



**T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI BUĞDAY GENOTİPLERİNİN SARI CÜCELİK VİRÜSLERİNE
KARŞI DAYANIKLILIĞININ GENOTİPİK ve FENOTİPİK
KARAKTERİZASYONUNUN BELİRLENMESİ**

Mahir BAŞARAN

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

**HATAY
EYLÜL - 2022**



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI BUĞDAY GENOTİPLERİNİN SARI CÜCELİK VİRÜSLERİNE
KARŞI DAYANIKLILIĞININ GENOTİPİK ve FENOTİPİK
KARAKTERİZASYONUNUN BELİRLENMESİ**

Mahir BAŞARAN
ORCID:0000-0002-9655-0992

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN
ORCID: 0000-0002-4381-4149

HATAY
EYLÜL - 2022

09/09/2022

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Mahir BAŞARAN

ÖZET

BAZI BUĞDAY GENOTİPLERİNİN SARI CÜCELİK VİRÜSLERİNE KARŞI DAYANIKLILIĞININ GENOTİPİK ve FENOTİPİK KARAKTERİZASYONUNUN BELİRLENMESİ

Bu çalışma 2019-2022 yılları arasında Diyarbakır GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi (GAPUTAEM) ve Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi (HMKÜ) Viroloji Laboratuvarında yürütülmüştür. Materyal olarak GAPUTAEM tarafından verim ve kalite parametreleri araştırılmış olan ve tescil için aday olarak belirlenen 13 adet buğday genotipi, 10 adet Diyarbakır ili için önemli yerel buğday çeşidi ve 7 adet de standart buğday çeşidi kullanılmış olup kontrol olarak Anza ekmeklik buğday ile Barbaros arpa çeşitleri kullanılmıştır. Çalışmanın temel amacı, bu genotiplerin sarı cücelik hastalığına neden olan barley yellow dwarf virus (BYDV)-PAV, BYDV-MAV ve cereal yellow dwarf virüs (CYDV)-RPV türlerine karşı dayanıklılık durumunun fenotipik ve genotipik analizlerle belirlenmesidir. Bu amaçla öncelikle BYDV'nin bu üç türüyle bulaşık olduğu tespit edilen buğday bitkileri inokulum kaynağı olarak kullanılmış ve virüs vektörü olarak bilinen *Rhopalosiphum padi* ve *Sitobion avenae* ile dayanıklılık durumu araştırılan buğday genotiplerine aktarılması sağlanmıştır. Afidlerle inokule edilen toplam 300 buğday bitkisinin DAS-ELISA testi sonucunda saptanan ortalama BYDV enfeksiyon oranları BYDV-PAV için %52.6, BYDV-MAV için %47.0, CYDV-RPV için %9.3 olarak tespit edilirken RT-PCR analizleri ile bu oranlar BYDV-PAV için %66.0, BYDV-MAV için %56.3, CYDV-RPV için ise %47.3 olarak tespit edilmiştir. Fenotipik gözlemlerin teyit edilmesi amacıyla yapılan genotipik analizlerde sarı cücelik virüslerine karşı dayanıklılıkla ilişkili Bdv2 ve Bdv3 genlerinin varlığının belirlenmesi için SSR, SCAR ve RAPD markörleri kullanılarak yapılan PCR analizleri sonucunda sadece SSR markörleri ile 16 genotipte Bdv2 geni, 20 genotipte ise Bdv3 geni ile ilişkili amplifikasyon elde edilmiştir. Genotipik olarak her iki SSR markörüyle de dayanıklı bulunan 16 genotipin fenotipik tepkileri değerlendirildiğinde ise bu genotiplerin farklı oranlarda BYDV'ye duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler ışığında ekmeklik buğday genotipleri makarnalık olanlara göre daha dayanıklı/tolerant bulunmuştur. Makarnalık buğday genotipleri içinde ise sadece Hevidi/Akbuğday makarnalık buğday genotipi dayanıklı/tolerant olarak tespit edilmiş olup gelecekteki ıslah çalışmaları için ekmeklik buğday genotiplerinin yanı sıra bu yerel çeşidin de kullanılması önerilmektedir.

2022, 90 sayfa

Anahtar Kelimeler: Buğday, arpa sarı cücelik hastalığı, BYDV-PAV-MAV, CYDV-RPV, dayanıklılık

ABSTRACT

DETERMINATION of the GENOTYPIC and PHENOTYPIC CHARACTERIZATION of SOME WHEAT GENOTYPES RESISTANCE to YELLOW DWARF VIRUSES

This study was carried out in Diyarbakır GAP International Agricultural Research and Training Center (GAPUTAEM) and Hatay Mustafa Kemal University (HMKU) Virology Laboratory between 2019-2022. Thirteen wheat genotypes whose yield and quality parameters were investigated by GAPUTAEM and determined as candidates for registration, 10 important local wheat cultivars for Diyarbakır province and 7 standard wheat cultivars were used as materials. As a control bread wheat cultivars Anza and Barbaros barley cultivars were used as controls. The main aim of the study is to determine the resistance status of these genotypes and cultivars against barley yellow dwarf virus (BYDV)-PAV, BYDV-MAV and cereal yellow dwarf virus (CYDV)-RPV species that cause yellow dwarf disease, by phenotypic and genotypic analyzes. For this purpose, wheat plants that were detected as infected by these three species of BYDV were used as inoculum source and the viruses were transferred to wheat genotypes and varieties whose resistance status was investigated with *Rhopalosiphum padi* and *Sitobion avenae*, which is known as the vector of this disease. While the mean BYDV infection rates of 300 wheat plants inoculated by aphids by DAS-ELISA were 52,6.0% for BYDV-PAV, 47.0% for BYDV-MAV, and 9.3% for CYDV-RPV. The infection rates were detected as 66.0% for BYDV-PAV, 56.3% for BYDV-MAV and 47.3% for CYDV-RPV by RT-PCR. As a result of PCR analyzes using SSR, SCAR and RAPD markers to determine the presence of Bdv2 and Bdv3 genes associated with resistance to yellow dwarf viruses in genotypic analyzes to confirm phenotypic observations, the amplification associated with the Bdv2 gene in 16 genotypes and the Bdv3 gene in 20 genotypes were obtained only by using SSR markers. When the phenotypic responses of 16 genotypes that were genotypically resistant to both SSR markers were evaluated, it was determined that all these genotypes were susceptible in different level to BYDVs. In the light of these data, bread wheat genotypes were found to be more resistant/tolerant than durum wheat genotypes. Among durum wheat genotypes, only Hevidi/Akbuğday was determined to be resistant/tolerant and for future breeding studies, this local variety should be used as well as bread wheat genotypes. recommended.

2022, 90 pages

Key Words: Wheat, barley yellow dwarf virus, BYDV-PAV-MAV, CYDV-RPV, resistance

TEŞEKKÜR

Mesleki ve akademik hayatımda önemli kararlar almam gerektiğinde sürekli yanımda olan ve varlığı ile benim için önemli bir rol model oluşturan, gerek doktora tez konumunun belirlenmesinde gerek araştırılması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmalarına ışık tutan ve yardımını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez konusunun belirlenmesi ve çalışmaların takibinde profesyonel yaklaşımları ve öngörülleri ile doktora çalışmalarımı zenginleştiren ve yardımlarını esirgemeyen Tez İzleme Komitesi üyeleri Prof. Dr. Mona GAZEL'e ve Doç. Dr. Eminur ELÇİ'ye, tez çalışmalarım sırasında tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi (HMKÜ) Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Başkanlığı ile Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü bünyesinde faaliyetlerine devam eden ve bu projeyi (Proje Numarası: TAGEM/BSAD/A/20/A2/P1/1542) finansal olarak destekleyen GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım süresince, sera çalışmalarımda yardımını benden esirgemeyen Ziraat Yüksek Mühendisi Mehmet BARIŞ'a, izolat temininde yardımcı olan Dr. Hakan HEKİMHAN'a, yaprak biti teşhisini yapan Doç. Dr. Asime Filiz ÇALIŞKAN KEÇE'ye laboratuvar çalışmalarımda yapmış oldukları katkı ve yardımları nedeniyle Dr. Bahar TUNÇ, Ziraat Yüksek Mühendisi Kıvılcım ÖRDEK'e ve filogenetik analizlerinde bana yardımcı olan Ziraat Yüksek Mühendisi Mehtap ACIOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen, güvenen ve daima yanımda olan canım aileme sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	X
1. GİRİŞ	1
3. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	9
3.1.Arpa sarı cücelik virüslerinin (barley yellow dwarf virus, BYDV) genel özellikleri	9
3.1.1. <i>Luteoviridae</i> familyası.....	9
3.1.2. BYDV'nin taşınması	11
3.1.3. BYDV'lerin kontrolü	12
3.1.4. BYDV/ CYDV'nin farklı ülkelerde yaygınlığının belirlenme çalışmaları ..	13
3.1.5. Arpa sarı cücelik hastalığı ile ilgili ülkemizde yapılan çalışmalar.....	15
4. MATERYAL ve YÖNTEM.....	20
4.1.Materyal.....	20
4.2.Yöntem	22
4.2.1. BYDV/CYDV türlerinin serolojik ve moleküler yöntemlerle tespit çalışmaları	22
4.2.1.1. Bitki Örneklerinin Toplanması	22
4.2.1.2. Serolojik Çalışmalar	22
4.2.1.3. Moleküler Çalışmalar	23
4.2.1.3.1. RT-PCR Analizleri	23
4.2.2. Farklı buğday genotip ve çeşitlerinin BYDV ve CYDV'ye karşı dayanıklılık durumunun tespiti	29
4.2.2.1. Genotipik Karakterizasyon	29
4.2.2.2. Fenotipik Karakterizasyon.....	30
4.2.2.2.1. Genotiplerin kontrollü koşullarda yetiştirilmesi ve BYDV/CYDV'nin inokulasyonu	30
4.2.2.2.2. Afidlerle inokulasyon	31
4.2.2.2.3. Simptomolojik gözlemler ve moleküler teşhis.....	31
5. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	32
5.1.Ön Çalışmalar	32
5.2.Buğday genotiplerinin saksılarda yetiştirilmesi	38
5.3.Barley yellow dwarf virüsleri için izolat temini.....	39
5.4.Afidlerle inokulasyon	41
5.5.Simptomolojik gözlemler	41
5.6.Serolojik ve Moleküler çalışmalar.....	44
5.6.1. DAS-ELISA	44
5.6.2. Moleküler Çalışmalar	45
5.7.Sekans analizleri ve filogenetik ağaç	60
5.8.Buğday genotiplerinin BYDV'ye karşı dayanıklılık çalışmaları	71

6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	75
KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ	87
EKLER.....	88



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünya buğday üretimi ve önemli üretici ülkeler (milyon ton)	2
Çizelge 1.2. Buğdayda BYDV/CYDV dayanıklılık genlerinin belirlenmesinde kullanılan markör tipleri, genler, DNA primer isimleri (Choudhury ve ark., 2017).....	7
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan buğday genotiplerinin pedigrisi ve orijini	21
Çizelge 3.2. Sarı cücelik virüslerinin RT-PCR yöntemiyle tespit edilmesinde kullanılan primer dizileri ve beklenen fragment uzunlukları ile PCR koşulları	27
Çizelge 3.3. Buğday genotiplerinde BYDV'ye dayanıklılık genleri için kullanılan markörler ve primer dizileri	30
Çizelge 4.1. Ön çalışma için kullanılan genotipler	32
Çizelge 4.2. Saksı denemeleri ve Diyarbakır ili buğday tarlalarından toplanan buğday ve arpa örneklerinin listesi	36
Çizelge 4.3. Sera koşullarında BYDV'ye dayanıklılık için testlenen 30 genotip ve tekerrürlerinin fenolojik olarak değerlendirilmesi ve üç farklı virüse karşı DAS-ELISA ve RT-PCR analizleriyle testlenme sonuçları.....	46
Çizelge 4.4. Saksı denemelerindeki buğday örneklerinden yapılan RT-PCR ve DAS-ELISA analizleri sonucunda saptanan virüsler ve enfeksiyon oranları.....	57
Çizelge 4.5. BYDV-PAV izolatlarının filogenetik analizinde kullanılan ve Gen bankasında kayıtlı farklı konukçulardan izole edilmiş olan BYDV-PAV izolatlarına ait ulaşım numarası, konukçu, ülke ve genom büyüklüğü	65
Çizelge 4.6. Gen bankasında kayıtlı bulunan ve farklı konukçulardan izole edilmiş olan BYDV-MAV kılıf protein genine ait ulaşım numarası, konukçu, ülke ve genom büyüklüğü	68
Çizelge 4.7. Gen bankasında kayıtlı bulunan ve farklı konukçulardan izole edilmiş olan CYDV-RPV kılıf protein genine ait ulaşım numarası, konukçu, ülke ve genom büyüklüğü	69
Çizelge 4.8. Buğday genotiplerinin SSR markörleri kullanılarak BYDV'ye karşı dayanıklılık açısından taranması	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Luteoviridae</i> familyasından olan <i>Luteovirus</i> , <i>Polerovirus</i> ve <i>Enamovirus</i> cinslerine ait genom organizasyonu (Sathess, 2015).	11
Şekil 3.1. Ekstraksiyon aşamasından bir görüntü	26
Şekil 4.1. Buğday ve arpa tohumlarının viyollere ekimi ve bitki çıkışlarının gözlenmesi	33
Şekil 4.2. Viyollerde gelişen bitkilerin saksılara şaşırtılması ve sulama işlemlerinden görüntüler	33
Şekil 4.3. En solda Eskişehir ilinden gönderilen ve sarı cücelik virüs hastalığının belirtilerine sahip bitkiler, orta ve sağdaki sırada ise denemede kullanılan buğday genotiplerinden genel görünüş	34
Şekil 4.4. Arpa sarı cücelik hastalığı belirtileri gösteren buğday bitkilerinde oluşan yaprak biti popülasyonunun görüntüsü	35
Şekil 4.5. DAS-ELISA yöntemi ile barley yellow dwarf virus (BYDV)-PAV ve BYDV-MAV açısından pozitif bulunan 33 no'lu örneğin görünümü a: BYDV-PAV, b: BYDV-MAV	37
Şekil 4.6. Eskişehir ve Diyarbakır'dan toplanan buğday ve arpa örneklerinin BYDV-MAV'a spesifik primerlerle uygulanan RT-PCR analizinin agaroz jel görüntüsü. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD), W: Su kontrol +C: Pozitif kontrol.....	38
Şekil 4.7. Eskişehir ve Diyarbakır'dan toplanan buğday ve arpa örneklerinin BYDV-PAV'a spesifik primerlerle uygulanan RT-PCR analizinin agaroz jel görüntüsü. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD), W: Su kontrol +C: Pozitif kontrol.....	38
Şekil 4.8. Buğday genotiplerinin çıkış sonrası seyreltilme çalışmaları	39
Şekil 4.9. İzmir ilinden temin edilen BYDV-MAV ve BYDV-PAV ile enfekteli olduğu tespit edilerek ve inokulum kaynağı olarak kullanılan buğday bitkilerinin seralarda muhafaza edilmesi	40
Şekil 4.10. İzmir ve Eskişehir illerinde barley yellow dwarf virüs simptomlarına benzeyen belirtiler gösteren tahıl bitkileri a,b.) İzmir ili yulaf tarlası c,d.) İzmir ili buğday tarlası e.f.) Eskişehir ili arpa parselleri	40
Şekil 4.11. BYDV ile enfekteli bulunan buğday yapraklarında beslenen <i>Rhopalosiphum padi</i> ve <i>Sitobion avenae</i> bireylerinin makroskopik ve mikroskopik görüntüleri	41
Şekil 4.12. a) BYDV ile enfekteli tahıl bitkilerinde beslenen afidler kullanılarak yapılan taşıma denemelerinin simptomolojik gözlemleri b) Bazı genotiplerde görülen bayrak yaprağın kırmızılaşması c) Buğday yapraklarında klorotik lekeler d) Buğday yapraklarından gözlenen kıvrılma simptomu	43
Şekil 4.13. Dayanıklılık çalışmalarında kullanılan genotiplerin DAS-ELISA ile testlenmesi a) BYDV-PAV, b) BYDV-MAV ve c) CYDV-RPV'nin DAS-ELISA analizleri sonucu gözlenen plakalar	45
Şekil 4.14. BYDV-PAV virüsüne spesifik primerler kullanılarak uygulanan RT-PCR analizinin agaroz jel görüntüsü. Deneyel taşıma denemelerinde kullanılan buğday örnekleri. Genotip numarası parantez içinde verilmiştir. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD), 148 (11), 152 (12), 164 (13), 169, 170, 173, 174, 175, 177, 178, (14), 180, 181, 182, 184, 185, 186, 187, 188, (15), 189, 190 (16), W: Su kontrol ve +C: Pozitif kontrol.....	58

Şekil 4.15. BYDV-MAV virüsüne spesifik primerler kullanılarak uygulanan RT-PCR analizinin agaroz jel görüntüsü. Deneysel taşıma denemelerinde kullanılan buğday örnekleri. Genotip numarası parantez içinde verilmiştir. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD), 148 (11), 152 (12), 164 (13), 169, 170, 173, 174, 175, 177, 178, (14), 180, 181, 182, 184, 185, 186, 187, 188, (15), 189, 190 (16), W: Su kontrol ve +C: Pozitif kontrol.....	59
Şekil 4.16. CYDV-RPV virüsüne spesifik primerler kullanılarak uygulanan RT-PCR analizinin agaroz jel görüntüsü. Deneysel taşıma denemelerinde kullanılan buğday örnekleri. Genotip numarası parantez içinde verilmiştir. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD), 87, 88 (5), 89, 91, 92, 93, 95, 96, 97 (6), 99, 100, 101, 103, 104, 105, 107, 108 (7), 109, 110, 112 (8), W: Su kontrol ve +C: Pozitif kontrol	59
Şekil 4.17. Elde edilen BYDV-PAV izolatlarının nükleotid çoklu karşılaştırmaları	60
Şekil 4.18. Elde edilen 342 nolu BYDV-PAV izolatının nükleotid BLAST analiz sonucu.....	61
Şekil 4.19. Elde edilen 253 nolu BYDV-PAV izolatının nükleotid BLAST analiz sonucu.....	61
Şekil 4.20. Elde edilen 33 nolu BYDV-PAV izolatının nükleotid BLAST analiz sonucu	62
Şekil 4.21. Barley yellow dwarf virüs–PAV (BYDV-PAV)’ın kısmi kılıf protein gen bölgesi için spesifik Lu 1/Lu 4 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda elde edilen izolatlar ve Gen Bankasına kayıtlı BYDV-PAV izolatlarla çizilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde MEGA 11 yazılımında yer alan Neighbor joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendogramda 1000 bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir. Filogenetik ağaçta Potato leafroll virus (PLRV) out group olarak kullanılmıştır.....	63
Şekil 4.22. Barley yellow dwarf virüs–PAV (BYDV-PAV)’ın kısmi kılıf protein gen bölgesi için spesifik Lu 1/Lu 4 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda elde edilen izolatlarla çizilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde MEGA 11 yazılımında yer alan Neighbor joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendogramda 1000 bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir	64
Şekil 4.23. Barley yellow dwarf virüs–MAV (BYDV-MAV)’ın kısmi kılıf protein gen bölgesi için spesifik MAVL1/MAVR1 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda elde edilen izolatlar ve Gen Bankasına kayıtlı BYDV-MAV izolatlarla çizilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde MEGA 11 yazılımında yer alan Neighbor joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendogramda 1000 bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir. Filogenetik ağaçta Potato leafroll virus (PLRV) out group olarak kullanılmıştır	66
Şekil 4.24. Barley yellow dwarf virüs–MAV (BYDV-MAV)’ın kısmi kılıf protein gen bölgesi için spesifik MAVL1/MAVR1 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda elde edilen izolatlarla çizilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde MEGA 11 yazılımında yer alan Neighbor joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendogramda 1000 bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir	67

- Şekil 4.25. Cereal yellow dwarf virüs–RPV (CYDV-RPV)’nin kısmı kılıf protein gen bölgesi için spesifik RPV L/RPV R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda elde edilen izolatlar ve Gen Bankasına kayıtlı CYDV-RPV izolatlarla çizilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde MEGA 11 yazılımında yer alan Neighbor joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendogramda 1000 bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir. Filogenetik ağaçta Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) dış grup olarak kullanılmıştır..... 70
- Şekil 4.26. BYDV/CYDV virüsü için SSR markörü SSR xgwm37 kullanılarak yapılan PCR analizinin agaroz jel elektroforez sonucu. Saksılarda toplanan buğday örnekleri, M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD), (6): 89, 90, 94, 96 (19) :220, 228 (24): 275, 277, W: Su kontrol, +C Pozitif kontrol (birincisi Anza, ikincisi 6 no’lu genotip)..... 73
- Şekil 4.27. BYDV/CYDV virüsü için SSR markörü SSRBdv3 kullanılarak yapılan PCR analizinin agaroz jel elektroforez sonucu. Saksılarda toplanan buğday örnekleri, M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD), (6): 89, 90, 94, 96 (19) :220, 228 (24): 275, 277, W: Su kontrol, +C Pozitif kontrol (birincisi Anza, ikincisi 6 no’lu genotip)..... 74

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

bp	: base pair
°C	: Derece Celsius
dk	: Dakika
g	: gram
µg	: mikrogram
mg	: miligram
kg	: kilogram
ml	: mililitre
µl	: Mikrolitre
kDa	: Kilo dalton
M	: Molar
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
pmol	: Pikomol
rpm	: Revolutions per minute (dakikadaki dönme sayısı)
V	: Volt
%	: Yüzde

KISALTMALAR

AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ASC	: Arpa Sarı Cücelik
ASCH	: Arpa Sarı Cücelik Hastalık
BMV	: Brome mosaic bromovirus
BSMV	: Barley stripe mosaic virus
BYDV	: Barley yellow dwarf luteoviruses
BYDV-GAV	: Barley yellow dwarf virus-GAV
BYDV-GPV	: Barley yellow dwarf virus-GPV
BYDV-MAV	: Barley yellow dwarf virus-MAV
BYDV-PAV	: Barley yellow dwarf virus-PAV
BYDV-RMV	: Barley yellow dwarf virus-RMV
BYDV-SGV	: Barley yellow dwarf virus-SGV
BYSMV	: Barley yellow streak mosaic virus
BWYV	: Beet western yellow virus
cDNA	: Komplementer Deoksiribo Nükleik asit
CIMMYT	: International Maize And Wheat Improvement Center

CoMV	: Cocksfoot Mottle Virus
CP	: Coat protein (Kılıf protein)
CYDV-RPS	: Cereal yellow dwarf virus-RPS
CYDV-RPV	: Cereal yellow dwarf polerovirus-RPV
DAS-ELISA	: Double Antibody Sandwich –ELISA
DATAEM	: Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
dATP	: Deoksiadenozintrifosfat
d ₂ H ₂ O	: Su
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
dNTP	: Deoksinüklotidtrifosfat
DYB	: Diyarbakır
EDTA	: Ethylenediaminetetraaceticacid
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	: Etanol
GAP UTAEM	: GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi
HCl	: Hidroklorik Asit
HTS	: High throughout sequencing
ICTV	: International Committee on Taxonomy of Viruses
IgG	: Immunogamma Globulin
KH ₂ PO ₄	: Potasyum di Hidrojen Fosfat
ME	: Mercaptoethanol
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MMV	: Maize mosaic virus
MYDV	: Maize Yellow Dwarf Virus
MDMV	: Maize Dwarf Mosaic Virus
MP	: Hareket proteini (Movement protein)
NaI	: Sodyum iyodür
NaOAc	: Sodyum asetat
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
ORF	: Açık okuma çerçevesi (Open reading frame)
PCR	: Polymerase chain reaction
PLRV	: Potato leafroll virus
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	: Ribo Nükleik Asit
RNAse	: Ribo Nükleaz enzim
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
RT	: Reverse Transcriptase
RT-PCR	: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
SBWMV	: Soilborne Wheat Mosaic Virus
SCAR	: Sequence Characterized Amplified Region
SCMV	: Sugarcane Mosaic Virus
SCV	: Sarı Cücelik Virüsü

SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SSR	: Simple Sequence Repeats
TAE	: Tris Asetat EDTA
Taq DNA	: Termo stabil DNA polimeraz enzimi
TNA	: Total Nükleik Asit
TTAE	: Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
UV	: Ultraviyole
WDV	: Wheat Dwarf virus
WSMV	: Wheat Streak Mosaic Virus
WYDV	: Wheat Yellow Dwarf Virus
YDV	: Yellow Dwarf Virus
YND	: Yeni Nesil Dizileme
ZYMV	: Zucchini Yellow Mosaic Virus

1. GİRİŞ

Buğday bitkisinin kültüre alınması günümüzden yaklaşık 12 bin sene öncesine dayanması yanında yetiştiriciliği, hasadı ve depolanmasındaki kolaylıkları ile insan doğasına uygun bir gıda olması gibi özellikleri ile, dünya genelinde önemli ve stratejik bir ürün haline gelmiştir (Kılıç ve ark., 2021). İnsanlar için gereksinim duyulan günlük kalorinin %19'u ve proteinin %21'i temin edildiği buğdayın (Braun ve ark., 2010; Tadesse ve ark., 2019) dünyada üretimi 774 milyon ton olup bunun yaklaşık %95'ini ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) geri kalan %5'ini ise durum buğday (*Triticum durum* Desf.) oluşturmaktadır (Anonim, 2020).

Tahıl cinslerinin tümü, Poaceae familyasına dâhil olup, bu familyada aralarında buğday, mısır, pirinç, arpa, yulaf, çeltik, çavdar ve darı bitkisinin de yer aldığı yaklaşık 400 cins ve 4500 türü kapsayan önemli bitkiler yer almaktadır. Serin iklim tahıllarından olan buğday bitkisinin hem insan hem de hayvan beslenmesinde kullanılması, her türlü iklim ve toprak şartlarında yetişebilmesi gibi üstün özellikleri nedeniyle dünyanın çoğu ülkesinde tarımı yapılan yapılmaktadır (Kün,1996; İlbağı, 2003).

Dünya buğday üretim miktarı incelendiğinde en yüksek üretimin AB ülkeleri tarafından yapıldığı ve Çin, Hindistan, Rusya, ABD, Kanada, Avustralya, Ukrayna, Pakistan ve Türkiye'nin takip eden ülkeler olduğu görülecektir (Çizelge 1.1), (Anonymous, 2021).

Çizelge 1.1. Dünya buğday üretimi ve önemli üretici ülkeler (milyon ton)

Ülkeler	YILLAR						
	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
Çin	128.3	132.6	133.3	134.3	131.4	133.6	134.3
AB	156.1	159.6	144.2	151.4	137.7	154.9	124.5
Hindistan	95.9	86.5	86.0	98.5	99.7	103.6	107.9
Rusya	59.1	61.0	72.5	85.1	71.7	73.6	85.4
ABD	55.1	56.1	62.8	47.4	51.3	52.6	49.7
Kanada	29.4	27.6	32.1	30.0	32.2	32.3	35.2
Avustralya	23.7	22.3	31.8	21.2	17.3	15.2	33.3
Ukrayna	24.7	27.3	26.8	27.0	25.1	29.2	25.5
Pakistan	26.0	25.5	25.6	26.6	25.5	24.4	25.2
Türkiye	19.0	22.6	20.6	21.5	20.0	19.0	20.5
Arjantin	13.9	11.3	18.4	18.5	19.5	19.8	17.6
Kazakistan	13.0	13.7	15.0	14.8	13.9	11.5	14.3
Diğerleri	87.8	92.9	87.9	86.7	86.9	92.3	100.9
Toplam	732.0	739.0	757.0	763.0	732.2	762.0	774.3

Buğday, ülkemiz başta olmak üzere dünyadaki diğer ülkelerde insan beslenmesi için en temel besinlerin (unlu mamuller, bulgur, makarna vb.) ana maddesi olmasından dolayı diğer tarım ürünlerine göre daha önemli bir konumda yer almaktadır. Son zamanlarda, Covid-19 salgını nedeniyle makarna gibi dayanıklı ürünlere talebin artması doğal olarak buğdaya olan talebi de artırmıştır (Polat, 2021).

Türkiye ekonomisi için de büyük önem taşıyan buğday ülkemizde hem ekmek hem de bulgur, makarna ve bisküvi sanayisi açısından temel hammadde olması bakımından vazgeçilmez tarım ürünlerimizden birisidir. Ülkemizde yıllık ortalama 19 milyon ton üretim olmasına rağmen bazı yıllarda iç talebi bile karşılayamadığımızdan dolayı ithalat yapılmaktadır (Şahin ve ark., 2016).

Buğday üretiminde son yıllarda belirli bir artış görülmesine rağmen hızla artan dünya nüfusuna karşın azalan tarım alanları, birim alandan yüksek verimi zorunlu kılmaktadır. Bunun yanında çevre şartları ve daha dirençli hastalıkların oluşması ise verimi etkileyen en önemli nedenler arasındadır. Fungal ve bakteriyel hastalıklardan farklı olarak, bitkilerde hastalık etmeni virüslerin uygulamada etkili bir kimyasal mücadele ile kontrolü günümüzde mümkün değildir. Virüs etmenlerinin yayılması ve sağlıklı bitkilere bulaşmasını önlemek amacı ile virüslerden arı üretim materyallerinin kullanılması gibi klasik uygulamalar ise her zaman virüs hastalıkları ile mücadelede yeterli olamamaktadır.

Hastalık epidemisinin görüldüğü yıllarda hassas çeşitlerde verim kayıplarının yanında kalite özellikleri de kötü yönde etkilendiği için bu yıllarda hastalıkla mücadelede tolerant çeşit kullanımı ön plana çıkmaktadır (Başaran ve ark., 2020). Viral etmenlerle en etkili mücadele yöntemi dayanıklı bitki türleri veya varyetelerinin geliştirilmesi ve kullanılmasıdır (Sökmen, 2005). Dayanıklı bitki türlerinin ve varyetelerinin geliştirilmesi, buğday virüslerinin güvenilir şekilde tanılanması, hastalık mekanizmalarının bilinmesi ve moleküler genom özelliklerinin en iyi bir şekilde ortaya konmasını gerektirmektedir. Viral etmenlerle mücadelede dayanıklı çeşitlerin, virüs vektörlerine karşı da etkili olması için viral hastalıkların epidemiyolojisinin iyi bilinmesi son derece önemlidir (Erkan, 2008).

Dünyada buğdayın yaygın bir şekilde yetiştirilmesi ve çok sayıda çeşitleri bulunmasından dolayı birçok virüs hastalığına maruz kalmaktadır. Buğdaygillerde virüsler oldukça dinamik ve değişken bir yapı gösterirler. Dünyada ekonomik anlamda en önemli tahıl hastalıklarından birisi de arpa sarı cücelik hastalığıdır (ASCH) (D'arcy, 1995; Svanella-Dumas ve ark., 2013). Tahıllarda bu hastalığa neden olan etmenin “barley yellow dwarf virus (BYDV)” olarak adlandırılması ilk kez 1953 yılında Oswald ve Houston tarafından yapılmış olup izleyen yıllarda ise Bill Rochow adlı araştırmacı virüslerin taşınmasında rol oynayan afid türlerine göre 5 farklı serotipe ayırmış ve günümüzde bu virüsler farklı türler olarak gruplandırılmıştır. Her bir türün etkin vektörü parantez içinde verilmiştir: Cereal yellow dwarf virus (CYDV)-RPV (*Rhopalosiphum padi*), BYDV-MAV (*Macrosiphum avenae*, bu tür daha sonra *Sitobion avenae* olarak adlandırılmıştır), BYDV-PAV (*R. padi* and *S. avenae*), BYDV-SGV (*Schizaphis graminum*) ve maize yellow dwarf virus (MYDV)-RMV (*Rhopalosiphum maidis*) (Rochow ve Muller, 1969 ve 1971). İlerleyen yıllarda diğer vektör türleri de tespit edilerek bu gruba dâhil edilen virüs türü sayısı artmıştır. Bu türler, BYDV-GAV (*S. graminum* ve *S. avenae*), wheat yellow dwarf virus (WYDV)-GPV (*S. graminum* and *R. padi*), CYDV-RPV'nin daha şiddetli simptom oluşturan farklı bir varyantı olan CYDV-RPS (*R. padi*), BYDV-PAV'a benzeyen ve Kuzey Amerika'da tespit edilen BYDV-PAS (*R. padi*, *S. avenae*) olarak bildirilmiştir. Bu çalışmaların ışığı altında BYDV taksonomisi ilk kez 1990'lı yıllarda yapılmış olup 2021 yılında ise önemli değişiklikler önerilmiştir (Miller ve Lozier, 2022).

Bu gruba giren 5 serotip BYDV olarak adlandırılmakla birlikte bu türlere ait viral genomların sekans analizlerinin elde edilmesiyle bu sınıflandırma geçerliliğini

kaybetmiştir. BYDV-PAV ve BYDV-MAV yakın akraba türler olmakla birlikte CYDV-RPV ve MYDV-RMV'nin BYDV-PAV'dan daha çok potato leafroll virus (PLRV) ve beet western yellows virus (BWYV)'e benzediği bildirilmiştir (Kruger ve ark., 2013). Böylece bu virüsler yeniden adlandırılarak PLRV ve BWYV ile birlikte Polerovirüs cinsine dahil edilirken (Delfosse ve ark., 2021) BYDV-PAV ve BYDV-MAV ve diğer konukçularla ilişkili virüsler Luteovirus cinsi içerisine yerleştirilmiştir (D'Arcy ve ark., 2000). Yüksek kapasiteli dizilemenin (High throughput sequencing-HTS) yaygın kullanımı ile birlikte BYDV grubuna yeni üyeler de dâhil edilerek taksonimide bazı değişiklikler olmuştur. ICTV 2021 yılında *Polerovirus* and *Luteovirus* cinsini yeniden düzenlemiş ve *Luteoviridae* familyası iptal edilmiştir (ICTV, 2021). Son düzenlemeye göre *Luteovirus* cinsi *Tombusviridae* familyasına, *Polerovirus* ve *Enamovirus* cinsi ise *Solemoviridae* familyasına dâhil edilmiştir.

Arpa sarı cücelik virüsü (barley yellow dwarf virus) (BYDV), buğdayın ekonomik olarak en önemli hastalık etmenlerinden birisi olup çok geniş alanlarda etkili olmaktadır. BYDV %5-80 arasında değişen verim kayıplarına yol açmaktadır (Perry ve ark., 2000). Arpa sarı cücelik hastalığı son 20 yılda tahmin edilen yaklaşık %1'lik bir ortalama verim kaybı ile yılda 10 milyon dolardan fazla bir kayba eşdeğer önemli derecede verim azalmalarına yol açarak buğdayın en önemli dördüncü hastalığı durumunda olduğu bildirilmiştir (Hollandbeck ve ark. 2019).

Çeşitli ülkelerde buğday virüsleri ile yapılan çalışmalarda bu virüslerin farklı oranlarda ürün kayıplarına yol açtığı belirtilmektedir. Buğdayın önemli bir virüsü olan ve yaprak bitleri ile taşınan BYDV'nin farklı ırkları çevresel faktörlere bağlı olarak buğdayda çok ciddi zararlar oluşturabilmektedir (Pike,1990; Lister ve Ranieri, 1995).

Diğer hastalıklarda olduğu gibi buğday virüs hastalıklarının mücadelesinde başvurulacak en önemli yöntemlerden birisi de dayanıklı bitki yetiştirilmesi ve kullanılmasıdır. Dayanıklılık ve tolerans farklı genetik mekanizmalar olup dayanıklılık durumunda virüs replikasyonunun durdurulması, tolerans durumunda ise hastalık belirtilerinin en aza indirilmesi hedeflenmektedir. Genetik dayanıklılık içeren ıslah stratejilerinde doğrudan virüsler ya da virüs vektörü olan afidler hedeflenmektedir. Bugüne kadar yürütülen ıslah çalışmalarında bitkilerin BYDV ile enfekte olma durumlarında dahi virüs yoğunluğundan bağımsız olarak semptomların azaltılabilmesi ve verim alınabilmesini tanımlayan "tarla dayanıklılığı" oluşması için viral toleransın

sağlanmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır (Foresman ve ark., 2016). Kantitatif dayanıklılık sınıfında yer alan tarla dayanıklılığı çoklu genle idare edilmektedir ancak bazı genlerin dayanıklılıkta çok az etkisi olduğu bildirilmiştir (Cisar ve ark., 1982; Ayala ve ark., 2002; Choudhur ve ark., 2019). Günümüzde ekmeklik buğdaylarda immunité ya da kuvvetli dayanıklılıktan sorumlu birincil gen henüz tanımlanmamış olup tam anlamıyla dayanıklı çeşit elde edilemediğinden ıslahçılar buğdayın yabani akrabalarında dayanıklılık geni araştırmışlardır (Brettell ve ark., 1988). Bugüne kadar buğdaylarda arpa sarı cücelik hastalığına karşı dayanıklılıkta 4 gen tespit edilmiştir ve bunlardan sadece 7DS kromozomu üzerinde bulunan *Bdv1* geni buğdayın birincil havuzundan tanımlanan tek dayanıklı genidir ve orijinal olarak "Anza" çeşidi buğdayda tanımlanmıştır. (Singh ve ark., 1993), Anza buğday çeşidinin bu virüs hastalığına karşı kısmi dayanıklılık gösterdiği ve *Bdv1* olarak adlandırılan bir dominant genin Brezilya kökenli bir buğday çeşidi olan "Frontana" orijinli olduğu ve BYDV-MAV türüne karşı tolerant olduğu bildirilmiştir (Van Ginkel ve Henry, 2002). *Bdv1* geni arazi koşullarında BYDV-MAV türüne karşı tolerantlık sağlamakla birlikte bütün BYDV türlerine karşı veya bütün çevresel koşullarda dayanıklılık göstermemektedir (Zhang ve ark., 2009). BYDV'ye ikinci dayanıklılık geni, buğdayın yabani akrabalarından *Thinopyrum intermedium*'da 2. ve 7. grup kromozomlar üzerinde saptanmış (Xin ve ark., 1988; Sharma ve ark., 1995, Larkin ve ark., 1995) ve bu gen *Bdv2* olarak adlandırılmıştır (McIntosh ve ark., 2001). İlerleyen yıllarda yine 7. grup kromozomlar üzerinde yeni bir dayanıklılık lokusu tanımlanmış ve *Bdv3* olarak adlandırılmıştır (Ohm ve Anderson, 2007). Bu dayanıklılık geninin saptandığı P29 kodlu buğday hattı CYDV-RPV'ye tamamen, hem de BYDV-PAV ve BYDV-MAV'a karşı ise orta derecede dayanıklı olarak tespit edilmiştir. CYDV-RPV açısından dayanıklılık durumu analiz edildiğinde virüsün P29 nolu buğday hattının mezofil protoplastında çoğalabildiğini ve bu dayanıklılığın tek bir hücre düzeyinde yürütülmediğini göstermiştir (Anderson ve ark., 1998). CYDV dayanıklılığını kodlayan *Bdv3* geninin CYDV'nin iletim demetlerine hareketini engelleme şeklinde ortaya çıktığı bildirilmiştir (Ohm ve Anderson, 2007). P29'un yaprak ve gövde dokularında BYDV-PAV konsantrasyonu önemli ölçüde azalırken virüs köklerde saptanabilmiş ancak tarla koşullarında BYDV-PAV'a karşı dayanıklılık gösterdiği gözlenmiştir. BYDV'ye karşı diğer bir dayanıklılık geni ise *Thinopyrum intermedium* bitkisinde saptanmış olup 2. Grup kromozom üzerinde tespit edilmiş ve *Bdv4* olarak adlandırılmıştır (Lin ve ark., 2007;

Zhang ve ark., 2009). Bugüne kadar yapılan bu çalışmaların ışığı altında buğdaylarda sarı cücelik hastalığına dayanıklı az sayıda gen bulunduğunu söylemek mümkündür. Dayanıklılıktan sorumlu ana genin bulunmayışı ve dayanıklılığın çoklu genler tarafından sağlanması nedeniyle buğday havuzunda dayanıklı genotipleri tanımlamanın oldukça zor olduğu bildirilmiştir (Silva ve ark., 2022). Bununla birlikte, ıslah programları, bu hastalığın ekonomik önemi nedeniyle sarı cücelik hastalığına karşı direnç geliştirmek için büyük çaba sarf etmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde buğday genotiplerinde BYDV/CYDV'ye dayanıklılık genlerini tespit etmek için farklı markör geliştirildiği görülmektedir (Çizelge 1.2).



Çizelge 1.2. Buğdayda BYDV/CYDV dayanıklılık genlerinin belirlenmesinde kullanılan markör tipleri, genler, DNA primer isimleri (Choudhury ve ark., 2017)

Markör Tipleri	Genler	DNA Primer İsimleri	Kaynaklar
Mikrosatellit, RFLP	Bdv1	WMS130,psr 80,psr687,ipr129,csIH81, Acc2	Zhang ve ark., 1999 Banks ve ark., 1995
RAPD	Bdv1	OPAO7, OPR19940, OPD041300	Banks ve ark., 1996 Zhang ve ark., 2002
RFLP	Bdv2	psr548, ksuD2, fbb189, ksuA1, psr129, cdo949,cd611,bcd102a, cdo1164bfba91a,ccdo126a,z395bcd506, cdo388a, wg546a, kabaGfbb70bksuD17, wg69a- wg818	Ayala ve ark., 2001 Banks ve ark., 1995 Ayala ve ark., 2002
RAPD	Bdv2	OPAD2-800 OPR19940, OPD04130	Jahier ve ark., 2009 Zhan ve ark., 2002
SSR	Bdv2	Xgwm37	Ayala ve ark., 2001
SCAR	Bdv2	SC-W37, AD2,SC-D04, SC-gp1 SC-A07566 BYAgi, BDF5	Zhang ve ark., 2002, Zhang ve ark., 2004, Stotjesdijk ve ark., 2001, Kausar ve ark., 2015
RAPD	Bdv3	ORR16340,OPH091580, OPC0150	Xin ve ark., 2002
SSR	Bdv3	SSR-Bdv3	Kong ve ark., 2009
RAPD	Bdv4	OPO05650, OPM04140	Zhang ve ark., 2001
SCAR	Bdv4	Sc-R16	Zhang ve ark., 2009

Klasik melezleme ıslahı üstün genotiplerin fenotipik açıdan seçilmesi yoluyla olmaktadır ancak genotip ve çevre etkileşimi zaman gerektirmekte olup zor bir süreçtir. Bunun ötesinde fenotipik seleksiyonun pahalı olmasının yanı sıra abiyotik stres koşullarına tolerans gibi karakterler açısından daha fazla zamana gereksinim gösterir. Markörler yoluyla seleksiyon bu güçlükleri yenmek için alternatif bir yöntem olarak geliştirilmiştir (Francia ve ark., 2005). Buğday da üstün özelliklere sahip genotiplerin

moleküler markörler yardımıyla, birkaç virüs tarafından oluşturulan ve ekonomik anlamda verim kaybına yol açan sarı cücelik virüs hastalığına karşı taranması gelecekte yapılacak olan ıslah çalışmaları için temel oluşturacaktır.

Bu çalışma, ülkemizin önemli buğday yetiştiriciliği yapılan bölgelerinden BYDV izolatları temin edilerek DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleriyle testlenmesiyle elde edilen virüs izolatlarının sekans analizleri yapılarak filogenetik analizlerinin gerçekleştirilmesi ve tespit edilen sarı cücelik virüs türlerine karşı önemli buğday genotiplerinin genotipik ve fenotipik dayanıklılık durumlarının araştırılması amaçlanmıştır. BYDV/CYDV'ye dayanıklılık çalışmalarında PCR temelli; SSR, RFLP ve SCAR markör sistemleri kullanılarak ülkemize ait ekmeklik buğday genotiplerinin taranmasında uygun markörlerin kullanım olanakları fenotipik analizlerle desteklenerek araştırılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Tahıllar içerisinde virüslere duyarlılık açısından ilk sırada yer alan buğday bitkisinin (*Triticum aestivum* L.) 55 virüs etmeni bildirilmiştir. (Brunt ve ark., 1996). Doğal olarak buğdayı enfekte eden yaklaşık 30 civarında virüs tanımlanmıştır (Wiese, 1987). Buğday üretim alanlarında en yaygın olarak görülen virüs etmenleri ise; barley yellow dwarf virus (BYDV), soilborne wheat mosaic virus (SBWMV) ve wheat yellow mosaic virus (WYMV)'leridir. Bunların dışında cereal yellow dwarf virus (CYDV-RPV), brome mosaic virus (BMV), wheat dwarf virus (WDV), barley stripe mosaic virus (BSMV) ve wheat streak mosaic virus (WSMV)'da buğdayda yaygın görülen virüs türleri arasında yer almaktadır (Hofmann ve Kolb, 1998; Duveiller ve ark., 2007; Gaunce ve Bockus, 2015).

Buğdayda enfeksiyona neden olan viral hastalık etmenleri; bitkilerin yapraklarında beneklenme, çizgi mozaik ve sararma şeklinde klorozun yanı sıra nekroz, cücelik ve rozetleşme belirtilerine neden olmaktadır. Özellikle yaprak renginde değişikliğe neden olan bazı belirtiler beslenme ve abiyotik etmenlerin oluşturduğu belirtiler ile karıştırılabilmektedir. Bundan başka, aynı bitkide enfeksiyona neden olan birçok virüsün bulunma durumuna da sıklıkla rastlanmaktadır (Irwin ve Thresh, 1990).

2.1. Arpa sarı cücelik virüslerinin (barley yellow dwarf virus, BYDV) genel özellikleri

1900'lü yılların ortalarında Oswald ve Houston (1951) tarafından tanımlanan barley yellow dwarf (arpa sarı cücelik) hastalığı ile ilişkili olan virüsler, pozitif anlamlı tek sarmal RNA içeren 24-25 nm çapında ikozahedral yapıda partiküle sahip, *Luteoviridae* familyasının *Luteovirus* cinsi içinde yer alan türlerdir. Bu virüsler elektron mikroskobu kullanılarak incelendiğinde parankima ile enfekteli kalbur hücrelerinde, çekirdek ve stoplazmada görülebilmektedirler (Wiese, 1987).

2.1.1. *Luteoviridae* familyası

Luteoviridae familyası, biyolojik nitelikleri, genom organizasyonu ve serolojik özellikleri ile ayırt edilen üç cinsi kapsamaktadır. Bunlar; *Luteovirus*, *Polerovirus* ve *Enamovirus*'dür. *Polerovirus* cinsi içinde 15 tür, *Luteovirus*'de 7 tür ve *Enamovirus*'de

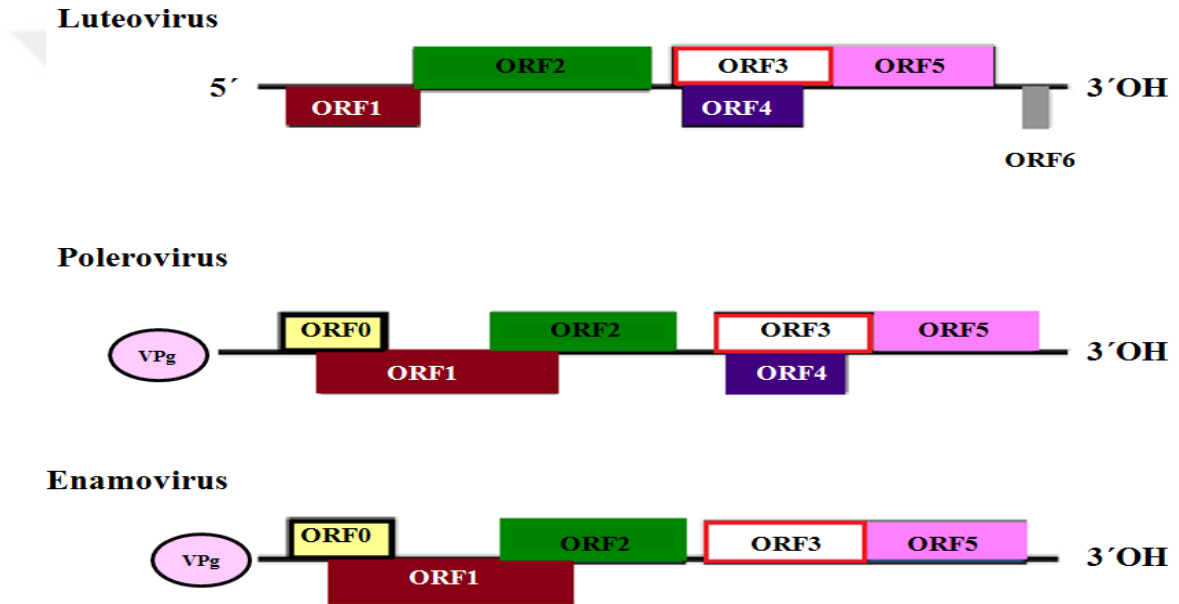
ise 1 tür bulunmaktadır. Kalan üyeler ise henüz sınıflandırılmamıştır (Domier, 2012; Sathees, 2015). Bununla birlikte son yıllarda yapılan taksonomi çalışmalarında *Luteoviridae* familyası kaldırılarak *Luteovirüs* cinsi *Tombusviridae* familyasına, *Polerovirus* ve *Enamovirus* cinsleri ise *Solemoviridae* familyasına dâhil edilmiştir (Miller ve Lozier, 2022).

Bu gruptaki virüslerin çoğu küresel tarımda ciddi patojenler olarak kabul edilmektedir. Luteovirüsler kendileri ile bağlantılı ve bağlantısız virüslerle karışık enfeksiyonlar oluşturabilmektedir. Bu karışık enfeksiyonlar ciddi hastalık salgınlarına neden olmaktadır (Liu ve ark., 2001; Hauser ve ark., 2000).

İlk çalışmalarda vektör yaprak biti türlerine özgü olarak ırk düzeyinde tanımlanan bu virüsler, günümüzde tür düzeyinde isimlendirilerek sınıflandırılmışlardır (Domier, 2012). Bu virüslerin tüm genom sekansları karşılaştırılmış ve bu virüslere ortak olarak “Yellow dwarf viruses (YDVs)” adı verilerek gruplandırılmışlardır (Kruger ve ark., 2013). Buna göre Luteovirus cinsi içerisinde, BYDV-GAV, BYDVMAV, BYDV-PAV, BYDV-PAS, BYDV-SGV olmak üzere beş tür yer almıştır. Tahıllarda sarı cücelik hastalığına sebep olan cereal yellow dwarf virus RPV (CYDV-RPV) ve cereal yellow dwarf virus RPS (CYDV-RPS), iki yeni tür olarak *Polerovirus* cinsi içerisine yerleştirilmiştir. Bunlardan CYDV-RPV, eskiden BYDV-RPV olarak isimlendirilen bir türdür. Yine eskiden BYDV-GPV olarak adlandırılan virüsün, sadece buğdayda sarı cücelik hastalığına neden olduğu saptandıktan sonra yeni tür adı wheat yellow dwarf virus-GPV (WYDV-GPV) olarak değiştirilmiştir. Ayrıca eskiden BYDV-RMV olarak bilinen virüsün yeni adı maize yellow dwarf virus-RMV (MYDV-RMV) olarak önerilmiştir (Kruger ve ark., 2013). Böylelikle, genom analiz sonuçlarına göre, gerek WYDV-GPV gerekse MYDV-RMV; CYDV-RPV ve CYDV-RPS ile birlikte *Polerovirus* cinsinde yer almıştır (Kruger ve ark., 2013).

Eski *Luteoviridae* familyasındaki virüsler de dâhil olmak üzere çok sayıda virüs genomunun ayrıntılı genom yapısı ve nükleotit sekansları, yeni nesil dizileme (YND) gibi moleküler tekniklerin gelişmesiyle daha detaylı olarak ortaya çıkarılmış ve virüs taksonomisinde önemli değişiklikler olmuştur. *Luteoviridae* familyasının üç cinsi, genom yapısı ve nükleotit dizilimi ile açıkça ayırt edilebilmektedir. Bu üç cinsinde genom yapısında 4 kDa ile 132 kDa arasında değişen protein kodlama bölgeleri olan open reading frame (ORF) alanları bulunmaktadır (Şekil 2.1). Open reading frame

bölgelerinden ORF-1, ORF2, ORF-3 ve ORF-5 tüm cinslerde korunmuştur. *Luteovirüs* cinsinde bulunmayan ORF-0 bölgesinin simptom başlatıcı, konukçu aralığı belirleme ve bitkilerin dayanıklılık mekanizmasından olan gen susturucu özelliğini baskılayan görevler üstlendiği bildirilmiştir. ORF-1 ve ORF-2 bölgelerinin ise replikasyonlarda ve protein üretim sürecinde etkili oldukları bilinmektedir. ORF-3 bölgesi virüsün kılıf protein bölgesini kodlarken ORF-5'in virüsün yaprak bitleriyle taşınmasından önemli rol aldığı tespit edilmiştir. Enamovirüs cinsinde bulunmayan ORF-4'ün diğer cinslerde virüsün uzak alanlara yayılımı için gerekli olduğu anlaşılmıştır (Chay ve ark., 1996; Ziegler-Graff ve ark., 1996; Mangwende ve ark., 2009; Peter ve ark., 2009).



Şekil 2.1. *Luteoviridae* familyasından olan *Luteovirus*, *Polerovirus* ve *Enamovirus* cinslerine ait genom organizasyonu (Sathess, 2015).

2.1.2. BYDV'nin taşınması

BYDV virüsleri mekanik yolla, polenle, toprakla, temasla ve tohumla taşınmaz. Bu virüsler sadece yaşayan canlı bitki dokusunda varlıklarını sürdürebilmektedir. Bundan dolayı toprakta veya anızda yaşayamazlar sadece yaprak bitleri tarafından taşınabilmektedir. BYDV'lerin, en az 25 farklı yaprak biti tarafından bitkiden bitkiye taşındıkları tespit edilmiştir. Taşıyıcı vektörlerin gömlek değiştirmesinden sonra virüs vektör içerisinde canlı kalabilmektedir fakat virüsün bir dahaki nesli olan yumurtaya

geçmesi mümkün değildir. BYDV'nin 5 türü (BYDV-PAV, BYDV-MAV, BYDV-SGV, BYDV-RMV ve CYDV-RPV) en çok 5 farklı yaprak bitinde tanımlanmışlardır. Bunlardan PAV türü *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) ve *Sitobion avenae*, MAV türü *Macrosiphum (Sitobion) avenae*, SGV türü *Schizaphis graminum* ve daha az yoğunlukta *Macrosiphum (Sitobion) avena*, RMV türü *Rhopalosiphum maidis* ve daha az yoğunlukta *Rhopalosiphum padi*, *Macrosiphum (Sitobion) avenae* ve *Acrosternum hilare*, RPV ise *Rhopalosiphum padi* ve daha az yoğunlukta *Rhopalosiphum maidis*, *Acrosternum hilare*, yaprak biti vektörleri ile taşınmaktadır (Miller ve Rasochová, 1997; Moon ve ark., 2000; Deligöz ve ark., 2011; Siddiqui ve ark., 2011; Çapkan, 2015).

BYDV'nin taşınması persistent (sirkülatif) şeklinde olmaktadır. Virüs vektör bünyesinde 2-3 hafta canlı kalabilmektedir. Virüsün taşınması bir sonraki nesile geçmez. Virüs alındıktan sonra 1 günden az süren latent bir periyod görülmektedir. Ancak virüsün alınması ve iletilmesi 1-2 dakikadan az olduğu için taşınım kolayca gerçekleşmektedir (Deligöz ve ark., 2011; Çapkan, 2015).

BYDV'nin hastalık oluşturmada çevresel faktörler oldukça önemlidir. Bu faktörler arasında nispi sıcaklıklar, enfekteli bitkilerin yaprağındaki renk değişiminin yaprak biti tarafından cezbedici olması ve yüksek ışık yoğunluğu bulunmaktadır. Tarladaki birincil enfeksiyon vektörün virüslü bitkiler ile beslenmesi, ikincil enfeksiyonlar ise virüsü içine alan yaprak bitlerinin virüsü diğer bitkilere bulaştırmasıyla ortaya çıkmaktadır. Ortamın nemli olması yaprak bitlerinin göç etmesinde ve çoğalmasında önemli bir rol oynamaktadır. Bunların dışında rüzgarın etkisiyle de vektörler kilometrelerce uzaklara sürüklenebilmektedirler (Miller ve Rasochova, 1997; Fabrea ve ark., 2003; Makkouk ve Kumari, 2009).

2.1.3. BYDV'lerin kontrolü

BYDV'lerin kontrolünde yabancı ot ve vektörlerin kontrolü, ekim zamanının ayarlanması ve dayanıklı bitki çeşitlerinin kullanılması gibi kültürel yöntemler önemlidir. BYDV ve vektörlerine konukçuluk yapan buğday ve diğer bitkilerin üst üste ekiminden kaçınılmalıdır. Ayrıca diğer hastalıklarda olduğu gibi BYDV ile mücadelede en iyi yöntem virüslere dayanıklı bitki çeşitlerinin yetiştirilmesidir. (Farrell ve Stufkens, 1990; Karaozan, 2019).

2.1.4. BYDV/ CYDV'nin farklı ülkelerde yaygınlığının belirlenme çalışmaları

Osler ve ark. (1984) İtalya'da tahıl üretim alanlarında görülen BYDV'nin çeltikte de enfeksiyonlara yol açtığını belirtmişlerdir. Bazı durumlarda %100'e varan oranda verim kaybına neden olabilen bu virüsün *Rhopalosiphum padi*, *Sitobion avenae* ve *Metopolophium dirhodum* yaprak biti türleri ile taşındığını bildirmişlerdir.

Guy ve ark. (1986) Avustralya'nın Tasmanya adasında farklı alanlardan beş ayrı çayır çim bitkisi *Dactylis glomerata*, *Festuca arundinacea*, *Lolium perenne*, *Phalaris aquatica* ve *Phleum pratense*'den topladıkları toplam 1048 adet bitki örneğinde BYDV'lerin varlığını serolojik testlerle ve vektör yaprak biti türlerinin kullanıldığı taşınma denemeleri ile araştırmışlardır. Yapılan bu çalışmada 140 bitkinin PAV ile enfekteli olduğu saptanırken sadece bir bitkinin RPV ile enfekteli olduğu bir bitkinin ise PAV ve RPV ile karışık enfeksiyon halinde bulunduğu tespit edilmiştir. *Festuca arundinacea* ve *Lolium perenne* yabancı ot türleri vektöre özgü iki BYDV türü ile enfekteli bulunmuş ancak diğer bitki türlerinde virüs saptanamamıştır.

Conti ve ark. (1990) yürüttükleri bir çalışmada arpa sarı cücelik virüs (BYDV) hastalığının dünya genelinde yaygın bir virüs olduğunu, birçok tahıl ve çayır otlarını enfekte ettiğini ve bitkilerde; sarılık, kızarıklık, yapraklarda kıvrılma, cücelik ve başak ile danelerde azalmaya neden olan floem kaynaklı bir patojen olduğunu bildirmişlerdir. Serolojik bulgulara dayalı olarak BYDV izolatlarının diğer Luteovirüs'lerle ilişkili olduğunu belirlemişlerdir.

1987 ve 1988 yılları arasında yürütülen bir çalışmada Güney-Batı İngiltere'nin beş bölgesinden mera ve çayır otu türlerinden toplanan 14 örnekte yaprak biti ile bulaşan arpa sarı cücelik virüslerinin (BYDV-RPV, BYDV-PAV ve BYDV-MAV benzeri izolatlar) dağılımını ve etkisini ELISA ile belirlemeye çalışmışlardır. BYDV'lerin epidemiyolojisi ve kontrolü için bazı bulgular elde edilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre BYDV izolatlarının geniş alanda yaygın olduğu, RPV'nin daha çok güney bölgelerde MAV'ın ise daha çok kuzey bölgelerde görüldüğü ve PAV'ın ise yalnızca en güney bölgelerde yaygın olduğu tespit edilmiştir. Çıkan bu sonucun her iki yılda da tutarlı olduğu bildirilmiştir (Kendall ve ark., 1996).

El-Muadhidi ve ark. (2001), 2000 yılında Irak'ın farklı bölgelerinde (Bağdat, Al-Anbar, Diyala, At-Tamim ve Ninava) baklagil ve tahıl ürünlerini etkileyen virüs hastalıklarını tanımlamak amacıyla yaptıkları çalışmada, toplamda 7663 baklagil ve 3455 tahıl örneği toplamıştır. Baklagil ve tahıl örneklerini serolojik bir yöntem olan TBIA'yı kullanarak 12 tane baklagil ve 5 tane tahıl virüsü için test etmişlerdir. Araştırmada kullanılan tahıllarda cereal yellow dwarf virüs RPV (CYDV-RPV) ve barley yellow dwarf virus-MAV (BYDV-MAV)'a nadiren rastlanılmıştır. Araziden toplanan tesadüfi tahıl örneklerinin yaklaşık %1'inde barley yellow dwarf virus-PAV (BYDV-PAV) saptanmıştır. Tahıl arazilerinde virüslerin oluşturduğu zararın yapılan test sonuçlarına bağlı olarak %5 olarak tespit edilmiştir.

Delmiglio ve ark. (2010) Yeni Zelanda'nın 29°-6° güney enlemler arasındaki bölgede gerçekleştirdikleri çalışmada, 15 doğal ve 3 egzotik çim türünden topladıkları bitkileri ELISA yöntemi ile testleyerek sarı cücelik virüsleri ve cocksfoot mottle virus (CoMV)'nin varlığını araştırmışlardır. CoMV'nin doğal konukçuları olarak *Dactylis* ve *Triticum* türleri ile *Poa anceps*, *Poa cita*, *Festuca novae-zelandiae* ve *Chinochloa rubra* yabancı ot türleri tespit edilmiştir. BYDV-PAV'ın yeni konukçuları olarak *Microlaena stipoides* ve *Dichelachne crinita*, BYDV-MAV'ın konukçularının *Poa cita*, *Festuca novae-zelandiae*, *Hierochloe redolens* olduğu CYDV-RPV'nin konukçularının ise *Poa cita*, *Microlaena stipoides* bildirilmiştir.

Áy ve ark. (2008) tarafından, 2006-2007 yılları arasında yapılan bir çalışmada, 12 adet kışlık buğday çeşidi kullanılmış ve iki farklı tarihte (11 Ekim ve 3 Kasım 2006) ekim yapılmıştır. Buğday bitkilerindeki virüslerin teşhis edilmesinde RT-PCR ve ELISA yöntemleri kullanılmıştır. Test sonucunda, yaprak biti ile taşınan BYDV-PAV sıklıkla bulunurken, diğer virüslerin bulunmadığı bildirilmiştir. ELISA ile test edilen buğday bitkilerinin %46'sı BYDV-PAV ile enfekteli bulunurken RT-PCR yöntemiyle testlenen buğday örneklerini %58'inin pozitif olduğu belirlenmiştir.

Siddiqui ve ark. (2012), Pakistan'ın farklı bölgelerinden izole edilen BYDV'nin kılıf protein geninin klonlama ve filogenetik analizi üzerine yaptıkları çalışmada, farklı buğday üretim alanlarında sarı cücelik virüsü belirtisi gösteren buğday örneklerinde BYDV-PAV, BYDV-SGV, BYDV-MAV, CYDV-RPV, BYDV-GPV ve BYDV-RPV'nin varlığının belirlenmesi amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Testlenen 37 örneğin 13 tanesinin BYDV virüslerinden en az birisi ile enfekteli olduğu ve onların da 10

tanisinin BYDV-PAV, 3 tanesinin ise BYDV-MAV ile enfekte olduğunu saptamışlardır. Virüslerin dizi analizlerine göre 3 izolatın (Nowshera, Fatehjang ve Attock) BYDV-PAS ile maksimum benzerlik oranı %92.8-94.6 olarak bulunurken 6 izolatın (Peshawar, Faisalabad ve Islamabad Swabi) BYDV-PAV ile %99.3- 99.7 oranında benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. Sonuç olarak, Pakistan'ın kuzeyinde buğday yetiştirilen alanlarda BYDV-PAV türlerinin daha yoğun olduğunu tespit etmişlerdir.

Parizoto ve ark. (2013), Brezilya'da BYDV-PAV'nin mevsimsel yayılımı ve biyolojik özellikleri üzerine yaptıkları çalışmada, BYDV-MAV, CYDV-RPV ve BYDV-PAV'ın mevsimsel yayılımlarının kış aylarında buğday ve yulaf, yaz aylarında ise mısır üretim alanlarında tespit edildiğini rapor etmişlerdir. Virüs yoğunluğunun bitkilerde ve yaprak bitlerinde benzer oranlarda olduğunu, kış üretim sezonunda ise bu oranın zirveye ulaştığı bildirilmiştir.

2.1.5. Arpa sarı cücelik hastalığı ile ilgili ülkemizde yapılan çalışmalar

Dünya'daki çalışmalara paralel olarak Türkiye'de tahıl virüs hastalıkları ile ilgili çalışmalar Bremer tarafından 1971 yılında başlamıştır. 1975 yılına kadar yapılan çalışmalarla diğer tahıl virüsleri yanında Batı Anadolu'da BYDV'nin varlığı da Bremer ve Raatikainen (1975) tarafından bildirilmiştir. Bu çalışmaları takiben Yurdakul ve ark. (1987) tarafından İç Anadolu'da Ankara, Eskişehir ve Konya illerindeki buğday üretim alanlarında görülen sarılık ve cücelik hastalıklarının yaprak bitleri ile taşınan barley yellow dwarf virus (BYDV)'den kaynaklanabileceği simptomatolojik ve biyolojik testlerle belirlenmiş ancak kesin tanı için serolojik testlerin yapılması önerilmiştir.

Deligöz ve ark. (2011) tarafından 2006 ve 2007 yıllarında Samsun ve Amasya illerinde BYDV-PAV ve BYDV-MAV virüslerinin yaygınlığını belirlemek amacıyla Samsun ilinden 116 adet buğday örneği, Amasya ilinden ise 100 adet buğday örneği toplanmıştır. Bu çalışma için toplanan buğday örnekleri DAS-ELISA yöntemiyle BYDV-MAV ve BYDV-PAV virüslerine spesifik antiserumlarla test edilmişlerdir. Araştırma sonucunda Samsun ilinde 10 örnekte (%8.6) BYDV-PAV, 6 örnekte (%5.1) BYDV-MAV ve iki örnekte (%1.7) ise BYDV-PAV+MAV'dan oluşan karışık enfeksiyon belirlenirken, Amasya ilinde; 4 örnekte (%4) BYDV-PAV, 1 örnekte (%1) BYDV-MAV

ve 4 örnekte (%4) ise BYDV-PAV+MAV'dan oluşan karışık enfeksiyon olduğunu bildirmişlerdir.

2010-2011 üretim sezonunda Tekirdağ Merkez İlçe'nin 3 lokasyonunda 2 ekim tarihi, 3 tekerrür ve 8 kışlık ekmeklik buğday çeşidi ile Tesadüf bloklarında bölünmüş parseller deneme desenine göre tarla denemeleri kurulmuştur. Bu parsellerden toplam 336 yaprak örneği toplanmıştır. Toplanan örnekler DAS-ELISA yöntemi ile testlenmiştir. Testler sonucunda %80,17 oranında BYDV-PAV, %4,83 oranında wheat dwarf virus (WDV) ve %6,61 oranında CYDV-RPV türleri bulunmuştur. Bunların karışık enfeksiyon oranları %8,39 olarak tespit edilmiş olup BYDV-MAV ve diğer türlere rastlanılmamıştır (Hamamcı, 2012).

Tekirdağ ilinde 2011-2012 üretim sezonunda 8 farklı kışlık ekmeklik buğday çeşitinde tahıl virüs hastalıklarının kalite üzerine etkilerinin araştırdığı bir çalışmada üç farklı bölgede tarla denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu bölgelerde 200 adet buğday yaprak örneği toplanmıştır. Örnekler 8 ayrı tahıl virüsü için DAS-ELISA testine tabii tutulmuş olup 200 adet yaprak örneğinin 60 adedinde BYDV-MAV, BYDV-PAV, CYDV-RPV, WDV, BrMV ve WSMV'lerin varlığı tespit edilmiştir. Buğday yaprak örneklerinin hiçbirinde sugarcane mosaic virus (SCMV) ve maize dwarf mosaic virus (MDMV) saptanmamıştır. Buna ek olarak toplanmış olan 200 adet örnek 9 ayrı kalite analiz testleriyle incelenmiştir. Testler sonucunda özellikle dane yapısının tahıl virüs hastalıklarından doğrudan etkilendiği bildirilmiştir (Dayan, 2013).

2012 yılında Doğu Anadolu Bölgesi Van, Bitlis, Iğdır, Kars, Ağrı, Muş, Erzincan, Elazığ ve Malatya illerinden 900 adet buğday yaprak ve 78 toprak örneği alınarak survey çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada örneklerin 50 tanesinde BYDV-PAV (%5.5) 44 örnekte BYDV-SGV (%4.8) 4 örnekte CYDV-RPV (%0.4) ve 8 örnekte ise WSMV (%0.8) saptanmıştır. Testlenen buğday örneklerinde SBWMV ve incelenen toprak örneklerinde *Polymyxa graminis* vektörü tespit edilmemiştir. Bu çalışma ile BYDV-PAV, BYDV-SGV, CYDV-RPV ve WSMV virüsleri Doğu Anadolu Bölgesi'ndeki buğday alanlarında ilk defa rapor edilmiştir (Usta, 2013).

2016 yılı tahıl üretim alanlarında sarı cücelik hastalıklarının (ASCH) epidemisi ve mücadelesinin araştırıldığı bir çalışmada, Edirne ili başta olmak üzere Tekirdağ ve Kırklareli illerindeki tahıl tarlalarında sarılık, cücelik ve kızarıklık belirtilerinin görüldüğü arpa, yulaf ve kışlık buğday üretim alanlarından 10 adet yulaf, 138 adet buğday

ve 19 adet arpa örneği ile ASCH'nın konukçusu olan çok yıllık *Poaceae* familyasına ait yabancı ot türü ile karnı (Phragmites australis (Cav.) Trin ex.Steudel) bitkilerinden 20 adet olmak üzere toplam 187 adet yaprak örneği toplanmıştır. Toplanan bu örnekler BYDV-MAV, CYDV-RPV ve BYDV-PAV için DAS-ELISA yöntemiyle testlenmiştir. Enfekteli olduklarından şüphelenilen bazı bitki örnekleri ise RT-PCR testi ile doğrulanmıştır. Bu testler sonucunda 187 adet yaprak örneğinin 30'unda (%16.04), CYDV-RPV, 89'unda (%47.59) BYDV-PAV, 4'ünde (%2.14) BYDV-MAV ve 14 tanesinde (%7.48) YDVs (BYDV-PAV, BYDV-MAV ve CYDV-RPV)'nin karışık enfeksiyonları saptanmıştır (İlbağı, 2017).

Diyarbakır ili buğday alanlarında Arpa sarı cücelik virüslerini (BYDV-PAV, MAV, SGV, RMV ve CYDV-RPV) belirlemek amacı ile 2016 yılında survey yapılmıştır. Belirlenen virüslerin karakterizasyonu için multipleks RT-PCR ve RT-PCR yöntemleri kullanılmıştır. Testlenen 365 buğday örneğinden 13'ünün BYDV-PAV (%3.5), 9'unun BYDV-SGV (%2.4), 5'inin CYDV-RPV (%1.3) ile bulaşık oldukları tespit edilmiştir. Bu çalışma ile BYDV-PAV, BYDV-SGV, CYDV-RPV virüsleri Diyarbakır ilindeki buğday alanlarında ilk defa rapor edilmiştir (Hassan, 2018).

Mardin ili ve ilçelerinde buğday üretim alanlarında Arpa sarı cücelik virüslerinin (BYDV-PAV, BYDV-MAV, BYDV-SGV, BYDV-RMV ve CYDV-RPV) varlığını belirlemek amacı ile 2017 yılında survey çalışmaları yapılmıştır. Yapılan survey çalışmasında toplam 400 örnek toplanmıştır. Bu örneklerde virüs tespiti için multipleks RT-PCR ve RT-PCR yöntemleri kullanılmıştır. Testlenen 400 örneğin 10'nunda BYDV-PAV (%2.5), 7'sinde BYDV-SGV (%1.75), 2'sinde CYDV-RPV (%0.5) ve 1'inde BYDV-RMV (%0.25) bulunmuştur. Pozitif izolatların 7'sinde BYDV-PAV+BYDV-SGV (%1.75) ve 1'inde BYDV-PAV+CYDV-RPV (%0.25) karışık enfeksiyon saptanmıştır. Testlenen örneklerin hiçbirinde BYDV-MAV tespit edilememiştir. Yapılan bu araştırmada Mardin ilinde BYDV-PAV, BYDV-SGV, BYDV-RMV ve CYDV-RPV virüsleri ilk defa tespit edilmiştir (Karaozan, 2019).

2016 yılında yapılan bir çalışmada Afyonkarahisar ve Isparta illerindeki buğday üretim alanlarında BYDV-PAV ve BYDV-MAV'nin tanınması amacıyla virüs belirtisi gösteren 94 adet bitki örneği toplamıştır. Toplanan bu örnekler DAS-ELISA testlenmiş ve 94 örneğin 2 adedinde %2.1 oranında BYDV-MAV ve 68 adedinde ise %72.3 oranında

BYDV-PAV enfeksiyonları belirlenmiştir. Bu çalışmada sadece 4 adet örnekte %4.2 oranında karışık enfeksiyon bulunmuştur (Kılıç ve ark., 2019).

Trakya bölgesinde Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ illerindeki tahıl üretim alanlarında 2010-2012 yıllarını kapsayan üç yıllık bir çalışmada sarı cücelik virüslerinin epidemiyolojisi ve olası yabancı ot konukçu türlerini belirlemek amacıyla tek ve çok yıllık bitkilerden toplam 808 yabancı ot örneği toplanmıştır. Toplanan bu örnekler BYDV-PAV, BYDV-MAV, BYDV-SGV, BYDV-RMV ve CYDV-RPV'nin varlığını belirlemek amacıyla serolojik ve moleküler yöntemlerle testlenmiştir. Buna göre, 808 yabancı ot örneğinden 535 adedinin sarı cücelik virüsleri ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Enfeksiyon oranları ise %23.8 BYDV-PAV, %10.4 BYDV-MAV, %6.8 CYDV-RPV, %1.1 BYDV-SGV ve %0.7 BYDV-RMV olarak tespit edilmiştir. %23.3 oranında da karışık enfeksiyon belirlenmiştir. Buna ek olarak bölgede sarı cücelik virüslerinin vektörü olan 7 farklı yaprak biti türünün belirlendiği bildirilmiştir (İlbağı ve ark., 2021).

Ege Bölgesi'nde Uşak, Kütahya, Manisa, Denizli, Aydın ve İzmir illerinin üçer ilçesinde üç farklı tarladan kışlık buğday üretim alanlarından 2018 yılında arpa sarı cücelik hastalığı belirtisi gösteren toplamda 135 yaprak örneği toplanmıştır. Toplanan 135 örnekten %6'sının BYDV-PAV ve %3'ünün BYDV-MAV ile bulaşık olduğu RT-PCR ile tespit edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca ülkemizin farklı bölgelerinde yetiştirilen 88 adet buğday genotipinde SCAR markörleri kullanılarak BYDV ile ilişkili Bdv2 dayanıklılık geninin varlığının tespitinin belirlenmesi ve Bdv2 dayanıklılık geni içerdiği saptanan buğday genotiplerinin BYDV-PAV ve BYDV-MAV'a reaksiyonlarının sera ve tarla koşullarında değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Testlenen buğday genotiplerinden sadece birinin iki SCAR markörü ile ilişkili Bdv2 genini içerdiği ve diğer genotiplerin ise Bdv2 genini içermediği tespit edilmiştir. Sera ve tarla koşullarında yapılan reaksiyon denemelerinde Bdv2 geni taşıyan genotipin BYDV-PAV ve BYDV-MAV'a reaksiyonları 0-5 skalasına göre değerlendirildiğinde 0-3 skala değerleri arasında sonuç verdiği gözlemlenmiş olup Bdv2 geni taşıyan genotipin orta derecede dayanıklı/toleranslı olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (Yorgancı, 2021).

Şırnak ili ve ilçelerinde buğday üretim alanlarında 2020 yılında arpa sarı cücelik virüslerini (BYDV-PAV, BYDV-MAV, BYDV-SGV, BYDV-RMV ve CYDV-RPV) belirlemek amacı ile survey çalışmaları yapılmıştır. Yapılan survey çalışmasında 411

örnek toplanmış olup virüs tespiti için multipleks RT-PCR ve RT-PCR yöntemleri kullanılmıştır. Testlenen örneklerin 55 tanesi pozitif (%13.38) bulunmuştur. Bu örneklerin 40'ında BYDV-PAV (%9.73), 3'ünde CYDV-RPV (%0.73) virüsleri tespit edilirken 12'sinde BYDV-PAV+CYDV-RPV (%2.91) karışık infeksiyonları tespit edilmiştir. Testlenen örneklerde BYDV-MAV, BYDV-SGV ve BYDV-RMV virüsleri saptanamamıştır. Yapılan bu çalışmada, BYDV-PAV ve CYDV-RPV virüsleri Şırnak ilinde ilk defa tespit edilmiştir (Kapan, 2022).



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışma 2019-2021 yılları arasında, GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü serası ve Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji laboratuvarında yürütülmüştür.

Araştırmada kullanılan materyallerin ilk 10 tanesi ileri kademede ekmeklik buğday, 11,12 ve 13 no'lu genotipler ileri kademede makarnalık buğday, 14, 15, 16, 17, 18 ve 19 no'lu genotipler yerel makarnalık buğday, 20, 21, 22 ve 23 no'lu genotipler yerel ekmeklik buğday, 24, 25, 26, 27 ve 28 no'lu genotipler ekmeklik buğday çeşidi, 29 ve 30 no'lu genotipler makarnalık buğday çeşididir (Çizelge 3.1). Belirlenen buğdaylardan 10'ar adet tohum seçilmiştir. BYDV/CYDV'ye dayanıklı olduğu bilinen Anza ekmeklik buğday çeşidi ve hassas çeşit olarak ise Barbaros arpa çeşidi kontrol olarak kullanılmıştır. Fenotipik analizlerde deneysel taşıma denemeleri için BYDV belirtileri gözlenen buğday tarlalarından afidli bitkiler toplanmış ve Çukurova Üniversitesi öğretim üyesi Doç. Dr. Asime Filiz ÇALIŞKAN KEÇE tarafından *Rhopalosiphum padi* L.ve *Sitobion avenae* olarak teşhis edilen afidler materyal olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan buğday genotiplerinin pedigrisi ve orijini

Genot ip	Çeşit ve Pedigri	İslahçı Kuruluş, Menşei veya tedarik edildiği yer
No		
1	BAV92//IRENA/KAUZ/3/HUITES/4/2*ROLF07 CMSS06Y00875T-099 TOPM-099Y-099ZTM-099Y-099M-25WGY-0B MXI11-12\MSAWYT\32	CIMMYT
2	WBLL1/FRET2//PASTOR*2/3/MURGA CMSS06Y00937T-099TOPM-099Y-099ZTM-099Y-099M-10WGY-0B MXI11-12\MSAWYT\44	CIMMYT
3	KACHU/5/NAC/THAC//3*PVN/3/MIRLO/BUC/4/2*PASTOR CMSS05B00584S-099Y-099M-099Y-099ZTM-8WGY-0B	CIMMYT
4	BECARD/KACHU CMSS06B00169S-0Y-099ZTM-099Y-099M-28WGY-0B	CIMMYT
5	KIRITATI/WBLL1//FRANCOLIN#1 CMSS07Y00174S-0B-099Y-099M-099Y-22M-0WGY	CIMMYT
6	J15418/MARAS//KAMB1*2/KUKUNA TCI061373 -0SE-0E-050YC-050YC-5YM-0E	CIMMYT
7	ALMALY*2//PRL/2*PASTOR CMWS07MI00013T -099MI-099MI-020KM-9YM-0E MX-TCI	CIMMYT
8	PYN/BAU/3/AGRI/BJY//VEE TCI02-68-0AP-0AP-49AP-0AP-2AP-05AP KIRITATI/4/2*SERI.1B*2/3/KAUZ*2/BOW//KAUZ/8/AGRI/BJY//VEE/6/S	CIMMYT
9	N64//SKE/2*ANE/3/ SX/4/BEZ/5/SERI/7/F10S-1 TCI091059 -0SE-0E	CIMMYT
10	KS82W422/SWM754308//KS831182/KS82W422/3/KS82W409/SPN/4/GRIS ET-4 TCI051146-0SE-0E-0YC-050E-4YK-0E	CIMMYT
11	TRN//D215637AA/3BD2080/4/	CIMMYT
12	CHEN/CALI//OSU-3910244/	CIMMYT
13	MRF1/STJ2//BCRCH1/4/ICAMOR-TA04-62/	CIMMYT
14	SORGÜL (Yerel makarnalık buğday)	GAPUTAEM
15	HAVRANI (Yerel makarnalık buğday)	GAPUTAEM
16	KARAKILÇIK (Yerel makarnalık buğday)	GAPUTAEM
17	HEVİDİ/AKBUĞDAY (Yerel makarnalık buğday)	GAPUTAEM
18	DEVEDİŞİ (Yerel makarnalık buğday)	GAPUTAEM
19	MENCEKİ (Yerel makarnalık buğday)	GAPUTAEM
20	DYB1 (Diyarbakır İlçe ve Köyleri)	GAPUTAEM
21	DYB2 (Diyarbakır İlçe ve Köyleri)	GAPUTAEM
22	DYB3 (Diyarbakır İlçe ve Köyleri)	GAPUTAEM
23	DYB4 (Diyarbakır İlçe ve Köyleri)	GAPUTAEM
24	DİNÇ	GAPUTAEM
25	TEKİN	GAPUTAEM
26	SÜMERLİ	GAPUTAEM
27	HASANBEY	GAPUTAEM
28	SAGITTARIO	Tasaco A.Ş.
29	PEHLİVAN	TTAE
30	CEYHAN-99	DATAEM

3.2. Yöntem

3.2.1. BYDV/CYDV türlerinin serolojik ve moleküler yöntemlerle tespit çalışmaları

3.2.1.1. Bitki Örneklerinin Toplanması

BYDV izolatlarının temini için önemli buğday alanlarından Mart-Haziran arası dönemde İç Anadolu ve Ege Bölgesinde virüs benzeri simptom (yapraklarda sararma, kızarma ve bodurlaşma v.b.) gösteren bitkilerden kademeli örnekleme metodu kullanılarak örnek alınmış ve testleninceye kadar +4°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.1.2. Serolojik Çalışmalar

Virüs ile enfekteli olduğundan şüphelenilen bitki örnekleri BYDV-PAV, BYDV-MAV ve CYDV-RPV virüslerine karşı DAS-ELISA (Double antibody sandwich- Enzyme linked immunosorbent assay) yöntemi ile testlenmesi Clark ve Adams (1977)’a göre yapılmıştır. Testlemelerde BIOREBA, ve AGDIA firmalarına ait belirteçler (IgG, konjugat, pozitif ve negatif kontroller) kullanılmıştır.

DAS-ELISA yönteminde şu aşamalar uygulanmıştır:

1. Kaplama tampon çözeltisi içinde Immunogamma globulinleri (IgG), ilgili firmanın göndermiş olduğu prosedüre göre sulandırılarak ELISA plakalarının her bir çukuruna 100 µl konulmuştur. Plakaların üzeri kapatılmak suretiyle nemli bir ortamda 37 °C’de 4 saat inkübe edilmiştir.

2. İnkubasyon süresi tamamlandığında plakalar yıkama tamponu ile üçer kez yıkanarak her yıkama sırasında 3 dakika beklenmiştir. Bu işlem bitince plakalar ters çevrilerek boşaltılmıştır ve birkaç kat kâğıt havlu üzerinde hızlıca vurularak kuruması sağlanmıştır.

3. Ekstraksiyon tamponu içerisinde ezilen bitki örnekleri plakalara her örnekten iki çukur olacak şekilde 100’er µl konulmuştur. Bu aşamada plakaların iki çukuruna ekstraksiyon tamponu pozitif ve negatif kontrollerden 100’er µl konulmuş ve plakalar nemli ortamda +4°C’de gece boyunca inkube edilmiştir.

4. İnkubasyondan sonra plakalar önce bekletilmeden iki kez arka arkaya, sonra 2. adımda açıklandığı gibi 3 kez yıkanmış ve kurutulmuştur.

5. Plakalara konjugat tamponu içerisinde sulandırılan konjugatlar her çukura 100 µL olacak şekilde konularak 37°C’de 4 saat inkube edilmiştir.

6. İnkubasyon süresi tamamlandığında plakalar tekrar 3 kez yıkanarak kurutulmuştur.

7. Substrat tamponu içerisinde 1 mg/1 ml oranında taze olarak hazırlanmış substrattan (P-Nitrophenylphosphate) her çukura 100 µl olacak şekilde konulmuş ve plakalar 15 dk oda sıcaklığında (+25°C) karanlık bir ortamda ve sonra 37°C’de enzimatik reaksiyonun gerçekleşmesi için bekletilmiştir.

Renk gelişmesine göre 30 dk, 1 saat ve 2 saat sonra plakalar optik okuyucuda 405nm dalga boyunda absorbans (A405 nm) değerleri okunmuştur. Tüm plakalar SEAC SIRIO S ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda okutulmuş ve absorbans değerleri ölçülmüştür. Okumalar sonucunda negatif kontrolün iki katı ve daha fazla olan örnekler pozitif yani virüs ile enfekteli olarak değerlendirilmiştir (Clark, 1981, Barba ve Riccioni, 1993).

3.2.1.3. Moleküler Çalışmalar

3.2.1.3.1. RT-PCR Analizleri

Nükleik asit izolasyonu

BYDV-PAV, BYDV-MAV ve CYDV/RPV tüm genom çalışmalarında RNA izolasyonu için NORGEN ve Silica ekstraksiyon yöntemleri kullanılmıştır (Şekil 3.1.). Aşağıda ekstraksiyon yöntemleri verilmiştir.

NORGEN bitki/fungus RNA izolasyon mini kiti ile total nükleik asit izolasyonu

- RNA izolasyonu için kullanılan kitin ilk aşamasında öncelikli olarak kit içerisinde bulunan Wash solution A’ya 90 ml %96 -100 etanol, 1 ml Lyzis buffer C için 10 µl BME (β-mercaptoethanol) eklenerek solusyonlar hazırlanmıştır.

- Her bir bitkiden 50 mg doku ezilerek 2 ml'lik ependorf tüplere alınmıştır. Tüplere 600 µl Lyzis buffer C eklenip kuvvetlice vortex yapılmıştır. Tüpler 55°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi boyunca tüpler 2-3 kez ters düz edilmiştir.

- Filter column (şeffaf O- ring) koleksiyon tüpüne yerleştirilip, sıvı kısmın tamamı pipetle kolona boşaltılarak 14.000 rpm'de 2 dk süreyle santrifüj edilmiş ve sıvı kısım yeni bir tüpe alınmıştır.

- Sıvı kısım üzerine eşit hacimde %96-100 ethanol eklenerek tüpler vortexlenmiştir. Spin coloum (grey O-ring) koleksiyon tüpüne yerleştirilip, ethanol-lizat karışımından 600 µl kolona boşaltılmıştır. Tüpler 6.000 rpm'de 1 dk süreyle santrifüj edilmiş ve sıvı kısım atılmıştır.

- Spin kolon yeniden koleksiyon tüpüne yerleştirilmiş. Lizat hacmine bağlı olarak bir önceki adım tekrar edilmiştir. Bu aşamada eğer gerekli görülürse DNase uygulaması yapılmıştır.

- Yeniden aynı koleksiyon tüpüne yerleştirilen spin kolonun üzerine 400 µl wash solüsyon A eklenip, 14.000 rpm'de 1 dk. süreyle santrifüj edilmiştir.

- Koleksiyon tüpü içerisindeki sıvı kısım atılmış ve bu işlem tekrar edilmiştir. 3 kez 400 µl Wash solution A eklenip, 14.000 rpm' de 1 dk santrifüj edilerek sıvı kısım atılmıştır.

- Spin kolon yeniden koleksiyon tüpüne yerleştirilip, kolonu kurutmak için 14.000 rpm'de 2 dk. santrifüj edildikten sonra koleksiyon tüp atılmıştır.

- Spin kolon 1.7 ml'lik Elution tüpün içine yerleştirilerek üzerine 50 µl elution solüsyon A eklenmiştir. Tüpler 2 dk süreyle 2.000 rpm'de santrifüj edilmesinin ardından 14.000 rpm'de 1 dk daha santrifüj edilmiştir. Eğer sıvı geçmezse tekrar santrifüj yapılmıştır.

- Ekstrakte edilen RNA -20°C'de birkaç gün veya daha uzun süre -80°C'de saklanmış ve bu RNA'lar RT-PCR analizlerinde kullanılmıştır.

Silica Yöntemiyle RNA Ekstraksiyonu (Poudel ve ark., 2013)

1. 50 mg bitki dokusu üzerine 1000 µl silica ekstraksiyon buffer ve 1 µl βMercaptoethanol eklenerek iyice karıştırıldıktan sonra solüsyon ependorf tüpe alınmıştır.

2. Santrifuj yapılmadan 600 µl sıvı fazdan çekilerek yeni ependorf tüpe aktarılmıştır. Tüpün içine 600 µl 5.8 molarlık potasyum asetat eklenmiştir. Tüpler ters-düz edildikten sonra 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.

3. Üstteki sıvı fazdan 750 µl alınıp yeni bir tüpe konulmuştur ve üzerine 750 µl % 100 isopropanol ilave edilmiştir. Tüpler 20°C'de en az yarım saat bekletilmiş daha sonra 13.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir.

4. Sıvı faz atılmış ve pellet üzerine 500 µl yıkama solüsyonu eklenmiştir. Tüpler vortexlenmiş ve pellet çözündürülmüştür. Tüplere 20 µl silica ilave edilerek 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.

5. Sıvı faz atılmıştır. Pellet 500 µl wash buffer ile yıkanmış ve çözündürülmüştür.

6. Tüpler 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek, sıvı faz atılmış ve pellet oda sıcaklığında kurutulmaya bırakılmıştır (Alkol kokusu kalmayana kadar).

7. Pelletin üzerine 150 µl TE buffer eklenerek pellet çözündürülmüş ve ardından oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir.

8. Tüpler 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. 100 µl sıvı faz alınıp alınan sıvı fazın üzerine 8 µl sodium asetat ve 200 µl % 100 ethanol eklenmiştir.

9. Tüpler 20°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Tüpler 10 dakika süreyle +4 °C'de 12.000 rpm' de santrifüj edilmiş ve ardından sıvı faz dökülmüştür.

10. Pellet üzerine 200 µl % 70'lik ethanol eklendikten sonra 20°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir.

11. Tüpler vortexlenmiş ve + 4°C'de 3 dakika 12. 000 rpm'de santrifüj edilmiş ve sıvı faz atılmıştır (bu aşama 2 defa tekrarlanmıştır).

12. Pellete dokunmadan sıvı faz atılıp pellet 20 dk oda sıcaklığında kurutulmuştur (alkol kokusu kalmayana kadar).

13. Pellet 80 µl TE buffer ile çözündürülmüştür.

14. Elde edilen RNA'ların konsatrasyonları ölçülerek moleküler analizlerde kullanmak için -80 °C'de saklanmıştır.



Şekil 3.1. Ekstraksiyon aşamasından bir görüntü

RNA’lardan cDNA sentezi

Farklı yöntemlerle izolasyonu yapılan RNA’lardan PCR analizleri için öncelikle cDNA elde edilmiştir. Bu amaçla her bir örnek için 1 μ l Random hexamer primer, 6,5 μ l d_2H_2O ve 5 μ l RNA karışımı hazırlanarak PCR tüplerine konulmuştur. Tüpler PCR cihazında 94 °C’de 5 dakika ve buzda 5 dakika bekletildikten sonra her bir tüp içine 5xRT tamponundan (Thermo fisher scientific) 4 μ l, d_2H_2O 2 μ l, dNTP (10 mM) 0,5 μ l ve RT enziminden 1 μ l eklenmiştir. Tüpler PCR cihazında 42 °C’de 1 saat 72 °C’de 10 dakika tutularak cDNA aşaması tamamlanmıştır.

RT-PCR Analizleri

BYDV-PAV ve BYDV- MAV virüsü için hazırlanan PCR karışımı; 16,8 µl d₂H₂O, 2,5 µl 10XB, 2µl dNTP (2,5 mM), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), 0.5 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl), 0,2 µl Taq-DNA polymerase olacak şekilde hazırlanmıştır. CYDV-RPV için ise RT-PCR analiz çalışmalarında Grisp High-Fidelity PCR Master Mix kullanılmıştır. PCR karışımı firma önerisine göre hazırlanmış olup, 12.5 µl Grisp High-Fidelity PCR Master Mix, 1 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl), 8,5 µl d₂H₂O ve 2 µl cDNA kullanarak yapılmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Sarı cücelik virüslerinin RT-PCR yöntemiyle tespit edilmesinde kullanılan primer dizileri ve beklenen fragment uzunlukları ile PCR koşulları

Virüs Adı	Primer adı ve dizilimi (5'-3')	Uygulanan sıcaklık aralıkları			Baz büyüklüğü (bp) ve Referans
BYDV-PAV	CCAGTGGTTRTGGTC (forward) Lu1	<u>1 döngü</u>	<u>40 döngü</u>	<u>1 döngü</u>	531 bp Robertson ve ark. 1991
	GTCTACCTATTTGG (reverse) Lu4	94 °C 2 dk	94 °C 1 dk 43 °C 1 dk 72 °C 1 dk	72 °C 10 dk	
BYDV-MAV	CAACGCTTACGCAGATGA A (forward) MAVL1	<u>1 döngü</u>	<u>40 döngü</u>	<u>1 döngü</u>	175 bp Deb ve Anderson, 2007
	AGGACTCTGCAGCACCATT CT (reverse) MAVR1	94 °C 5 dk	94 °C 1 dk 55 °C 1 dk 72 °C 1 dk	72 °C 10 dk	
CYDV-RPV	ATGTTGTACCGCTTGATCC AC (forward) RPV L	<u>1 döngü</u>	<u>40 döngü</u>	<u>1 döngü</u>	400 bp Deb ve Anderson, 2007
	GCGAACCATTGCCATTG (reverse) RPV R	94 °C 2 dk	94 °C 30 sn 60 °C 45 sn 72 °C 1 dk	72 °C 10 dk	

PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Agaroz Jel Elektroferezi

Çalışma boyunca elde edilen tüm PCR ürünlerinin görüntülenebilmesi için %1'lik agaroz jelde elektroferez işlemi yapılmıştır. 100 ml 1XTAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu içerisinde 1 gr agaroz mikrodalga fırında çözündürülmüş ve hazırlanan çözelti iyice ılıtıldıktan sonra içerisine 5 µl RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON, 20,000X) eklenip, hafifçe karıştırılarak boyanması sağlanmıştır. Düz bir zemin üzerine jel tepsisi konularak taraklar yerleştirilmiş ve hazırlanan agaroz çözeltisi dökülerek jelin katılaşması için 30 dk bekletilmiştir. Jel katılaştıktan sonra taraklar dikkatli bir şekilde çıkarılarak elektroferez tankına yerleştirilmiştir. 1XTAE tamponu tankın içerisine jeli kapatacak şekilde döküldükten sonra jel çukurlarına 2 µl yükleme tamponu ile 10 µl PCR ürünü karıştırarak jele yüklenmiştir. Jeldeki çukurlardan birine 4 µl Thermo SM0321 Generuler™ 100 bp Plus DNA Ladder yüklenmiştir. Yükleme işlemi yapıldıktan sonra elektroferez güç kaynağı ile elektroferez tankına 120 V'luk elektrik akımı yaklaşık 50 dk süreyle uygulanmıştır. Jel UV ışıktaki görüntülenip meydana gelen bantların büyüklüğüne göre sonuçlar değerlendirilmiştir. Testlenen örnekler pozitif kontrollerle karşılaştırılmış ve beklenen düzeyde bant oluşturanlar pozitif, bant oluşturmamaları ise negatif kabul edilerek jel görüntüleme cihazında fotoğraflanmıştır. Pozitif olarak kabul edilen örnekler çoğaltılarak sekans analizine gönderilmiştir.

Sekans analizleri ve flogenetik ağaç

PCR ile çoğaltılan her bir izolata ait DNA fragmentlerinin bazı dizileri tayin edilmek üzere bir ticari firmaya (Medsantek, İstanbul) gönderilmiş ve sonuçlar çevrimiçi olarak alınmıştır. Sekans analizi sonrasında Geneious programı kullanılarak sarı cücelik virüslerine (SCV) ait her iki yönde (forward ve reverse) elde edilen ham sekans verileri hizalanmış ve konsensus diziler elde edilmiştir. Her bir SCV izolatlarına ait diziler, GenBankasına (NCBI; National Center for Biotechnology Information) kayıtlı diğer SCV izolatlarına ait sekans verileri ile MEGA 11 yazılımında yer alan Kimura-2 parametre yöntemi ile genetik uzaklıklar belirlenmiş ve neighbor-joining algoritmasına göre filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Bootstrap 1000 değeri kullanılmıştır (Tamura ve ark., 2021).

3.2.2. Farklı buğday genotip ve çeşitlerinin BYDV ve CYDV'ye karşı dayanıklılık durumunun tespiti

3.2.2.1. Genotipik Karakterizasyon

BYDV türlerine karşı dayanıklılık durumu araştırılan tüm genotiplerin yapraklarından DNA izolasyonu Qiagen DNA Ekstraksiyon Kiti (DNeasy Plant Mini Kit) kullanılarak aşağıda verildiği şekilde yapılmıştır:

1. Örnekler sıvı azot ile ezildikten sonra ezilen dokudan 0.1 gr alınıp 1.5 ml'lik tüplere aktarılmıştır.
2. Tüplerin üzerine 400 µl AP1 buffer ve 4 µl RNase A eklendikten sonra karıştırıcıda karıştırılmış ve ardından tüpler 65°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon esnasında tüpler 10'ar dakika arayla 2 kez ters-düz edilmiştir.
3. İnkübasyondan sonra tüplerin üzerine 130 µl P3 buffer eklenip karıştırılmış ve buz üzerinde 5-10 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra tüpler 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
4. Karışım mor renkli kolona pipetle aktarılmış ve 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
5. Sıvı kısım çökelti hareket ettirilmeden yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 1.5 hacim AW1 buffer eklenip pipetleme yapılarak karıştırılmıştır.
6. Hazırlanmış olan beyaz renkli kolona 650 µl karışım aktarılmış ve 8000 rpm'de 2 dk santrifüj edilip sıvı kısım atılmıştır. Bu adım arta kalan örnek karışımı ile tekrar edilmiştir.
7. Yıkama aşamasında beyaz renkli spin kolonu 2 ml'lik yeni bir tüpe yerleştirilmiş ve üzerine 500 µl AW2 buffer eklenmiştir. Tüpler 8000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
8. Sıvı kısım atılmıştır, kolon üzerine tekrar 500 µl AW2 buffer eklenmiş ve 14000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir.
9. Daha sonra beyaz spin kolonu 1.5 ml'lik ependorf tüplerine transfer edilmiş ve üzerine 25 µl AE solüsyonu eklenmiştir. Oda sıcaklığında 20-30 dk bekletilerek 8000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir.
10. Daha sonra bir önceki adım tekrar edilerek izolasyon tamamlanmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile BYDV'lerine dayanıklı genlerin tespiti

Ekstrakte edilen genomik DNA, Çizelge 3.3'de verilen SSR, RFLP ve SCAR markörleri kullanılarak PCR yöntemiyle taranmıştır. Son hacim 22 µl olacak şekilde uygulanan PCR analizlerinde kullanılan PCR karışımı; 15,8 µl d₂H₂O, 2,5 µl 10XB, 0,5µl dNTP (10 mM), 2 µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl), 0,2 µl Taq-DNA polymerase 3 µl genomik DNA olacak şekilde hazırlanmıştır. Uygulanacak program 94 °C'de 4 dakika, 95 °C'de 30 saniye, 55°C de 45 saniye ve 72°C de 1 dakika 35 döngü; son olarak 72°C'de 10 dakika şeklinde olmuştur. Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde elektroforezde 1 saat yürütüldükten sonra görüntülenmiştir.

Çizelge 3.3. Buğday genotiplerinde BYDV'ye dayanıklılık genleri için kullanılan markörler ve primer dizileri

Tür	Gen	Primer	Primer Dizilimi (5'-3')	Markör tipi	Kaynaklar
Buğday	Bdv2	Xgwm37	F:ACTTCATTGTTGATCTTGCATG R:CGACGAATTCCCAGCTAAAC	SSR	Ayala ve ark., 2001
		SC-D04	F:TCTGGTGAGGCAAACCTTCTGG R:TCTGGTGAGGGAGGTGTGATGACG	SCAR	Zhang ve ark., 2002
		AD2	F:TGAACCGCTTCCAGTAATGGAC R:CTGAACCGCTTCAGCGGTTTCAG	SCAR	Jahier ve ark., 2009
		BYAgi	F:ACTTCATTGTTGATCTTGCATG R:CATGGATAATTCAGGGAGCATTCTG	SCAR	Stoutjesdijk ve ark., 2001
		SC-gp1	F:CAGGACAAGTGAAAGCACCTAAGC R:GTCCACAAGTCATATGGGGAGAC	SCAR	Zhang ve ark., 2004
		Xpsr129	F:CATGGATAATTCAGGGAGCATTCTG R:CTGAACACGAATTTGCTGAGGTTG	RFLP	Banks ve ark., 1995
Buğday	Bdv2/Bdv3	Bdv3	F:CGACGAATTCCCAGCTAACTAGACT R:CTTAACTTCATTGTTGATCTTA	SSR	Kong ve ark., 2009

3.2.2.2. Fenotipik Karakterizasyon

3.2.2.2.1. Genotiplerin kontrollü koşullarda yetiştirilmesi ve BYDV/CYDV'nin inokulasyonu

Denemede kullanılan her bir genotip ve çeşite ait tohumlar saksılara ekilmiş ve bakım işleri düzenli olarak yürütülmüştür. Pozitif ve negatif kontrol olarak BYDV'ye çok

duyarlı olarak olduğu bildirilen ve “Uçarlar Tohumculuk Firmasından” temin edilen “Barbaros” arpa çeşidi ile BYDV’ye dayanıklı olarak bildirilen “Anza” çeşidi kullanılmıştır (İlbağı ve ark., 2018). Sera çalışmaları GAPUTAEM serasında tesadüf parselleri deneme desenine göre 10 tekerrürlü olarak kurulmuş olup tüm bakım işleri düzenli olarak yürütülmüştür. Arpa sarı cücelik hastalığına neden olan virüsler mekanik olarak taşınmadığı için bu bitkilerin virüsle inokulasyonu amacıyla afidler kullanılmıştır.

3.2.2.2.2. Afidlerle inokulasyon

BYDV ile bulaşık olduğu bilinen buğday tarlalarından toplanan ve morfolojik teşhisleri Çukurova Üniversitesi öğretim üyesi Doç. Dr. Asime Filiz ÇALIŞKAN KEÇE tarafından *Rhopalosiphum padi* L.ve *Sitobion avenae* olarak teşhis edilen afid kolonileri 3-5 yaprak dönemindeki buğday bitkilerinin üzerinde ortalama 24 °C sıcaklık ve 15 saat gün ışığı koşullarına sahip seralarda 72 saat boyunca muhafaza edilmiştir. Bu sürenin sonunda tüm yaprak bitleri ilaçlanarak imha edilmiştir (Sadeghi ve ark., 2016).

3.2.2.2.3. Simptomolojik gözlemler ve moleküler teşhis

Arpa sarı cücelik hastalığının simptomolojik gözlemleri inokulasyondan 3-4 hafta sonra bitki başaklanma döneminde ve 0–5 skalası (0 - Simptom yok, 1 - Birkaç renksiz yaprak, 2 - Bitkilerde yaprakların yaklaşık %20'si, 3 - Bitkilerde yaprakların %40 4 - %60 yaprakların etkilenmesi ve 5 - Bütün bitkide sararma) kullanılarak yapılmıştır (Choudhury ve ark., 2019a). BYDV/CYDV enfeksiyonlarını sadece simptomolojik gözlemlere göre belirlemek yeterli olmadığı için inokule edilen bitkiler yukarıda anlatılan şekilde hem DAS-ELISA hem de RT-PCR analizleri ile teyit edilmiştir (Fouly ve ark., 1992; Habili ve ark., 1987).

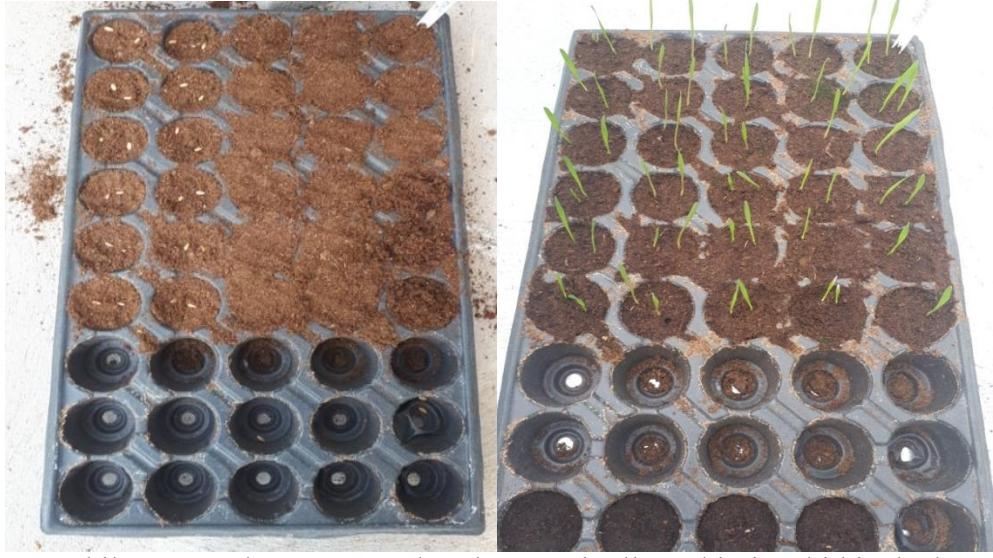
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Ön Çalışmalar

Çalışma kapsamında denemeler kurulmadan önce 2019 yılında ön çalışmalar yapılmıştır. Çizelge 3.1.'de materyal olarak kullanılan tohumlardan 10 hat/çeşit 3 tekrarlı, Barış ve Kendal arpa çeşitleri ise 2 tekrarlı olarak viyollere ekilmiş ancak Kendal çeşidinin bir tekrarında çıkış gözlenmemiştir (Çizelge 4.1), (Şekil 4.1). Bitkiler 1 hafta arayla sulanmıştır. 2019 yılı Nisan ayında viyollerde gelişen bitkiler saksılara şaşırtılıp ardından sulama yapılmıştır (Şekil 4.2).

Çizelge 4.1. Ön çalışma için kullanılan genotipler

Hat/Çeşit No	Çeşit ve Pedigri	İslahçı Kuruluş veya Menşei
1	SORGÜL	Yerel makarnalık buğday
2	DYB1	Diyarbakır İlçe ve Köyleri
3	SÜMERLİ	GAPUTAEM
4	DİNÇ	GAPUTAEM
5	KACHU/5/NAC/TH.AC//.....	CIMMYT
6	BECARD/KACHU	CIMMYT
7	CHEN/CALI//OSU-3910244/....	CIMMYT
8	MRF1/STJ2//BCRCH1/4/ICAMOR-TA04-62/...	CIMMYT
9	JI5418/MARAS...	CIMMYT
10	KS82W422/SWM7...	CIMMYT
11	BARIŞ	GAPUTAEM
12	KENDAL	GAPUTAEM



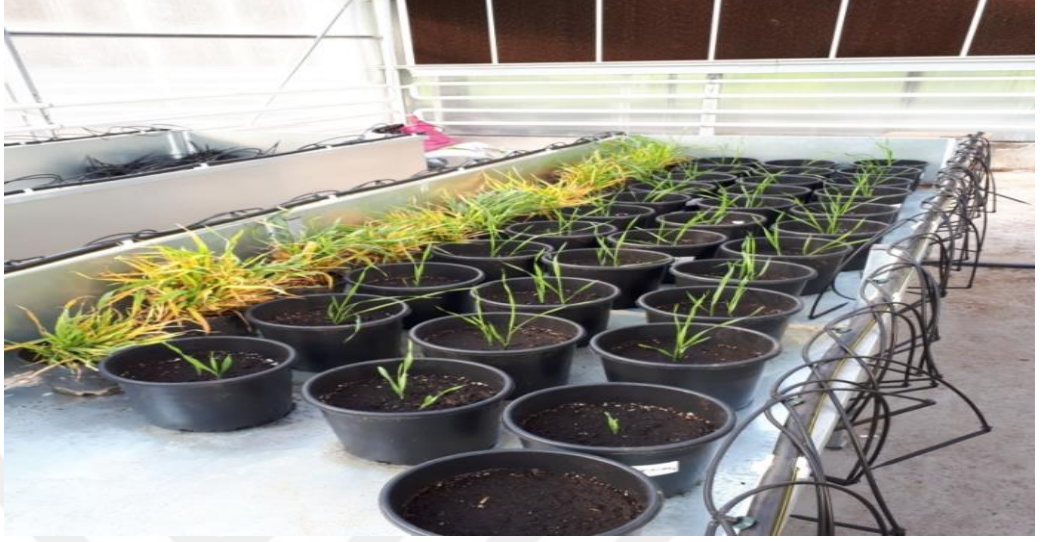
Şekil 4.1. Buğday ve arpa tohumlarının viyollere ekimi ve bitki çıkışlarının gözlenmesi



Şekil 4.2. Viyollerde gelişen bitkilerin saksılara şaşırtılması ve sulama işlemlerinden görüntüler

Tahıl virüslerinin afidlerle taşınma durumunu gözlemlemek amacıyla Eskişehir İli Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden gönderilen, sarı cücelik virüslerinin belirtilerini gösteren bitkiler saksılara dikilerek dayanıklılık çalışmalarında

kullanılacak genotiplerin yanına alınmıştır. İnokulum kaynağı olarak Müfitbey ekmeklik buğday çeşidi ve Enstitü tarafından geliştirilmiş arpa hatları kullanılmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. En solda Eskişehir ilinden gönderilen ve sarı cücelik virüs hastalığının belirtilerine sahip bitkiler, orta ve sağdaki sırada ise denemede kullanılan buğday genotiplerinden genel görünüş

Eskişehir ilinden gönderilen bitkilerin üzerinde yaprak biti olmadığından Diyarbakır ili buğday tarlalarından BYDV simptomu gösteren ve yaprak bitleri içeren bitki örnekleri toplanmış ve hastalıklı bitkilere aktarılmıştır. Enfekteli olduğu düşünülen buğday ve arpa bitkilerinde beslenmeye bırakılan ve *Rhopalosiphum padi* ve *Sitobion avenae* olarak teşhis edilmiş olan bu yaprak bitlerinin sağlıklı bitkilere taşınması sağlanmıştır (Şekil 4.4).



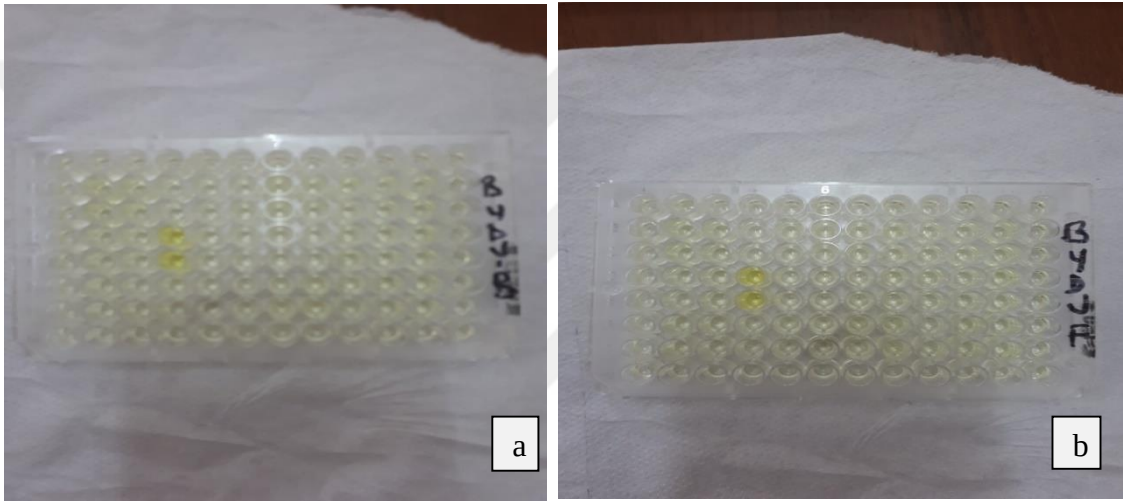
Şekil 4.4. Arpa sarı cücelik hastalığı belirtileri gösteren buğday bitkilerinde oluşan yaprak biti popülasyonunun görüntüsü

Bu çalışma survey çalışması olarak planlanmamış olmakla birlikte, Diyarbakır ilinden toplanan yaprak bitlerinin bulunduğu tarlalardan virüs simptomu gösteren bitki örnekleri de alınarak DAS-ELISA ve RT-PCR analizleri ile testlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Saksı denemeleri ve Diyarbakır ili buğday tarlalarından toplanan buğday ve arpa örneklerinin listesi

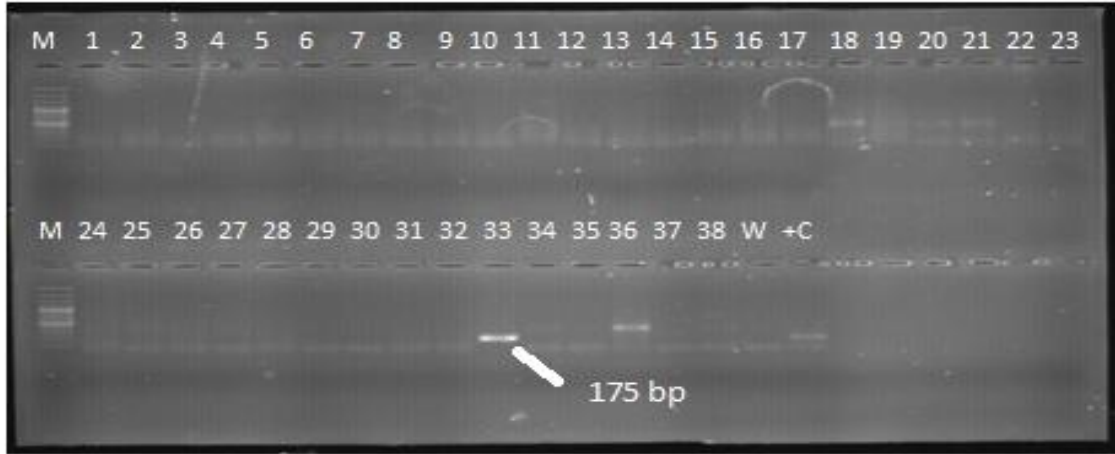
Sıra No:	Genotip ve Tekrarları	Toplandığı yer	Sıra No:	Genotip ve Tekrarları	Toplandığı yer
1	SORGÜL -1	Saksı	20	CHEN/CALI//OSU-3910244/ -2	Saksı
2	SORGÜL -2	Saksı	21	CHEN/CALI//OSU-3910244/ -3	Saksı
3	SORGÜL -3	Saksı	22	J15418/MARAS -1	Saksı
4	DİNÇ -1	Saksı	23	J15418/MARAS -2	Saksı
5	DİNÇ -2	Saksı	24	J15418/MARAS -3	Saksı
6	DİNÇ -3	Saksı	25	KS82W422/SWM7-1	Saksı
7	DYB1 -1	Saksı	26	KS82W422/SWM7-2	Saksı
8	DYB1 -2	Saksı	27	KS82W422/SWM7-3	Saksı
9	DYB1 -3	Saksı	28	BECARD/KACHU -1	Saksı
10	SÜMERLİ -1	Saksı	29	BECARD/KACHU -2	Saksı
11	SÜMERLİ -2	Saksı	30	BARIŞ-1	Saksı
12	SÜMERLİ -3	Saksı	31	BARIŞ-2	Saksı
13	KACHU/5/NAC/TH.AC// -1	Saksı	32	KENDAL -1	Saksı
14	KACHU/5/NAC/TH.AC// -2	Saksı	33	TEKİN	Diyarbakır ili survey
15	KACHU/5/NAC/TH.AC// -3	Saksı	34	ARAZİDEN RASTGELE TOPLANAN EKMEKLİK BUĞDAY YAPRAĞI	Diyarbakır ili survey
16	MRF1/STJ2//BCRCH1/4/ICAMOR-1	Saksı	35	YABANI BUĞDAY	Diyarbakır ili survey
17	MRF1/STJ2//BCRCH1/4/ICAMOR-2	Saksı	36	ZÜHRE (MAKARNALIK BUĞDAY)	Diyarbakır ili survey
18	MRF1/STJ2//BCRCH1/4/ICAMOR-3	Saksı	37	ŞAHİN-91 (ARPA)	Diyarbakır ili survey
19	CHEN/CALI//OSU-3910244/ -1	Saksı	38	YABANI YULAF	Diyarbakır ili survey

Testlenen örneklerden sadece 33 no’lu örneğin (TEKİN buğday çeşidi-Diyarbakır) gerek BYDV-MAV gerekse BYDV-PAV türleri için DAS-ELISA ile pozitif bulunması üzerine (Şekil 4.5) bu örnek ve ELISA kitinin pozitif kontrolleri kullanılarak RT-PCR analizleri için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle buğdaylar için en iyi toplam nükleik asit (TNA) izolasyonunu belirlemek üzere ticari kit olarak “Norgen-Bitki, Fungus RNA izolasyon Kiti” ile MKÜ Viroloji laboratuvarlarında birçok bitki virüsünün tespit edilmesinde başarı ile kullanılan “Silica ekstraksiyon yöntemi” denenmiş ve sonuçlar kıyaslanmıştır. Her iki yöntemde de nükleik asit konsantrasyonu ve kalitesinin oldukça iyi olduğu belirlenmiştir.

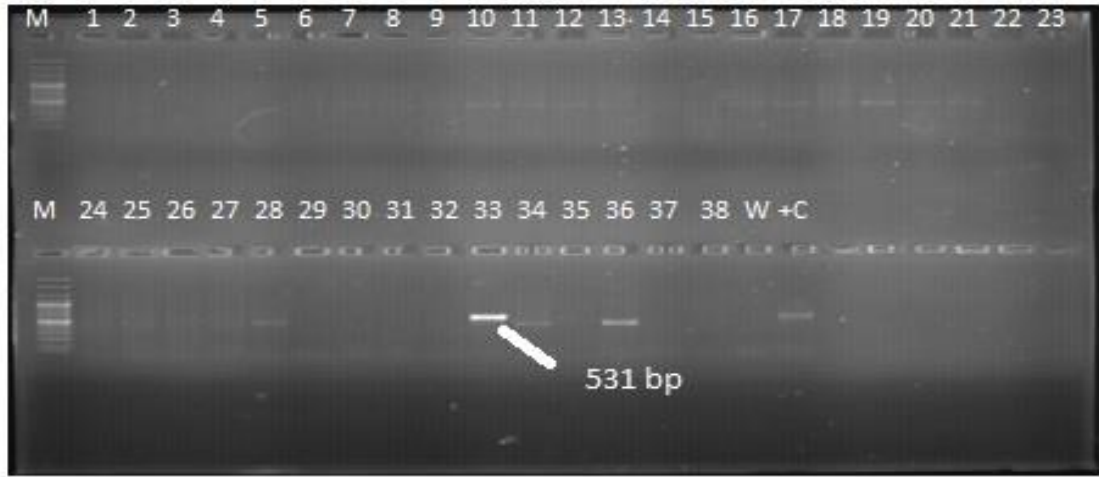


Şekil 4.5. DAS-ELISA yöntemi ile barley yellow dwarf virus (BYDV)-PAV ve BYDV-MAV açısından pozitif bulunan 33 no’lu örneğin görünümü a: BYDV-PAV, b: BYDV-MAV

DAS-ELISA sonuçları RT-PCR analizleriyle de doğrulanmış olup testlenen 38 örnekten sadece 33 nolu örnek BYDV-MAV ve BYDV-PAV ile karışık enfekteli bulunmuştur. Eskişehir ilinden gelen örnekler semptomlu olmasına rağmen BYDV ile enfekteli bulunmamıştır. RT-PCR sonucu yapılan agaroz jel elektroforez analizlerinde testlenen örneklerde belirlenen düzeyde bant elde edilmesine rağmen (Şekil 4.6, Şekil 4.7) ardından yapılan sekans analizlerine göre bu örnekler BYDV-PAV ve BYDV-MAV olmadıkları saptanmıştır.



Şekil 4.6. Eskişehir ve Diyarbakır'dan toplanan buğday ve arpa örneklerinin BYDV-MAV'a spesifik primerlerle uygulanan RT-PCR analizinin agaroz jel görüntüsü. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD), W: Su kontrol +C: Pozitif kontrol



Şekil 4.7. Eskişehir ve Diyarbakır'dan toplanan buğday ve arpa örneklerinin BYDV-PAV'a spesifik primerlerle uygulanan RT-PCR analizinin agaroz jel görüntüsü. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD), W: Su kontrol +C: Pozitif kontrol

4.2. Buğday genotiplerinin saksılarda yetiştirilmesi

Yapılan ön çalışma sonrasında 2020 yılı Mart ayında GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü serasında çizelge 3.1'de verilen genotiplerin tohumları 10 tekrarlı olarak her bir saksıya 3'er adet tohum olacak şekilde ekilmiştir. Ekilen tohumlar 8 gün sonra tamamıyla çıkış yapmıştır. Çıkışların ardından 5 gün sonra saksılara damla sulama lateralleri eklenmiş olup bitkiler yaklaşık 1'er hafta ara ile sulanmıştır. Ekimden 22 gün sonra her bir saksıda 2 adet bitki kalacak şekilde bitki seyreltilmesi yapılmıştır (Şekil 4.8).



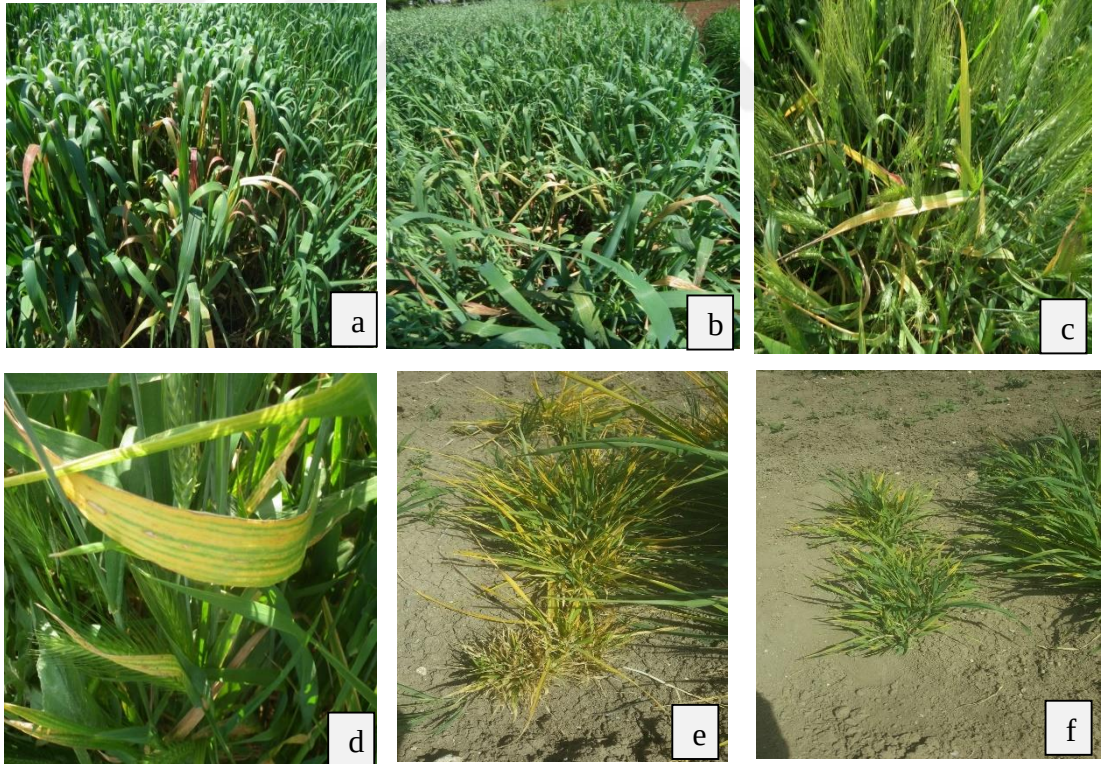
Şekil 4.8. Buğday genotiplerinin çıkış sonrası seyreltilme çalışmaları

4.3. Barley yellow dwarf virüsleri için izolat temini

İzolat temini için İzmir ili Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden arpa sarı cücelik virüslerinin oluşturduğu semptomlara benzeyen ve üzerinde yaprak biti bulunan buğday bitkileri seraya alınmıştır. Bu bitkiler hem DAS-ELISA hem de RT-PCR analizleri ile testlenmiş ve BYDV-PAV ve BYDV-MAV pozitif bulunmuştur. İzolat temini amacıyla kullanılan buğday bitkilerinin tarladaki görünümü ve Diyarbakır'a getirildikten sonra saksıya dikilerek seralarda muhafaza edilmesi Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da görülmektedir.



Şekil 4.9. İzmir ilinden temin edilen BYDV-MAV ve BYDV-PAV ile enfekteli olduğu tespit edilerek ve inokulum kaynağı olarak kullanılan buğday bitkilerinin seralarda muhafaza edilmesi



Şekil 4.10. İzmir ve Eskişehir illerinde barley yellow dwarf virüs semptomlarına benzeyen belirtiler gösteren tahıl bitkileri a,b.) İzmir ili yulaf tarlası c,d.) İzmir ili buğday tarlası e,f.) Eskişehir ili arpa parselleri

4.4. Afidlerle inokulasyon

Eskişehir ve İzmir ilinden temin edilerek BYDV-PAV ve BYDV-MAV ile enfekteli olduğu tespit edilen bitkilerde beslenen *R. padi* ve *S. avenae* bireyleri denemede kullanılan 30 genotip ile pozitif ve negatif kontrol olarak kullanılan Barbaros arpa çeşidi ile Anza buğday çeşidinden her bitkiye yaklaşık 20 afid olacak şekilde aktarılmış ve 72 saat beslenmeye bırakılmıştır. Taşıma denemelerinde kullanılan yaprak bitlerinin enfekteli buğday yapraklarında beslenmesi ve mikroskop altındaki görünüşleri Şekil 4.11’de verilmiştir. Her saksıdaki bitkinin sağlıklı ve hastalıklı yaprakları alınarak Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Koruma Viroloji laboratuvarında virüs tespiti amacıyla Hatay’a götürülmüştür. Bu işlem yapıldıktan sonra seradaki yaprak bitleri insektisit kullanılarak imha edilmiştir.



Şekil 4.11. BYDV ile enfekteli bulunan buğday yapraklarında beslenen *Rhopalosiphum padi* ve *Sitobion avenae* bireylerinin makroskobik ve mikroskobik görüntüleri

4.5. Simptomolojik gözlemler

Arpa sarı cücelik hastalığının simptomolojik gözlemleri inokulasyondan 3-4 hafta sonra ve bitki başaklanma dönemindeyken 0–5 skalası (0 - Simptom yok, 5 - Bütün bitkide sararma) kullanılarak yapılmıştır. Çizelge 4.3 incelendiğinde en düşük değer 0 olmuşken en yüksek skala değeri ise 4 olarak tespit edilmiştir. Genotipler ve tekrarlarında bazı yapraklarda kırmızılaşma, yaprak kıvrılması, cüceleşme ve yapraklarda kloritik çizgili desenler gibi viral enfeksiyon belirtileri gözlemlenmiştir (Şekil 4.12). ASC hastalığı belirtileri, tahıl türüne, çeşide, enfeksiyonun meydana geldiği gelişme

dönemine, afid yoğunluğuna ve çevresel koşullara bağlı olarak oldukça değişkenlik göstermektedir (Shah ve ark. 2012; Choudhury ve ark. 2019b). ASC hastalığının tipik belirtileri özellikle yaprağın ucundan başlayarak sarı, kırmızı veya mor tonlarında renk bozuklukları, yaprak kenarlardan başlayarak tabana doğru yayılma ve klorofil içeriğinde azalmalar şeklinde görülür (Jensen ve Van Sambeek 1972; D'arcy 1995). Bu çalışma kapsamında gözlenen belirtiler de daha önce birçok araştırmacı tarafından bildirilen belirtilerle benzer bulunmuştur.





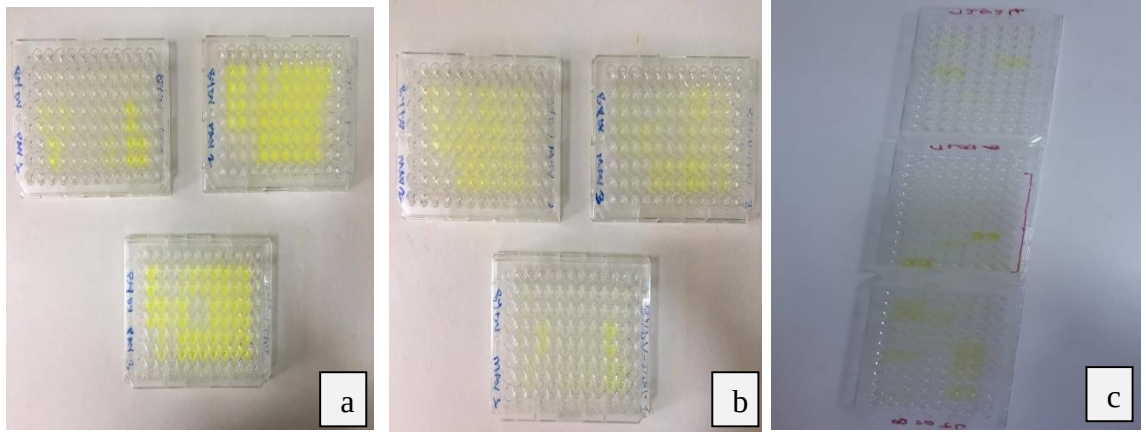
Şekil 4.12. a) BYDV ile enfekteli tahıl bitkilerinde beslenen afidler kullanılarak yapılan taşıma deneylerinin simptomolojik gözlemleri b) Bazı genotiplerde görülen bayrak yaprağın kırmızılaşması c) Buğday yapraklarında klorotik lekeler d) Buğday yapraklarından gözlenen kıvrılma simptomsu

4.6. Serolojik ve Moleküler çalışmalar

4.6.1. DAS-ELISA

Dayanıklılık çalışmalarında kullanılan tüm genotiplerin DAS-ELISA ile testlenmesinde BYDV-PAV ve BYDV-MAV için BIOREBA firması tarafından üretilen ticari kit kullanılırken CYDV-RPV için AGDIA firmasının kiti kullanılmıştır. Yapılan DAS-ELISA analizleri sonuçlarına göre; 30 genotipin tekrarlarıyla birlikte toplam 300 örneğin 158 tanesinde BYDV-PAV ve 141 tanesinde BYDV-MAV bulunmuştur. CYDV-RPV için ise testlenen 215 örneğin 20 tanesinde bu virüs tespit edilmiştir (Çizelge 4.3; Şekil 4.13). DAS-ELISA sonuçlarına göre enfeksiyon yüzdeleri BYDV-PAV'da %52.6, BYDV-MAV'da %47.0 ve CYDV-RPV'de % 9.3 olarak saptanmıştır. Bu enfeksiyon oranları arazi koşullarında yürütülen ve ASC hastalığının yaygınlığını belirlemek amacıyla yapılan bir çok çalışma sonucuyla uyumlu bulunmuştur. Ülkemizde Afyonkarahisar ve Isparta buğday alanlarında yürütülen bir survey çalışmasında DAS-ELISA test sonuçlarına göre 94 örneğin 68 adedinde % 72.3 oranında BYDV-PAV ve 2 örnekte ise % 2.1 oranında BYDV-MAV enfeksiyonu belirlenmiştir. Örneklerin sadece 4 adedinde % 4.2 oranında her iki virüsün karışık enfeksiyonu tespit edilmiştir (Kılıç ve ark. 2019). Tunus'da yapılan bir çalışmada da benzer şekilde BYDV-PAV, MAV, RPV, RMV ve SGV'nin tespit edilmesi amacıyla yapılan DAS-ELISA analizlerinde BYDV-PAV serotipi en yaygın olarak bulunmuş olup bunu sırasıyla BYDV-MAV ve CYDV-RPV izlemiştir (Makkouk ve ark., 1990; Najar ve ark.,2000; Makkouk ve ark., 2001).

Bu çalışma kapsamında DAS-ELISA sonuçları, genel BYDV enfeksiyonu açısından değerlendirildiğinde en hassas olarak 10, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 29 no'lu genotipler bulunurken daha az etkilenenler 5, 9, 11 ve 30 no'lu genotipler olup 12 ile 13 nolu genotiplerin tekrarlarında bir örnek dışında virüs tespit edilememiş bu nedenle de BYDV kompleksinde yer alan bu 3 virüse karşı daha tolerant oldukları değerlendirilmiştir (Çizelge 4.3, 4.4). BYDV'nin nicel olarak tespit edilmesi gerek ASC hastalığının kontrolünde gerekse dayanıklılık kaynaklarının araştırılmasında çok önemli bir role sahiptir. DAS-ELISA yöntemi bu amaçla kullanılan en güvenilir yöntemlerden birisidir (Balaji ve ark. 2003).



Şekil 4.13. Dayanıklılık çalışmalarında kullanılan genotiplerin DAS-ELISA ile testlenmesi a) BYDV-PAV, b) BYDV-MAV ve c) CYDV-RPV'nin DAS-ELISA analizleri sonucu gözlenen plakalar

4.6.2. Moleküler Çalışmalar

DAS-ELISA sonuçlarının teyit edilmesi amacıyla yürütülen RT-PCR analizlerinde; 30 genotipin tekrarlarıyla birlikte 300 örneğin 198 adedinde BYDV-PAV, 169 adedinde BYDV-MAV ve 142 adedinde CYDV-RPV tespit edilmiştir. Buna göre enfeksiyon yüzdeleri ise BYDV-PAV'da %66.0, BYDV-MAV'da %56.3 ve CYDV-RPV'de ise %47.3 olarak saptanmıştır. Trakya Bölgesi'nde yürütülen bir çalışmada testlenen 187 adet farklı tahıl örneklerinin %47.59'unda BYDV-PAV, %16.04'ünde CYDV-RPV ve %2.14'ünde ise BYDV-MAV tespit edilmiştir (İlbağı, 2017). Diyarbakır ili buğday alanlarında Arpa sarı cücelik virüslerini (BYDV-PAV, MAV, SGV, RMV ve CYDV-RPV) belirlemek amacı ile 2016 yılında survey yapılmış ve toplanan örnekler multipleks RT-PCR ve RT-PCR yöntemleriyle testlenmiştir. Testlenen 365 buğday örneğinden 13'ünün BYDV-PAV (%3.5), 9'unun BYDV-SGV (%2.4), 5'inin CYDV-RPV (%1.3) ile bulaşık oldukları tespit edilmiştir (Hassan, 2018). Bu çalışmalardan da görüleceği gibi farklı illerde yürütülen survey çalışmalarında bizim çalışmamıza paralel olarak BYDV-PAV en yaygın tür olarak tespit edilmiştir.

Yapılan serolojik ve moleküler testlemelerde benzer sonuçlar elde edilerek en hassas genotipler 10, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 29 olarak bulunurken daha az etkilenenler ise 5, 9, 11 ve 30 no'lu genotipler olmuştur. 12 ile 13 nolu genotipler ise yine hem fenolojik gözlemler hem de DAS-ELISA ve RT-PCR analiz sonuçlarına göre BYDV'lere karşı en tolerant genotipler olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Sera koşullarında BYDV'ye dayanıklılık için testlenen 30 genotip ve tekerrürlerinin fenolojik olarak değerlendirilmesi ve üç farklı virüse karşı DAS-ELISA ve RT-PCR analizleriyle testlenme sonuçları

Genel Sıra	Genotip	Teker rür	BYDV-PAV		BYDV-MAV		CYDV-RPV		Scala değeri
No	No		DAS-ELISA	RT-PCR	DAS-ELISA	RT-PCR	DAS-ELISA	RT-PCR	(0-5)
39	1	1	-	-	-	-	-	+	3
40	1	2	-	-	-	-	-	+	1
41	1	3	+	+	-	+	-	-	2
42	1	4	+	+	+	-	-	-	2
43	1	5	-	-	-	-	-	+	1
44	1	6	-	-	-	-	-	+	1
45	1	7	+	+	+	+	-	-	3
46	1	8	-	+	-	-	-	+	3
47	1	9	-	-	-	-	-	+	2
48	1	10	+	-	+	-	-	-	2
Toplam			4	4	3	2	0	6	
49	2	1	-	-	-	-	-	+	3
50	2	2	+	+	+	+	-	-	4
51	2	3	-	-	-	-	-	+	2
52	2	4	-	-	-	-	-	+	2
53	2	5	-	-	-	-	-	+	2
54	2	6	+	+	+	+	+	-	2
55	2	7	-	-	-	-	-	-	3
56	2	8	+	+	+	-	-	-	3
57	2	9	+	+	+	+	-	-	3
58	2	10	-	+	-	-	-	+	1
Toplam			4	5	4	3	1	5	
59	3	1	-	-	-	-	-	+	1
60	3	2	+	-	+	-	-	-	2
61	3	3	+	+	+	+	-	-	3
62	3	4	-	-	-	-	-	+	2
63	3	5	+	+	+	+	-	-	4
64	3	6	-	-	-	-	-	+	1
65	3	7	+	+	+	+	-	-	2
66	3	8	+	+	+	+	-	-	2
67	3	9	-	-	-	+	-	+	1
68	3	10	+	+	+	+	-	-	0
Toplam			6	5	6	6	0	4	

Çizelge 4.4. (Devamı) Sera koşullarında BYDV'ye dayanıklılık için testlenen 30 genotip ve tekerrürlerinin fenolojik olarak değerlendirilmesi ve üç farklı virüse karşı DAS-ELISA ve RT-PCR analizleriyle testlenme sonuçları

69	4	1	-	-	-	-	-	-	1
70	4	2	-	+	-	+	-	+	1
71	4	3	+	+	+	+	-	-	1
72	4	4	-	-	-	-	-	-	0
73	4	5	+	+	+	+	-	-	2
74	4	6	-	+	-	-	-	-	1
75	4	7	-	-	-	-	-	+	3
76	4	8	+	+	-	-	-	-	2
77	4	9	-	-	-	-	-	+	2
78	4	10	-	+	-	+	-	+	2
Toplam			3	6	2	4	0	4	
79	5	1	-	-	-	-	-	+	1
80	5	2	-	+	-	+	+	+	0
81	5	3	-	-	-	-	-	-	1
82	5	4	+	+	+	+	-	-	2
83	5	5	-	-	-	-	-	+	1
84	5	6	-	-	-	-	-	-	1
85	5	7	-	+	-	-	-	-	1
86	5	8	-	+	-	+	-	+	1
87	5	9	-	-	-	-	-	+	1
88	5	10	-	-	-	-	-	+	1
Toplam			1	4	1	3	1	6	
89	6	1	-	-	-	-	-	-	1
90	6	2	+	+	+	+	-	-	1
91	6	3	-	-	-	+	-	+	1
92	6	4	-	-	-	-	-	+	1
93	6	5	-	+	-	+	-	+	2
94	6	6	+	+	+	+	-	-	1
95	6	7	-	-	-	-	-	+	2
96	6	8	-	-	-	-	-	+	1
97	6	9	-	-	-	-	-	+	1
98	6	10	+	+	-	-	-	-	1
Toplam			3	4	2	4	0	6	

Çizelge 4.5. (Devamı) Sera koşullarında BYDV'ye dayanıklılık için testlenen 30 genotip ve tekerrürlerinin fenolojik olarak değerlendirilmesi ve üç farklı virüse karşı DAS-ELISA ve RT-PCR analizleriyle testlenme sonuçları

99	7	1	-	-	-	-	-	+	1
100	7	2	-	-	-	-	-	+	0
101	7	3	-	-	-	-	+	+	1
102	7	4	+	+	+	+	-	-	1
103	7	5	-	+	-	+	-	+	1
104	7	6	-	-	-	-	-	+	1
105	7	7	-	-	-	-	-	+	2
106	7	8	+	+	+	+	-	-	2
107	7	9	-	+	-	-	-	+	1
108	7	10	-	-	-	-	-	+	1
Toplam			2	4	2	3	1	8	
109	8	1	-	+	-	-	-	+	2
110	8	2	-	-	-	-	-	+	1
111	8	3	+	+	+	+	-	-	1
112	8	4	-	-	-	-	-	+	2
113	8	5	+	+	+	+	+	+	2
114	8	6	-	-	-	-	-	-	2
115	8	7	-	-	-	-	-	-	3
116	8	8	+	+	+	+	-	-	2
117	8	9	+	+	+	+	-	-	4
118	8	10	+	+	+	+	-	-	2
Toplam			5	6	5	5	1	4	
119	9	1	-	+	-	+	-	-	2
120	9	2	-	-	-	-	-	-	1
121	9	3	+	+	+	+	-	-	2
122	9	4	-	-	-	-	-	-	1
123	9	5	-	-	-	-	-	-	2
124	9	6	+	+	+	+	-	-	2
125	9	7	-	-	-	-	-	-	3
126	9	8	-	-	-	-	-	-	2
127	9	9	+	+	+	-	-	-	3
128	9	10	-	+	-	+	-	-	2
Toplam			3	5	3	4	0	0	

Çizelge 4.6. (Devamı) Sera koşullarında BYDV'ye dayanıklılık için testlenen 30 genotip ve tekerrürlerinin fenolojik olarak değerlendirilmesi ve üç farklı virüse karşı DAS-ELISA ve RT-PCR analizleriyle testlenme sonuçları

129	10	1	+	+	-	+	-	-	1
130	10	2	-	+	-	+	-	-	1
131	10	3	+	+	-	+	-	-	1
132	10	4	+	+	+	+	-	+	1
133	10	5	+	+	+	+	-	-	1
134	10	6	+	+	+	+	-	-	1
135	10	7	+	+	+	+	-	-	1
136	10	8	-	+	-	+	-	-	1
137	10	9	+	+	+	+	-	-	1
138	10	10	+	+	+	+	-	-	1
Toplam			8	10	6	10	0	1	
139	11	1	-	-	-	-	-	-	2
140	11	2	-	-	-	-	-	-	1
141	11	3	-	-	-	-	-	-	1
142	11	4	+	+	+	+	-	-	2
143	11	5	-	-	-	-	-	-	2
144	11	6	-	+	-	+	-	-	0
145	11	7	-	-	-	-	-	-	1
146	11	8	-	-	-	-	+	-	1
147	11	9	-	+	-	-	-	-	3
148	11	10	+	+	-	+	-	-	1
Toplam			2	4	1	3	1	0	
149	12	1	-	+	-	+	-	+	2
150	12	2	-	-	-	-	-	-	0
151	12	3	-	+	-	+	-	-	2
152	12	4	+	+	+	+	-	-	2
153	12	5	-	-	-	-	-	+	1
154	12	6	-	+	-	+	-	+	1
155	12	7	-	-	-	-	-	-	1
156	12	8	-	-	-	-	-	-	1
157	12	9	-	+	-	+	-	-	3
158	12	10	-	-	-	-	-	-	1
Toplam			1	5	1	5	0	3	

Çizelge 4.7. (Devamı) Sera koşullarında BYDV'ye dayanıklılık için testlenen 30 genotip ve tekerrürlerinin fenolojik olarak değerlendirilmesi ve üç farklı virüse karşı DAS-ELISA ve RT-PCR analizleriyle testlenme sonuçları

159	13	1	-	+	-	-	-	-	2
160	13	2	-	+	-	-	-	-	2
161	13	3	-	-	-	-	-	-	2
162	13	4	-	+	-	-	-	-	1
163	13	5	-	+	-	+	-	-	2
164	13	6	+	+	-	+	-	+	1
165	13	7	-	+	-	+	-	+	3
166	13	8	-	+	-	-	-	-	1
167	13	9	-	-	-	-	-	-	2
168	13	10	-	-	-	+	-	+	2
Toplam			1	7	0	4	0	3	
169	14	1	+	+	+	+	-	-	1
170	14	2	+	+	+	+	-	+	1
171	14	3	-	+	-	+	-	-	3
172	14	4	-	-	-	-	-	-	2
173	14	5	+	+	+	+	-	+	2
174	14	6	+	+	+	+	-	+	3
175	14	7	+	+	+	+	-	+	3
176	14	8	-	+	-	-	-	-	2
177	14	9	+	+	+	+	-	+	2
178	14	10	+	+	+	+	-	-	2
Toplam			7	9	7	8	0	5	
179	15	1	-	+	-	-	-	-	2
180	15	2	+	+	+	+	-	-	1
181	15	3	+	+	+	+	+	+	2
182	15	4	+	+	+	+	-	-	2
183	15	5	-	-	-	-	-	-	2
184	15	6	+	+	+	+	-	+	2
185	15	7	+	+	+	+	-	+	2
186	15	8	+	+	+	+	-	+	2
187	15	9	+	+	+	+	-	+	2
188	15	10	+	+	+	+	-	-	3
Toplam			8	9	8	8	1	5	

Çizelge 4.8. (Devamı) Sera koşullarında BYDV'ye dayanıklılık için testlenen 30 genotip ve tekerrürlerinin fenolojik olarak değerlendirilmesi ve üç farklı virüse karşı DAS-ELISA ve RT-PCR analizleriyle testlenme sonuçları

189	16	1	+	+	+	+	-	-	2
190	16	2	+	+	+	+	-	-	2
191	16	3	+	+	+	+	-	+	2
192	16	4	+	+	+	+	-	+	3
193	16	5	+	+	+	+	-	+	3
194	16	6	+	+	+	+	-	+	2
195	16	7	+	+	+	+	-	+	3
196	16	8	+	+	+	+	-	+	2
197	16	9	+	+	+	+	-	-	2
198	16	10	+	+	+	+	-	-	2
Toplam			10	10	10	10	0	6	
199	17	1	-	-	-	-	-	-	2
200	17	2	-	-	-	-	-	-	2
201	17	3	+	+	+	+	-	-	3
202	17	4	+	+	+	+	-	-	1
203	17	5	-	-	-	-	-	+	1
204	17	6	+	+	-	+	-	-	1
205	17	7	+	+	+	+	-	-	2
206	17	8	+	+	-	-	-	-	2
207	17	9	+	+	-	+	-	-	1
208	17	10	+	+	+	+	-	-	4
Toplam			7	7	4	6	0	1	
209	18	1	+	+	+	+	+	+	2
210	18	2	+	+	+	+	-	-	2
211	18	3	-	+	-	-	-	+	1
212	18	4	+	+	+	+	+	+	2
213	18	5	+	+	-	+	-	-	2
214	18	6	-	-	-	-	-	-	2
215	18	7	+	+	+	-	-	+	3
216	18	8	+	+	+	+	-	+	2
217	18	9	+	+	+	+	+	+	3
218	18	10	+	+	+	+	-	-	1
Toplam			8	9	7	7	3	6	

Çizelge 4.9. (Devamı) Sera koşullarında BYDV'ye dayanıklılık için testlenen 30 genotip ve tekerrürlerinin fenolojik olarak değerlendirilmesi ve üç farklı virüse karşı DAS-ELISA ve RT-PCR analizleriyle testlenme sonuçları

219	19	1	+	+	+	+	-	+	1
220	19	2	+	+	+	+	-	+	1
221	19	3	+	+	+	+	+	+	1
222	19	4	+	+	+	+	-	+	1
223	19	5	+	+	+	+	-	+	2
224	19	6	+	+	+	+	-	+	1
225	19	7	+	+	+	+	-	+	2
226	19	8	+	+	+	+	-	+	2
227	19	9	+	+	+	+	+	+	2
228	19	10	+	+	+	+	-	+	2
Toplam			10	10	10	10	2	10	
229	20	1	+	+	+	+	+	+	1
230	20	2	+	+	+	+	+	+	3
231	20	3	+	+	+	+	+	+	3
232	20	4	+	+	+	+	-	+	2
233	20	5	+	+	+	+	-	+	2
234	20	6	+	+	+	+	-	+	2
235	20	7	+	+	+	+	-	+	1
236	20	8	+	+	+	+	+	+	1
237	20	9	+	+	+	+	-	+	1
238	20	10	+	+	+	+	-	+	1
Toplam			10	10	10	10	4	10	
239	21	1	+	+	+	+	+	+	2
240	21	2	+	+	+	+	-	+	2
241	21	3	+	+	+	+	+	+	1
242	21	4	+	+	+	+	+	+	2
243	21	5	+	+	+	+	-	+	2
244	21	6	+	+	+	+	-	+	3
245	21	7	+	+	+	+	-	-	3
246	21	8	+	+	+	+	-	-	2
247	21	9	+	+	+	+	+	-	3
248	21	10	+	+	+	+	-	+	1
Toplam			10	10	10	10	4	7	

Çizelge 4.10. (Devamı) Sera koşullarında BYDV'ye dayanıklılık için testlenen 30 genotip ve tekerrürlerinin fenolojik olarak değerlendirilmesi ve üç farklı virüse karşı DAS-ELISA ve RT-PCR analizleriyle testlenme sonuçları

249	22	1	+	-	+	+	-	+	2
250	22	2	+	-	+	+	-	+	2
251	22	3	-	+	-	+	-	+	2
252	22	4	+	+	+	+	-	-	2
253	22	5	+	+	+	+	+	+	2
254	22	6	+	+	+	+	Testlenmedi	+	3
255	22	7	-	-	-	-	Testlenmedi	-	1
256	22	8	+	+	+	-	Testlenmedi	+	2
257	22	9	+	+	+	+	Testlenmedi	+	2
258	22	10	-	+	-	-	Testlenmedi	+	1
Toplam			7	7	7	7	1	8	
259	23	1	-	-	-	+	Testlenmedi	+	1
260	23	2	-	-	-	-	Testlenmedi	+	2
261	23	3	-	-	-	-	Testlenmedi	-	1
262	23	4	-	+	-	-	Testlenmedi	+	2
263	23	5	+	+	+	+	Testlenmedi	+	3
264	23	6	+	+	+	+	Testlenmedi	+	3
265	23	7	+	+	+	+	Testlenmedi	+	2
266	23	8	+	+	+	-	Testlenmedi	+	2
267	23	9	+	+	+	+	Testlenmedi	-	1
268	23	10	+	+	+	+	Testlenmedi	+	4
Toplam			6	7	6	6	Testlenmedi i	8	
269	24	1	+	+	+	+	Testlenmedi	+	3
270	24	2	+	-	+	-	Testlenmedi	-	1
271	24	3	-	+	-	+	Testlenmedi	+	2
272	24	4	+	+	+	+	Testlenmedi	+	2
273	24	5	-	+	-	-	Testlenmedi	+	1
274	24	6	+	+	+	+	Testlenmedi	+	2
275	24	7	-	-	-	-	Testlenmedi	-	1
276	24	8	-	-	-	+	Testlenmedi	-	2
277	24	9	+	+	+	+	Testlenmedi	+	3
278	24	10	+	+	+	+	Testlenmedi	+	2
Toplam			6	7	6	7	Testlenmedi i	7	

Çizelge 4.11. (Devamı) Sera koşullarında BYDV'ye dayanıklılık için testlenen 30 genotip ve tekerrürlerinin fenolojik olarak değerlendirilmesi ve üç farklı virüse karşı DAS-ELISA ve RT-PCR analizleriyle testlenme sonuçları

279	25	1	-	+	-	+	Testlenmedi	-	3
280	25	2	-	+	-	+	Testlenmedi	+	2
281	25	3	-	-	-	-	Testlenmedi	+	2
282	25	4	-	+	+	+	Testlenmedi	+	3
283	25	5	+	+	-	+	Testlenmedi	-	2
284	25	6	+	+	+	+	Testlenmedi	+	1
285	25	7	-	-	-	-	Testlenmedi	-	2
286	25	8	+	-	-	-	Testlenmedi	-	2
287	25	9	-	-	-	-	Testlenmedi	-	3
288	25	10	+	-	-	-	Testlenmedi	-	3
Toplam			4	5	2	5	Testlenmedi	4	
289	26	1	+	+	+	+	Testlenmedi	-	1
290	26	2	-	-	-	-	Testlenmedi	+	1
291	26	3	+	+	-	+	Testlenmedi	-	2
292	26	4	-	+	-	+	Testlenmedi	-	2
293	26	5	-	-	-	-	Testlenmedi	-	2
294	26	6	+	+	+	-	Testlenmedi	-	2
295	26	7	-	+	-	-	Testlenmedi	-	1
296	26	8	-	+	-	-	Testlenmedi	+	2
297	26	9	+	+	+	+	Testlenmedi	-	2
298	26	10	-	-	-	-	Testlenmedi	-	2
Toplam			4	7	3	4	Testlenmedi	2	
299	27	1	-	-	-	-	Testlenmedi	-	2
300	27	2	-	+	-	-	Testlenmedi	-	2
301	27	3	-	-	-	-	Testlenmedi	+	2
302	27	4	-	-	-	-	Testlenmedi	+	2
303	27	5	-	+	-	+	Testlenmedi	+	1
304	27	6	+	+	-	-	Testlenmedi	-	3
305	27	7	+	+	+	+	Testlenmedi	+	3
306	27	8	-	+	+	-	Testlenmedi	-	3
307	27	9	-	-	-	-	Testlenmedi	+	2
308	27	10	-	-	-	-	Testlenmedi	+	2
Toplam			2	5	1	2	Testlenmedi	6	

Çizelge 4.12. (Devamı) Sera koşullarında BYDV'ye dayanıklılık için testlenen 30 genotip ve tekerrürlerinin fenolojik olarak değerlendirilmesi ve üç farklı virüse karşı DAS-ELISA ve RT-PCR analizleriyle testlenme sonuçları

309	28	1	+	+	+	+	Testlenmedi	-	2
310	28	2	-	+	-	-	Testlenmedi	+	2
311	28	3	-	-	-	-	Testlenmedi	-	2
312	28	4	+	+	+	+	Testlenmedi	-	2
313	28	5	+	+	+	+	Testlenmedi	-	2
314	28	6	-	-	-	-	Testlenmedi	-	2
315	28	7	+	+	+	-	Testlenmedi	-	2
316	28	8	+	+	+	+	Testlenmedi	-	1
317	28	9	-	+	-	+	Testlenmedi	-	2
318	28	10	-	-	-	-	Testlenmedi	-	1
Toplam			5	7	5	5	Testlenmedi	1	
319	29	1	+	+	+	+	Testlenmedi	-	1
320	29	2	+	+	+	+	Testlenmedi	-	1
321	29	3	+	+	+	+	Testlenmedi	-	1
322	29	4	+	+	+	+	Testlenmedi	-	1
323	29	5	+	+	+	+	Testlenmedi	+	1
324	29	6	-	-	-	-	Testlenmedi	+	1
325	29	7	-	-	-	-	Testlenmedi	-	1
326	29	8	+	+	+	+	Testlenmedi	-	1
327	29	9	+	+	+	+	Testlenmedi	-	1
328	29	10	-	-	-	-	Testlenmedi	-	1
Toplam			7	7	7	7	Testlenmedi	2	
329	30	1	+	-	+	-	Testlenmedi	+	1
330	30	2	-	-	-	-	Testlenmedi	-	1
331	30	3	-	-	-	-	Testlenmedi	-	1
332	30	4	-	-	-	-	Testlenmedi	-	2
333	30	5	+	-	-	-	Testlenmedi	-	2
334	30	6	-	+	-	+	Testlenmedi	+	1
335	30	7	-	-	-	-	Testlenmedi	+	2
336	30	8	+	+	+	-	Testlenmedi	-	2
337	30	9	-	+	-	-	Testlenmedi	+	2
338	30	10	+	-	-	-	Testlenmedi	-	2
Toplam			4	3	2	1	Testlenmedi	4	
Genel Toplam			158	198	141	169	20	142	

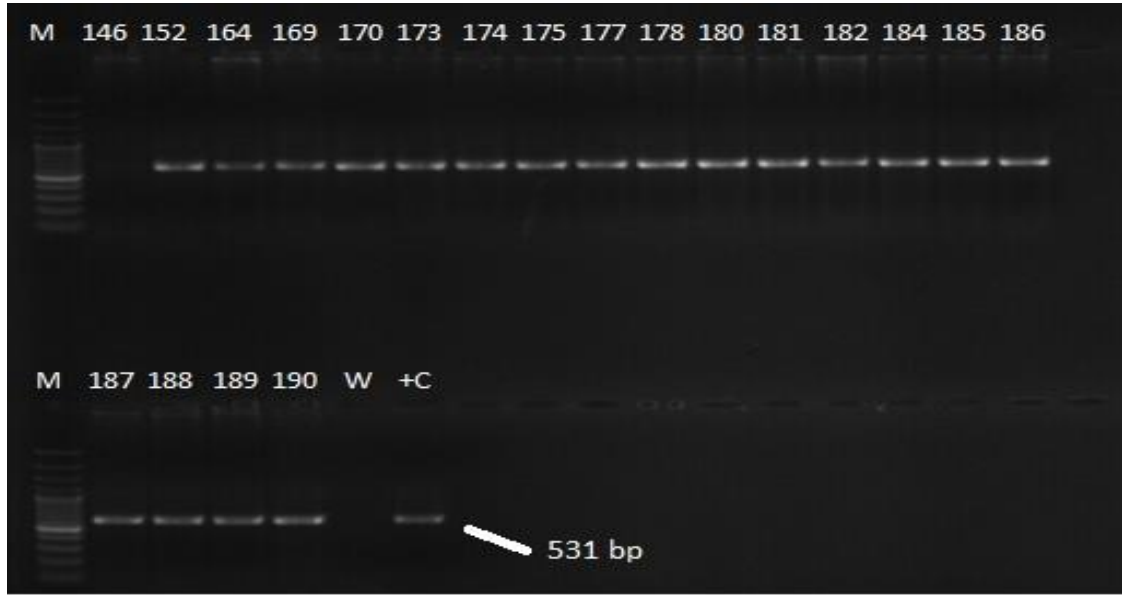
RT-PCR analiz sonuçlarına göre sadece 9 nolu genotipin hiçbir tekerrüründe CYDV-RPV saptanamamış olup diğer tüm genotiplerde karışık enfeksiyon şeklinde testlenen bütün virüsler tespit edilmiştir. RT-PCR sonucu yapılan agaroz jel elektroforez analizlerinde testlenen 11, 12, 13, 14, 15 ve 16 no'lu genotiplerin BYDV-MAV, BYDV-PAV (Şekil 4.14, Şekil 4.15) ile 5, 6, 7 ve 8 no'lu genotiplerin ise CYDV-RPV ile bulaşık olduğu görülmektedir (Şekil 4.16).



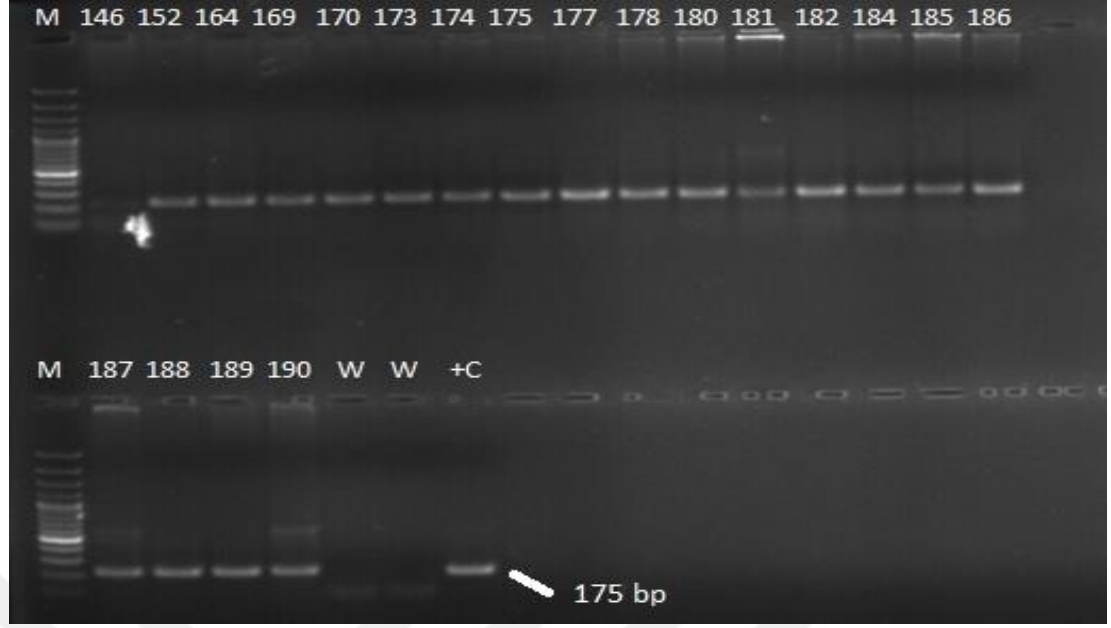
Çizelge 4.13. Saksı denemelerindeki buğday örneklerinden yapılan RT-PCR ve DAS-ELISA analizleri sonucunda saptanan virüsler ve enfeksiyon oranları

Genotip No	Testlenen Örnek Sayısı	RT-PCR ve DAS-ELISA analizi sonucunda virüs ile pozitif bulunan örnek sayısı ve enfeksiyon oranı (%)					
		BYDV-PAV		BYDV-MAV		CYDV-RPV	
		RT-PCR	DAS-ELISA	RT-PCR	DAS-ELISA	RT-PCR	DAS-ELISA
1	10	4	4	2	3	6	0
2	10	5	4	3	4	5	1
3	10	5	6	6	6	4	0
4	10	6	3	4	2	4	0
5	10	4	1	3	1	6	1
6	10	4	3	4	2	6	0
7	10	4	2	3	2	8	1
8	10	6	5	5	5	4	1
9	10	5	3	4	3	0	0
10	10	10	8	10	6	1	0
11	10	4	2	3	1	0	1
12	10	5	1	5	1	3	0
13	10	7	1	4	0	3	0
14	10	9	7	8	7	5	0
15	10	9	8	8	8	5	1
16	10	10	10	10	10	6	0
17	10	7	7	6	4	1	0
18	10	9	8	7	7	6	3
19	10	10	10	10	10	10	2
20	10	10	10	10	10	10	4
21	10	10	10	10	10	7	4
22	10	7	7	7	7	8	1
23	10	7	6	7	6	8	testlenmedi
24	10	7	6	7	6	7	testlenmedi
25	10	5	4	4	2	4	testlenmedi
26	10	7	4	4	3	2	testlenmedi
27	10	5	2	2	1	6	testlenmedi
28	10	7	5	5	5	1	testlenmedi
29	10	7	7	7	7	2	testlenmedi
30	10	3	4	1	2	4	testlenmedi
Genel Toplam	300	198	158	169	141	142	20
% Enfeksiyon Oranları							
BYDV-PAV		RT-PCR			66.0		
		DAS-ELISA			52.6		
BYDV-MAV		RT-PCR			56.3		
		DAS-ELISA			47.0		
CYDV-RPV		RT-PCR			47.3		
		DAS-ELISA			9.3		

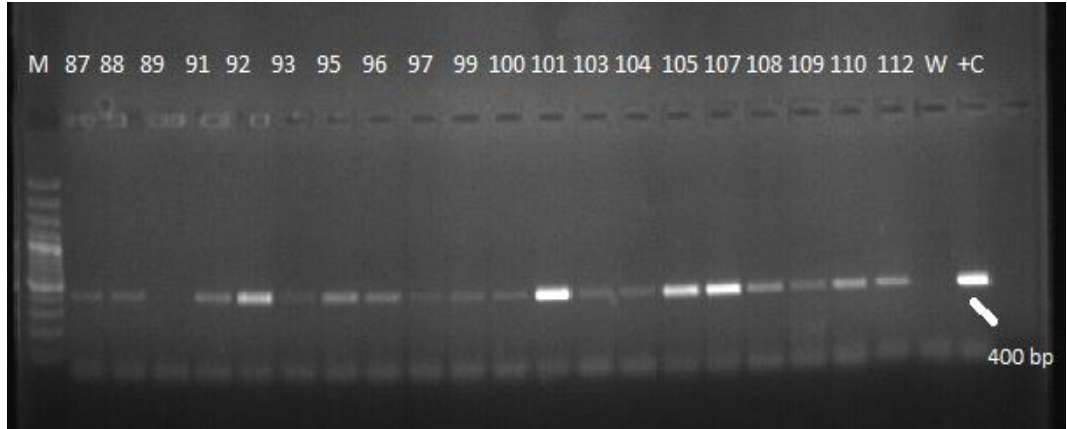
Yapılan birçok çalışmada virüsleri tanımda önemli bir kullanım potansiyeline sahip olan nükleik asit temelli RT-PCR yönteminin DAS-ELISA yöntemine oranla daha güvenilir olduğu bildirilmektedir.(Jacobi ve ark, 1998; Paylan, 2011; Áy ve ark., 2008). Bu çalışmada da farklı BYDV türlerinin tespit edilmesinde DAS-ELISA'ya göre RT-PCR analizleri ile her zaman daha yüksek oranda virüs tespiti yapılabilmektedir (Çizelge 4.4).



Şekil 4.14. BYDV-PAV virüsüne spesifik primerler kullanılarak uygulanan RT-PCR analizinin agaroz jel görüntüsü. Deneyisel taşıma denemelerinde kullanılan buğday örnekleri. Genotip numarası parantez içinde verilmiştir. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD), 148 (11), 152 (12), 164 (13), 169, 170, 173, 174, 175, 177, 178, (14), 180, 181, 182, 184, 185, 186, 187, 188, (15), 189, 190 (16), W: Su kontrol ve +C: Pozitif kontrol



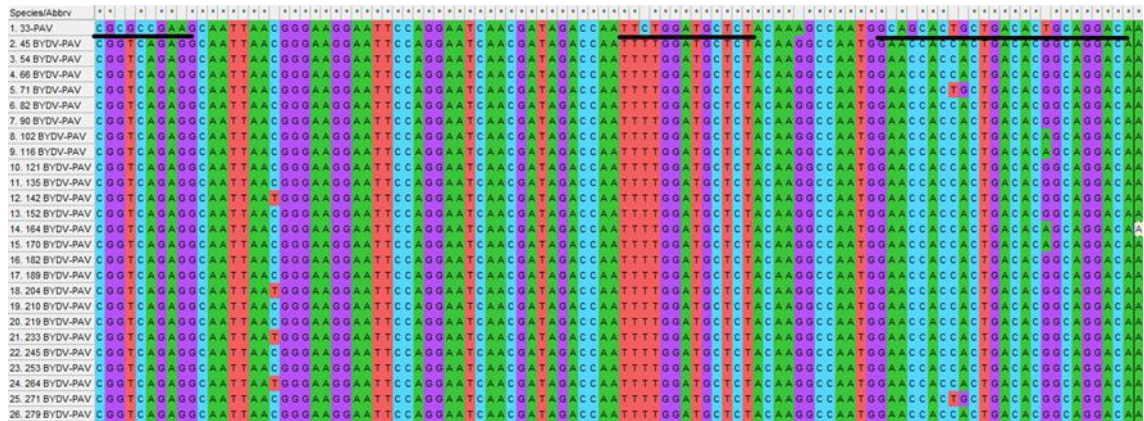
Şekil 4.15. BYDV-MAV virüsüne spesifik primerler kullanılarak uygulanan RT-PCR analizinin agaroz jel görüntüsü. Deneysel taşıma denemelerinde kullanılan buğday örnekleri. Genotip numarası parantez içinde verilmiştir. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD), 148 (11), 152 (12), 164 (13), 169, 170, 173, 174, 175, 177, 178, (14), 180, 181, 182, 184, 185, 186, 187, 188, (15), 189, 190 (16), W: Su kontrol ve +C: Pozitif kontrol



Şekil 4.16. CYDV-RPV virüsüne spesifik primerler kullanılarak uygulanan RT-PCR analizinin agaroz jel görüntüsü. Deneysel taşıma denemelerinde kullanılan buğday örnekleri. Genotip numarası parantez içinde verilmiştir. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD), 87, 88 (5), 89, 91, 92, 93, 95, 96, 97 (6), 99, 100, 101, 103, 104, 105, 107, 108 (7), 109, 110, 112 (8), W: Su kontrol ve +C: Pozitif kontrol

4.7. Sekans analizleri ve filogenetik ağaç

Çalışma kapsamında farklı buğday genotiplerine ve Barbaros arpa çeşidine ait bitkilerden toplam 300 buğday örneği BYDV- PAV, BYDV-MAV ve CYDV-RPV'lerinin kısmı kılıf protein gen bölgelerini çoğaltan spesifik primer çiftleri kullanılarak testlenmiştir. RT-PCR analizleriyle testlenen 300 buğday örneğinden BYDV-PAV pozitif saptanan örnekler arasında farklı hatlardan 38 örnek seçilerek sekans analizi için firmaya gönderilmiş ve DNA dizileri elde edilmiştir. Sekans sonucu elde edilen DNA dizileri NCBI veri tabanında nükleotid BLAST analizleri yapılmış ve MEGA 11 programında nükleotid dizilerin çoklu dizi karşılaştırılması (Şekil 4.17, 4.18, 4.19, 4.20) yapılmış olup filogenetik ağaç çizilmiştir. Yapılan BLAST ve çoklu dizi analizleri sonucunda izolatlar Gen Bankasında kayıtlı Mısır izolatı (KM046987), izolatı ile en yüksek (%99.81), İsveç izolatı (AJ563415) izolatı ile en düşük (%96.20) nükleotid benzerliği göstermiştir. Yapılan filogenetik analizlerde BYDV-PAV'a ait izolatlardan 33 nolu izolat diğer izolatlardan farklı bir grup içinde yer almıştır (Şekil 4.21, 4.22, 4.23). Bu izolat, Diyarbakır ilinde yaygın olarak yetiştirilen ve yerel bir çeşit olan Tekin buğday çeşidine ait olup farklı bir coğrafik bölgeden alındığı için diğer Türkiye izolatlarından farklı gruplandığı düşünülmektedir. Bu izolat Dünya izolatları içinde de ayrı bir grup oluşturan ABD (DQ631850, DQ631853) ve Yeni Zelanda izolatları (EF408177) ile yakın benzerlik göstermiştir. Genel olarak değerlendirme yapıldığında izolatların grup oluşturmada filogenetik sonuçlarına göre farklı konukçularda tespit edilmiş olsa bile yakın coğrafyada bulunan izolatlar daha yakın benzerlik göstermişlerdir.



Şekil 4.17. Elde edilen BYDV-PAV izolatlarının nükleotid çoklu karşılaştırmaları

Sequences producing significant alignments

Download Select columns Show 100

☒ select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate 12 coat protein gene, partial cds	Barley yellow dw...	804	804	100%	0.0	100.00%	500	JX275852.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV partial ORF3 for coat protein and partial ORF4 for 17-kDa protein, genomic RNA	Barley yellow dw...	804	804	100%	0.0	100.00%	502	AJ563414.1
☒ Barley yellow dwarf virus mRNA for coat protein and 17 kDa protein isolate MA9501	Barley yellow dw...	804	804	100%	0.0	100.00%	603	AJ007929.1
☒ Barley yellow dwarf virus mRNA for coat protein and 17 kDa protein isolate MA9502	Barley yellow dw...	804	804	100%	0.0	100.00%	603	AJ007918.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate TR-POA coat protein gene, partial cds	Barley yellow dw...	798	798	100%	0.0	99.77%	503	KJ816660.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate Egy-WZ coat protein gene, complete cds	Barley yellow dw...	798	798	100%	0.0	99.77%	603	KM046987.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate 31 coat protein gene, partial cds	Barley yellow dw...	798	798	100%	0.0	99.77%	467	JX275856.1
☒ Barley yellow dwarf virus - PAV isolate 052, complete genome	Barley yellow dw...	798	798	100%	0.0	99.77%	5673	EF521841.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV partial ORF3 for coat protein and partial ORF4 for 17-kDa protein, genomic RNA	Barley yellow dw...	798	798	100%	0.0	99.77%	502	AJ563415.1
☒ Barley yellow dwarf virus PAV isolate PAV 6-7 coat protein and movement protein genes, complete cds	Barley yellow dw...	793	793	100%	0.0	99.54%	603	KY634883.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate PAV-YNKM11-19 coat protein (cp) and movement protein (mp) genes, complete cds	Barley yellow dw...	793	793	100%	0.0	99.54%	603	KP096672.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate PAV-SCCD10-2 coat protein (cp) and movement protein (mp) genes, complete cds	Barley yellow dw...	793	793	100%	0.0	99.54%	603	KP096653.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate PAV-SCCD09-12 coat protein (cp) and movement protein (mp) genes, complete cds	Barley yellow dw...	793	793	100%	0.0	99.54%	600	KP096648.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate PAV-GZGY09-8 coat protein (cp) and movement protein (mp) genes, complete cds	Barley yellow dw...	793	793	100%	0.0	99.54%	600	KP096643.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate Egy-Ho coat protein gene, partial cds	Barley yellow dw...	793	793	100%	0.0	99.54%	525	KP708704.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate TR-LPER coat protein gene, partial cds	Barley yellow dw...	793	793	100%	0.0	99.54%	503	KJ816655.1

Şekil 4.18. Elde edilen 342 nolu BYDV-PAV izolatının nükleotid BLAST analiz sonucu

Sequences producing significant alignments

Download Select columns Show 100

☒ select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

Description	Scientific Name	Score	Total Score	Cover	E value	Ident	Len	Accession
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate 12 coat protein gene, partial cds	Barley yellow dw...	798	798	100%	0.0	99.77%	500	JX275852.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV partial ORF3 for coat protein and partial ORF4 for 17-kDa protein, genomic RNA	Barley yellow dw...	798	798	100%	0.0	99.77%	502	AJ563414.1
☒ Barley yellow dwarf virus mRNA for coat protein and 17 kDa protein isolate MA9501	Barley yellow dw...	798	798	100%	0.0	99.77%	603	AJ007929.1
☒ Barley yellow dwarf virus mRNA for coat protein and 17 kDa protein isolate MA9502	Barley yellow dw...	798	798	100%	0.0	99.77%	603	AJ007918.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate TR-POA coat protein gene, partial cds	Barley yellow dw...	793	793	100%	0.0	99.54%	503	KJ816660.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate Egy-WZ coat protein gene, complete cds	Barley yellow dw...	793	793	100%	0.0	99.54%	603	KM046987.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate 31 coat protein gene, partial cds	Barley yellow dw...	793	793	100%	0.0	99.54%	467	JX275856.1
☒ Barley yellow dwarf virus - PAV isolate 052, complete genome	Barley yellow dw...	793	793	100%	0.0	99.54%	5673	EF521841.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV partial ORF3 for coat protein and partial ORF4 for 17-kDa protein, genomic RNA	Barley yellow dw...	793	793	100%	0.0	99.54%	502	AJ563415.1
☒ Barley yellow dwarf virus PAV isolate PAV 6-7 coat protein and movement protein genes, complete cds	Barley yellow dw...	787	787	100%	0.0	99.31%	603	KY634883.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate PAV-YNKM11-19 coat protein (cp) and movement protein (mp) genes, complete cds	Barley yellow dw...	787	787	100%	0.0	99.31%	603	KP096672.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate PAV-SCCD10-2 coat protein (cp) and movement protein (mp) genes, complete cds	Barley yellow dw...	787	787	100%	0.0	99.31%	603	KP096653.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate PAV-SCCD09-12 coat protein (cp) and movement protein (mp) genes, complete cds	Barley yellow dw...	787	787	100%	0.0	99.31%	600	KP096648.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate PAV-GZGY09-8 coat protein (cp) and movement protein (mp) genes, complete cds	Barley yellow dw...	787	787	100%	0.0	99.31%	600	KP096643.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate Egy-Ho coat protein gene, partial cds	Barley yellow dw...	787	787	100%	0.0	99.31%	525	KP708704.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate TR-LPER coat protein gene, partial cds	Barley yellow dw...	787	787	100%	0.0	99.31%	503	KJ816655.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate TR-ECH coat protein gene, partial cds	Barley yellow dw...	787	787	100%	0.0	99.31%	503	KJ816653.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate TR-CYNO coat protein gene, partial cds	Barley yellow dw...	787	787	100%	0.0	99.31%	503	KJ816651.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate 16 coat protein gene, partial cds	Barley yellow dw...	787	787	100%	0.0	99.31%	500	JX275853.1
☒ Barley yellow dwarf virus-PAV isolate CA197_73 coat protein (ORF3) gene, complete cds	Barley yellow dw...	787	787	100%	0.0	99.31%	603	JX067837.1

Şekil 4.19. Elde edilen 253 nolu BYDV-PAV izolatının nükleotid BLAST analiz sonucu

Sequences producing significant alignments

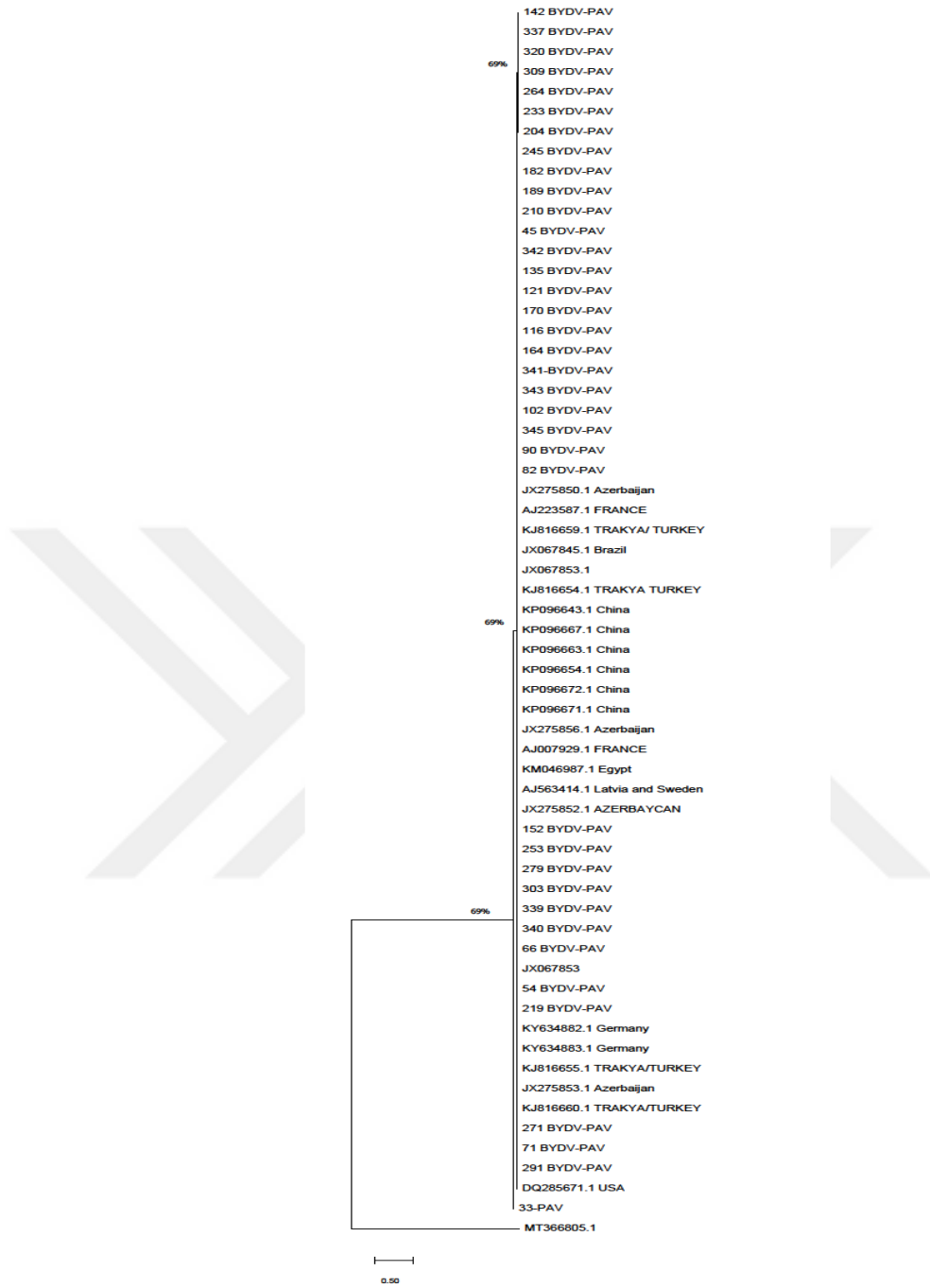
Download Select columns Show 100

☒ select all 100 sequences selected

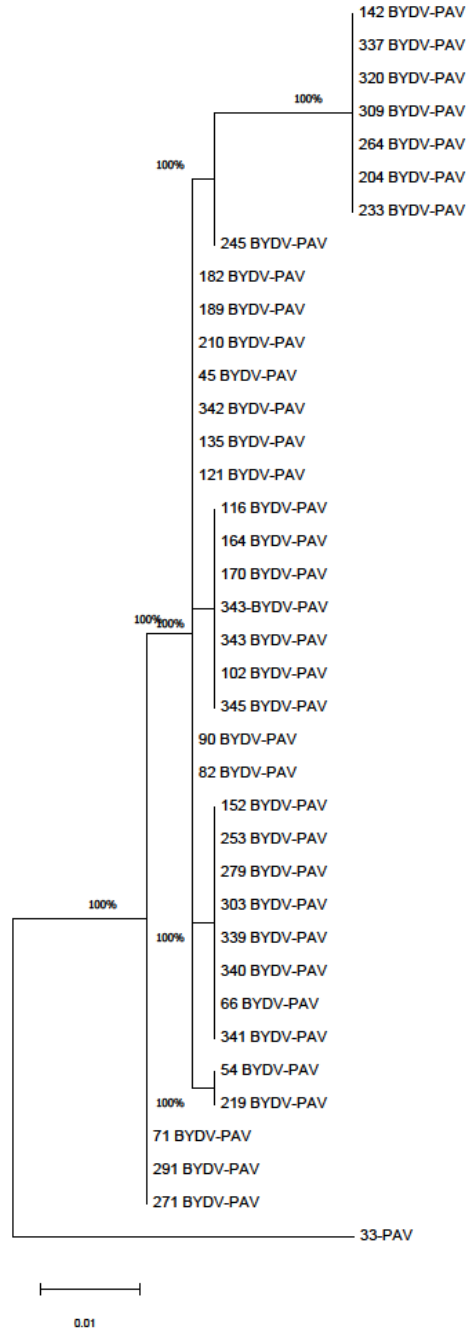
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
☒ Barley yellow dwarf virus PAV strain BYDV-PAV isolate Hyd107 coat protein gene, partial cds	Barley yellow dw...	771	771	100%	0.0	98.62%	591	KT222669.1
☒ Barley yellow dwarf virus PAV isolate TR-AQUA2 coat protein gene, partial cds	Barley yellow dw...	771	771	100%	0.0	98.62%	503	KJ816644.1
☒ Barley yellow dwarf virus PAV isolate TR-APERA coat protein gene, partial cds	Barley yellow dw...	771	771	100%	0.0	98.62%	503	KJ816642.1
☒ Barley yellow dwarf virus PAV strain BYDV-PAV isolate Pr161 coat protein gene, partial cds	Barley yellow dw...	765	765	100%	0.0	98.39%	589	KT222672.1
☒ Barley yellow dwarf virus PAV strain BYDV-PAV isolate DI144 coat protein gene, partial cds	Barley yellow dw...	765	765	100%	0.0	98.39%	584	KT222670.1
☒ Barley yellow dwarf virus PAV strain BYDV-PAV isolate Hx47 coat protein gene, partial cds	Barley yellow dw...	765	765	100%	0.0	98.39%	589	KT222668.1
☒ Barley yellow dwarf virus PAV strain Mx47, complete genome	Barley yellow dw...	765	765	100%	0.0	98.39%	5471	KT252978.1
☒ Barley yellow dwarf virus PAV strain DI144, complete genome	Barley yellow dw...	765	765	100%	0.0	98.39%	5653	KT252976.1
☒ Barley yellow dwarf virus PAV isolate Saray 1 coat protein gene, partial cds	Barley yellow dw...	765	765	100%	0.0	98.39%	503	KF176939.1
☒ Barley yellow dwarf virus PAV strain Pr161, complete genome	Barley yellow dw...	760	760	100%	0.0	98.17%	5654	KT252977.1
☒ Barley yellow dwarf virus PAV isolate TR19, complete genome	Barley yellow dw...	760	760	100%	0.0	98.17%	5672	MW916321.1
☒ Barley yellow dwarf virus PAV isolate 22 coat protein gene, partial cds	Barley yellow dw...	760	760	100%	0.0	98.17%	500	JX275855.1
☒ Barley yellow dwarf virus PAV isolate PK1 coat protein gene, partial cds	Barley yellow dw...	760	760	100%	0.0	98.17%	603	JQ811488.1
☒ Barley yellow dwarf virus isolate MAV-PK coat protein (CP) and movement protein genes, partial cds	Barley yellow dw...	760	760	100%	0.0	98.17%	521	HM368370.1
☒ Barley yellow dwarf virus PAV clone 61AG coat protein (ORF3) gene, complete cds	Barley yellow dw...	749	749	100%	0.0	97.71%	603	KT198984.1
☒ Barley yellow dwarf virus PAV clone 60AG coat protein (ORF3) gene, complete cds	Barley yellow dw...	749	749	100%	0.0	97.71%	603	KT198975.1

Feedback

Şekil 4.20. Elde edilen 33 nolu BYDV-PAV izolatının nükleotid BLAST analiz sonucu



Şekil 4.21. Barley yellow dwarf virüs–PAV (BYDV-PAV)’ın kısmı kılıf protein gen bölgesi için spesifik Lu 1/Lu 4 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda elde edilen izolatlar ve Gen Bankasına kayıtlı BYDV-PAV izolatlarla çizilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde MEGA 11 yazılımında yer alan Neighbor joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendogramda 1000 bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir. Filogenetik ağaçta Potato leafroll virus (PLRV) out group olarak kullanılmıştır



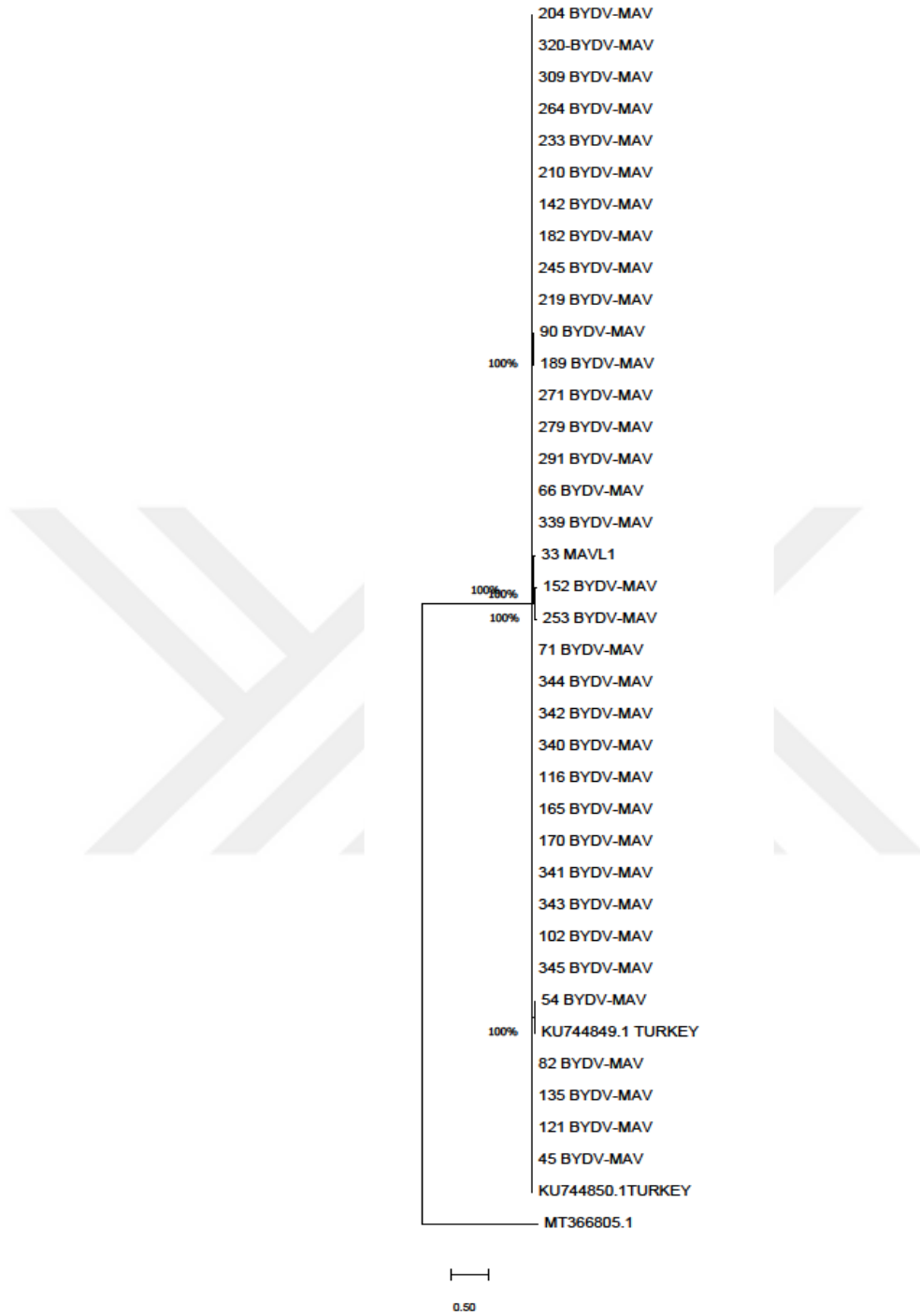
Şekil 4.22. Barley yellow dwarf virüs–PAV (BYDV-PAV)’ın kısmı kılıf protein gen bölgesi için spesifik Lu 1/Lu 4 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda elde edilen izolatlarla çizilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde MEGA 1.1 yazılımında yer alan Neighbor joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendogramda 1000 bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir

Çizelge 4.14. BYDV-PAV izolatlarının filogenetik analizinde kullanılan ve Gen bankasında kayıtlı farklı konukçulardan izole edilmiş olan BYDV-PAV izolatlarına ait ulaşım numarası, konukçu, ülke ve genom büyüklüğü

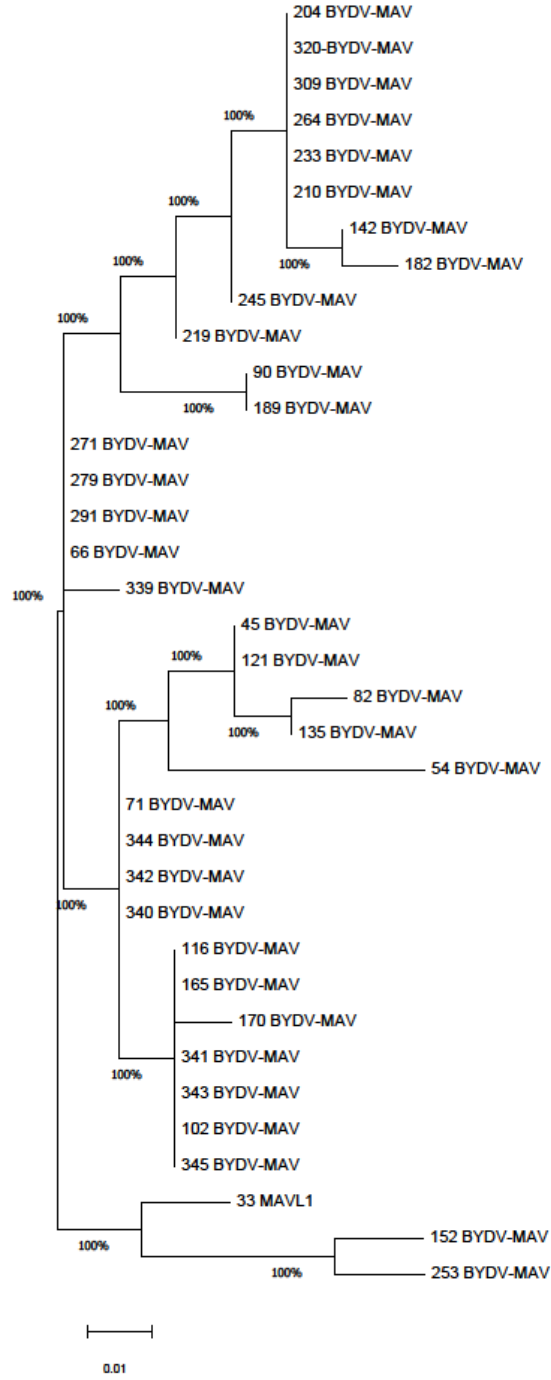
Sıra No	Ulaşım Numarası	Konukçu	Ülke	Uzunluk (bp)
1	JX275850	<i>Triticum aestivum</i>	Azerbaycan	461
2	AJ223587	<i>Lolium multiflorum</i>	Fransa	603
3	KJ816659	<i>Phragmites australis</i>	Türkiye	503
4	JX067845	İtalyan çimi	Brezilya	603
5	JX067853	Oat	Brezilya	603
6	KJ816654	<i>Hordeum murinum</i>	Türkiye	503
7	KP096643	Wheat	Çin	600
8	KP096667	Wheat	Çin	603
9	KP096663	Wheat	Çin	603
10	KP096654	Wheat	Çin	603
11	KP096672	Wheat	Çin	603
12	KP096671	Wheat	Çin	603
13	JX275856	<i>Triticum durum</i>	Azerbaycan	467
14	JX275852	<i>Triticum aestivum</i>	Azerbaycan	500
15	KM046987	Wheat	Mısır	603
16	AJ007929	-	Fransa	603
17	AJ563414	<i>Lolium perenne</i>	Letonya	502
18	KY634882	<i>Lolium multiflorum</i>	Almanya	603
19	KY634883	<i>Lolium multiflorum</i>	Almanya	603
20	KJ816655	<i>Lolium perenne</i>	Türkiye	503
21	KJ816660	<i>Poa trivialis</i>	Türkiye	503
22	JX275853	<i>Triticum boeoticum</i>	Azerbaycan	500
23	DQ285671	-	ABD	603
24	*MT366805	<i>Solanum tuberosum</i>	Sırbistan	627

*Bu izolat Potato leafroll virus izolatı olup dış grup olarak kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan 27 ve 30 no'lu genotipler hariç toplam 28 genotip ve Barbaros Arpa çeşidinden elde edilen toplam 36 BYDV-MAV izolatı seçilerek sekans analizi için firmaya gönderilmiş ve DNA dizileri elde edilmiştir. Sekans sonucu elde edilen DNA dizileri NCBI veri tabanında nükleotid BLAST analizleri yapılmış ve MEGA 11 programında nükleotid dizilerin çoklu dizi karşılaştırılması (Şekil 4.23, 4.24) yapılmış ve filogenetik ağaç çizilmiştir. Gen bankasında kayıtlı BYDV-MAV türüne ait sınırlı sayıda sekans kayıtları olduğu belirlenmiş ve bu yüzden az sayıda izolatla kıyaslama yapılabilmektedir. BYDV-MAV izolatlarımız ve diğer izolatlar arasında yapılan çoklu nükleik asit karşılaştırmalarında benzerlik oranı %100.0 olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.6).



Şekil 4.23. Barley yellow dwarf virüs–MAV (BYDV-MAV)’ın kısmı kılıf protein gen bölgesi için spesifik MAVL1/MAVR1 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda elde edilen izolatlar ve Gen Bankasına kayıtlı BYDV-MAV izolatlarla çizilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde MEGA 11 yazılımında yer alan Neighbor joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendogramda 1000 bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir. Filogenetik ağaçta Potato leafroll virus (PLRV) out group olarak kullanılmıştır



Şekil 4.24. Barley yellow dwarf virüs–MAV (BYDV-MAV)’ın kısmı kılıf protein gen bölgesi için spesifik MAVL1/MAVR1 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda elde edilen izolatlarla çizilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde MEGA 11 yazılımında yer alan Neighbor joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendogramda 1000 bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir

Çizelge 4.15. Gen bankasında kayıtlı bulunan ve farklı konukçulardan izole edilmiş olan BYDV-MAV kılıf protein genine ait ulaşım numarası, konukçu, ülke ve genom büyüklüğü

Sıra No	Ulaşım Numarası	Konukçu	Ülke	Uzunluk (bp)
1	KU744849	<i>Geranium dissectum</i>	Türkiye	170
2	KU744850	<i>Juncus sp</i>	Türkiye	170
3	*MT366805	<i>Solanum tuberosum</i>	Sırbistan	627

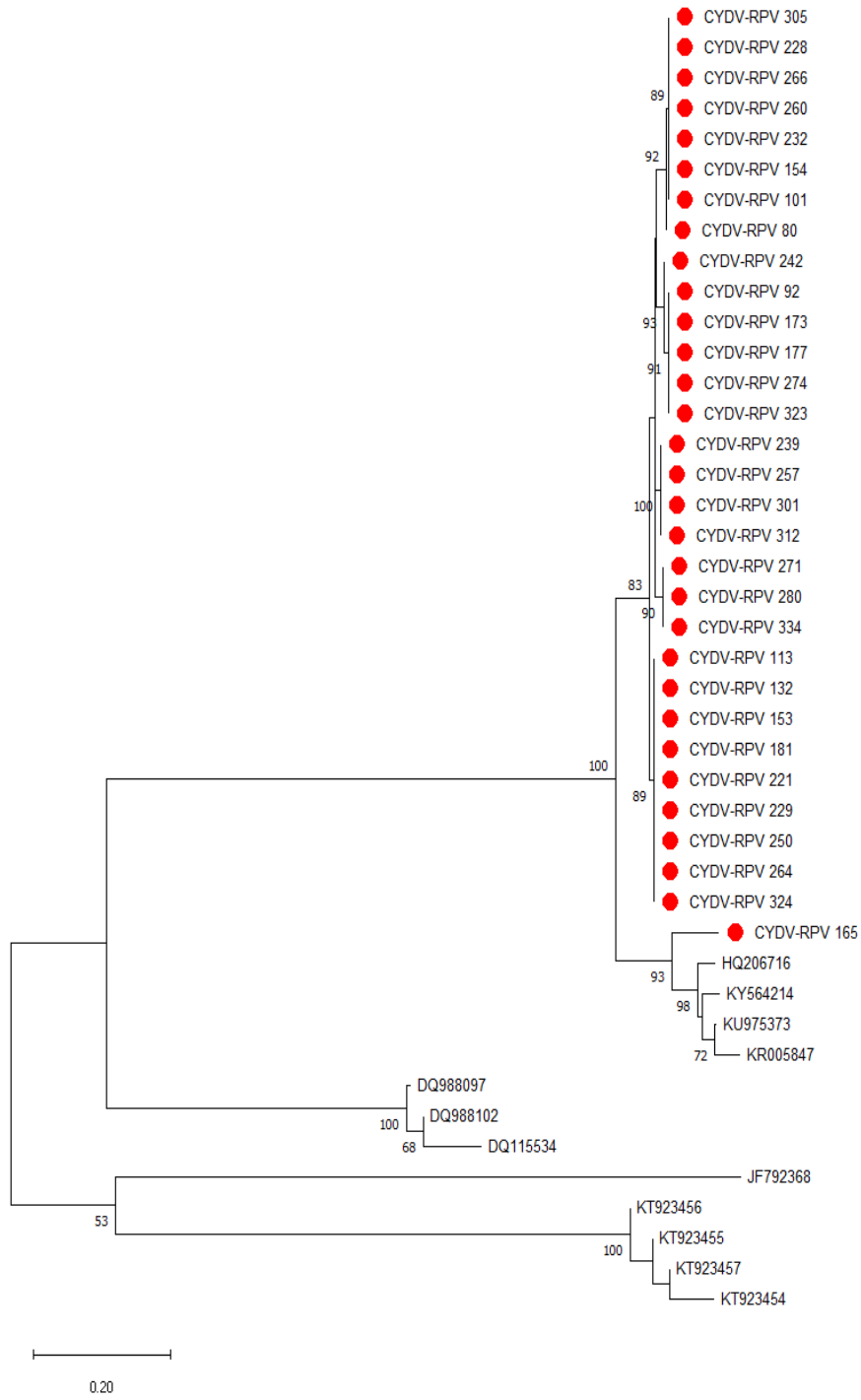
*Bu izolat Potato leafroll virus izolatı olup dış grup olarak kullanılmıştır.

Çalışma kapsamında 1, 2, 3, 4, 16, 17, 18 ve 26 no'lu genotipler hariç diğer 22 genotipten elde edilen CYDV-RPV izolatlarından 31 tanesi için çoklu nükleik asit karşılaştırılmalarında yapılmıştır. CYDV-RPV izolatlarımızın dünyada tespit edilen diğer izolatlarla %80.00-92.19 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. CYDV-RPV izolatlarının %92.19 oranla ABD DQ988097 ve DQ988102 izolatları ile %80.0 oranla Türkiye KT923454 izolatı ile benzerlik gösterdiği görülmüştür. Filogenetik ağaçta kullanılan Genbankasına kayıtlı farklı ülkelere ait CYDV-RPV izolatları Çizelge 4.7'de verilmiştir. Filogenetik ağaç oluşturulurken *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (JF792368) dış grup olarak kullanılmıştır (Şekil 4.25).

Çizelge 4.16. Gen bankasında kayıtlı bulunan ve farklı konukçulardan izole edilmiş olan CYDV-RPV kılıf protein genine ait ulaşım numarası, konukçu, ülke ve genom büyüklüğü

Sıra No	Ulaşım Numarası	Konukçu	Ülke	Uzunluk (bp)
1	DQ988097	<i>Hordeum vulgare</i>	ABD	1368
2	DQ988102	<i>Avena sativa</i>	ABD	1353
3	KY564214	<i>L. multiflorum</i>	Almanya	1075
4	KU975373	<i>Triticum aestivum</i>	Almanya	1075
5	KT923457	<i>Echinochloa crus-galli</i>	Türkiye	371
6	KT923456	<i>Hordeum bulbosum</i>	Türkiye	371
7	KT923455	<i>Bromus sterilis</i>	Türkiye	371
8	KR005847	<i>Avena sterilis</i>	Türkiye	371
9	KT923454	<i>Avena sativa</i>	Türkiye	371
10	DQ115534	<i>Avena fatua</i>	ABD	682
11	HQ206716	Barley	Ürdün	396
12	JF792368	<i>Cucumis melo</i>	Avustralya	837

CYDV-RPV izolatlarımıza ait filogenetik ağaç incelendiğinde genotiplere ait izolatların belli bir yerde toplandığı önceki çalışmalarda elde edilen Türkiye CYDV-RPV izolatlarından (KT923454, KT923455, KT923456 ve KT923457) (İlbağı ve ark. 2018) oldukça ayrı bir grupta olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların tahıllardan değil *Poaceae* familyasına ait yabancı otlardan elde edilmiş olması nedeniyle bu farklılığın meydana geldiği düşünülmektedir.



Şekil 4.25. Cereal yellow dwarf virüs–RPV (CYDV-RPV)’nin kısmi kılıf protein gen bölgesi için spesifik RPV L/RPV R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda elde edilen izolatlar ve Gen Bankasına kayıtlı CYDV-RPV izolatlarla çizilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde MEGA 11 yazılımında yer alan Neighbor joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendogramda 1000 bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir. Filogenetik ağaçta Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) dış grup olarak kullanılmıştır

4.8. Buğday genotiplerinin BYDV'ye karşı dayanıklılık çalışmaları

Buğdaylarda BYDV'ye karşı dayanıklılık konusunda yapılan araştırmalarda direnç genlerinin nadiren bulunduğu bildirilmektedir. Ana dayanıklılık genlerinin bulunmayışı ve muhtemelen buğday gen havuzundaki direnç genlerinin karakterizasyonunun zorluğu, direnci belirleyen birçok küçük etki lokusunun poligenik yapısı nedeniyle olmaktadır. Bununla birlikte, bu hastalığın ekonomik önemi nedeniyle ıslah programlarında ASC hastalığına karşı direnç geliştirmek için yoğun çalışmalar devam etmekte olup geniş çaprazlamalarla üçüncül gen havuzuna yeni kaynaklar aktarılmaya çalışılmaktadır (Silva ve ark. 2022). Dayanıklı bitkilerde virüs çoğalması engellenmektedir. BYDV'ye dayanıklılık çalışmalarında afid inokulasyonları ve DAS-ELISA testlerinin kullanılması zaman alıcı ve zor işlemlerdir. Bilinen dayanıklılık lokuslarının markör destekli seleksiyonu ile ıslah materyallerinin ve elit çeşitlerin dayanıklılık durumunun belirlenmesi ile ilgili süreç oldukça hızlı gerçekleşmektedir (Choudhury ve ark. 2019a)

Bu çalışmada farklı buğday genotiplerinin BYDV'ye karşı dayanıklılığının belirlenmesi amacıyla SSR, SCAR ve RFLP dayanıklılık markörleri kullanılmıştır. Ön çalışma niteliğinde yürütülen optimizasyon çalışmalarında SSR markörleri ile olumlu sonuç alınırken SCAR ve RFLP markörleri ile materyal metot bölümünde belirtilen PCR döngüleri kullanılarak herhangi bir amplifikasyon elde edilememiştir (Çizelge 4.8). Primerin bağlanma sıcaklıkları değiştirilerek (58, 60, 62 ve 64 °C) denenmiş ancak yine olumlu bir sonuç alınamamıştır. Bdv2 geni için geliştirilen RFLP markörlerinin daha fazla miktarda genomik DNA'ya ihtiyaç duyması ve uzun zaman alması nedeniyle SSR gibi PCR temelli markörlerin daha iyi sonuç verdiği birçok araştırmacı tarafından da bildirilmiştir (Stoutjesdijk et al. 2001; Ayala et al. 2001a; Zhang et al. 2004)

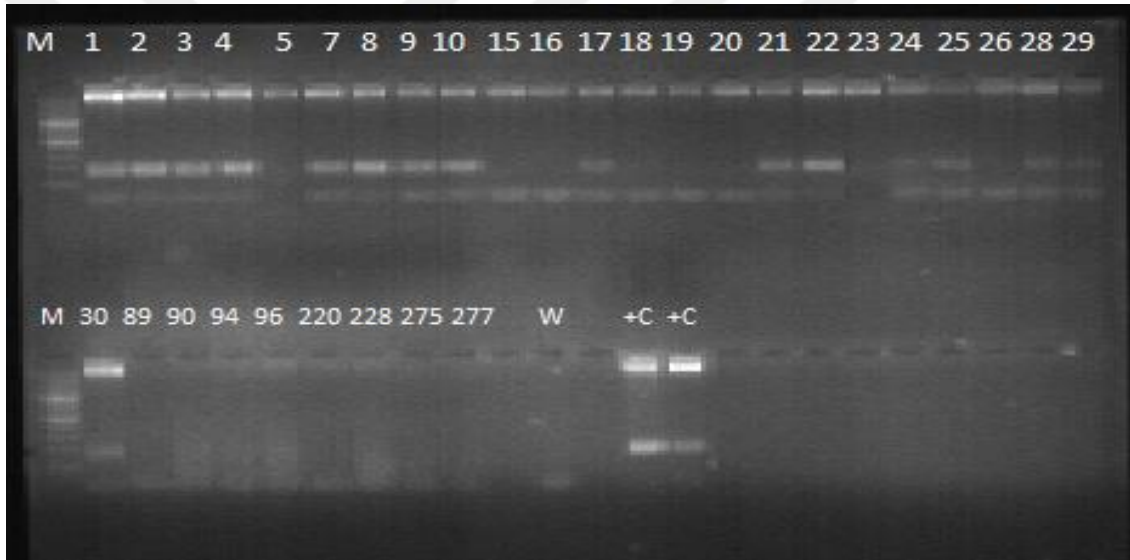
Çizelge 4.17. Buğday genotiplerinin SSR markörleri kullanılarak BYDV'ye karşı dayanıklılık açısından taranması

Genotipler	Pedigri	Markörler	
		SSR xgwm37	SSR Bdv3
1	BAV92//IRENA/KAUZ..	D	D
2	WBLL1/FRET2//PASTOR..	D	D
3	KACHU/5/NAC/TH.AC//..	D	D
4	BECARD/KACHU ..	D	D
5	KIRITATI/WBLL1//..	H	D
6	JI5418/MARAS..	D	D
7	ALMALY*2//PRL//..	D	D
8	PYN/BAU/3//..	D	D
9	KIRITATI/4/2*SERI.1B..	D	D
10	KS82W422/SWM7..	D	D
11	TRN//D215637AA/3BD2080/4..	H	H
12	CHEN/CALI//OSU-3910244//..	H	H
13	MRF1/STJ2//BCRCH1/4/ICAMOR-TA04-62//..	H	H
14	SORGÜL	H	H
15	HAVRANI	H	H
16	KARAKILÇIK	H	H
17	HEVİDİ/AKBUGDAY	D	D
18	DEVEDİŞİ	H	H
19	MENCEKİ	H	H
20	DYB1	H	D
21	DYB2	D	D
22	DYB3	D	D
23	DYB4	H	D
24	DİNÇ	H	D
25	TEKİN	D	D
26	SÜMERLİ	H	H
27	HASANBEY	H	H
28	SAGİTTARİO	D	D
29	PEHLİVAN	D	D
30	CEYHAN-99	D	D

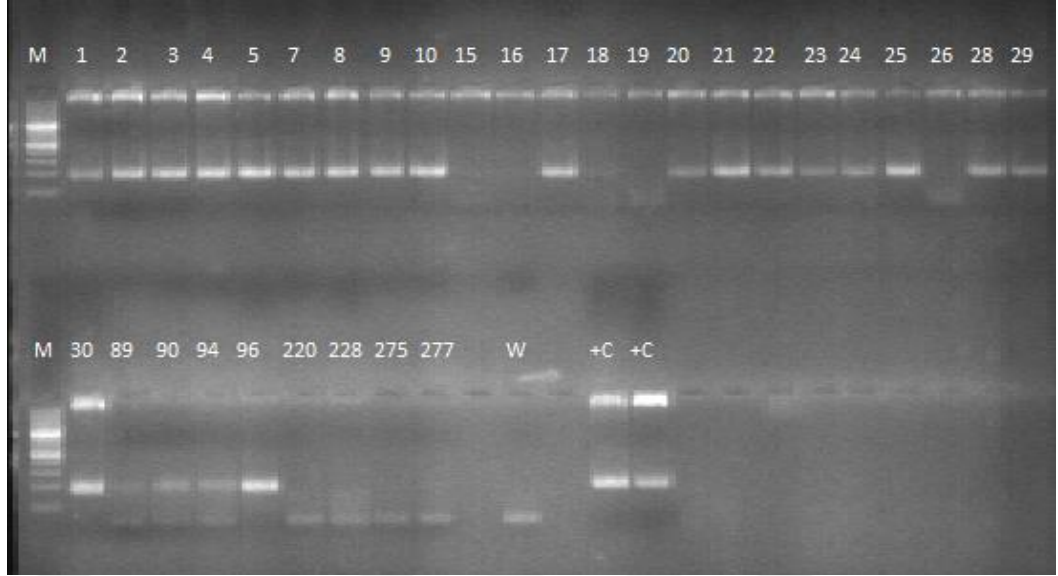
D: Dayanıklı H: Hassas

BYDV/CYDV direnç geni bulunan Anza buğday çeşidi dayanıklılık çalışmasında kullanılmıştır. SSR markörlerinde sonuç verirken yaklaşık olarak 180 bp' de görülmüştür (Ayala 2001), (Şekil 4.26, 4.27). Çalışmada Anza buğday çeşidi direnç geni pozitif olarak kabul edilerek SSR Xgwm37'de 16 genotipte (1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 17, 21, 22, 25, 28, 29, 30) ve SSR Bdv3 20 genotipte (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 17, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 29, 30) direnç geninin bulunduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre ekmeklik buğday

genotipleri makarnalık olanlara göre daha dayanıklı/tolerant olarak tespit edilmiştir. Makarnalık buğday genotipleri (11-19 ve 26,27) içinde ise sadece Hevidi/Akbuğday makarnalık buğday genotipi tolerant olarak tespit edilmiş olup diğerleri hassas olarak saptanmıştır (Çizelge 4.8). Makarnalık buğdaylarda BYDV dayanıklılığını tespit etmek için simptomolojik gözlemler yeterli olmamaktadır ve verim kayıplarının da dikkate alınması gereklidir. BYDV direnç veya tolerans genleri makarnalık buğdaylarda çok yaygın olmamakla birlikte kalıtsal direnç kaynakları nadiren de olsa bulunabilir. Ancak ekmeklik buğdaylarda (*Triticum aestivum*)'un BYDV'ye direnci, makarnalık buğdaylara (*T. durum*) göre çok daha üstündür (Cheour ve ark. 1989). Bizim çalışma sonuçlarımız da bu bulguları destekler nitelikte bulunmuştur.



Şekil 4.26. BYDV/CYDV virüsü için SSR markörü SSR xgwm37 kullanılarak yapılan PCR analizinin agaroz jel elektroforez sonucu. Saksılarda toplanan buğday örnekleri, M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD), (6): 89, 90, 94, 96 (19) :220, 228 (24): 275, 277, W: Su kontrol, +C Pozitif kontrol (birincisi Anza, ikincisi 6 no'lu genotip)



Şekil 4.27. BYDV/CYDV virüsü için SSR markörü SSRBdv3 kullanılarak yapılan PCR analizinin agaroz jel elektroforez sonucu. Saksılarda toplanan buğday örnekleri, M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD), (6): 89, 90, 94, 96 (19): 220, 228 (24): 275, 277, W: Su kontrol, +C Pozitif kontrol (birincisi Anza, ikincisi 6 no'lu genotip)

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada Diyarbakır GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi (GAP UTAEM) tarafından verim ve kalite parametreleri araştırılmış olan ve tescil için aday olarak belirlenen 13 adet buğday hattı, 10 adet Diyarbakır ili için önemli yerel buğday çeşidi ve 7 adet de ticarete mal olmuş modern buğday çeşidinin sarı cücelik hastalığına neden olan barley yellow dwarf virus (BYDV)-PAV, BYDV-MAV ve cereal yellow dwarf virüs (CYDV)-RPV türlerine karşı dayanıklılık durumunun fenotipik ve genotipik aanalizlerle belirlenmesi hedeflenmiştir. Afidlerle inokule edilen toplam 300 buğday bitkisinin DAS-ELISA ve RT-PCR analizleri sonucunda bütün genotiplerde en az bir virüs türü tespit edilmiş olup en yaygın bulunan virüs BYDV-PAV olurken bunu BYDV-MAV ve CYDV-RPV izlemiştir. Fenotipik gözlemlerin teyit edilmesi amacıyla yapılan genotipik analizlerde sarı cücelik virüslerine karşı dayanıklılıkla ilişkili Bdv2 ve Bdv3 genlerinin varlığının belirlenmesi amacıyla SSR, SCAR ve RAPD markörleri kullanılarak yapılan PCR analizleri sonucunda sadece SSR markörleri ile 16 genotipte Bdv2 geni, 20 genotipte ise Bdv3 geni ile ilişkili amplifikasyon elde edilmiştir. Genotipik olarak her iki SSR markörüyle de dayanıklı bulunan 16 genotipin fenotipik tepkileri ve RT-PCR analiz sonuçları değerlendirildiğinde hastalık simptomlarının hafif seyrettiği ancak her bir genotipin bazı tekrarlarında RT-PCR analizleri ile en az bir virüs türünün varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışma ile ilk defa verim ve kalite parametreleri araştırılmış ve tescil için aday olan genotiplerin arpa sarı cücelik hastalığına neden olan virüslere karşı dayanıklılık tepkileri incelenmiş ve gerek genotipik gerekse fenotipik analizleri yapılarak bu hastalığa karşı testlenen aday genotiplerin hiçbirisinin tamamen dayanıklı olmadığı tespit edilmiştir.

Ayrıca, bu çalışmada elde edilen BYDV izolatlarının filogenetik analizlerinde; BYDV-PAV için yapılan çoklu nükleik asit karşılaştırmalarında dünyada tespit edilen diğer izolatlarla en çok %100 benzerlik gösterdiği bulunmuştur. BYDV-MAV için yapılan çoklu nükleik asit karşılaştırmalarında ise dünya izolatlarıyla %100.0 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. CYDV-RPV için yapılan çoklu nükleik asit karşılaştırmalarında dünyada tespit edilen diğer izolatlarla kendi aralarında benzerlik oranları daha düşük bulunmuş olup (%80.00- 92,19) bu izolatların dünya izolatlarından oldukça farklı oldukları belirlenmiştir.

Bu çalışma ile sarı cücelik virüslerine dayanıklı buğday genotiplerinin markör destekli seleksiyon yöntemi ile belirlenmesi uzun yıllar boyunca çalışılan klasik buğday ıslahına birçok katkı sağlayacaktır. Çünkü klasik ıslah çalışmalarında amaca uygun özelliklere sahip ebeveyn seçimi ile seçilen ebeveynlerin üzerinde melezleme yapılarak varyasyon oluşturulması, 4-5 yıl geriye melezleme yapılarak amaca uygun seleksiyonların yapılması, ileri kademe genotiplerin seçilmesi için farklı lokasyonlarda verim denemelerinin kurulması ve ardından aday çeşitlerin tescile gönderilerek oluşan süreç 14-15 yıl sürmektedir. Buğday bitkisi klasik ıslah çalışmalarının uzun yıllar alması modern tekniklerin ve moleküler genetik bilgilerinin kullanıldığı daha kısa sürede yapılabilen çalışmalara ihtiyaç doğurmuştur. Markör çalışmaları ile laboratuvar koşullarında dayanıklı olduğu belirlenen genotiplerin ıslah materyali olarak kullanılabilecek olması, bu konuda çalışan araştırmacılara zaman, maliyet ve hız kazandırmaktadır. Buna ek olarak; klasik ıslah veya moleküler yöntem ile elde edilen sarı cücelik virüslerine dayanıklı buğday çeşitlerinin kullanımı hastalığın oluşturduğu ekonomik kayıpları önlemek için en etkili kültürel önlemlerden birisidir.

Yapılan bu çalışma sonucundan elde edilen bulgulardan yola çıkarak;

- 30 buğday genotipinin farklı moleküler markörler ile (SCAR, RFLP ve SSR) Bdv2/Bdv3 geninin varlığının araştırılması sonucunda en etkin markörün SSR markörü olduğu belirlenmiştir. Ancak bu konuda validasyon çalışmalarının devam etmesi gereklidir.
- Buğday genotiplerinde YDV'ye dayanıklılıkta rol oynayan Bdv2/Bdv3 geninin dışında diğer dayanıklılık genlerinde (Bdv1, 4) araştırılması gerekmektedir.
- YDV'ye dayanıklılığı sağlayan Bdv2/Bdv3 geninin SSR markörleri ile belirlendiği direnç geninin bulunduğu genotipler üzerinde diğer markörlerle desteklenerek bu genotiplerin buğday ıslah programlarında materyal olarak kullanılması önerilmektedir.
- Buğday genotipleri makarnalık olanlara göre daha dayanıklı/tolerant bulunmuştur. Makarnalık buğday genotipleri içinde ise sadece Hevidi/Akbuğday makarnalık buğday genotipi dayanıklı/tolerant olarak tespit edilmiş olup gelecekteki ıslah çalışmaları için ekmeklik buğday genotiplerinin yanı sıra bu yerel çeşidin de kullanılması önerilmektedir.

- Sarı cücelik virüslerinin bir konukçudan başka bir konukçuya taşınması vektör böcekler yaprak bitleri tarafından gerçekleşmektedir. Virüslerin yayılmasında ana etken olan vektör böceklerin populasyon miktarı ve türleri farklı olabilmektedir. Buğday tarımında sarı cücelik virüslerine karşı dayanıklı genotiplerin kullanılması ile bu hastalığın vektörleriyle mücadele sırasında daha az oranda ve daha az kimyasalın kullanılması mümkün olacaktır. Dolayısıyla da kimyasalların az kullanılması hem çevre ve insan sağlığına dost bir yaklaşım olup hem de daha ekonomik olarak buğday üretiminin gerçekleştirilmesi mümkün hale gelecektir.



KAYNAKLAR

- Anderson, J.M., Bucholtz, D.L., Greene, A.E., Francki, M.G., Gray, S.M., Sharma, H., Ohm, H.W., Perry, K.L., 1998. Characterization of wheatgrass-derived barley yellow dwarf virus resistance in a wheat alien chromosome substitution line. **Phytopathology** 88, 851-855.
- Anonim, 2020. TMO. Toprak Mahsulleri Ofisi Genel Müdürlüğü 2020 yılı hububat sektör raporu Ankara, <http://www.tmo.gov.tr/Upload/Document/sektorraporlari/hububat2020.pdf>. (Erişim Tarihi:01.06.2022).
- Anonymous, 2021. <https://www.igc.int/en/default.aspx> (Erişim Tarihi:25.06.2022).
- Ay, Z., Kerényi, Z., Takács, A., Papp, M., Petróczi, I. M., Gáborjányi, R., Silhavy, D., Pauk J., Kertész, Z., 2008. Detection of cereal viruses in wheat (*Triticum aestivum* L.) by serological and molecular methods. **Cereal Research Communications**, 36(2): 215–224.
- Ayala, L., Henry, M., Gonzalez-de-Leon, D., Van Ginkel, M., Mujeeb-Kazi, A., Keller, B., & Khairallah, M., 2001. A diagnostic molecular marker allowing the study of Th. intermedium-derived resistance to BYDV in bread wheat segregating populations. **Theoretical and Applied Genetics**, 102(6), 942-949.
- Ayala, L., Henry, M., Van Ginkel, M., Singh, R., Keller, B., & Khairallah, M., 2002. “Identification of QTLs for BYDV tolerance in bread wheat”, **Euphytica**, 128(2), 249- 259.
- Balaji, B., Bucholtz, D. B., & Anderson, J. M., 2003. Barley yellow dwarf virus and Cereal yellow dwarf virus quantification by real-time polymerase chain reaction in resistant and susceptible plants. **Phytopathology**, 93(11), 1386-1392.
- Banks, P.M., Larkin, P.J., 1995. Registration of three BYDV-resistant wheat germplasms: TC5, TC6, and TC9. **Crop Sci.** 35, 600–601.
- Banks, P. M., Larkin, P. J., Bariana, H. S., Lagudah, E. S., Appels, R., Waterhouse, P. M., ... & Zhou, G. H., 1995. The use of cell culture for subchromosomal introgressions of barley yellow dwarf virus resistance from *Thinopyrum intermedium* to wheat. **Genome**, 38(2), 395-405.
- Barba, M. and Riccioni, L., 1993. Improvement of diagnostic methods to detect plum pox virus in apricot plants. **Agriculture**, 139- 141.
- Başaran, M., Karaman, M., Okan M, Bilge, U., & Okur, D., 2020. Ekmeklik buğdayda (*Triticum aestivum* L.) kalite özellikleri ile tane veriminin etkileşimi ve uygun genotip seçimi. **ISPEC Journal of Agricultural Sciences**, 4(3), 609-622.
- Braun, H. J., Atlin, G., & Payne, T., 2010. Multi-location testing as a tool to identify plant response to global climate change. **Climate Change and Crop Production**, 1, 115-138.
- Bremer, K., 1971. *Wheat streak mosaic virus* in Turkey. **Phytopathologia mediterranea**, 10 (3): 280-282.
- Bremer, K., Raatikainen, M., 1975. “Cereal disease transmitted or caused by aphids and leafhoppers in Turkey”, **Ann. Acad. Sai. Fenn. A. IV. Biologica**, 203, 1-14.
- Brettell, R. I. S., Banks, P. M., Cauderon, Y., Chen, X., Cheng, Z. M., Larkin, P. J., & Waterhouse, P. M., 1988. A single wheatgrass chromosome reduces the concentration of barley yellow dwarf virus in wheat. **Annals of Applied Biology**, 113(3), 599-603.

- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L., 1996. Viruses of plants descriptions and lists from the VIDE database. Wallingford, UK, **CAB International**. p:1484.
- Chay, C. A., Smith, D.M., Vaughan, R., Gray, S.M., 1996. Diversity among isolates within the PAV serotype of barley yellow dwarf virus. **Phytopathology**, 86: 370-77
- Cheour, F., Comeau, A., & Asselin, A., 1989. Genetic variation for tolerance or resistance to barley yellow dwarf virus in durum wheat. **Euphytica**, 40(3), 213-220.
- Choudhury, S., Hu, H., Meinke, H., Shabala, S., Westmore, G., Larkin, P., Zhou, M., 2017. "Barley yellow dwarf viruses: infection mechanisms and breeding strategies", **Euphytica**, 213(8), 168.
- Choudhury, S., Larkin, P., Xu, R., Hayden, M., Forrest, K., Meinke, H., ... & Fan, Y., 2019a. Genome wide association study reveals novel QTL for barley yellow dwarf virus resistance in wheat. **BMC genomics**, 20(1), 1-8.
- Choudhury, S., Larkin, P., Meinke H, Hasanuzzaman, MD, Johnson, P, Zhou M., 2019b. Barley yellow dwarf virus infection affects physiology, morphology, grain yield and flour pasting properties of wheat. **Crop Pasture Sci.** 70(1):16–25. doi:10.1071/CP1836
- Cisar, G., Brown, C. M., & Jedlinski, H., 1982. Diallel analyses for tolerance in winter wheat to the barley yellow dwarf virus 1. **Crop Science**, 22(2), 328-333.
- Clark, M.F., and Adams, A.M., 1977. Characteristics of the 8 16 2 microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **J. Gen. Virol.** 34: 475-483.
- Clark, M.F., 1981. Immunosorbent assay plant pathology. **Ann. Rev. Phytopathology**, 19: 83-106.
- Conti M, D'Arcy CJ, Jedlinski H, Burnett PA., 1990. The yellow plague of cereals, barley yellow dwarf virus (No. 91-013855. CIMMYT.).
- Çapkan, D., 2015. Ege bölgesi buğday üretim alanlarında BYDV (barley yellow dwarf virus)'nin bulunma durumunun ve moleküler özelliklerinin belirlenmesi üzerinde araştırmalar. **Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, Yüksek Lisans Tezi.
- D'Arcy CJ., 1995. Symptomatology and host range of barley yellow dwarf. In: D'Arcy CJ, Burnett PA, eds. **Barley Yellow Dwarf - 40 Years of Progress**. St. Paul, USA: APS Press, 9-28.
- D'Arcy CJ, Domier LL, Mayo MA., 2000. Family luteoviridae. In virus taxonomy: **Seventh Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses**, ed. MHV van Regenmortel, CM Fauquet, DHL Bishop, EB Carstens, MK Estes, et al., pp. 775–84. San Diego: Academic
- Dayan, S. S., 2013. Tekirdağ ili buğday ekim alanlarında ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşitlerinde görülen tahıl virüs hastalıklarının buğday kalitesi üzerine etkilerinin araştırılması. **Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, Yüksek Lisans Tezi.
- Deb M and Anderson Jm., 2007. Development of a multiplexed PCR method for barley and cereal yellow dwarf viruses, Wheat spindle streak virus, Wheat streak mosaic virus and Soil-borne wheat mosaic virus. **Journal of Virological Methods** 148:17-24.

- Delfosse, VC., Barrios Barón MP, Distéfano AJ., 2021. What we know about poleroviruses: advances in understanding the functions of polerovirus proteins. **Plant Pathol.** 70:1047–61
- Deligöz, İ., Kahveci Caner, Y. ve Akyol, H., 2011. Samsun ve Amasya illerinde buğday üretim alanlarında infeksiyona neden olan barley yellow dwarf virus-PAV ve barley yellow dwarf virus-MAV virüslerinin araştırılması, **Bitki Koruma Bülteni** 2011, 51(2): 187-193.
- Delmiglio, C., Pearson, M. N., Lister, R. A., & Guy, P. L., 2010. Incidence of cereal and pasture viruses in New Zealand's native grasses. **Annals of Applied Biology**, 157(1), 25-36.
- Domier, L.L., 2012. Family Luteoviridae. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. & Lefkowitz, E.J. (Eds). **Virus taxonomy.9th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier/Academic Press. Oxford, UK: 1045-1053.
- Duveiller, E., SinghJulie R.P., Nicol, M., 2007. The challenges of maintaining wheat productivity: pests, diseases, and potential epidemics. **Euphytica**, 157(3): 417–430.
- 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): 224-233
- Erkan, E., 2008. Samsun ili buğday üretim alanlarında infeksiyon oluşturan virüslerin saptanması. **Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, Yüksek Lisans Tezi.
- 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): 51–60.
- Farrell, J. A., & Stufkens, M. W., 1990. The impact of *Aphidius rhopalosiphii* (Hymenoptera: Aphidiidae) on populations of the rose grain aphid (*Metopolophium dirhodum*)(Hemiptera: Aphididae) on cereals in Canterbury, New Zealand. **Bulletin of Entomological Research**, 80(4), 377-383.
- Foresman, B. J., Oliver, R. E., Jackson, E. W., Chao, S., Arruda, M. P., & Kolb, F. L., 2016. Genome-wide association mapping of barley yellow dwarf virus tolerance in spring oat (*Avena sativa* L.). **PloS one**, 11(5), e0155376.
- Fouly, H. M., Domier, L. L., & D'arcy, C. J., 1992. A rapid chemiluminescent detection method for barley yellow dwarf virus. **Journal of virological methods**, 39(3), 291-298.
- Francia, E., Tacconi, G., Crosatti, C., Barabaschi, D., Bulgarelli, D., Dall'Aglio, E., & Valè, G., 2005. Marker assisted selection in crop plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 82(3), 317-342.
- Gaunce, G.M., Bockus W.W., 2015. Estimating yield losses due to barley yellow dwarf on winter wheat in Kansas using disease phenotypic data. **Plant Health Progress**, 16(1): 1-6.
- Guy P.L, Johnstone G.R, Duffus J.E., 1986. Occurrence and identity of barley yellow dwarf viruses in Tasmanian pasture grasses. **Crop and Pasture Science**, 37(1), 43-53.

- Habili, N., McInnes, J. L., & Symons, R. H., 1987. Nonradioactive, photobiotin-labelled DNA probes for the routine diagnosis of barley yellow dwarf virus. **Journal of virological methods**, 16(3), 225-237.
- Hamamcı, G., 2012. Tekirdağ ili'nde ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) alanlarında yaygın olarak görülen virüs hastalıklarına karşı bazı çeşitlerin reaksiyonlarının saptanması üzerine araştırmalar. **Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, Yüksek Lisan Tezi, 37 sayfa
- Hassan, N.Ö., 2018. Diyarbakır ili buğday (*Triticum aestivum* L.) tarlalarında arpa sarı cücelik virüsleri'nin multipleks Rt-Pcr İle araştırılması ve moleküler karakterizasyonu **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi**, 71 sayfa
- Hauser, S., Stevens, M., Mougél, C., Smith, H.G., Fritsch, C., Herrbach, E. and Lemaire, O., 2000. Biological, serological, and molecular variability suggest three distinct polerovirus species infecting beet or rape. **Phytopathology**, 90(5), pp.460-466.
- Hofmann, T.K. and Kolb F.L., 1998. Effects of barley yellow dwarf virus on yield and yield components of drilled winter wheat. **Plant Diseases**, 82, 620-624 p.
- Hollandbeck, GF, DeWolf E, Todd T., 2019. Kansas cooperative plant disease survey report. Preliminary 2019 Kansas wheat disease loss estimates. October 2, 2019. <https://agriculture.ks.gov/divisionsprograms/plant-protect-weed-control/reports-and-publications>.
- Irwin, M.E., Thresh, J.M., 1992. BYDV epidemiology: A study in ecological complexity. In: Comeau, A., Makkouk, K.(Eds.). **BYDV in West Asia and North Africa**. Sayce Publishing, Exeter, UK. pp, 3-30.
- ICTV., 2021. Virus taxonomy: 2020 release. **International Committee on Taxonomy of Viruses**. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- İlbağı, H., 2003. Trakya bölgesinde üretimi yapılan bazı tahıl türlerinde verim kayıplarına neden olan viral kökenli enfeksiyonların etmenlerinin tanılanması. **Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü**, Doktora Tezi, İzmir.
- İlbağı, H., 2017. Tahıl üretim alanlarında sarı cücelik virüs hastalıkları (Yellow dwarf virus diseases) epidemisi ve mücadelesi. **Bitki Koruma Bülteni**, 57(3) : 317 – 335
- İlbağı, H., Çıtır, A., Adnan, K. A. R. A., & Uysal, M., 2018. Poaceae Weed Hosts of Yellow dwarf viruses (YDVs) in the Trakya Region of Turkey. **Ekin Journal of Crop Breeding and Genetics**, 4(2), 8-19.
- İlbağı, H., Adnan, K. A. R. A., Çıtır, A., & Uysal, M., 2021. Trakya bölgesi tahıl üretim alanlarındaki sarı cücelik virüs hastalıklarının doğal konukçusu yabancı ot türleri. **Turkish Journal of Weed Science**, 24(1), 1-12.
- Jacobi, V., Bachand, G. D., Hamelin, R. C., & 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(2), 167-178.
- Jahier J, Chain F, Barloy D, Tanguy AM, Lemoine J, Riault G, Margalé E, Trottet M, Jacquot E., 2009. Effect of combining two genes for partial resistance to barley yellow dwarf virus-PAV (BYDV-PAV) derived from *Thinopyrum intermedium* in wheat. **Plant Pathol.** ;58:807–814.

- Jensen, S. G., & Van Sambeek, J. W., 1972. Differential effects of barley yellow dwarf virus on the physiology of tissues of hard red spring wheat. **Phytopathology**, 62(2), 290.
- Kapan, O., 2022. Şırnak ili buğday üretim alanlarındaki arpa sarı cücelik virüs (barley yellow dwarf viruses; Bydvs)'lerinin multipleks Rt-Pcr yöntemiyle araştırılması ve bazı virüs izolatlarının moleküler karakterizasyonu **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi**, 77 sayfa
- Karaozan, A., 2019. Mardin ili buğday üretim alanlarındaki arpa sarı cücelik virüs (barley yellow dwarf viruses; Bydvs)'lerinin multipleks Rt-Pcr yöntemi ile araştırılması ve bazı virüs izolatlarının moleküler karakterizasyonları **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi**, 90 sayfa
- Kausar, S., Hameed, S., Saleem, K., ul Haque I, Zamurad M, Ashfaq M., 2015. Molecular confirmation of Bdv2 gene in wheat germplasm and its field based assessment for resistance against barley yellow dwarf viruses. **Adv Life Sci** 3:16–22.
- Kendall, D.A., George, S. ve Smith, B.D., 1996. Occurrence of Barley yellow dwarf viruses in some common grasses (Gramineae) in South West England, **Plant Pathology**, 45(1): 29-37.
- Kılıç, H. Ç., Yardımcı, N., & Toman, D., 2019. Afyonkarahisar ve Isparta illerindeki buğday üretim alanlarında Barley yellow dwarf virus-PAV ve Barley yellow dwarf virus-MAV'ın belirlenmesi. **Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi**, 34(1), 129-134.
- Kılıç, H., Hatipoğlu, A., Şahin, M., 2021. İnsan sağlığı esaslı ekmeklik buğday kalite yaklaşımları. **Muş Alparslan Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi**, 9(1), 857-870.
- Kong, L., Anderson, J.M., Ohm, H.W., 2009. Segregation distortion in common wheat of a segment of *Thinopyrum intermedium* chromosome 7E carrying Bdv3 and development of a Bdv3 marker. **Plant Breed.** 128, 591–597.
- Krueger, E.N., Beckett, R., Gray, S.M., Miller, W.A., 2013. The complete nucleotide sequence of the genome of Barley yellow dwarf virus-RMV reveals it to be a new Polerovirus distantly related to other yellow dwarf viruses. **Frontiers Microbiology**, 4: 205.
- Kün, E., 1996. Tahıllar-I (Serin İklim Tahılları). **Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları**, Yayın No: 1451, Ankara.
- Lin, Z. S., Cui, Z. F., Zeng, X. Y., Ma, Y. Z., Zhang, Z. Y., Nakamura, T., ... & Xin, Z. Y., 2007. Analysis of wheat-*Thinopyrum intermedium* derivatives with BYDV-resistance. **Euphytica**, 158(1), 109-118.
- Lister, R.M., Ranieri, R., 1995. Distribution and economic importance of barley yellow dwarf. In J.C. D'Arcy and P.A. Burnett, eds. **Barley Yellow Dwarf, 40 Years of Progress**, p. 29- 53. St. Paul, MN, USA, APS Press.
- Liu, H.Y., Wisler, G.C., Wintermantel, W.M. Sears, J.L., 2001. Differentiation of poleroviruses in sugarbeet. **J. Sugar Beet Res.** 38(1):84.
- Makkouk, K.M., Azzam, O.I., Skaf J, El-Yamani, M., Cherif C, Zouba A., 1990. Situation review of Barley yellow dwarf virus in West Asia and North Africa. In Burnett

- PA (Ed.): **World Perspectives on Barley Yellow Dwarf**. CIMMYT, Mexico, D.F., Mexico, pp. 61–65.
- Makkouk, K.M., Najar, A., Kumari, S., 2001. First record of Barley yellow dwarf and Cereal yellow dwarf viruses in Tunisia. **Plant. Pathol.** 50, 806. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00629.x>
- 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– 218.
- Mangwende, T., Wang, M.L., Borth, W., Hu, J., Moore, P.H., Mirkov, E.T. Albert, H.H.2009. The P0 gene of Sugarcane yellow leaf virus encodes an RNA silencing suppressor with unique activities. **Virology**, 384: 38–50.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Miller, W.A. and Rasochová, L., 1997. Barley yellow dwarf viruses, **Annual Review of Phytopathology**, 35: 167-190.
- Miller, W. A., Lozier, Z. 2022. Yellow dwarf viruses of cereals: Taxonomy and molecular mechanisms. **Annu. Rev. Phytopathol.** 60:6.1-6.21
- Moon, J. S., Allen, R. G., Domier, L. L., Hewings, A. D., 2000. Molecular and biological characterization of a trackable Illinois isolate of Barley yellow dwarf virus - PAV. **Plant Dis.** 84: 483–486.
- McIntosh, R. A., Devos, K. M., Dubcovsky, J., & Rogers, W. J., 2001. Catalog of gene symbols for wheat: **Supplement** pp 14.
- Najar A, Makkouk KM, Boudhir H, Kumari S, Bessai R, Ben Othman F., 2000. Viral diseases of cultivated legume and cereal crops in Tunisia. **Phytopathol. Mediterr.** 39,423–432
- Ohm, H., & Anderson, J., 2007. Utilization and performance in wheat of yellow dwarf virus resistance transferred from *Thinopyrum intermedium*. In **Wheat production in stressed environments** (pp. 149-152). Springer, Dordrecht.
- Osler, R., Burnett PA, Cuéllar E., 1984. Rice giallume, a disease related to barley yellow dwarf in Italy. In Barley Yellow Dwarf, **a Proceedings of the Workshop** December 6-8, 1983 CIMMYT Mexico, sponsored by the United Nations Development Programme and CIMMYT (pp. 125-131). Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo.
- Oswald, J.W., Houston, B.R., 1951. A new virus disease of cereals, transmissible by aphids. **Plant Dis. Rep.** 35: 471-475.
- Oswald, J.W., Houston B. E. 1953. The yellow-dwarf virus disease of cereal crops. **Phytopathology** 43:128–36
- Parizoto, G, Rebonatto A, Schons J, Lau D., 2013. Barley yellow dwarf virus -PAV in Brazil: Seasonal fluctuation and biological characteristics. **Tropical Plant Pathology**, 38:11–19. (<https://doi.org/10.1590/S1982-56762013000100002>).
- Paylan., 2011. Bazı sebze türlerinin tohumlarındaki virüslerin belirlenmesi ve tohumlardaki viral enfeksiyonların inaktifleştirilmesi üzerinde araştırmalar. **Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.**172 sayfa

- Perry, K.L., Kolb, F.L., Sammons, B., Lawson, C., Cisar, G., Ohm, H., 2000. Yield effects of Barley yellow dwarf virus in soft red winter wheat. **Phytopathology** 90, 1043–1048.
- Peter, K.A., Gildow, F., Palukaitis, P. Gray, S.M. 2009. The C terminus of the polerovirus P5 readthrough domain limits virus infection to the phloem. **J. Virol.** 83: 5419–5429.
- Pike, K. S., 1990. A review of Barley yellow dwarf virus grain yield losses. In P.A. Burnett, ed. **World perspectives on Barley yellow dwarf**, Mexico, DF, CIMMYT.p: 356- 361.
- Polat, K., 2021. Tarım Ürünleri Piyasaları. Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü.<https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20Tar%C4%B1m%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Piyasalar%C4%B1/2021-Haziran%20Tar%C4%B1m%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Raporu/Bu%C4%9Fday,%20Haziran2021,%20Tar%C4%B1m%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Piyasa%20Raporu,%20TEPGE.pdf>
- Poudel, B., Wintermantel, W. M., Cortez, A. A., Ho, T., Khadgi, A., and Tzanetakis, I. E. 2013. Epidemiology of Blackberry yellow vein associated virus. **Plant Dis.** 97:1352-1357.
- Rochow, W.F., 1969. Biological properties of four isolates of barley yellow dwarf virus. **Phytopathology** 59:1580–89 106.
- Rochow, W.F., Muller I., 1971. Fifth variant of barley yellow dwarf virus in New York. **Plant Dis. Rep.** 55:874–77
- Robertson, N. L., French, R., Gray, S. M., 1991. Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. **J. Gen. Virol.** 72: 1473-1477.
- Rott ME, Jelkmann W 2001. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR) and modification of an RNA extraction protocol. **European Journal of Plant Pathology** 107:411-420.
- Sadeghi, S. E., Bjur, J., Ingwell, L., Unger, L., Bosque-Pérez, N. A., & Eigenbrode, S. D., 2016. Interactions between *Metopolophium festucae cerealium* (Hemiptera: Aphididae) and barley yellow dwarf virus (BYDV-PAV). **Journal of Insect Science**, 16(1).
- Sathees, K., 2015. Sequence characterization of Barley yellow dwarf virus – OYV. Sveriges lantbruksuniversitet/Swedish University of Agricultural Sciences. The Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences Department of Plant Biology-Master’s programme.
- Shah, S. J. A., Bashir, M., & Manzoor, N., 2012. A review on barley yellow dwarf virus. **Crop Production for Agricultural Improvement**, 747-782.
- Sharma, H., Ohm, H., Goulart, L., Lister, R., Appels, R., Benlhabib, O., 1995. Introgression and characterization of barley yellow dwarf virus resistance from *Thinopyrum intermedium* into wheat. **Genome** 38, 406–413.
- Siddiqui, N. N., Ilyas, M., Mansoor, S., Azhar, A. and Saeed, M., 2012. Cloning and phylogenetic analysis of coat protein of barley yellow dwarf virus isolates from different regions of Pakistan, **Journal of Phytopathology**, 160(1): 13–18.

- Silva, P., Evers, B., Kieffaber, A., Wang, X., Brown, R., Gao, L., ... & Poland, J., 2022. Applied phenomics and genomics for improving barley yellow dwarf resistance in winter wheat. **G3**, 12(7), jkac064.
- Singh, R.P., Burnett, P.A., Albarran, M., Rajaram, S., 1993. Bdv1: a gene for tolerance to Barley yellow dwarf virus in bread wheats. **Crop Sci.** 33, 231–234.
- Sökmen, M., 2005. Genetik yapısı değiştirilmiş bitkiler ve bitki koruma amaçlı kullanımı. **Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi**, 20(3), 105-109.
- Stoutjesdijk, P., Kammholz, S.J., Kleven, S., Matsay, S., Banks, P.M., Larkin, P.J., 2001. PCR based molecular marker for the Bdv2 *Thinopyrum intermedium* source of barley yellow dwarf virus resistance in wheat. **Crop Pasture Sci.** 52 (12), 1383–1388.
- Svanella-Dumas, L., Candresse, T., Hullé, M., & Marais, A., 2013. Distribution of barley yellow dwarf virus-pav in the sub-antarctic Kerguelen Islands and characterization of two new luteovirus species. **Plos one**, 8(6), e67231.
- Şahin, M., Akçacık, A. G., Aydoğan S., Yakışır, E., 2016. Orta Anadolu Sulu Koşullarında Bazı Kışlık Ekmeklik Buğday Genotiplerinin Verim ve Kalite Performanslarının Belirlenmesi. **Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi**, 25 (1):19-23
- Tadesse, W., Sanchez-Garcia M., Gizaw Assefa S., Amri A., Bishaw Z., Ogbonnaya FC., Baum M., 2019. Genetic gains in wheat breeding and its role in feeding the world. **Crop Breed Genetics Genomics**, 1 1-28,
- Tamura, K., Stecher G., and Kumar S., 2021. MEGA 11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution** <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Usta, M., 2013. Doğu Anadolu Bölgesi'nde buğday üretim alanlarındaki bazı buğday virüslerinin multipleks Rt-Pcr yöntemi ile araştırılması ve virüs izolatlarının moleküler karakterizasyonu. **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı Doktora Tezi**, 153 sayfa
- Wiese, M. V., 1987. Compendium of wheat diseases, 2nd ed. St Paul, MN, USA, **APS Press**. 112 pp.
- Xin, Z.Y., R.I.S. Brettell, Z.M. Chen, P.M. Waterhouse, R. Appels, P.M. Banks, G.H. Zhou, X. Chen & Larkin P.J., 1988. Characterization of potential source of barley yellow dwarf virus resistance for wheat. **Genome**, 30: 250-257
- Xin Z.Y, Zhang Z.Y, Lin Z.S, Chen X, Xu H.J, Ma Y.Z, Wu D.L, Xu Q.F, Du L.P, Banks P.M. 2002. Advances in breeding wheat for BYDV resistance using biotechnology. Barley Yellow Dwarf Dis.: Recent Adv. **Future Strategies**, 67.
- Van Ginkel, M., & Henry, M., 2002. Breeding for BYDV tolerance/resistance in CIMMYT bread wheats targeted to developing countries. *Barley Yellow Dwarf Disease: Recent Advances and Future Strategies*. Henry, M., and A. McNab, eds, 93-96.
- Yorgancı, S., 2021. Bazı buğday genotiplerinin barley yellow dwarf virus (BYDV)'ne markör destekli seleksiyon ile dayanıklılıklarının belirlenmesi ve reaksiyonlarının değerlendirilmesi **Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı Doktora Tezi**, 128 sayfa
- Yurdakul, S., Çalı, S., Baklacı, S., 1987. Orta Anadolu'da buğdayda görülen hastalık belirtilerinin virüs yönünden incelenmesi, **Bölge Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü**, E-104835 No'lu proje özeti, Ankara, s.1.

- Zhang, Z., Xin, Z., Ma, Y., Chen, X., Xu, Q., Lin, Z., 1999. "Mapping of a BYDV resistance gene from *Thinopyrum intermedium* in wheat background by molecular markers", *Sci. China Ser., C: Life Sci.*, 42 (6), 663–668.
- Zhang, S., & Klessig, D. F., 2001. "MAPK cascades in plant defense signaling", **Trends in plant science**, 6(11), 520-527.
- Zhang, Z.Y., Wang, L.L., Xin, Z.Y., Lin, Z.S., 2002. Development of new PCR markers specific to a *Thinopyrum intermedium* chromosome 2Ai-2 and cloning of the St-specific sequences. **Acta Genet. Sin.** 29 (7), 627–633.
- Zhang, Z., Xu, J., Xu, Q., Larkin, P., Xin, ZY., 2004. Development of novel PCR markers linked to the BYDV resistance gene Bdv2 useful in wheat for marker-assisted selection. **Theoretical and Applied Genetics**, 109(2), 433-439.
- Zhang, Z., Lin, Z., Xin, Z., 2009. Research progress in BYDV resistance genes derived from wheat and its wild relatives. **J. Genet. Genomics** 36, 567–573.
- Ziegler-Graff, V., Brault, V., Mutterer, D., Simonis, M.T., Herrbach, E., Guilley, H., Richards, K.E. Jonard, G. 1996. The coat protein of beet western yellows luteovirus is essential for systemic infection but the viral gene products P29 and P19 are dispensable for systemic infection and aphid transmission. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 9: 501-510.

EKLER

EK-1

SİLİCA RNA EXT. BUFFER(1000 ml) (Rott and Jelkmann-2001)

24,2 g Tris- Base
12,66 g LiCl
15 g SDS 2,92 g
EDTA veya 3,72 g EDTA*2H₂O
10 g Sodium Deoxycholate 10 ml NP- 40
% 1 β -MCE (Kullanmadan hemen önce eklenmelidir).

5,8 M POTASYUM ASETAT (pH 6.5) (100 ml)

60 ml 5 M Potasyum Asetat (pH 7.5)
28,5 ml H₂O
11,5 ml Glesial asetic asit
1 M Katı Potasyum Asetat

SİLİCA WASH BUFFER (1000 ml) (Rott and Jelkmann-2001)

10 mM Tris- HCl (pH 7.5)
1 ml 0.5 M EDTA
1 ml 5M NaCl
500 ml 100% EtOH
479 ml sterile H₂O

TE BUFFER (pH 8) (1000 ml) (Rott and Jelkmann-2001)

10 ml 1 M Tris- HCl (pH 8)
2 ml 0,5 M EDTA
Steril H₂O ile tamamlanır.

EK-2

AGARUZ JEL ELEKTROFEREZ (Maniatis ve ark., 1982)

TAEX50 (100 ml)

0.5 M EDTA pH:8	10 ml
0.6 Glacial acetic acide	5.71 ml
Trizma base	24,2 g

Çözelti 100 ml d₂H₂O'ya tamamlanıp otoklavlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

PCR ürününün yükleme ortamı (15 ml 6X stok için)

Bromophenol blue	15 ml
Glycerol	18 g
TAEX50	6 ml

Hazırlanan ortam -20 °C'de saklanmıştır.

%1 Agaroz Jel Elektroferezi

1 g Agaroz, 100 ml 1XTAE tamponu içerisinde mikrodalga fırında eritilmiş ve yaklaşık 40°C sıcaklığa geldikten sonra içerisine 5 µl nükleik asit boyama solüsyonu (RedSafe™-iNtRON) eklenmiş ve tarakları yerleştirilmiş jel tepsisine dökülerek agarozun katılaşması için 30 dk bekletilmiştir. Ardından 0,5XTAE ortamı içeren elektroferez tankına yerleştirilmiştir.

EK-3

ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler ve İçerikleri (1000 ml)

Kaplama Tamponu (Coating Buffer)

pH : 9.6

Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.93 g
NaN ₃	0.20 g

Fosfat-Tuz Tamponu (PBS Buffer)

pH : 7.4

NaCl	8.00 g
KH ₂ PO ₄	2.90 g
Na ₂ HPO ₄ X 12 H ₂ O	0.20 g
KCL	0.20 g
NaN ₃	0.20 g

Yıkama Tamponu (PBST Buffer)

pH :7.4

PBS Buffer	999.50 ml
Tween 20	0.50ml

Örnek Tamponu (Extraction Buffer)

pH : 7.4

PBST	1000,0 ml
Polyvinylpyrrolidone	20,00 g
(MV = 40000 K =40)	

Konjuget Tamponu (Conjugate Buffer)

pH : 7.4

PBST	1000,0 ml
Polyvinylpyrrolidone	20,00 g
(MV = 40000 K =40)	
Ovalbumin	2,00 g
NaN ₃	0.20 g

Substrat Tamponu (Substrat Buffer)

pH : 9,8

Diethanolamin	97.00 ml
NaN ₃	0.20 g
Destile su	1000,0 ml
oluncaya	kadar.