yellow dwarf virus* (BYDV)'nin saptanmasındaki ana faktörlerden biri, rüzgarla göçeden kanatlı yaprak bitlerinin virüs taşıyıcılığı durumudur (Fabrea et al., 2003). Parizoto et al., (2013), BYDV-PAV, BYDV-MAV ve CYDV-RPV'nin mevsimsel dalgalanmalarını yazın mısır, kışın ise buğday ve yulaf üretim alanlarında analiz etmiştir. Virüsün popülasyon dinamikleri, yaprak bitlerinde ve bitkilerde benzer olup kış üretim sezonunda zirveye ulaştığı sonucuna varılmıştır.

Bitkinin virüsle başarılı mekanik inokulasyonu, bitkinin uygun hücre içine viral patojenin girmesine etki eden bir metot gerektirir. Yaprak bitleriyle doğal olarak taşınan *Barley yellow dwarf virus-PAV* (BYDV-PAV, *Luteovirus*), sistemik olarak inokule edilmiş konukçuyu bulaştırmak için floem dokusu içine inokule edilebilmektedir. Helloc-Kervarrec et al. (2002), BYDV için yaprak biti kullanılmadan yapılan inokulasyonun ilk çalışmasını gerçekleştirmiştir. Buğday kültürlerinin olgunlaşmamış embriyolarına nükleik asit transferi (BYDV-PAV) için büyük ölçüde partikül bombardımanı metodu kullanılmıştır. Bombardımandan sonra 7 haftada gelişmiş ekstraktlara DAS-ELISA ve RT-PCR uygulanmış ve BYDV enfekteli buğday bitkilerinin %14'den fazla bombardıman edilmiş embriyo ürettiği ortaya çıkmıştır.

Yoon et al. (2011), bitkileri BYDV-PAV ve CYDV-RPV ile enfekte etmek için *Nicotiana benthamiana* ve *N. clevelandii* türlerindeki iki çenekli bitkiyi ilk kez kullanmıştır. Sistemik bulgular gözlemlenmemiş ancak inokulasyondan birkaç hafta sonra floem dokusunun sistemik enfeksiyonu tespit edilmiştir.

Siddiqui et al., (2011), Pakistan'daki farklı buğday üretim alanlarında BYDV belirtisi gösteren şüpheli buğday örneklerini BYDV-PAV, BYDV-MAV, BYDV-SGV, BYDV-RPV, CYDV-RPV ve BYDV-GPV adlı etmenlerin varlığı açısından taramıştır. Test edilmiş 37 örneğin 13'ü BYDV ve onların da 10'unun BYDV-PAV, 3'ünün BYDV-MAV için pozitif olduğu saptanmıştır. Sekans analizine göre, 3 izolat (Fatehjang, Nowshera ve Attock) BYDV-PAS'a maksimum benzerlik (%92.8-94.6), 6 izolat (Peshawar, Islamabad Swabi ve Faisalabad) BYDV-PAV'a maksimum benzerlik (99.3-99.7) göstermektedir. Dolayısıyla Pakistan'ın kuzeyinde buğday yetiştirilen alanlarda BYDV-PAV türlerinin baskın olduğu tespit edilmiştir.

Kumari et al. (2006), Yemen'de farklı lokasyonlarda arpa ve ekmeklik buğday ürünlerine etki eden virüs hastalıklarını tanımlamak için bir araştırma yürütmüştür. Rastgele seçilmiş örneklerde saptanan en yaygın virüsün, arpada %7 ve ekmeklik buğdayda %4.3 oranları ile *Barley yellow dwarf virus*-PAV ve onu takip eden etmenin ise *Barley stripe mosaic virus* olduğu tespit edilmiştir.

Bisnieksab et al. (2006), Letonya'daki yazlık tahıllarda ve mera otlarında, *Barley yellow dwarf virus*-PAV (BYDV-PAV), BYDV-MAV ve *Cereal yellow dwarf virus*-RPV (CYDV-RPV) izolatlarının mevcut olduğunu saptamıştır.

Arpa sarı cücelik hastalığı, İran'da tahıl üretiminde gözlenen en önemli problemlerden birisi olduğunu belirten Rastgou et al. (2005), İran ve Güneybatı Asya'da arpa sarı cücelik hastalığına neden olan virüsleri tanılamak için ilk girişimi gerçekleştirmiştir. Buğdaydan (PAV-IR) BYDV-PAV'ın bir izolatı, arpadan (RPV-IR) CYDV-RPV'nin bir izolatı moleküler karakterizasyon için seçilmiştir. PAV-IR, ABD, Fransa ve Japonya'dan PAV izolatlarına yüksek sekans benzerliği (%96-97) göstermiştir.

El-Muadhidi et al. (2001), Irak'da baklagil (nohut, bakla ve mercimek) ve tahıl (buğday ve arpa) ürünlerini etkileyen virüs hastalıklarını tanımlamak amacıyla araştırma yürütmüştür. Toplanan tahıl ve baklagil örnekleri, tissue blot immunoassay (TBIA) kullanılarak 12 baklagil ve 5 tahıl virüsü için testlenmiştir. Tahıl arazisinde tesadüfi örneklerin yaklaşık %1'inde *Barley yellow dwarf virus*-

PAV (BYDV-PAV, genus *Luteovirus*, family *Luteoviridae*) saptanmıştır. Tüm tahıl arazilerinde virüsün hastalık etkisi tarla gözlemlerine bağlı olarak %5'dir. Tahıllarda, BYDV-MAV (genus *Luteovirus*, family *Luteoviridae*) ve *Cereal yellow dwarf virus-RPV* (CYDV-RPV, genus *Polerovirus*, family *Luteoviridae*) viral etmenlerine nadiren rastlanmıştır.

Kendall et al. (1996), 1987 ve 1988 yılları boyunca güneybatı İngiltere'de bulunan ve *Barley yellow dwarf virüs*'lerini (PAV, RPV ve MAV izolatları) ileten yaprak bitlerinin dağılımını ve oranını tanımlamıştır. BYDV'nin tüm izolatlarının geniş alanda yaygın olduğu, MAV'ın daha kuzeydeki lokasyonlarla ve RPV'nin daha güneydeki lokasyonlarda, PAV'ın sadece en güney bölgelerde fazla olduğu tespit edilmiştir.

Bisnieks et al. (2004), *Barley yellow dwarf virus-PAV* (PAV) ve *Barley yellow dwarf virus-MAV* (MAV)'ın sekans değişkenliği üzerine çalışma yapmıştır. ABD ve Çin'de saptanan izolatlarla da kıyaslandığında MAV'ın bünyesindeki çeşitliliğin çok az (>97% sekans benzerliği) olduğu, tam aksine PAV izolatları arasındaki çeşitliliğin daha büyük olduğu saptanmıştır. Letonya'da BYDV-PAV'ın yeni varyantı keşfedilmiştir ve sekans farklılığı nedeniyle yeni bir türe (BYDV-OYV) ait olması önerilmiştir.

Türkiye'de buğday başta olmak üzere tahıl hastalıkları için ayrıntılı ve kapsamlı bilgiler Bremer (1984) tarafından verilmiştir. Bremer 1971 yılından 1974 yılına kadar Türkiye ve Finlandiya'da bulunan buğdaygil hastalıklarını karşılaştırmak üzere yaptığı çalışmalarda, Türkiye'de İzmir ve çevresinde *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) ve *Barley stripe mosaic virus* (BSMV)'ü tanılamıştır (Bremer, 1971, 1972, 1973, 1974). Bunların yanı sıra *Maize mosaic virus* (MMV) ve *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) de Bremer ve Raatikainen (1975)'in çalışmaları ile saptanmıştır (İlbağı, 2003).

Rochow (1970), BYDV'yi dünyada en yaygın ve önemli tahıl virüs hastalığı olarak tanımlamaktadır. Brunt et. al. (1996) ise buğdayda sistemik enfeksiyonlara neden olan ve Avrasya bölgesinde yayıldığı saptanan 12 ayrı virüs hastalığının özelliklerini açıklamaktadır (İlbağı, 2003). Bunlardan bazılarının Türkiye'de

bulunma olasılığını düşünen İlbağı (2003) Trakya Bölgesi'nde üretimi yapılan bazı tahıl türlerinde verim kayıplarına neden olan viral kökenli etmenlerin tanımlanmasına dair yürüttüğü çalışmada, Trakya bölgesi tahıl üretim alanlarında yaygın olarak görülen enfeksiyonların viral kökenli olduğunu ve ağırlıklı olarak BYDV-PAV virüsü başta olmak üzere WSMV ve *Oat necrotic mottle virus* (ONMV) virüslerinden ileri geldiğini kanıtlamış olup, BYDV-PAV ve WSMV Trakya Bölgesi için ve ONMV Türkiye için ilk kayıt olmuştur.

Ilbagi et al., (2006), Türkiye'nin Trakya bölgesinde mısır virüs hastalıkları üzerinde bir araştırma gerçekleştirmiştir. Toplanan örneklerde MDMV (*Maize dwarf mosaic virus*), BYDV-PAV (*Barley yellow dwarf virus*) ve SCMV (*Sugarcane mosaic virus*) ve JGMV (*Johnson grass mosaic virus*) enfeksiyonları saptanmıştır.

Ilbagi (2006), 2004 ve 2005'de toplanan kamış (*Phragmites communis* Trin.) yaprak örneklerinde *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Barley yellow dwarf virus-PAV* (BYDV-PAV), *Cereal yellow dwarf virus-RPV* (CYDV-RPV) ve *Wheat dwarf virus* (WDV)'nin varlığını ve yayılımını araştırmıştır. Kamışların ilk kez MDMV ve SCMV'nin doğal bir konukçusu olduğu tespit ederken BYDV-PAV'ın da bir konukçusu olduğu saptanmıştır.

Ilbagi et al. (2008), yapraklarda sararmaya ve bitkide cüceleşmeye neden olan virüs enfeksiyonunu Türkiye'nin Tekirdağ ilindeki kanarya tohumlarında gözlemlemiştir. Belirti gösteren örnekler toplanmış ve *Barley yellow dwarf virus-PAV* (BYDV-PAV) ve *Cereal yellow dwarf virus-RPV* (CYDV-RPV)'ye karşı serolojik olarak testlenmiştir. Örneklerin %48'inin BYDV-PAV ile, %2'sinin CYDV-RPV ile enfekteli, %14'ünün karışık enfeksiyonlu olduğunu ve %36'sının enfekte olmadığını veya saptama limitinin altında enfeksiyona sahip olduğunu tespit etmiştir.

Ilbagi et al. (2005), biyolojik, serolojik ve moleküler testler kullanılarak Türkiye'nin Trakya Bölgesi'nde sararma, cüceleşme, çizgi mozaik, sürgünlerde nekroz, benek ve tahıl ürünlerinde verim kaybı sergileyerek hüküm süren virüsleri

tanımlamak amacıyla bir çalışma yürütmüştür. Bu amaçla, Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ illerinde enfekteli arazi bölgelerinden 2001 yılında 90 tahıl yaprak örneğini, 2002 yılında 106 bitki örneğini toplanmıştır. Örnekler, 8 indikatör bitki grubuna mekanik olarak inokule edilmiştir. İnokule edilmiş 37 bitki örneği en az bir indikatör bitkide virüs benzeri belirtiye sebep olmuştur. Örneklerle, DAS-ELISA testi uygulanmış ve bu serolojik testler sonucunda 2001’de 90 örneğin 63’ünün *Barley yellow dwarf virus*-PAV (BYDV-PAV) içerdiğini, 90 örneğin 9’unun *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) içerdiğini, 90 örneğin sadece 2’sinin *Necrotic mottle virus* (ONMV) içerdiğini ve 2002’de 106 tahıl bitki örneklerinin 14’ünün BYDV-PAV içerdiğini ortaya çıkarmıştır. Bölgede BYDV-PAV’ın varlığı RT-PCR tetstleriyle de doğrulanmıştır. Önemli seviyede kolonize olmuş *Rhopalosiphum padi* L.’nin varlığının BYDV-PAV’ın bölgedeki büyük virüs enfeksiyonundan sorumlu olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma, Türkiye’de ONMV ve BYDV-PAV’nin yaygınlığının DAS-ELISA ve moleküler RT-PCR testleri ile tanılandığı ilk çalışmadır.

Köklü (2004), Tekirdağ ili buğday üretimi yapılan alanlarda 260 buğday örneğinde altı virüsün yaygınlığını saptamak için bir çalışma gerçekleştirmiştir. Bu çalışma sonuçları ile en yaygın iki virüsün %25 ve %22.3 enfeksiyon oranları ile sırasıyla BYDV-MAV ve BYDV-PAV olduğu saptanmıştır.

Erkan ve Kutluk Yılmaz (2009), Samsun ili buğday üretim alanlarından toplanan 154 bitki örneğini çeşitli tahıl virüslerine karşı test etmişler ve örnekleri BYDV-PAV ile %3.4 oranında enfekteli olarak saptamışlardır. Aynı çalışmada BYDV-MAV varlığı %2 oranında tespit edilmiştir.

Deligöz ve ark. (2011), buğdaylarda BYDV-PAV ve BYDV-MAV virüslerinin yaygınlığını belirlemek amacıyla 2006 ve 2007 yıllarında Samsun ve Amasya illerinde bir çalışma yürütmüştür. Samsun ilinden 116 örnek ve Amasya ilinden 100 örnek toplanmış olup toplanan örnekler DAS-ELISA yöntemi ile BYDV-PAV ve BYDV-MAV virüslerine spesifik antiserumlarla test edilmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda hem Samsun hem de Amasya illerinde en yaygın tür BYDV-PAV olarak bulunmuştur. BYDV-PAV, Samsun ilinde %8.6, Amasya ilinde ise %4 oranında belirlenmiştir.

Arpa sarı cücelik hastalığına karşı doğal dayanıklılık yetersizdir (Koev et al., 1998). Virüs hastalık yönetimi değişik kontrol metodları bir araya getirilerek yönetilebilmesine rağmen dayanıklı genotiplerin gelişimi şüphesiz ki birçok uygun kontrol metodlarından biridir. Son 10 yılda yapılan çalışmalar baklagil ve tahıl ürünlerinin kayıplarını azaltmak için virüs hastalık kontrolü için tek bir yöntemin olmadığını göstermektedir (Makkouk and Kumari, 2009).

Barley yellow dwarf virus ve *Cereal yellow dwarf virus*'ün güvenilir tespit ve ölçümü küçük daneli tahıl ürünlerinde arpa sarı cücelik hastalığının yönetiminde önemli bir ögedir. Q-RT-PCR (quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction), hassas, tekrarlanabilir, arpa sarı cücelik hastalığının incelenmesi için kullanılma potansiyeline sahip ve BYDV için hızlı bir teşhis aracıdır (Balaji et al., 2003).

Figueira et al. (1997), kromogenetik ve kemilüminesan substratlı radyoaktif olmayan probun kullanıldığı geliştirilmiş nükleik asit hibridizasyon tekniği ile *Barley yellow dwarf virus* (BYDV)-PAV-IL'nin tespiti polymerase chain reaction (PCR), poliklonal antibodili double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) ve polyclonal ve monoclonal antibodili triple antibody sandwich ELISA ile tespiti ile kıyaslamıştır. En hassas saptama tekniği, saflaştırılmış virüsten ve ekstrakte edilmiş 0.1 pg kadar az RNA'yı ve 0.5 pg enfekteli yaprak dokusuna eşdeğer viral RNA'yı saptayabilen PCR amplifikasyonudur.

Arpa sarı cücelik hastalığını içeren luteoviruslerden biri olan BYDV-PAV, tahıl ürünlerindeki verimi büyük derecede azaltmaktadır (Beuve et al., 1999). Bitkinin gelişme döneminin erken evresinde bu virüsün enfeksiyonu çıktığı zaman ortaya çıkan verim kayıpları oldukça yüksek olmaktadır (Makkouk and Kumari, 2009). Bu nedenle, bu virüs ile savaşmada bitkinin bulaşmasını önlemek gerekmektedir. Virüse ve yaprak biti vektörüne genetik olarak direnç ve tolerans, bu virüsü kontrol etmek için önemli stratejilerdendir.

BRS Timbaúva adlı çeşit, diğer buğday çeşitlerine kıyasla *Rhopalosiphum padi* vektörüne karşı dayanıklılık göstermektedir. de Cezare et al. (2011), BRS

Timbaúva çeşidinin BYDV-PAV'a da dirençli veya toleranslı olup olmadığını saptamayı amaçlamıştır. Denemeler, BRS Timbaúva ve EMBRAPA 16 (duyarlı ve toleranssız) karşılaştırarak yapılmıştır. BRS Timbaúva'nın EMBRAPA 16 gibi viral enfeksiyonlara karşı duyarlı olduğu, ancak tüm denemelerde verimlilik kaybının EMBRAPA 16'dan daha düşük olduğunu ve bu da BYDV-PAV'a karşı toleranslı olduğunu göstermektedir. BRS Timbaúva alan davranışı, vektör direnci ve virüs toleransı ile ilişkili olabilir.

Genetik olarak virüsün tüm konukçularına uygulanabilecek olan BYDV'e kararlı transgenik dayanıklılık için bir strateji ortaya koymak amacıyla Koev et al. (1998) bir çalışma yürütmüştür. Transgen içeren tüm BYDV inokule edilmiş bitkiler başlangıçta hastalık semptomu göstermiştir fakat kurtarılmış, çiçeklenmiş ve tohum üretmiştir. Tam aksine BYDV-PAV inokule edilmiş transgen içermeyenler 25 cm uzunluğa ulaşmadan ölmüştür.

Lanzarini et al., (2007), Brezilya'nın Rio Grande do Sul eyaletinde Passo Fundo'da Brezilya Tarımsal Araştırma Kurumu [Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária)]'nda bir serada yetişen 5 buğday çeşidinde (BRS 177, BRS 179, BRS 194, BRS Camboatá ve BRS Angico) *Barley yellow dwarf virus-PAV* (BYDV-PAV)'den kaynaklanan zararı değerlendirmiştir. BYDV-PAV'den kaynaklanan zarar, verimin (bitkideki kardeş, dane sayısı, bin dane ağırlığı) ve agronomik özelliklerin (bitki boyu, kuru madde) analizi ile saptanmıştır. Virüsün, test edilmiş tüm değişkenleri belirgin bir şekilde etkilediği saptanmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki örnekleri

Ege Bölgesi'nde buğday üretimi yapılan illerdeki yetiştirme alanlarının gezilmesi ve firmalardan yardım alınmasıyla bitki örneklerinin toplanması gerçekleştirilmiştir. Bu illerdeki yetiştirme alanlarında gelişme geriliği ve sarı ya da kırmızı renk değişikliği belirtileri gösteren şüpheli buğday bitkilerinden alınan örnekler çalışmanın materyalini oluşturmuştur.

Çizelge 3.1 Ege Bölgesi illerinde buğday ekilen alanlar ile orantılı olacak şekilde örnekleme yüzdeleri ve miktarları.

İller	Ekilen alan (dekar)	Yüzde (%)	Toplanan Örnek sayısı
Afyon	1.645.349	24	45
Kütahya	1.452.441	21	42
Manisa	1.050.476	16	32
Denizli	794.965	12	22
Uşak	709.127	10	21
Aydın	406.300	6	18
Muğla	400.014	6	17
İzmir	333.292	5	17
Toplam	6.791.964	100	214

Ege Bölgesi illeri için TÜİK 2013 verilerinde yer alan buğday ekili alan miktarları ile orantılı olarak Çizelge 3.1'de de görüldüğü gibi Afyon'dan 45, Kütahya'dan 42, Manisa'dan 32, Denizli'den 22, Uşak'dan 21, Aydın'dan 18, Muğla'dan 17, İzmir'den 17 bitki örneği olacak şekilde toplan 214 buğday bitki örneği alınmıştır.

Toplanan buğday örnekleri steril polietilen torbalara konarak numaralandırılmış ve testleri yapılana kadar -20°C’de çalışan derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Arazi çalışmalarından toplanan örnekler Şekil 3.1’de görülmektedir.



Şekil 3.1 Arazi çalışmalarından toplanan örneklerden bir görünüm.

3.1.2. Serolojik testlerde kullanılan materyaller

Viral hastalık etmeni BYDV-PAV’ın toplanan örneklerde serolojik olarak saptanmasında DAS-ELISA (Double Antibody Sandwic) test yöntemi kullanılmıştır. ELISA yöntemi çok sayıda örneğinin aynı zamanda test edilmesine ve ölçülebilen sonuçlar elde edilmesine imkan vermektedir (Erkan, 1998).

Serolojik test yöntemi olarak uygulanacak DAS-ELISA testlerinde, ticari olarak temin edilen tanı kitleri ve reagentleri (antiserum, pozitif ve negatif örnekler ile kaplama, ekstraksiyon, konjugat, substrat ve yıkama çözeltileri), Elisa tabakları, otomatik pipetler ve uçları, saf su ve Elisa reader kullanılmıştır. DAS-ELISA testinde kullanılan tanı kitleri, 96 çukurlu mikrolateler (Nunc F96 Maxisorp) ve solüsyon ve çözeltiler Bioreba AG firmasından temin edilmiştir. Test sonuçlarının değerlendirilmesi, 405 nm dalga boyunda okuma yapan Titertek Multiskan Plus MK II marka ELISA okuyucusu ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.3. Moleküler testlerde kullanılan materyaller

Buğdaygil üretim alanlarından alınan tüm örneklerle Reverse-Transcriptase PCR testleri uygulanmıştır. Bu testler sırasında kullanılan kimyasallar ve hazırlanışları Ek-1’de yer almaktadır.

3.1.3.1. Total nükleik asit (TNA) ekstraksiyonu aşamasında kullanılan materyaller

RNA Ekstraksiyonu sırasında ependorf tüpleri, ayarlanabilir mikro pipetler ve pipet uçları, steril örnek poşetleri, tampon çözeltiler, Sigma D37520 marka santrifüj, ETG MBT 250 marka blok ısıtıcı ve -20°C’ye kadar soğutma kapasitesine sahip derin dondurucu kullanılmıştır.

3.1.3.2. Komplementer DNA (cDNA) sentezi aşamasında kullanılan materyaller

Daha önce hazırlanmış olan TNA örnekleri, Fermantas marka cDNA sentez kiti, inkubatör (Nüve ES500), ısıtıcı ve çalkalayıcı (Heidolph Unimax 2010) materyal olarak kullanılmıştır.

3.1.3.3. RT-PCR testlerinde kullanılan materyaller

PE Applied Biosystems Gene Amp PCR Systems 9700 marka thermocycler, Eppendorf marka PCR tüpleri, etmenlere spesifik primerler (Çizelge 3.2), çözeltiler ve solüsyonlar materyal olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.2 BYDV’nin teşhisinde kullanılan primerlerin bilgileri.

Primer	Primer Dizilimi	Baz Uzunluğu	PCR Döngüsü
BYDV-PAV-F BYDV-PAV-R	CCACTAGAGAGGTGGTGAATG CCGGTGTTGAGGAGTCTACC (Kundu, 2008)	641 bp.	1 x 94°C 2 dk 35 x (94°C 1 dk / 54°C 1 dk / 72°C 1 dk) 1 x 72°C 10 dk

3.1.3.4. Çoğaltılmış PCR ürünlerinin analizinde kullanılan materyaller

Örneklerin ve jellerin hazırlanmanıp boyanmasında kullanılmış olan kimyasallar, çözeltiler, DNA markerı Consort E815 marka güç kaynağı, Owl A2 ve Owl B1 marka jel elektroforez düzeneği materyal olarak kullanılmıştır. DNR Bio-imaging Systems Minibis Pro marka jel görüntüleme cihazında tüm jellerin fotoğrafları çekilmiştir.

3.1.4 Çalışmada kullanılan diğer materyaller

Çalışmanın çeşitli aşamalarında ayrıca, Binder inkübatör, Bioreba AG örnek ezme makinası, Elga saf su makinası, Heidolph tüp karıştırıcı, HI 9321 pH metre, Memmert marka etüv, Sartorius hassas terazi, Scotsman buz makinası, Systec 2540 otoklav, manyetik karıştırıcı ve mikrodalga fırın kullanılmıştır.

3.2. Metod

3.2.1. Bitkilerin incelenmesi

Ege Bölgesi'nde illerindeki buğday üretimi yapılan alanlarda arpa sarı cücelik hastalığının belirtilerinden olan gelişme geriliği ve sarı-kırmızı renk değişikliği belirtilerini gösteren şüpheli buğday bitkilerinden yeterli sayıda bitki örnekleri alınmıştır. Çalışmanın materyali olan bu bitki örnekleri arazilerde ve laboratuarda görsel olarak incelenmiştir. Hastalığın belirtilerinden olan gelişme geriliği ve sarı ya da kırmızı renk değişikliği gösteren şüpheli buğday bitkileri çalışmada kullanılmıştır. Belirti göstermeyen bitkilerde de latent virüs enfeksiyonlar olabileceği dikkate alınmıştır.

3.2.2. Serolojik çalışmalar

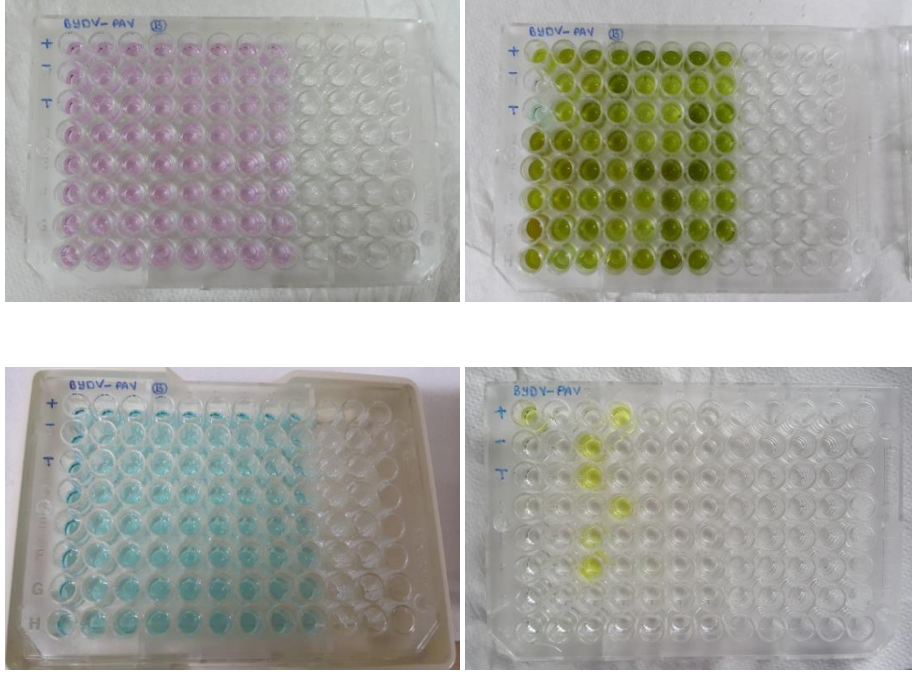
Toplanan buğday örneklerine BYDV-PAV için serolojik yöntemlerden direkt yöntem (Double Antibody Sandwich) uygulanmıştır. DAS-ELISA

testlerinin uygulanması aşağıda belirtilen aşamaların izlenmesiyle gerçekleştirilmiştir (Clark ve Adams, 1977; Erkan vd., 1995).

- Elisa tabaklarının her bir çukuruna kaplama tamponundan 1:1000 (Bioreba firması ticari kitleri) oranında seyreltilmiş olan IgG'den 100 µl eklenerek 34°C'de 3 saat inkube edilmesi.
- Elisa tabaklarının yıkama tamponu ile yıkanarak 3 dakika beklenmesi eve bu işlemin 3 kez tekrarlanması.
- Ekstraksiyon tamponu ile hazırlanan bitki örnekleri, pozitif ve negatif kontrollerin her bir çukura 100 µl olacak miktarda eklenerek 4°C'de bir gece inkube edilmesi.
- Elisa tabaklarının ikinci aşamada açıklandığı şekilde tekrar yıkanması.
- Konjuge edilmiş IgG, konjuge tamponu içerisinde 1:1000 (Bioreba firması ticari kitleri) oranında seyreltilip her bir çukura 100 µl eklenerek 34°C'de 3 saat inkube edilmesi.
- Elisa tabaklarının ikinci aşamada açıklandığı şekilde tekrar yıkanması.
- Substrat çözeltisine 1 mg/ml olacak şekilde substrat (paranitrofenilfosfat) her bir çukura 100 µl konularak oda sıcaklığında inkube edilmesi.

Sonuçlar iki şekilde değerlendirilmiştir (Erkan vd., 1995).

- a) Sarı renk oluşumu gözlenerek,
- b) Elisa reader cihazı kullanılarak 405 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Örneklerde sağlıklı kontrolün 2 katı olan absorbans derğerleri enfekteli olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.2).



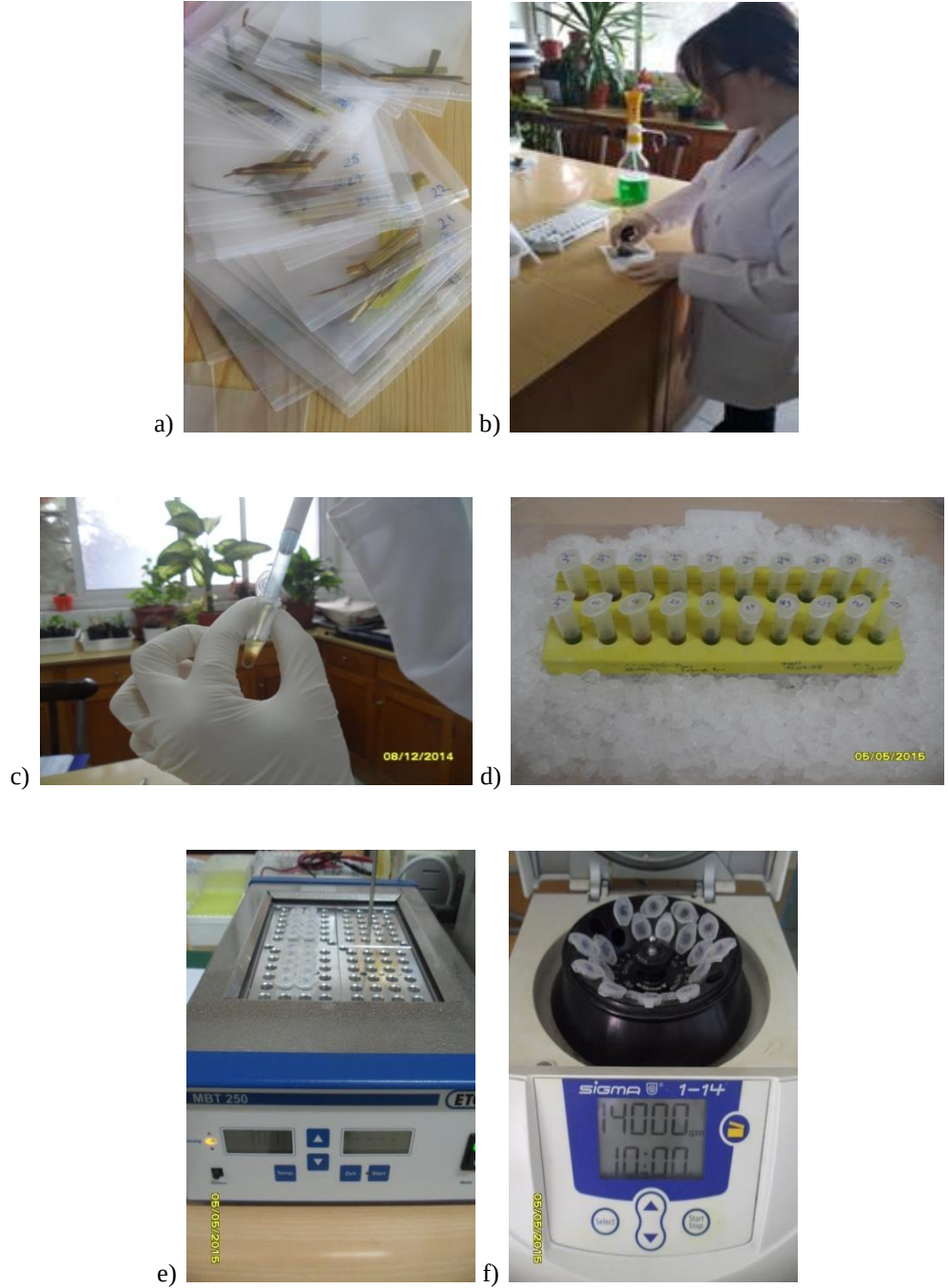
Şekil 3.2 BYDV için yapılan DAS-ELISA testlerinden bir görünüm.

3.2.3. Moleküler çalışmalar

3.2.3.1. Total nükleik asit (TNA) ekstraksiyonu

TNA ekstraksiyonu için Foissac et al. (2001)'in 'silica capture' yöntemi kullanılmıştır. TNA ekstraksiyonunda kullanılan tüm malzemeler yapısına uygun olarak ekstrakte edilmiştir. Araziden alınarak kullanılıncaya kadar -20°C 'de saklanan bitki örneklerinden her izolat için yaklaşık 100 mg alınarak %1 oranında mercapto-ethanol içeren 'grinding buffer' varlığında steril örnek poşetleri içinde homojenize edilmiştir. Tüpler ısıtıcıda 70°C 'de 10 dakika inkube edildikten sonra 5 dakika buzda bekletilmiştir. Daha sonra örnekler 14000 rpm'de 10 dakika santrifüjde tutulmuş ve üst sıvıdan 300 μl alınarak yeni tüplere aktarılmıştır. Tüplere 150 μl ethanol, 300 μl 6M NaI, 50 μl silika süspansiyonu eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında inkubasyona bırakılmıştır. Tüpler 6000 rpm'de 1 dakika santrifüjde tutulduktan sonra üst sıvı kısmı atılmış tüpün içinde kalan silika partiküllerinin yıkanması için 500 μl yıkama tampon çözeltisi eklenmiştir. Bu işlemden sonra tüpler 6000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Yıkama işlemi iki kere yapılmıştır. Yıkamadan sonra silika partikülleri içeren tüplere 150 μl RNase'dan arı steril su eklenmiştir. Tüpler 70°C 'de 4 dakika ısıtıcıda inkube edilmiş, 14000

rpm’de 3 dakika santrifüjde tutulmuştur. Tüpün üst kısmında kalan sıvıdan 145µl alınarak yeni tüplere aktarılmış ve TNA ekstraksiyonu tamamlanmıştır. Örnekler cDNA sentez ve PCR uygulamaları yapılncaya kadar -20°C’de derin dondurucuda saklanmıştır (Foissac et al., 2001) (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 TNA ekstraksiyonu aşamalarından görüntüler. a) Ekstrakte edilecek örnekler, b) Örnek ezme aşaması, c) Süpernatanttaki TNA’nın alınması, d) Örneklerin buzda bekletilmesi, e) Blok ısıtıcıda inkübe elden örnekler, f) Santrifüjde tutulan örnekler.

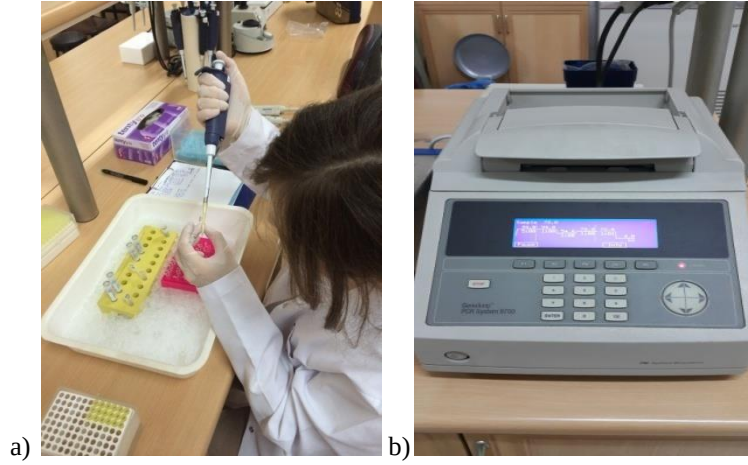
3.2.3.2. Komplementer DNA (cDNA) sentezi

TNA'sı ekstrakte edilmiş olan örneklerin cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Fermentas firmadan temin edilmiş cDNA sentez kiti ve firmanın belirttiği prosedür kullanılmıştır.

Bu yöntemle göre ilk olarak eppendorf tüplerin içerisine 2 µl total RNA, 1 µl oligo (dt) primer konulmuş ve DEPC su ile 12 µl'ye tamamlanmıştır. 70°C'de 5 dakika inkubasyon uygulandıktan sonra tüpler buz üzerine konulmuş ve içlerine sırasıyla 4 µl 5X Reaction buffer, 1 µl Ribolock Ribonuclease inhibitor, 2 µl 10mM dNTP mix eklenmiştir. Kısa süreli santrifüj uygulandıktan sonra 37°C'de 5 dakika inkubasyon uygulanmıştır ve tüplerin içine 1 µl M-MuLV Reverse Transcriptase eklenerek toplam 20 µl hacime ulaşılmıştır. Karışıma daha sonra 42°C'de 60 dakika ve 70°C'de 10 dakika inkubasyon uygulanarak cDNA sentez aşaması tamamlanmıştır.

3.2.3.3. Reverse Transkriptase (RT) PCR yöntemi

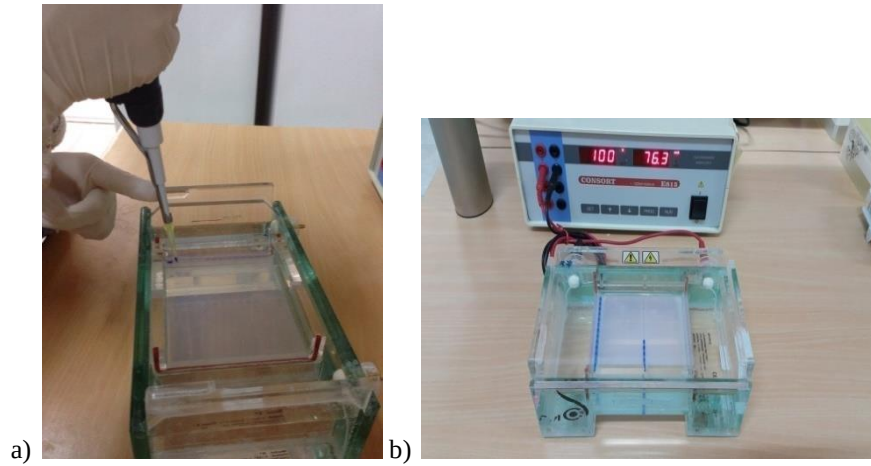
RT-PCR işlemi ticari firmanın önerdiği prosedüre göre, 50 µl hacimde yapılmıştır. Steril PCR tüplerine 25 µl 2x PCR master mix, 1 µl primer1, 1 µl primer 2, 2 µl cDNA ve 21 µl nuclease free su eklenmiştir. Tüpler PCR cihazına yerleştirilerek test edilecek virüs için spesifik olan program uygulanmıştır (Kundu, 2008). Tüm işlemler boyunca eldiven kullanılmış ve herhangi bir kontaminasyon bulunma olasılığını belirlemek için de nükleik asit eklemekten sadece karışımın yer aldığı bir tüpte (kontrol) PCR programında çoğaltma işlemine alınmıştır (Şekil 3.4). Testlerde kullanılan etmene özgü primerin baz uzunluğu ve döngüsü Çizelge 3.2'de görülmektedir.



Şekil 3.4 PCR aşamalarından görüntüler. a) cDNA'sı elde edilmiş örneklerin PCR'a hazırlanması, b) PCR Thermocycler.

3.2.3.4. Agaroz jel elektroforez yöntemi

100 ml 1X TAE tamponu içine 1,5 g agaroz konularak karışım mikrodalga fırında 3.5 dakika tutularak eriyik haline gelmesi sağlanmıştır. Elektroforez koşumu, 100 V'da, yatay düzenekte 60 dakika süreyle ve 1X TAE çözeltisi içerisinde uygulanmıştır. İlk kuyucuğa 12 μ l DNA ladder yüklenmiş olup jele yüklenmeden önce örnekler 6X loading dye ile karıştırılmış (2 μ l loading dye-10 μ l örnek) olarak diğer kuyucuklara yüklenmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 Agaroz jel elektroforezi aşamalarından görüntüler. a) Örneklerin jele yüklenmesi, b) Elektroforez koşumu.

3.2.3.5. Jel görüntüleme cihazında PCR sonuçlarının değerlendirilmesi

Ethidium bromide ile boyanan jelin, DNR Bio-Imaging marka Jel Dokümantasyon ve Analiz Sistemi ile fotoğrafı çekilerek kaydedilmiştir.

3.2.3.6. Dizi analizleri ve filogenetik sınıflandırma

DNA örneklerindeki baz dizilerinin sırasını ortaya çıkarmak için kullanılan genetik şifreleme yöntemine DNA dizi analizi denir. Günümüzde genel olarak DNA dizi analizlerinde birbirinden farklı iki yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan ilki Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi (Maxam and Gilbert, 1977) diğeri ise Sanger-Coulson'un zincir sonlama yöntemidir (Sanger et al., 1977). Bu araştırmada da uygulanacak 'Zincir Sonlama Yöntemi', enzimatik DNA sentezine dayanan, günümüzde DNA dizi analizi için en sık kullanılan yöntemdir.

RT-PCR çalışmaları tamamlanan ve elektroforez sonrası beklenen büyüklükte fragmentler gözlenen örnekler dizi analizi için İontek firmasına gönderilmiştir. Elde edilen dizileme sonuçları NCBI BLAST'ta dünya izolatlarıyla kıyaslanmış, ClustalW2-Multiple Sequence Alignment ve MEGA 6.0 programı kullanılarak benzer izolatların çoklu dizi hizalamaları gerçekleştirilmiş ve filogenetik ağaçları çizilmiştir.

4. BULGULAR

Yürütülen bu çalışmada, Ege Bölgesi illerinin buğday üretimi yapılan üretim alanlarındaki *Barley yellow dwarf virus-PAV* (BYDV-PAV) etmeninin varlığını tespit etmek için belirti gösteren 214 bitki örneği toplanmıştır. Belirtilerin arazilerde ve laboratuvarlarda incelenmesi, serolojik ve moleküler yöntemlerle tanılanması yapılmış, dizi analizi ve filogenetik sınıflandırması gerçekleştirilmiştir.

4.1 Bitki Örneklerinde Gözlenen Belirtiler

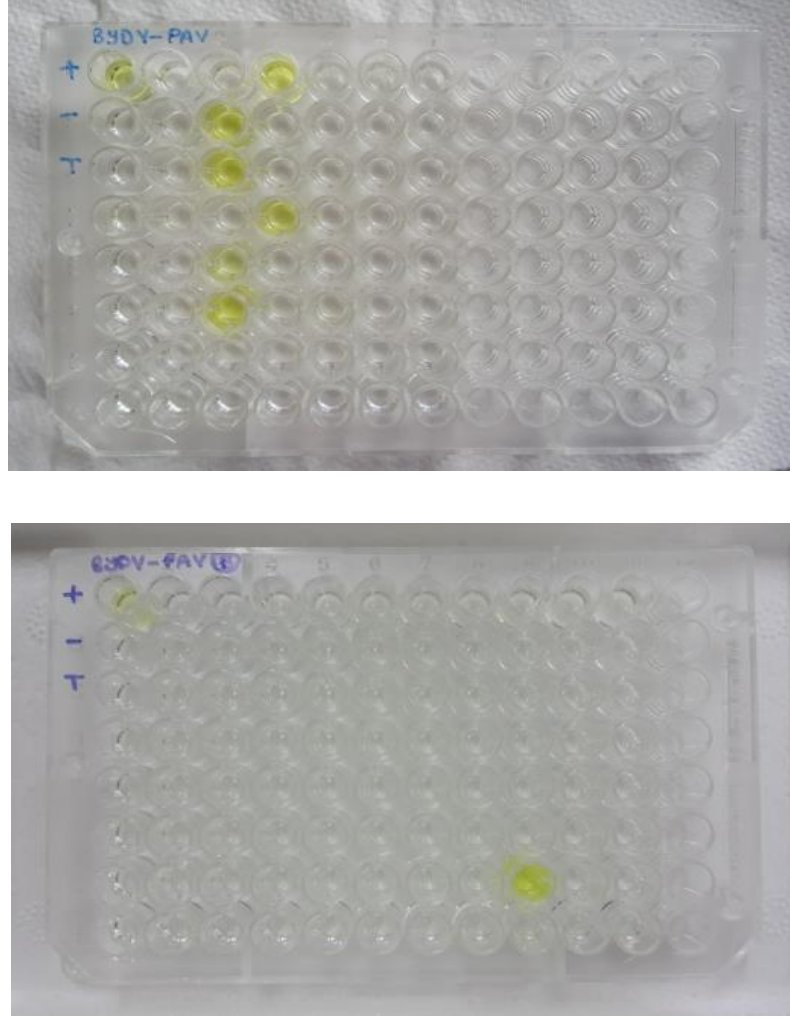
Ege Bölgesi buğday alanlarından alınan 214 buğday yaprak örneğinde genel olarak sarı rengin hakim olduğu görülmektedir. Yapraklarda uçtan başlayarak devam eden klorotik çizgiler, klorotik lekeler, çizgi mozaik ve yeşil rengin zamanla kaybı görülmektedir. Dik, sert yapraklar ve tırtıklı yaprak kenarları ile daha az ve küçük daneler olduğu da gözlemlenmiştir. Gözlemlenen virüs belirtileri Şekil 4.1’de yer almaktadır. Simptomatolojik bu incelemeler, sonrasında yapılacak olan serolojik ve moleküler yöntemler için ön basamak niteliğindedir.



Şekil 4.1 Toplanan bitki örneklerinde görülen belirti tipleri. a) Yapraklardaki çizgi mozaik belirtisi, b) Yapraklardaki klorotik lekeler, c) Yapraklardaki klorotik çizgiler, d) Dik, sert yaprak belirtileri, e) Tırtıklı yaprak kenarı belirtisi, f) Daha az ve küçük oluşan çekirdek belirtisi.

4.2 Serolojik Testlerin Sonuçları

Çalışma kapsamında toplanan buğday örneklerinde BYDV-PAV varlığını saptamak amacıyla örnekler serolojik tanılama yöntemi olan DAS-ELISA testine tabi tutulmuştur. Gerçekleştirilen ELISA testinin aşamalarının sonucunda, testlenen 214 buğday yaprak örneklerinden 21 tanesi BYDV-PAV için pozitif sonuç vermiştir (Şekil 4.2). Virüslü bitki örneği oranı DAS-ELISA yöntemine göre %9.8 olarak bulunmuştur.

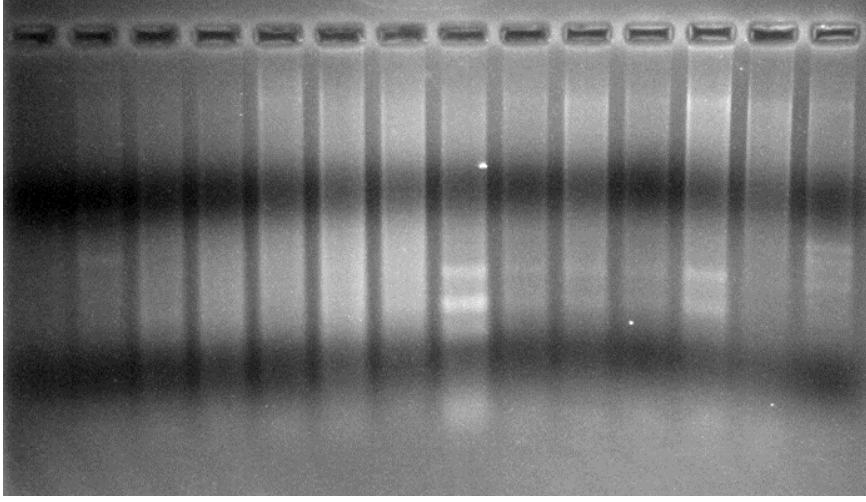


Şekil 4.2 DAS-ELISA testinde pozitif sonuç veren örneklerden görüntüler.

4.3 Moleküler Testlerin Sonuçları

4.3.1 RT-PCR testlerinin sonuçları

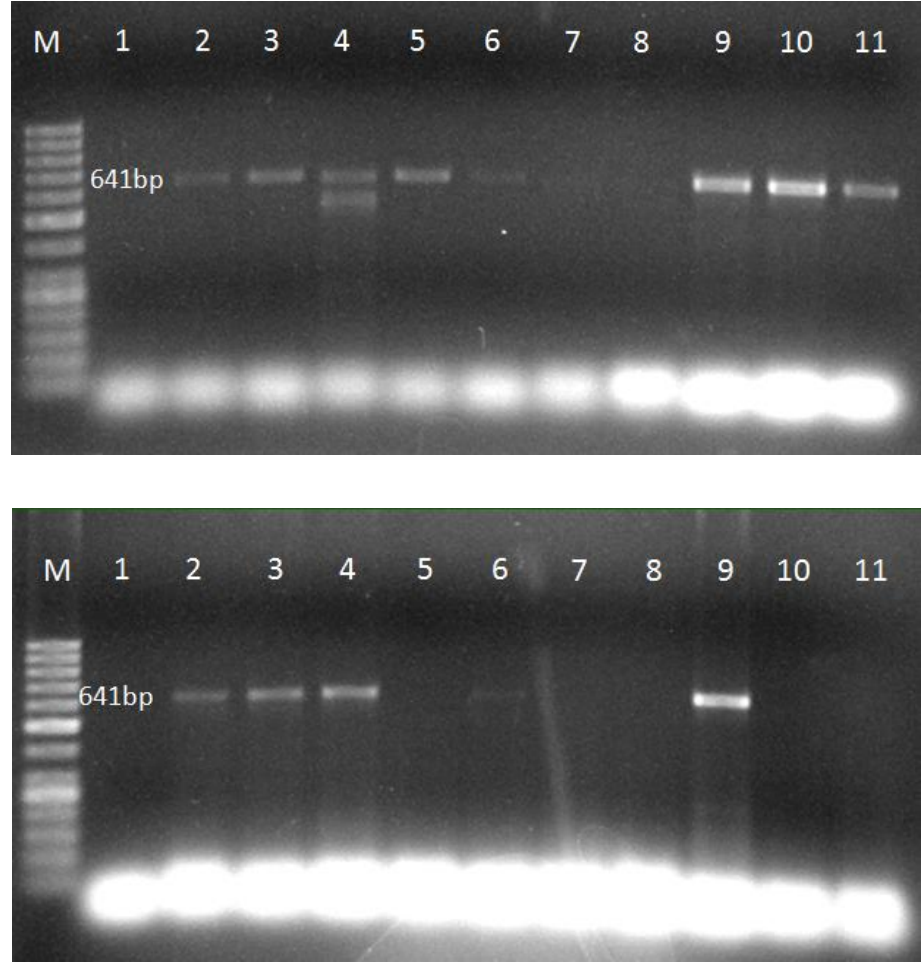
Moleküler çalışmalarda testlenecek 50 örnek, elisa testi sonucunda pozitif çıkan örnekleri, elisa testi sonucunda absorbans değerlerine göre pozitifliği şüpheli olan örnekleri ve illere göre orantılı olacak şekilde belirlenen örnekleri içerecek şekilde seçilmiştir. Bu 50 örneğe ‘silica capture’ yöntemi ile TNA ekstraksiyonu uygulanarak her örneğin TNA’sı elde edilmiştir (Şekil 4.3). TNA’sı elde edilen örneklerle BYDV-PAV için spesifik primer kullanarak RT-PCR test yöntemi uygulanmıştır.



Şekil 4.3 TNA'sı çıkarılan örneklerden bir görünüm.

Moleküler testlerin sonucunda BYDV-PAV için 50 örneğe uygulanan RT-PCR sonucunda 21 örnek enfekteli bulunmuştur. Virüs enfeksiyon oranı DAS-ELISA yönteminin sonuçları ile paralellik göstermekte olup aynı şekilde 214 örnekte viral enfeksiyon oranı %9.8'dir.

Pozitif sonuç veren örneklerden 641 bp uzunluğunda bantlar elde edilmiştir. RT-PCR sonuçlarının jel dökümantasyon cihazında elde edilen görüntüleri Şekil 4.4'de görülmektedir.

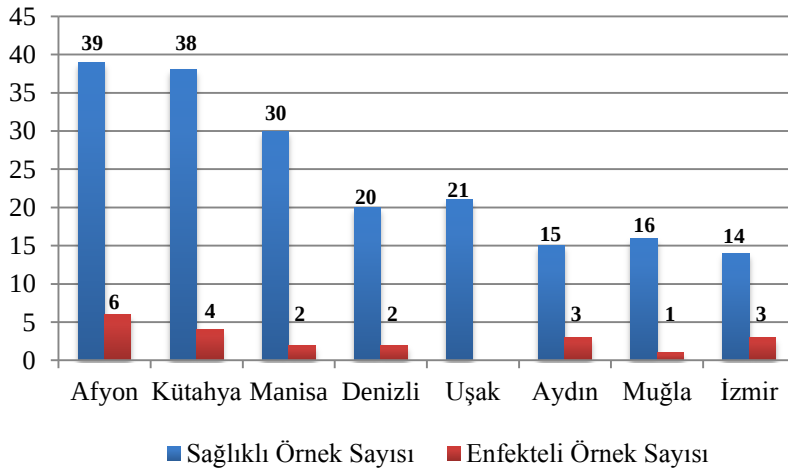


Şekil 4.4 BYDV için uygulanmış olan RT-PCR testi sonucunun jel görüntüleme sisteminde çekilmiş görünümünden bazıları, M: DNA Ladder.

Ege Bölgesi illerinin buğday üretimi yapılan illerinden toplanan 214 bitki örneğinden 21'i, DAS-ELISA ve RT-PCR testleri sonucunda *Barley yellow dwarf virus-PAV* (BYDV-PAV) ile enfekteli bulunmuştur. Afyon'dan toplanan 45 örneğin 6'sı, Kütahya'dan toplanan 42 örneğin 4'ü, Manisa'dan toplanan 32 örneğin 2'si, Denizli'den toplanan 22 örneğin 2'si, Aydın'dan toplanan 18 örneğin 3'ü, Muğla'dan toplanan 17 örneğin 1'i ve İzmir'den toplanan 17 örneğin 3'ü BYDV-PAV ile enfekteli olarak tespit edilmiştir. Uşak'tan toplanan 21 örnekte bu etmen tespit edilememiştir. İllere göre etmenin bulunma durumu ve enfeksiyon oranları Çizelge 4.1'de ve illere göre sağlıklı ve enfekteli örneklerin durumu Şekil 4.5'de yer almaktadır.

Çizelge 4.1 Ege Bölgesi illerinden toplanan örneklerde BYDV-PAV etmeninin bulunma durumu ve enfeksiyon oranları.

İller	Toplanan Örnek sayısı	Sağlıklı Örnek sayısı	Enfekteli Örnek Sayısı	Enfeksiyon Oranı
Afyon	45	39	6	%13.33
Kütahya	42	38	4	%9.52
Manisa	32	30	2	%6.25
Denizli	22	20	2	%9.09
Uşak	21	21	0	%0
Aydın	18	15	3	%16.66
Muğla	17	16	1	%5.88
İzmir	17	14	3	%17.64
Toplam	214	193	21	%9.8



Şekil 4.5 İllere göre toplanan örneklerde sağlıklı ve BYDV-PAV ile enfekteli örnek sayıları.

4.3.2 Dizi analizi ve filogenetik sınıflandırma sonuçları

Moleküler yöntem RT-PCR ile elde edilen BYDV-PAV etmeninin Aydın ve İzmir'den birer izolatu, dizi analizlerinin yapılması için İontek firmasına gönderilmiştir. Gelen gen dizilimleri, Türkiye ve Dünya'da daha önceden bu etmen ile ilgili yapılmış çalışmalardan NCBI (National Center for Biotechnology Information)'a kaydedilen izolatların (Çizelge 4.2) gen dizilimleri ile karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.2 Bu çalışma sonunda dizilimi yapılmış izolatların akrabalık ilişkilerinin karşılaştırıldığı Türkiye ve Dünya izolatları.

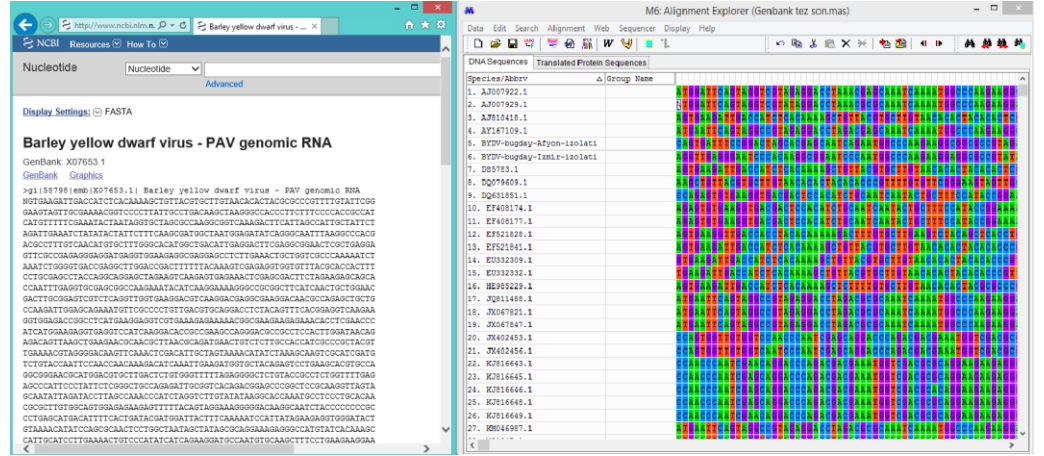
İzolatlar (Accession Number)	Ülkeler
AJ810418.1	Almanya
X07653.1	Avustralya
DQ631850.1	Amerika
EF521828.1	Amerika
JX275852.1	Azerbaycan
EU332309.1	Çin
AJ007922.1	Fas
AJ007929.1	Fas
AY167109.1	Fransa
AJ007491.1	Fransa
EF521841.1	İsveç
D85783.1	Japonya
KM046987.1	Mısır
HE985229.1	Pakistan
JQ811488	Pakistan
JX402453.1	Tunus
KJ816646.1	Türkiye
KJ816649.1	Türkiye
KJ816645.1	Türkiye
KJ816643.1	Türkiye
KJ816648.1	Türkiye
KJ816660.1	Türkiye
KJ816655.1	Türkiye
EF408177.1	Yeni Zellanda

Aydın izolatının gen dizilimi NCBI’da kayıtlı diğer BYDV-PAV izolatları ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonuçlarına göre; Türkiye izolatları ile %100 (KJ816648.1) ve %99 (KJ816646.1, KJ816649.1, KJ816645.1 ve KJ816643.1) benzerlik göstermektedir. Ayrıca, Amerika izolatı (EF521828.1) ile %99, Almanya izolatı (AJ810418.1) ile %98, Fransa izolatı (AY167109.1) ile %99, Fas izolatı (AJ007922.1) ile %99, Pakistan izolatı (HE985229.1) ile %96, Tunus izolatı (JX402453.1) ile %99 benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

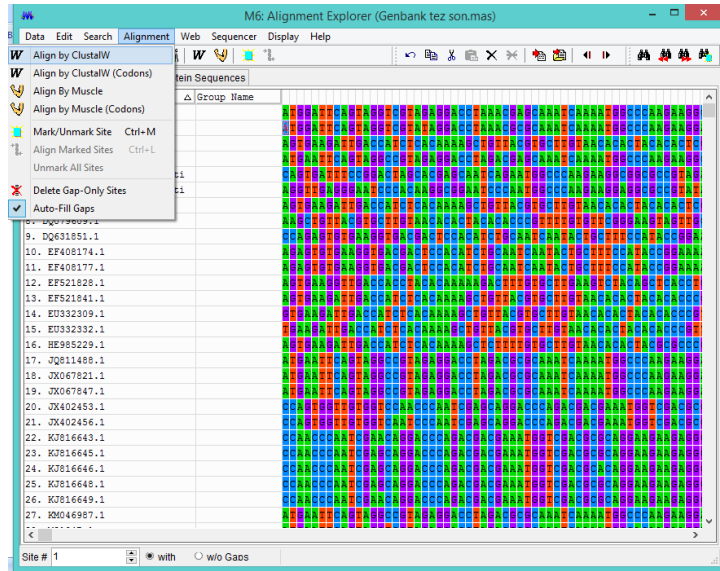
Aynı şekilde İzmir izolatının gen dizilimi de NCBI’da kayıtlı diğer BYDV-PAV izolatları ile karşılaştırılmıştır. Buna göre; Türkiye izolatları (KJ816660.1 ; KJ816655.1) ile %99 benzerlik gösterirken, İsveç izolatı (EF521841.1) ile %99, Avusturalya izolatı (X07653.1) ile %95, Brezilya izolatı (JX067837.1) ile %99,

Yeni Zellanda izolatu (EF408177.1) ile %98, Amerika izolatu (DQ631850.1) ile %99, Fransa izolatu (AJ007491.1) ile %97, Çin izolatu (EU332309.1) ile %99, Japonya izolatu (D85783.1) ile %95, Mısır izolatu (KM046987.1) ile %99, Fas izolatu ile (AJ007929.1) ile %99, Pakistan izolatu (JQ811488) ile %96 ve Azerbaycan izolatu (JX275852.1) ile %99 benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Filogenetik analiz çalışmalarında MEGA 6.06 programı kullanılmıştır. Daha önceden BYDV-PAV etmeni ile çalışmanın yapıldığı ve sisteme kaydedildiği tüm ülkelerin en yüksek benzerlikte saptanan izolatları seçilmiştir. Kayıtlı izolatların NCBI'dan alınmış gen dizilimleri ve karşılaştırmak istenilen izolatların İontek firmasında gönderilen gen dizimleri programa yüklenmiştir (Şekil 4.6). ClustalW ile hizalanması yapıldıktan sonra Neighbor-joining istatistiksel metodu ile filogenetik ağacı elde edilmiştir (Şekil 4.7).

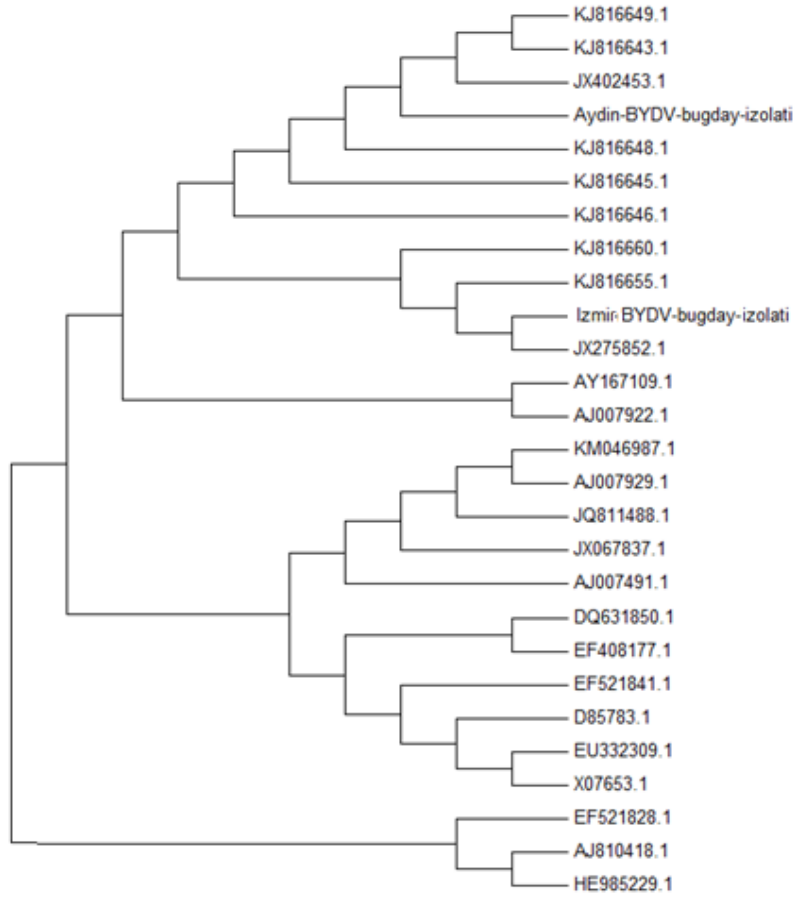


a)



b)

Şekil 4.6 Dizi analizi ve filogenetik çalışmalardan görüntüler. a) NCBI da daha önce yapılmış çalışmalardan izolatların gen dizilimlerinin MEGA 6.06'ya kaydedilmesi, b) Türkiye ve Dünya izolatları ile İzmir ve Aydın izolatlarının gen dizilimlerinin ClustalW ile hizalanması.



Şekil 4.7 Aydın ve İzmir izolatlarının Türkiye ve Dünya izolatları ile akrabalık durumunu gösteren filogenetik ağaç.

5. TARTIŞMA

Dünyada tahıl alanlarında BYDV-PAV viral hastalık etmeninin tanılanması için çeşitli araştırmalar yürütülmüştür. Ülkemizde ise bu konuda yapılan çalışmalar sınırlı olup Ege Bölgesi'ni kapsayan bir çalışma yapılmamış bulunmaktadır. Bu nedenle yürütülen bu çalışmada, dünyadaki tahıl üretim alanlarında en yaygın ve önemli derecede verim kayıplarına neden olan tahıl virüs hastalığı *Barley yellow dwarf virus-PAV* (BYDV-PAV)'nin Ege Bölgesi'nde buğday yetiştiriciliği yapılan alanlardaki bulunma durumu incelenmiştir.

Ege Bölgesi'nde buğday üretimi yapılan illerdeki arpa sarı cücelik hastalığının belirtilerinden olan gelişme geriliği ve sarı-kırmızı renk değişikliği belirtilerini gösteren 214 buğday yaprak örneği alınmıştır. Serolojik ve moleküler çalışmalar sonucunda, gözlemlenen belirtilerin etmenden kaynaklı olabildiği gibi abiyotik etkenler kaynaklı da olmuş olabileceği sonucuna varılmıştır.

Örneklerde yürütülen simptomatolojik gözlemler bazı durumlarda yetersiz kalabilmekte olup diğer tanılama yöntemleri için bir ön basamak niteliğindedir. Çalışmalardaki etmenin bitkilerde en çok göze çarpan belirtisi, yapraklardaki yeşil rengin kaybıdır (D'Arcy and Domier, 2000). Yapraklarda uçtan başlayarak devam eden klorotik çizgiler, lekeler gelişebilir ve suda ıslanmış görünüm olabilir (DPV, 2015). BYDV, cüceleşme, çizgi mozaik, sürgünlerde nekroz, benek ve tahıl ürünlerinde verim kaybı sergileyebilmektedir (Ilbagi et. al., 2005). Dik, sert yapraklar ve tırtıklı yaprak kenarları, verim kayıpları ile ilgili olarak da çiçeklenme ve kardeşlenme azalması, daha az ve küçük çekirdeklerin oluşması, BYDV'nin diğer enfeksiyon belirtilerini içermektedir (D'Arcy and Domier, 2000).

Buğday bitkisinde BYDV-PAV etmenine dair gerçekleştirilen önceki araştırmalarda yer alan belirtilere paralel bulgular elde edilmiştir. Yapraklarda uçtan başlayan klorotik çizgi ve lekeler, sert yapraklar, tırtıklı yaprak kenarları, daha az ve küçük olan çekirdekler gözlemlenmiştir (Şekil 4.1).

Bu çalışmada kullanılan DAS-ELISA testi antikor temelli serolojik bir yöntemdir ve 1977’de Clark ve Adams tarafından bitki virolojisinde tanıtılmıştır. Bitki virüslerinin rutin tespitinde güvenilir ve hızlı bir yöntem haline gelmiştir (Portsmann and Kiessig, 1992). Araştırma kapsamında buğday bitkilerinde enfeksiyon oluşturabilen BYDV-PAV viral etmeni için DAS-ELISA testi uygulanmış olup etmenin bulunma oranı %9.8 olarak belirlenmiştir.

Nükleik asit temelli yöntemler tanılamada önemli bir kullanım potansiyeli sunmaktadır. Yapılan çalışmalar, PCR yönteminin ELISA’ya oranla iki kat daha güvenilir olduğunu ortaya çıkarmıştır (Jacobi et al., 1998). Yürütülen bir çalışmada (Paylan, 2011), farklı türlere ait tohumlar her üç yöntemle (DAS-ELISA, RT-PCR, mekanik inokulasyon) testlenmiş ve RT-PCR yönteminin virüs enfeksiyonlarını saptama oranı %100 olarak bulunurken, DAS-ELISA’da bu oran %96 olmuş, mekanik inokulasyonun tanılama başarısı ise %95 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada, DAS-ELISA ve RT-PCR testleri sonucunda 214 örnekten 21’i enfekteli bulunmuştur. DAS-ELISA ve RT-PCR testleri paralel sonuç vermiştir. Ancak, DAS-ELISA testinde şüpheli olan birkaç örnek RT-PCR testlerinde pozitif sonuç vermiştir.

RT-PCR yönteminin bu başarısı spesifik nükleik asitlerin duyarlı şekilde çoğaltılmasına ve bitki dokularından ekstrakte edilen nükleik asit miktarı ve kalitesine bağlıdır (Sipahioğlu et al., 2006). Ekstraksiyon aşaması RT-PCR’ın güvenilirliğini ve spesifikliğini etkileyen en önemli faktörlerin başında gelmektedir. Bu çalışmada “silica capture (Foissac et al., 2001)” RNA ekstraksiyon yöntemi olarak kullanılmıştır.

İzole edilen spesifik bir DNA parçasının *in vitro* koşullarda, kısa zincirli oligonükleotid primerler ve *Taq* DNA polimeraz enzimi yardımıyla kopyalanması şeklinde de tanımlanan PCR ile virüsün bitkideki varlığı gen düzeyinde belirlenebilmektedir. Çalışma kapsamında alınan tüm örnekler, BYDV-PAV için spesifik primer kullanılarak RT-PCR ile testlenerek tanılamaları yapılmıştır.

Dünya’da tahıl alanlarında BYDV-PAV viral etmeninin tanılanması için çeşitli araştırmalar yürütülmüştür. El-Muadhidi et al. (2001), Irak’da baklagil

(nohut, bakla ve mercimek) ve tahıl (buğday ve arpa) ürünlerini etkileyen virüs hastalıklarını tanımlamak için yürüttüğü araştırmada *Barley yellow dwarf virus-PAV* (BYDV-PAV, genus *Luteovirus*, family Luteoviridae) ve nadiren de BYDV-MAV (genus *Luteovirus*, family Luteoviridae) ve *Cereal yellow dwarf virus-RPV* (CYDV-RPV, genus *Polerovirus*, family Luteoviridae) viral etmenlerinin varlığını tespit etmiştir. Bisnieksab et al. (2006), Letonya'daki yazlık tahıllarda ve mera otlarında, *Barley yellow dwarf virus-PAV* (BYDV-PAV), BYDV-MAV ve *Cereal yellow dwarf virus-RPV* (CYDV-RPV) izolatlarının mevcut olduğunu saptamıştır. Kumari et al. (2006), Yemen'de farklı lokasyonlarda arpa ve ekmeklik buğday ürünlerine etki eden virüs hastalıklarını tanımlamak için yürüttüğü araştırmada en fazla *Barley yellow dwarf virus-PAV*'ın ve onu takiben de *Barley stripe mosaic virus*'ün mevcut olduğunu tespit edilmiştir. Siddiqui et al., (2011) Pakistan'daki farklı buğday üretim alanlarında BYDV belirtisi gösteren şüpheli buğday örneklerini BYDV-PAV, BYDV-MAV, BYDV-SGV, BYDV-RPV, CYDV-RPV ve BYDV-GPV için taramıştır. Test edilmiş 37 örneğin 13'ü BYDV ve onların da 10'unun BYDV-PAV, 3'ünün BYDV-MAV için pozitif olduğu saptanmıştır.

Dünyada olduğu gibi Türkiye'de de tahıl alanlarında BYDV-PAV viral etmeninin tanınması için çeşitli araştırmalar yürütülmüştür. İlbağı (2003) Trakya Bölgesi tahıl üretim alanlarından topladığı belirti gösteren 327 örneğini testlemiş ve buna göre 133'ünü DAS-ELISA ile ve 162'sini RT-PCR ile BYDV için enfekteli olarak tespit etmiştir. Köklü (2004), Tekirdağ ili buğday üretimi yapılan alanlarda 260 buğday örneğinde BYDV'yi araştırmış ve %22.3 oranında enfeksiyon belirlenmiştir. Erkan ve Kutluk Yılmaz (2009), Samsun ili buğday üretim alanlarından toplanan 154 bitki örneğini BYDV için test etmişler ve %3.4 oranında enfeksiyon saptamışlardır. Deligöz ve ark. (2011), Samsun ve Amasya illerinin buğday üretim alanlarında enfeksiyona neden olan *Barley yellow dwarf virus*'ü araştırmıştır. Samsun'dan toplanan 116 örnekte %8.6 oranında ve Amasya'dan toplanan 100 örnekte %4 enfeksiyon belirlenmiştir.

Dünyada ve Türkiye’de tahıl alanlarında BYDV-PAV etmenine yönelik araştırmalar yürütülerek bulunma durumu saptanmıştır. Bu çalışmada kapsamında gerçekleştirilen RT-PCR testleri sonucunda Ege Bölgesi illerinden alınan örneklerde virüs enfeksiyonu oranının %9.8 olduğu belirlenmiştir. Bu oran iller bazında ayrı ayrı değerlendirildiğinde Afyon’da %13.33, Kütahya’da %9.52, Manisa’da %6.25, Denizli’de %9.09, Aydın’da %16.66, Muğla’da 5.88 ve İzmir’de %17.64 olarak enfeksiyon oranları tespit edilmiştir. Uşak’da ise BYDV-PAV etmeni saptanmamıştır (Çizelge 4.1).

Çalışmada kapsamında RT-PCR ve etmene spesifik primer ile izole edilen bulaşık Aydın ve İzmir izolatları ile nükleotid dizilerinin belirlenmesi, daha önceden yapılan çalışmalarda belirlenen izolatlarla karşılaştırılması ve filogenetik ağaç oluşturulması için çalışmalar yürütülmüştür. Bu amaçla izolatlar İontek firmasına gönderilerek nükleotid dizilerinin belirlenmesi sağlanmıştır. PCR ürünlerinden elde edilen bu sekanslar NCBI gibi gen bankalarındaki diğer izolatlarla benzerlik-farklılık açısından kıyaslanabilmektedir. Bu şekilde benzerlik oranları belirlenen izolatlar arasındaki akrabalık ve farklılıkların ortaya koyulması açısından soy ağaçları çıkarılmaktadır (Fidan, 2010).

Siddiqui et al., (2011) Pakistan’daki farklı buğday üretim alanlarında BYDV belirtisi gösteren şüpheli buğday örneklerini bu etmenin birçok ırkı için testlemiş ve pozitif olarak saptadığı BYDV-PAV ve BYDV-MAV izolatlarının sekanslarının) BYDV-PAS (%92.8-94.6)’a ve BYDV-PAV (99.3-99.7)’a maksimum benzerlik gösterdiği sonucuna varmıştır. İran’da tahıl üretiminde karşılaşılan en önemli problemlerden biri olan arpa sarı cücelik hastalığına neden olan virüsleri tanımlamak için çalışma yapan Rastgou et al. (2005), saptadığı BYDV-PAV izolatının moleküler karakterizasyonu gerçekleştirerek ABD, Fransa ve Japonya’dan PAV izolatlarına yüksek sekans benzerliği (%96-97) gösterdiğini saptamıştır.

Gerçekleştirilen çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da bulunma durumu araştırılan BYDV-PAV etmenin Dünya ve Türkiye izolatları ile sekans benzerlik durumları incelenmiştir. Dizi analizi ve filogeneik çalışmalar sonucunda, Aydın izolatının Türkiye izolatlarıyla %100 ve %99, Amerika, Fas, Fransa ve Tunus

izolatları ile %99, Almanya izolatu ile %98 ve Pakistan izolatu ile %96 benzerlik taşıdığı; İzmir izolatinin ise Amerika, Azerbaycan, Brezilya, Çin, Fas, İsveç, Mısır ve Türkiye izolatları ile %99, Yeni Zellanda izolatu ile %98, Fransa izolatu ile %97, Pakistan izolatu ile %96 ve Avusturalya ve Japonya izolatları ile %95 benzerlik taşıdığı saptanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yürütülen bu çalışmanın tamamlanması ile Ege Bölgesi illerinde buğday yetiştiriciliği yapılan alanlarda, *Barley yellow dwarf virus*-PAV viral etmeni saptanmıştır. Çalışmanın, ülkemizin Ege Bölgesi'ndeki buğday üretim alanlarında BYDV-PAV etmeninin araştırıldığı bir çalışma olarak literatüre katkı sağladığı düşünülmektedir.

Çalışma kapsamında saptanan etmene ait iki izolatın gen dizilimi elde edilmiş, dünyadaki ve ülkemizdeki benzer izolatlarla karşılaştırılmış, filogenetik ağaçlar yardımıyla da benzerlikleri belirlenmiştir.

Çalışmada buğday virüslerinin tanımlanmasında DAS-ELISA ve RT-PCR gibi güvenilir, hassas ve hızlı yöntemler kullanılmıştır. Kullanılan prosedürler, primerler gibi bazı bilgilerin viral enfeksiyonun tespiti için gelecekte yapılacak çalışmalarda referans oluşturabileceği düşünülmektedir.

Serolojik tanılamada şüpheye düşülen birkaç örnekte moleküler tanılama ile netliğe kavuşulmuştur. Bu durum RT-PCR ile tanımlanması moleküler yöntemlerin etkinliğinin yüksekliğini birkez daha göstermiştir. Ancak, çok sayıda kimyasal madde, alet ve ekipmanlara gereksinimi, test aşamalarının yoğunluğu ve pahalı oluşu RT-PCR kullanımını kısıtlamaktadır. Yine de sonuç olarak bu çalışmada tanılamada kullanılan her iki yöntemde de paralel sonuçlar elde edilmiştir.

Dünya genelinde yaygın olan ve ciddi verim kayıplarına neden olan *Barley yellow dwarf virus* hastalık etmeninin önlenmesi amacıyla bazı önerilerde bulunulması gerekli görülmüştür:

- Buğday üretiminde dayanıklı ya da tolerant çeşitlerin üretimde kullanılması bu virüse karşı alınabilecek en iyi önlem olacaktır.
- Ekim sıklığı, virüsün yayılmasından tahılları korumak için en iyi mesafede olacak şekilde ayarlanmalıdır. Epidemiler ve denemeler, sık

ekili alanlarda seyrek ekili alanlara göre arpa sarı cücelik hastalığının daha az zararının meydana geldiğini göstermektedir.

- Üretimde sonbaharın başındaki ya da ilkbaharın geç dönemlerindeki ekimlerden kaçınılmalıdır. Ürün aşaması ne olursa olsun yaprak bitleri bir bölgeye genellikle yılın aynı zamanında gelebilmektedir. Bu nedenle çoğu tahıl hastalıklarını engellemek için erken bahar ekimleri tavsiye edilmektedir.
- Gelişme döneminin erken evresinde enfeksiyon ortaya çıktığı zaman meydana gelen verim kayıplarının oldukça yüksek olması hatta %100'e ulaşması nedeniyle bu virüs ile savaşımında bitkinin enfekte olmasını önlemek gerekmektedir.
- Virüsün tarladaki yayılışını azaltmak ve alınacak ürün miktarını arttırmak için vektörler ile savaşım önem taşımaktadır. Bu amaçla yaprak bitlerine karşı gerçekleştirilebilen mücadele yöntemlerinin uygun şekilde yapılması etkili bir seçenek olacaktır.
- Tahıllarda virüs hastalıklarının yoğunluk artışının engellenmesi bakımından ekim nöbetinin uygulanması için üreticilere gerekli uyarılar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Anonymous**, 1999, Tarımsal Yapı ve Üretim, T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü, 598s.
- Balaji, B., Bucholtz, D.B. and Anderson, J.M.**, 2003, *Barley yellow dwarf virus* and *Cereal yellow dwarf virus* Quantification by Real-Time Polymerase Chain Reaction in Resistant and Susceptible Plant, *Phytopathology*, 93 (11): 1386-1392pp.
- Beuve, M., Naïbo, B., Foulgocq, L. and Lapierre, H.**, 1999, Irrigated hybrid maize crop yield losses due to *Barley yellow dwarf virus*-PAV luteovirus, *Crop Science*, 39(6): 1830-1834pp.
- Bisnieks, M., Kvarnheden, A., Sigvald, R. and Valkonen, J. P. T.**, 2004, Molecular diversity of the coat protein-encoding region of *Barley yellow dwarf virus*-PAV and *Barley yellow dwarf virus*-MAV from Latvia and Sweden, *Archives of Virology*, 149(4): 843-853pp.
- Bisnieksab, M., Kvarnhedenc, A., Turkab, I. and Sigvalda, R.** 2006, Occurrence of *Barley yellow dwarf virus* and *Cereal yellow dwarf virus* in pasture grasses and spring cereals in Latvia, *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science*, 56(3): 171-178pp.
- Bremer, H.**, 1984, Türkiye Fitopatolojisi Cilt II. Tarım Bakanlığı Neşriyat Müdürlüğü, Sayı 657, Ankara, 237s.
- Bremer, K.**, 1971, *Wheat streak mosaic virus* in Turkey, *Phytopathology Mediterranean*, 10: 280-282pp.
- Bremer, K.**, 1972, *Barley stripe mosaic virus* Identified in Turkey, *Phytopathology Mediterranean*, 11: 200-201pp.
- Bremer, K.**, 1973, The *Brom Grass Mosaic Virus* As a Cause of Cereal Diseases in Finland, *Ann. Agric. Fenn.*, 12: 207-214pp.
- Bremer, K.**, 1974, Occurence of Brom Grass Mosaic and Agropyron Mosaic From Turkey, *Phytopathology Mediteranean*, 12: 67-71pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bremer., K. and Raatikainen, M.,** 1975, Cereal Disease Transmitted or Caused by Aphids and Leafhoppers in Turkey, Ann. Acad. Sai. Fenn. A., IV. Biologica, 203: 1-14pp.
- Brunt, A. A., Crable, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J. and L. Watson.,** 1996, Viruses of Plants, Description and list from the VIDE Database CAB International University Press, Canbridge U.K., 1284p.
- Chain, F., Riault, G., Jacquot, E. and Trottet, M.,** 2006, Field trial of serially passaged isolates of BYDV-PAV overcoming resistance derived from *Thinopyrum intermedium* in wheat, Plant Breeding, 125(3): 211–216pp.
- Clark, M. F. and Adams, A. N.,** 1977, Characteristic of Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Plant Viruses, Journal of General Virology, 34: 475-483pp.
- Cook, R.J. and Veseth, R.J.,** 1991, Wheat healthy management, A.P.S. Presss. St Paul Minnesota, U.S.A., 152 p.
- D'Arcy, C.J. and Domier, L.L.,** 2000, *Barley yellow dwarf*, The Plant Health Instructor, DOI: 10.1094/PHI-I-2000-1103-01 Updated 2005, <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/Pages/BarleyYelDwarf.aspx> (Erişim Tarihi: 25.2.2015).
- D'Arcy, C.J. and Domier, L.L.,** 2005, Family luteoviridae, Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, 891-900pp.
- de Cezare, D.G., Schons, J. and Lau, D.,** 2011, Analysis of resistance/tolerance of the wheat cultivar BRS Timbaúva to *Barley yellow dwarf virus* (BYDV-PAV), Tropical Plant Pathology, 36(4): 249-255pp.
- Deligöz, İ., Kahveci Caner, Y. ve Akyol, H.,** 2011, Samsun ve Amasya illerinde buğday üretim alanlarında enfeksiyona neden olan Barley yellow dwarf virus-PAV ve Barley yellow dwarf virus-MAV virüslerinin araştırılması, Bitki Koruma Bülteni 2011, 51(2):187-193s.
- DPV,** 2015, Descriptions of Plant Viruses, <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=32> (Erişim tarihi: 7.7.2015).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- El-Muadhidi, M.A., Makkouk, K.M., Kumari, S.G., Jerjess, M., Murad, S.S., Mustafa, R.R. and Tarik, F.,** 2001, Survey for legume and cereal viruses in Iraq, *Phytopathologia Mediterranea*, 40(3): 224-233pp.
- Erkan E. ve Kutluk Yılmaz N.D.,** 2009, Samsun ilinde buğday üretim alanlarında enfeksiyon oluşturan virüslerin saptanması. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi* 24(2), 67-75s.
- Erkan, S., Gümüş, M., Türküsay, H. ve Duman, İ.,** 1995, Sanayi Domatesi Çeşitlerine Ait Tohum Örneklerinde Tohum Kaynaklı Bazı Hastalık Etmenlerinin Bulunma Durumunun Saptanması Üzerine Araştırmalar.
- Erkan, S.,** 1998, Tohum Patolojisi. E. Ü. Z. F. Bitki Koruma Bölümü, Bornova, İzmir, Gözdem Ofis, 275s.
- Fabrea, F., Kervarrec, C., Mieuzeta, L., Riaulta, G., Vialattea, A. and Jacquota, E.,** 2003, Improvement of *Barley yellow dwarf virus-PAV* detection in single aphids using a fluorescent real time RT-PCR, *Journal of Virological Methods*, 110(1): 51–60pp.
- FAO,** 2013, Food And Agriculture Organization Of The United Nations, Tarımsal Üretim İstatistikleri 2009-2013, <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (Erişim Tarihi: 19.08.2014).
- Fidan, H.,** 2010, Sarımsak, Soğan ve Pırasadaki Virüs Hastalıklarının Saptanması ve Taşköprü 56 Sarımsak Tipinin En Yaygın Virüse Karşı Reaksiyonunun Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enst. Doktora Tezi, Adana, 163s.
- Figueira, A.R., Domier, L.L. and D'Arcy, C.J.,** 1997, Comparison of techniques for detection of *Barley yellow dwarf virus-PAV-IL*, *Plant Disease*, 81 (11): 1236-1240pp.
- Foissac, X., Savelle-Dumas, L., Gentit, P., Dulucq, M.J. and Candresse, T.,** 2001, Polivalent detection of Fruit tree Tricho, Capillo and research Number 45: 33-35pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gildow, F.E.**, 1987, Virus-membrane interactions involved in circulative transmission of luteoviruses by aphids, *Current Topics in Vector Research*, 4: 93–120pp.
- Gill, C. C.**, 1969, Annual variation in strains of *Barley yellow dwarf virus* in Manitoba and the occurrence of green-bug-specific isolates, *Canadian Journal of Botany*, 47: 1277p.
- Gray, S. M.**, 1996, Plant virus proteins involved in natural vector transmission, *Trends in Microbiology*, 4: 259–264pp.
- Günen, E.**, 2007, Buğdayda Çıkış Sonrası Kullanılan Bazı Herbisitlerin Tek Başına ve Kombine Olarak Kullanılmasının Tarla Koşullarında Etkinliğinin Araştırılması, Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Hellico-Kervarrec, C., Riault, G. and Jacquot, E.**, 2002, Biolistic-mediated inoculation of immature wheat embryos with *Barley yellow dwarf virus-PAV*, *Journal of Virological Methods*, 102(1-2): 161-166pp.
- Hershman, D.E. and Johnson D.W.**, 2011, A survey of cereal aphids which may vector Barley yellow dwarf virus in Kentucky wheat fields: Common species and distribution, *Extension Entomologist and Extension Plant Pathologist University of Kentucky Princeton, KY 42445-0469*.
- İlbağı, H.**, 2003, Trakya Bölgesinde Üretimi Yapılan Bazı Tahıl Türlerinde Verim Kayıplarına Neden Olan Viral Kökenli Enfeksiyonların Etmenlerinin Tanılanması, Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 136s.
- İlbağı, H.**, 2006, Common reed (*Phragmites communis*) is a natural host of important cereal viruses in the Trakya region of Turkey, *Phytoparasitica*, 34(5): 441-448pp.
- İlbağı, H., Çitir, A. and Yorganci, Ü.**, 2005, Occurrence of virus infections on cereal crops and their identifications in the Trakya region of Turkey, *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 112(4): 313-320pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ilbagi, H., Rabenstein, F., Habekuss, A., Ordon, F. and Çitir, A.,** 2006, Incidence of virus diseases in maize fields in the Trakya region of Turkey, *Phytoprotection* 87(3): 115-122pp.
- Ilbagi, H., Rabenstein, F., Habekuss, A., Ordon, F., Citir, A., Cebeci, O. and Budak, H.,** 2008, Molecular, serological and transmission electron microscopic analysis of the *Barley yellow dwarf virus- PAV* and the *Cereal yellow dwarf virus-RPV* in canary seed (*Phalaris canariensis* L.), *Cereal Research Communications*, 36(2): 225-234pp.
- Jacobi, V., Bachand, G.D., Hamelin, R.C. and Castello, J.D.,** 1998, Development of A Multiplex Immunocapture RT-PCR Assay for Detection and Differentiation of Tomato and Tobacco Mosaic Tobamoviruses. *Journal of Virological Methods* 74: 164-178pp.
- Jensen, S. G.,** 1969, Occurrence of virus particles in the phloem tissue of BYDV-infected barley, *Virology*, 38: 83p.
- Kendall, D.A., George, S. and Smith, B.D.,** 1996, Occurrence of *Barley yellow dwarf viruses* in some common grasses (Gramineae) in south west England, *Plant Pathology*, 45(1): 29-37pp.
- Koev, G., Mohan, B. R., Dinesh-Kumar, S. P., Torbert, K. A., Somers, D. A. and Miller, A. W.,** 1998, Extreme reduction of disease in oats transformed with the 5' half of the *Barley yellow dwarf virus-PAV* genome, *Phytopathology*, 88(10): 1013-1019pp.
- Koonin and Dolja,** 1993. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 28(6):546p.
- Köklü G.,** 2004, Occurrence of cereal viruses on wheat in Tekirdag, Turkey. *Phytoprotection* 85: 19-25pp.
- Kumari, S. G., Muharram, I., Makkouk, K. M., Al-Ansi, A., El-Pasha, R., W. A. Al-Motwkel, W. A. and Kassem, A. H.,** 2006, Identification of viral diseases affecting barley and bread wheat crops in Yemen, *Australasian Plant Pathology*, 35(5): 563-568p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kundu, J. K.**, 2008, First Report of *Barley yellow dwarf virus*-PAS in Wheat and Barley Grown in the Czech Republic, Department of Virology, Crop Research Institute, Prague 6, 161 06 Czech Republic, 92: 11, 1587p.
- Kün, E.**, 1994, Tahıllar II. Sıcak İklim Tahılları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No:1360, Ders Kitabı: 394, Ankara, 317s.
- Kün, E.**, 1998, Serin İklim Tahılları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları No: 1032, Ders Kitabı:299, Ankara, 322s.
- Lanzarini, A.C., Schons, J., Salvadori, J.R., Nienow, A.A., Nicolini-Teixeira, F., Binotto-Missiura, F. and Deuner, E.**, 2007, Assessment of damage caused by the *Barley yellow dwarf virus* in Brazilian wheat cultivars, Fitopatologia Brasileira, 32(6): 512-517pp.
- Lister, R.M. and Ranieri, R.**, 1995, Distribution and economic importance of *Barley yellow dwarf*, 29-53pp.
- Makkouk, K. M. and Kumari, S. G.**, 2009, Epidemiology and integrated management of persistently transmitted aphid-borne viruses of legume and cereal crops in West Asia and North Africa, Virus Research, 141(2): 209–218pp.
- Mar, T. B., Lau, D., Schons, J., Yamazaki-Lau, E., Jr. A. N.**, 2013, Molecular identification based on coat protein sequences of the *Barley yellow dwarf virus* from Brazil, Scientia Agricola, 70(6).
- Maxam, A.M. and Gilbert, W.**, 1977, A new method for sequencing DNA, Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., vol. 74(2): 560-564pp.
- Miller, W.A. and Rasochová, L.**, 1997, *Barley yellow dwarf viruses*, Annual Review of Phytopathology, 35: 167-190pp.
- Nancarrow, N., Constable, F. E., Finlay, K. J., Freeman, A. J., Rodoni, B. C., Trebicki, P., Vassiliadis, S., Yen, A. L. and Luck, J. E.**, 2014, The effect of elevated temperature on *Barley yellow dwarf virus*-PAV in wheat, Virus Research, 186: 97-103pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Oswald, J.W. and Houston, B.R.**, 1951, A new virus disease of cereals, transmissible by aphid, Plant Disease Report, 15: 471-475pp.
- Oswald, J.W. and Houston, B.R.**, 1953a, The yellow dwarf virus disease of cereal crops, Phytopathology, 43: 128p.
- Oswald, J.W. and Houston, B.R.**, 1953b, Host range and epiphytology of *Cereal yellow dwarf*, Phytopathology, 43: 309p.
- Parizoto, G., Rebonatto, A., Schons, J. and Lau, D.**, 2013, *Barley yellow dwarf virus*-PAV in Brazil: seasonal fluctuation and biological characteristics. Tropical Plant Pathology, 38(1): 11-19pp.
- Paylan, İ.C.**, 2011, Bazı Sebze Türlerinin Tohumlarındaki Virüslerin Belirlenmesi ve Tohumlardaki Viral Enfeksiyonların İnaktifleştirilmesi Üzerinde Araştırmalar.. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, İzmir, 147s.
- Porstmann, T. and Kiessig, S.T.**, 1992, Enzyme Immunoassay Techniques, An Overview, Journal of Immunological Methods 150, 5-21pp.
- PVO**, 2014, Plant Viruses Online, Descriptions and Lists from the VIDE Database, *Barley yellow dwarf luteovirus*, <http://pvo.bio-mirror.cn/descr062.htm> (Erişim Tarihi: 20.08.2014).
- Rastgou, M., Khatabi, B., Kvarnheden, A. and Izadpanah, K.**, 2005, Relationships of *Barley yellow dwarf virus*-PAV and *Cereal yellow dwarf virus*-RPV from Iran with viruses of the family Luteoviridae, European Journal of Plant Pathology, 113(3): 321-326pp.
- Rochow, W. F.**, 1963, Latent periods in aphid transmission of *Barley yellow dwarf virus*, Phytopathology, 53: 355p.
- Rochow, W.F.**, 1969a, Biological properties of four isolates of *Barley yellow dwarf virus*, Phytopathology, 59: 1580-1589pp.
- Rochow, W. F.**, 1969b, Specificity in aphid transmission of a circulative plant virus. In 'Viruses, Vectors and Vegetation' (Karl Maramorosch, ed.), Interscience, New York, 175p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rochow, W.F.**, 1970, *Barley yellow dwarf virus* Description of Plant Viruses Number 32. Common Mycol. Inst., Surrey, England.
- Rochow, W.F. and Muller, I.**, 1971, A fifth variant of *Barley yellow dwarf virus* in New York, Plant Disease, 55: 874-877pp.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.**, 1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, 74(12): 5463–5467pp.
- Siddiqui, N. N., Ilyas, M., Mansoor, S., Azhar, A. and Saeed, M.**, 2011, Cloning and Phylogenetic Analysis of Coat Protein of *Barley yellow dwarf virus* Isolates from Different Regions of Pakistan, Journal of Phytopathology, 160(1): 13–18pp.
- Sipahioğlu, H.M., Usta, M. and Ocak, M.**, 2006, Use of dried high-phenolic laden host leaves for virus and viroid preservation and detection by PCR methods, Journal of Virological Methods, 137(1): 120-124pp.
- TÜİK**, 2013, Türkiye İstatistik Kurumu, Bitkisel Üretim İstatistikleri 2014, http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001 (Erişim Tarihi: 20.08.2014).
- Watson, M. A. and Mulligan, T.**, 1960, The manner of transmission of some *Barley yellow dwarf viruses* by different aphid species, Annals of Applied Biology, 48: 711p.
- Wiese, M.V.**, 1987, Compendium of Wheat Diseases A.P.S Press. St. Paul Minnesota, U.S.A., 106p.
- Yoon, J., Choi, ., Palukaitis, P. and Gray, S. M.**, 2011, Agrobacterium-mediated infection of whole plants by yellow dwarf viruses, Virus Research, 160(1-2): 428-434pp.
- Yorgancı, Ü.**, 1989, Bitki Virüs Hastalıkları Ders Notları, Derleme, Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Bornova, İzmir, 56s.

ÖZGEÇMİŞ

10.10.1991 tarihinde İzmir’de doğdu. Lise eğitimini Cem Bakioğlu Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 2009 yılında girdiği Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü’nden 2013 yılında mezun oldu. Aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başlamış olup halen çalışmalarına aynı birimde devam etmektedir.

EKLER

Ek 1. ‘Silica Capture’ Yöntemi ile TNA Ekstraksiyonunda, Elektroforez ve Görüntüleme Aşamalarında Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışları

EK 1. ‘Silica Capture’ Yöntemi ile TNA Ekstraksiyonunda, Elektroforez ve Görüntüleme Aşamalarında Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışları

1. Grinding Buffer (Ekstraksiyon tampon çözeltisi)

- Guanidine Thiocyanate 4 M	23.64gr/50ml
- NaOAc (pH: 5.2) 0.2 M	1.36 gr/50 ml
- EDTA 25 mM	0.465 gr/50 ml
- KOAc 1.0 M	4.9 gr/ 50 ml
- PVP-40 %2.5 wt/vol	1.25 gr/50ml
- %1 2-ME (Mercaptoethanol)	

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 50 ml hacimde hazırlanacak olan çözelti için steril su içerisinde çözdürülür ve kullanım süresince 4 °C’de saklanır.

* Mercaptoethanol ekstraksiyon esnasında eklenmelidir.

2. NaI (Sodyum iyodid) solüsyonu

- Na ₂ SO ₃	0.75 gr
- NaI (Sigma S8379)	36 gr

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 40 ml steril saf su içerisinde çözdürülür ve sonra saf su ile 50 ml’ye tamamlanır. Otoklav ile sterilize edilir ve kullanım süresince 4 °C’de saklanır.

3. Washing Buffer (Yıkama tampon çözeltisi)

- Tris-HCl (pH: 7.5) 1 M	10.0 mM
- EDTA 5 M	0.5 mM
- NaCl 0.5 M	50.0 mM
- EtOH	% 50

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar bir araya getirildikten sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlanır. Ardından 100 ml saf ethanol eklenerek 200 ml'ye tamamlanmış olur. Ethanol eklemeyden önce otoklav ile sterilize edilir ve 4°C'de saklanır.

4. Silika süspansiyonunun hazırlanması (pH: 2.0)

- Silica (Sigma % 12 S5631) 60 gr

Bir mezür kabındaki 500 ml saf su içersine 60 gr silika konulup karıştırdıktan sonra 24 saat beklenir. 470 ml'lik üst sıvı atılır (üst sıvının % 90'ı) ve 500 ml'ye tamamlanarak iyice karıştırılır. 5 saat bekletmedin sonunda 440 ml'lik üst sıvı (üst sıvının % 85'i) atılır ve geriye kalan 60 ml'lik bulamacın pH'ı HCl ile 2.0'ye ayarlanır. Otoklav ile sterilize edilir ve ışıktan etkilenmemesi için alimünyum folyo ile sarılarak oda sıcaklığında saklanır.

5. 50X TAE koşum tamponu stok solüsyon

- Tris-bace ($C_4H_{11}NO_3$) (pH: 8.0) 242 gr
- Glacial Acetic acid (CH_3COOH) 57.1 gr
- 0.5 M EDTA 100 ml

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre suda çözdürüldükten sonra otoklavda sterilize edilerek oda sıcaklığında saklanır.

6. 1X TAE koşum tamponunun hazırlanması

50X TAE stok solüsyondan 10 ml alınarak steril saf su ile 500 ml'ye tamamlanır ve bu şekilde kullanılır.