

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**MARDİN İLİ BUĞDAY ÜRETİM ALANLARINDAKİ ARPA SARI CÜCELİK
VİRÜS (*Barley yellow dwarf viruses*; BYDVs)'LERİNİN MULTİPLEKS RT-PCR
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI VE BAZI VİRÜS İZOLATLARININ
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONLARI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Abdulselam KARAOZAN
DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Mustafa USTA

VAN-2019

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**MARDİN İLİ BUĞDAY ÜRETİM ALANLARINDAKİ ARPA SARI CÜCELİK
VİRÜS (*Barley yellow dwarf viruses*; BYDVs)'LERİNİN MULTİPLEKS RT-PCR
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI VE BAZI VİRÜS İZOLATLARININ
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONLARI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Abdulselam KARAOZAN

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından **FYL-2017-6275** No'lu proje olarak desteklenmiştir

VAN-2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda Dr. Öğr. Üyesi Mustafa USTA danışmanlığında, Abdulsalam KARAOZAN tarafından sunulan "**Mardin İli Buğday Üretim Alanlarındaki Arpa Sarı Cücelik Virüs (*Barley yellow dwarf viruses; BYDVs*)'lerinin Multipleks RT-PCR Yöntemi ile Araştırılması ve Bazı Virüs İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonları**" isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 13/06/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisan tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Dr. Öğr. Üyesi Ahmet AKKÖPRÜ

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Mustafa USTA

İmza:

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Abdullah GÜLLER

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19/07/2019 tarih ve 2019/39-7 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Suat ŞENSOY
Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Suat ŞENSOY
Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm.



Abduselam KARAOZAN

ÖZET

MARDİN İLİ BUĞDAY ÜRETİM ALANLARINDAKİ ARPA SARI CÜCELİK VİRÜS (*Barley yellow dwarf viruses*; BYDVs)'LERİNİN MULTİPLEKS RT-PCR YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI VE BAZI VİRÜS İZOLATLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONLARI

KARAOZAN, Abdulselam
Yüksek Lisans Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Mustafa USTA
Temmuz 2019, 90 sayfa

Mardin ili ve ilçelerinde buğday üretim alanlarında Arpa sarı cücelik virüslerini (BYDV-PAV, BYDV-MAV, BYDV-SGV, BYDV-RMV ve CYDV-RPV) belirlemek amacıyla 2017 yılında survey çalışmaları yapılmıştır. Survey çalışması kapsamında toplanan 400 örnekte virüs tespiti için multipleks RT-PCR ve RT-PCR yöntemleri kullanılmıştır. Testlenen 400 örneğin 10'unda BYDV-PAV (% 2.5), 7'sinde BYDV-SGV (% 1.75), 2'sinde CYDV-RPV (% 0.5) ve 1'inde BYDV-RMV (% 0.25) tespit edilmiştir. Pozitif izolatların 7'sinde BYDV-PAV+BYDV-SGV (%1.75) ve 1'inde BYDV-PAV+CYDV-RPV (% 0.25) karışık infeksiyon belirlenmiştir. Mardin ilinde buğday virüslerinin genel infeksiyon oranı % 3.0 olarak bulunmuştur. Testlenen 400 buğday yaprağı örneğinin hiçbirinde BYDV-MAV tespit edilememiştir. Yürütülen bu çalışmada Mardin ilinde BYDV-PAV, BYDV-SGV, BYDV-RMV ve CYDV-RPV virüsleri ilk defa tespit edilmiştir.

Tespit edilen virüslerin kılıf protein gen bölgesinin karakterizasyonu için herbir virüs türünden bir pozitif izolat seçilerek kılıf protein gen bölgeleri karakterize edilmiştir. BYDV-PAV (Gen bankası Ulaşım No. MK732034) Mardin izolatının ve CYDV-RPV (Gen bankası Ulaşım No. MK732035) Mardin izolatlarının kılıf protein gen bölgelerinin tamamı, BYDV-RMV (Gen bankası Ulaşım No. MK955886) ve CYDV-RPV (Gen bankası Ulaşım No. MK940529) Mardin izolatların ise kılıf protein gen bölgeleri kısmi olarak klonlanıp DNA dizilemeleri gerçekleştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Buğday, Survey, Klonlama, Mardin ili, Moleküler karakterizasyon, Multipleks RT-PCR.

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATIONS OF SOME VIRUS ISOLATES and INVESTIGATION of *Barley yellow dwarf viruses* (BYDVs) IN THE WHEAT PRODUCTION AREAS in MARDIN PROVINCE BY MULTIPLEX RT-PCR

KARAOZAN, Abdulselam
M. Sc. Thesis, Department of Plant Protection
Supervisor: Assist. Prof. Dr. Mustafa USTA
July 2019, 90 pages

In order to determine the *Barley yellow dwarf virus* (BYDV-PAV, BYDV-MAV, BYDV-SGV, BYDV-RMV and CYDV-RPV) in Mardin province, survey studies were conducted in wheat production areas in 2017. In this context, four hundred samples were collected in survey areas and tested by Multiplex RT-PCR and RT-PCR. According to the test results it was found that BYDV-PAV in 10 samples (2.5 %), BYDV-SGV in 7 samples (1.75 %), CYDV-RPV in 2 had (0.5 %), and BYDV-RMV in 1 (0.25 %). Seven of the positive isolates were found to be infected by BYDV-PAV + BYDV-SGV (1.75 %) and 1 of them had BYDV-PAV + CYDV-RPV (0.25 %) mixed infection. The overall infection rate of wheat viruses in Mardin province was found to be 3.0 %. None of the 400 wheat leaf samples tested had BYDV-MAV detected. In this study, BYDV-PAV, BYDV-SGV, BYDV-RMV and CYDV-RPV viruses were detected for the first time in Mardin province.

A random isolate was selected from each detected virus to characterize the coat protein gene regions, which of complete for BYDV-PAV (Genbank accession no.MK732034) and CYDV-RPV (Genbank accession no.MK732035) viruses and partial for BYDV-SGV (Genbank accession no. MK940529) and BYDV-RMV (Genbank accession no. MK955886). The coat protein gene region of selected izolates were cloned and sequenced with the universal primers.

Keywords: Characterization, Mardin region, Multiplex RT-PCR, Viral diseases, Wheat.



ÖN SÖZ

Bu tez çalışmasında, her türlü bilgi ve yardımlarını esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mustafa USTA' ya ayrıca Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ahmet AKKÖPRÜ'ye ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Abdullah GÜLLER'e çok teşekkür ediyorum. Yüksek lisans çalışmam boyunca maddi ve manevi olarak bana her zaman destek olan annem Zeynep KARAOZAN ve babam Veysi KARAOZAN başta olmak üzere ablam Hatice KARAOZAN'a, ablam Fatma KOÇ'a ve eşi Dr. Öğr. Üyesi İbrahim KOÇ'a, kardeşim Yusuf KARAOZAN'a ve tüm aileme çok teşekkür ediyorum. Tez çalışmam sırasında bana her türlü konuda destek olan arkadaşım ve meslektaşım olan Abidin GÜNAY'a, Abdülhamit ÖNCEL'e, her zaman yanımda olan ve teşvik eden arkadaşım Sakine DALGA'ya ve diğer tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca bu yüksek lisans tez çalışmasını, FLY-2017-6275 No'lu proje ile destekleyen, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi' ne teşekkür ederim.

2019

Abduselam KARAOZAN



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖN SÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	7
2.1. Arpa Sarı Cücelik Virüs (<i>Barley yellow dwarf virus</i> , BYDVs)'lerinin Genel Özellikleri	8
2.1.1. Luteoviridae familyası	10
2.1.2. BYDV'nin taşınması	13
2.1.3. BYDV semptomları	14
2.1.4. BYDV'nin kontrolü	15
2.2. BYDV Üzerine Daha Önce Yapılmış Çalışmalar	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM	23
3.1. Materyal	23
3.1.1. Survey alanı	23
3.1.2. Bitkisel Materyal	23
3.1.3. Total nükleik asit (TNA) ekstraksiyon çalışmaları	24
3.1.4. Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi çalışmaları	24
3.1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) çalışmaları	25
3.1.6. Oligonükleotid Primerlerin kullanımı	25
3.1.7. Agaroz jel elektroforez çalışmaları	26
3.1.8. Klonlama çalışmaları	26
3.1.9. DNA dizi analizi ve biyofomatik yöntemlerle filogetik analiz	26
3.2. Yöntem	27

	Sayfa
3.2.1. Survey çalışmaları.....	27
3.2.2. Viral infeksiyonların araştırılması	27
3.2.3. Moleküler karakterizasyonlarının yapılması.....	32
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	43
4.1. Survey Çalışmaları.....	43
4.2. Arpa Sarı Cücelik Virüslerinin Multipleks Rt-Pcr ve Rt-Pcr Yöntemiyle Araştırılmasına Ait Bulgular.....	44
4.2.1. Test edilen yaprak örneklerinin Multiplek RT-PCR yöntemleri kullanılarak en az bir Arpa sarı cücelik virüs türleriyle (BYDV-PAV, BYDV-SGV, BYDV-MAV, BYDV-RMV ve CYDV-RPV) enfekteli olup olmadığına dair bulgular	45
4.2.2. Pozitif reaksiyon gösteren örneklerin spesifik primerlerle RT-PCR yöntemi kullanılarak BYDV türlerinin (BYDV-PAV, BYDV-MAV ve BYDV-SGV) belirlenmesine yönelik bulgular	50
4.2.3. RT-PCR yöntemiyle pozitif örneklerin grup-2 (BYDV-RMV ve CYDV-RPV) virüsleri yönelik çalışmalara ait bulgular	51
4.3. Rastgele Seçilen Bazı Pozitif Örneklerin Kılıfprotein Genin Karakterizasyonu	53
4.3.1. BYDV-PAV kılıf protein karakterizasyonu.....	53
4.3.2. BYDV-SGV kılıf protein karakterizasyonu.....	61
4.3.3. BYDV-RMV kılıf protein karakterizasyonu	65
4.3.4. CYDV-RPV kılıf protein karakterizasyonu.....	71
5. SONUÇ.....	81
KAYNAKLAR.....	85
ÖZ GEÇMİŞ.....	91

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Bitkisel üretimde en büyük ekonomik zararı veren ilk 10 virüs hastalıkları (Rybicki, 2014).....	8
Çizelge 2.2. Çalışma kapsamındaki Luteoviridae familyası üyelerinin taksonomisi (Domier, 2012).....	11
Çizelge 3.1. Survey yapılan illerdeki buğday ekim alanları, toplanan yaprak sayıları ..	24
Çizelge 3.2. BYDV virüslerinin teşhisinde kullanılan spesifik primer çiftleri	25
Çizelge 3.3. Virüslerin teşhisinde kullanılan primerler, amplifikasyon ürünü, PCR türü, sıcaklık döngüleri ve yararlanılan kaynaklara yönelik bilgiler	30
Çizelge 3.4. BYDV-PAV, CYDV-RPV, BYDV-SGV ve BYDV-RMV virüs izolatlarının kılıf protein genlerini çoğaltmak amacıyla Vector NTI 10 programı kullanılarak dizayn edilen primerler ile bu primerlerin çoğalttığı bölgelerin uzunluğu.....	33
Çizelge 4.1. Mardin ilinde buğday virüslerini araştırmak amacı ile survey çalışmalarının yürütüldüğü iller, testlenen örne sayıları, araştırılan virüsler ve tespit edilen virüslerin bulunma oranlar	49
Çizelge 4.2. 85 numaralı BYDV-PAV Mardin izolatına ait kılıf protein geni dizisi	54
Çizelge 4.3. Gen bankasında bulunan BYDV-PAV virüslerinin kılıf protein geninin ulaşım numarası, konukçu, ülke, gen ve uzunluğu konusundaki bilgiler .	55
Çizelge 4.4. BYDV-PAV Mardin izolatının (MK732034) kılıf protein gen bölgesinde consensusa göre meydana gelen baz değişimleri.....	57
Çizelge 4.5. 30 numaralı BYDV-SGV Mardin izolatına ait kılıf protein geni dizisi	61
Çizelge 4.6. Gen bankasında bulunan BYDV-SGV virüslerinin kılıf protein geninin ulaşım numarası, konukçu, ülke, gen ve uzunluğu konusundaki bilgiler .	62
Çizelge 4.7. BYDV-SGV Mardin izolatının (MK940529) kılıf protein gen bölgesinde consensusa göre meydana gelen baz değişimleri	64
Çizelge 4.8. 279 numaralı BYDV-RMV Mardin izolatına ait kılıf protein geni dizisi ..	66

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.9. Gen bankasında bulunan BYDV-RMV virüslerinin kılıf protein geninin ulaşım numarası, konukçu, ülke, gen ve uzunluğu konusundaki bilgiler .	67
Çizelge 4.10. BYDV-RMV Mardin izolatının (MK955886) kılıf protein gen bölgesinde consensusa göre meydana gelen baz değişimleri.....	69
Çizelge 4.11. 117 numaralı CYDV-RPV Mardin izolatına ait kılıf protein geni dizisi .	72
Çizelge 4.12. Gen bankasında bulunan CYDV-RPV virüslerinin kılıf protein geninin ulaşım numarası, konukçu, ülke, gen ve uzunluğu konusundaki bilgiler .	73
Çizelge 4.13. CYDV-RPV Mardin izolatının (MK732035) kılıf protein gen bölgesinde consensusa göre meydana gelen baz değişimleri	75



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Temsili olarak antik çağda işçilerin buğday hasadı (Anonim, 2019).....	2
Şekil 1.2. Dünyada başlıca buğday üreten ülkeler toplam üretim içindeki payları (FAO, 2018).....	3
Şekil 1.3. Türkiyede yıllara göre buğday üretim miktarı (TUİK, 2018).	4
Şekil 1.4. Türkiyede iller bazında buğday üretim miktarları (TUİK, 2018).	4
Şekil 2.1. <i>Barley yellow dwarf virus</i> -PAV virüslerinin elektron mikroskopuyla 200.000 kere büyütülmüş görüntüsü (Domier, 2008).	10
Şekil 2.2. Luteoviridae familyası içindeki <i>Luteovirus</i> , <i>Polerovirus</i> ve <i>Enamovirus</i> takımlarının genom organizasyonu (Sathess, 2015).	12
Şekil 2.3. Yaprak bitlerinin bitki dokusuna penetrasyonu sırasında virüsün taşınımı (Brault, 2007).	14
Şekil 3.1. Survey yapılan Mardin ili ve ilçelerinin haritası.	23
Şekil 3.2. A) DNA bantları içeren jellerin kesilip eppendorf tüplere aktarımı B) DNA bantlarının UV ışın altında görüntülenmesi.	35
Şekil 3.3. A) Transformasyon işlemi ve elektroşok uygulaması B) SOC süspansiyonunda gelişime bırakılan bakterilerin ampisilin içeren katı LB ortamında petrilere ekimi C) Bakteri süspansiyonlarının petrilere steril drisgaski çubuklarıyla besi yerine yayılmaları.....	36
Şekil 3.4. A) Mavi beyaz koloniler B) Besi ortamında gelişen mavi-beyaz kolonilerden beyaz olanların seçimi C) 37° C’de inkübasyon işlemi.	37
Şekil 3.5. Rekombinant plazmid saflaştırma aşaması.	39
Şekil 3.6. Dönüşümden sonra beyaz koloniler(A), katı LB ortamında geliştirilen beyaz kolonilerden tekli koloni alma(B).....	39
Şekil 4.1. Bayrak yaprak kırmızılaşması (a,c,f)(Kızıltepe, Derik, Nusaybin), buğday erken dönemde klorik çizgili desenler ve cüceleşme (b)(Savur), Survey çalışmalarının yürütüldüğü buğday ekim alanlarından görüntü (d,e) (Kızıltepe, Derik).	44

Şekil**Sayfa**

- Şekil 4.2. Mardin iline ait yaprak örneklerine uygulanan Multipleks RT-PCR testinin jel görüntüsü, M:(100-1000bp), 1:85, 2:76, 3:78, 4:86, 5:75, 6:67, 7:73, 8:83, 9:87, 10:89, 11:268, 12:222, 13:123, 14:127, 15:181, 16:154, 17:254, 18:118, 19:pozitif kontrol. 46
- Şekil 4.3. Mardin iline ait yaprak örneklerine uygulanan Multipleks RT-PCR testinin jel görüntüsü, M:(100-1000bp), 1:19, 2:104, 3:185, 4:163, 5:28, 6:133, 7:60, 8:135, 9:121, 10:93, 11:95, 12:100 nolu testlenen örnekler, 13:pozitif kontrol, 14:negatif kontrol. 46
- Şekil 4.4. Mardin iline ait yaprak örneklerine uygulanan Multipleks RT-PCR testinin jel görüntüsü, M:(100-1000bp), 1:pozitif kontrol, 2:3, 3:119, 4:46, 5:48, 6:54, 7:13, 8:122, 9:11, 10:8, 11:21, 12:22, 13:23, 14:32, 15:18, 16:20, 17:112, 18:61, 19:17, nolu testlenen örnekler. 47
- Şekil 4.5. Mardin iline ait yaprak örneklerine uygulanan Multipleks RT-PCR testinin jel görüntüsü, M:(100-1000bp), 1:255, 2:321, 3:253, 4:327, 5:394, 6:342, 7:279, 8:341, 9:317, 10:310, 11:313, 12:314, 13:322, 14:391, 15:129, 16:387, 17:338, 18:339 nolu testlenen örnekler, 19:pozitif kontrol. 47
- Şekil 4.6. Tüm pozitif reaksiyon gösteren örneklere uygulanan Multipleks RT-PCR testinin jel görüntüsü, M:(100-1000bp), 1:117, 2:85, 3:279, 4:86, 5:87, 6:17, 7:60, 8:61, 9:104, 10:164, 11:7, 12:105, 13:9, 14:185. 48
- Şekil 4.7. Mardin ili survey çalışmasında belirlenen tüm pozitif örneklerin spesifik primerlerle uygulanan RT-PCR yönteminde BYDV-PAV türlerinin belirlenmesi, M:(100-1000bp), 1:105, 2:85, 3:164, 4:86, 5:87, 6:17, 7:60, 8:61, 9:104, 10:185, 11: negatif kontrol, 12:Pozitif kontrol. 50
- Şekil 4.8. Mardin ili pozitif örneklerine Deb ve Anderson (2008) primerleriyle uygulanan RT-PCR testleriyle BYDV-SGV belirlenmesi, M:(100-1000bp), 1:185, 2:17, 3:85, 4:117, 5:87, 6:104, 7:86, 8:60, 9:61, 10: Negatif kontrol, 11: Pozitif kontrol. 51
- Şekil 4.9. Şekil 4.9. BYDV-RMV virüsleri için spesifik primerlerle uygulanan RT-PCR testlerinin agaroz jel görüntüsü, M:(100-1000bp), 1:185, 2:17, 3:85, 4:117, 5:279, 6:105, 7:60, 8:87, 9:104 ve 10:pozitif kontrol. 52
- Şekil 4.10. CYDV-RPV virüsleri için spesifik primerlerle uygulanan RT-PCR testlerinin agaroz jel görüntüsü, M:(100-1000bp), 1:185, 2:104, 3:117, 4:86, 5:279, 6:105, 7:164, 8:164, 9:negatif kontrol 10:pozitif kontrol. 52

- Şekil 4.11. Saflaştırılmış plazmite uygulanan PCR'ın agaroz jel görüntüsü, M:Marker (100-10000)bp, 1:17(1) nolu nolu koloniden rekombinant plazmit, 2:17(2) nolu koloniden alınmış rekombinant plazmit, 3:17(3) nolu nolu koloniden rekombinant plazmit, 4:17(4) nolu koloniden alınmış rekombinant plazmit, 5:17(5) nolu nolu koloniden rekombinant plazmit, 6:17(6) nolu koloniden alınmış rekombinant plazmit,..... 53
- Şekil 4.12. CLC Main Workbench 6.7.1 programı ile 17 nolu BYDV-PAV Mardin (MK732034) izolatının dünyadaki PAV izolatlarının (Çizelge 4.3) kılıf protein gen bölgesinin nükleik asit dizilerinin benzerlik oranları..... 56
- Şekil 4.13. CLC Main Workbench 6.7.1 programının yardımı ile BYDV-PAV Mardin izolatının (MK732034) dünyadaki PAV virüslerin kılıf protein gen bölgesi (Çizelge 4.3) ile çoklu nükleotit dizi karşılaştırılması 58
- Şekil 4.14. BYDV-PAV (MK732034) izolatı ile dünyadaki PAV izolatlarının (Çizelge 4.3.) kılıf protein geninin nükleik asit dizisi 1000 tekerrürlü olarak Neighbor joining yöntemiyle oluşturulan filogenetik ağacı. 60
- Şekil 4.15. Saflaştırılmış plazmite uygulanan PCR'ın agaroz jel görüntüsü, M:Marker (100-10000)bp, 1:30(1) nolu nolu koloniden rekombinant plazmit, 2:30(2) nolu koloniden alınmış rekombinant plazmit, 3:30(3) nolu nolu koloniden rekombinant plazmit, 4:30(4) nolu koloniden alınmış rekombinant plazmit, 61
- Şekil 4.16. CLC Main Workbench 6.7.1 programı ile 30 nolu BYDV-SGV Mardin (MK940529) izolatının dünyadaki SGV izolatlarının (Çizelge 4.6) kılıf protein gen bölgelerinin nükleik asit benzerlik oranları. 63
- Şekil 4.17. BYDV-SGV (MK940529) izolatı ile dünyadaki SGV izolatlarının (Çizelge 4.6.) kılıf protein geninin nükleik asit dizisi Mega 7 programı yardımı ile 100 tekerrürlü olarak Neighbor joining yöntemiyle oluşturulan filogenetik ağacı. 65
- Şekil 4.18. Saflaştırılmış plazmite uygulanan PCR'ın agaroz jel görüntüsü, M:Marker (100-10000)bp, 1:279(1) nolu nolu koloniden rekombinant plazmit, 2:279(2) nolu koloniden alınmış rekombinant plazmit,..... 66
- Şekil 4.19. CLC Main Workbench 6.7.1 programı ile 279 nolu BYDV-RMV Mardin (MK955886) izolatının dünyadaki RMV izolatlarının (Çizelge 4.9) kılıf protein gen bölgesinin nükleik asit dizilerinin benzerlik oranları..... 68
- Şekil 4.20. CLC Main Workbench 6 programının yardımı ile BYDV-RMV Mardin izolatının Çizelge 4.9.'daki RMV izolatlarıyla kılıf protein gen bölgelerinin çoklu nükleotit dizi karşılaştırılması..... 69

Şekil**Sayfa**

- Şekil 4.21. BYDV-RMV (MK955886) izolatu ile dünyadaki RMV izolatlarının (Çizelge 4.9) kılıf protein geninin nükleik ait dizisi Mega 7 programı yardımı ile 100 tekerrürlü olarak Neighbor joining yöntemiyle oluşturulan filogenetik ağaç. 71
- Şekil 4.22. Saflaştırılmış plazmite uygulanan PCR'in agaroz jel görüntüsü, M:Marker (100-10000)bp, 1:117(1) nolu koloniden rekombinant plazmit, 2:117(2) nolu koloniden alınmış rekombinant plazmit, 3:117(3) nolu koloniden rekombinant plazmit, 4:117(4) nolu koloniden alınmış rekombinant plazmit. 72
- Şekil 4.23. CLC Main Workbench 6.7.1 programı ile 117 nolu CYDV-RPV Mardin (MK955886) izolatının dünyadaki RPV izolatlarının (Çizelge 4.12) kılıf protein gen bölgesinin nükleik asit dizilerinin benzerlik oranları..... 74
- Şekil 4.24. CYDV-RPV (MK732035) izolatu ile dünyadaki RPV izolatlarının (Çizelge 4.12) kılıf protein geninin nükleik ait dizisi 1000 tekerrürlü olarak Neighbor joining yöntemiyle oluşturulan filogenetik ağacı. 76

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
μ	Mikron
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
Da	Dalton
Dk	Dakika
G	Gram
kDa	Kilo dalton
Kg	Kilogram
M	Molar
Mg	Miligram
mg/ml	Miligram/mililitre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MW	Molekül ağırlığı (weight)
Nm	Nanometre
pmol	Pikomol
U	Ünite
V	Volt
v/v	Hacim/hacim
w/v	Ağırlık/hacim

Kısaltmalar

Açıklama

A	Adenin
Aa	Amino asit
BMV	<i>Brome mosaic bromovirus</i>
ABD	Amerika Birlesik Devletleri
B/CYDV	<i>Barley/Cereal yellow dwarf virus</i>
BaMMV	<i>Barley mild mosaic virus</i>
BaYMV	<i>Barley yellow mosaic virus</i>
BSMV	<i>Barley stripe mosaic hordeivirus</i>
BYD	<i>Barley yellow dwarf</i>
BYDV	<i>Barley yellow dwarf luteoviruses</i>
BYDV-GAV	<i>Barley yellow dwarf virus-GAV</i>
V-GPV	<i>Barley yellow dwarf virus-GPV</i>
BYDV-MAV	<i>Barley yellow dwarf virus-MAV</i>
BYDV-PAV	<i>Barley yellow dwarf virus-PAV</i>
BYDV-RMV	<i>Barley yellow dwarf virus-RMV</i>
BYDV-SGV	<i>Barley yellow dwarf virus-SGV</i>
BYSMV	<i>Barley yellow streak mosaic virus</i>
BMV	<i>Brom mosaic bromovirus</i>
C	Sitozin
cDNA	Komplementer Deoksiribo Nükleikasit
CP	Coat protein (Kılıf protein)
CYDV-RPS	<i>Cereal yellow dwarf virus-RPS</i>
CYDV-RPV	<i>Cereal yellow dwarf polerovirus-RPV</i>
DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich –ELISA
dATP	Deoksiadenozintrifosfat
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
DNase	Deoksiribonükleaz
dNTP	Deoksinüklodtrifosfat
EDTA	Ethylenediaminotetraaceticacid

Kısaltmalar

Açıklama

ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMBL	European Moleküler Biyoloji Laboratuvarı
EtOH	Etanol
FAO	Dünya Tarım Örgütü
HCl	Hidroklorik Asit
IC-RT-PCR	Immuno Capture RT-PCR
ITS1	Internal Transcript Spacer
KH₂PO₄	Potasyum di Hidrojen Sülfat
MDMV	<i>Maize dwarf mosaic virus</i>
ME	Mercaptoethanol
MgCl₂	Magnezyum klorür
MMV	<i>Maize mosaic virus</i>
MP	Hareket proteini (Movement protein)
MSPV	<i>Maize stripe virüs</i>
NaI	Sodyum iyodür
NaOAc	Sodyum asetat
Nt	Nükleotid
OGSV	<i>Oat golden stripe virus</i>
OMV	<i>Oat mosaic virus</i>
ONMV	<i>Oat necrotic mottle virüs</i>
ORF	Açık okuma çerçevesi (Open reading frame)
PCR	Polymerase chain reaction
rDNA	Ribozomal DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RNA	Ribo Nükleik Asit
RNase	Ribo Nükleaz enzim
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
RT	Reverse Transcriptase
RTP	Read Through Protein

Kısaltmalar

Açıklama

RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SBCMV	<i>Soil-borne cereal mosaic virüs</i>
SBWMV	<i>Soil borne wheat mosaic furovirus</i>
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
sgRNA	Subgenomik RNA
ssRNA	Tek iplikli (single stranded) ribonükleik asit
T	Timin
TAE	Tris Asetat EDTA
Taq DNA Polimeraz	Termo stabil DNA polimeraz enzimi
TAS-ELISA	Triple antibody sandwich-ELISA
TBE	Tris Borate EDTA
TNA	Total Nükleik Asit
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
U	Urasil
WDV	<i>Wheat dwarf virus</i>
WSMV	<i>Wheat streak mosaic tiritimovirus</i>
WSSMV	<i>Wheat spindle streak mosaic bymovirus</i>
WYMV	<i>Wheat yellow mosaic virus</i>

1. GİRİŞ

Tarihi M.Ö 10.000 yıl öncesine kadar uzanan ve dünyanın en eski, en önemli tahıl ürünlerinden olan buğday, serin iklim tahılları içinde yer almaktadır (Şekil 1.1). Kış koşullarının şiddetine göre kışlık ile yazlık olmak üzere başlıca iki tip ekimi yapılan ve ilk kültüre alınan bitkilerden bir tanesidir (Anonim, 1996). Geniş adaptasyon yeteneğine sahip olan buğday bitkisi; tanesindeki uygun besleme değeri, saklama ve işlenmesindeki kolaylıklar nedeniyle birçok ülkenin temel besin kaynağı durumundadır (Anonim, 2016c).

Dünyada tahıllar içinde mısır ve çeltikten sonra en fazla üretilen ürün olan buğday ülkemizde 28 yabancı buğday çeşidine ev sahipliği yapmaktadır. Türkiye’de yüzlerce yerel çeşit buğday bulunmaktadır. 2016 yılı itibarıyla 198 çeşit ekmeklik ve 61 çeşit makarnalık olmak üzere toplamda 259 çeşit tescilli buğday bulunmaktadır. Buğday günümüzde tropik ülkelerden Amerika’nın güneyine, ılıman iklimlerden Avrupa’nın kuzeyine kadar çok geniş coğrafyalarda ve çeşitli iklimlerde yetiştirilmektedir (Özberk ve ark. 2016).

Buğday tanesi karbonhidrat, protein mineral maddeler, iz elementleri, vitaminler, yağ asitleri ile sekonder bitki metabolitleri olarak adlandırılan renk maddeleri ve fenoller bakımından zenginlik göstermektedir (Gooding ve Davies, 1997). Bununla birlikte Buğdayın içerdiği fitokimyasal maddeler (fenolik bileşikler, karotenoidler ve E vitamini) nedeniyle doğal besinsel antioksidan kaynağıdır ve bu aktif bileşikler güçlü antioksidan aktiviteleri ile insan ve hayvanlarda birçok kronik rahatsızlığı önler veya ilerlemesini geciktirebilmektedir (Menteş ve Yılmaz 2011).



Şekil 1.1. Temsili olarak antik çağda işçilerin buğday hasadı (Anonim, 2019).

Tümü *Poaceae* familyasına bağlı olan tahıllar 400 cins ve 4500 türü kapsayan geniş bir familyadır. Aralarında mısır, buğday, pirinç, arpa, yulaf, çavdar gibi bitkisel üretim açısından önemli bitkiler bulunmaktadır (İlbağı, 2003).

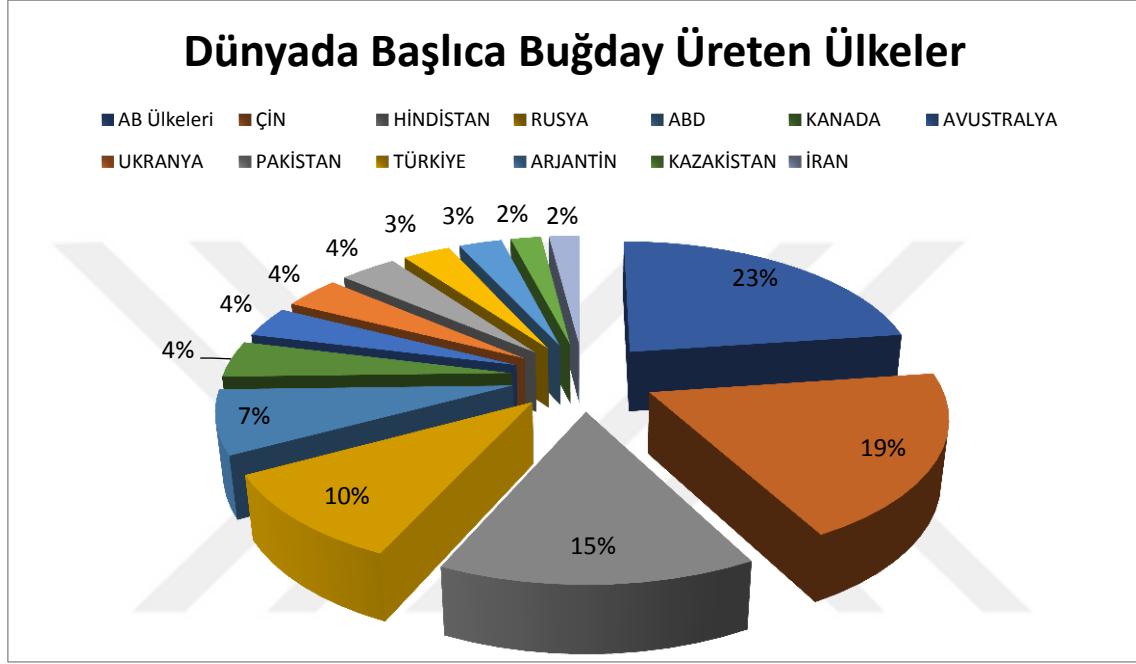
Buğdayın taksonomisi ise aşağıdaki gibidir;

- Alem: **Plantae**
- Şube: **Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)**
- Sınıf: **Liliopsida (Tek çenekliler)**
- Takım: **Poales**
- Familya: **Poaceae**
- Cins: ***Triticum* L.**

İnsan besin diyeti açısından böylesi önemli bir kültür bitkisinin, dünyada ki açlık sorunun çözümüne yönelik konumu stratejik bir noktadır. Dünya nüfusunun yıllık artış oranı % 1.7 olup bu orandaki artışa göre 2025 yılında dünya nüfusunun 8.5 milyar kişi olacağı tahmin edilmektedir (Boyraz, 2013). Buna karşın 2593.7 milyon ton olan dünya tahıl üretiminde 2017 yılı itibariyle yaklaşık 14.2 milyon tonluk bir azalma belirlenmiştir (FAO,2017). Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre, Dünya nüfusunun % 40'ı yeterli seviyede beslenemediğinden dolayı her yıl binlerce kişi beslenme yetersizliğinden kaynaklı hayatını kaybetmektedir (Karakaya ve Boyraz, 1992).

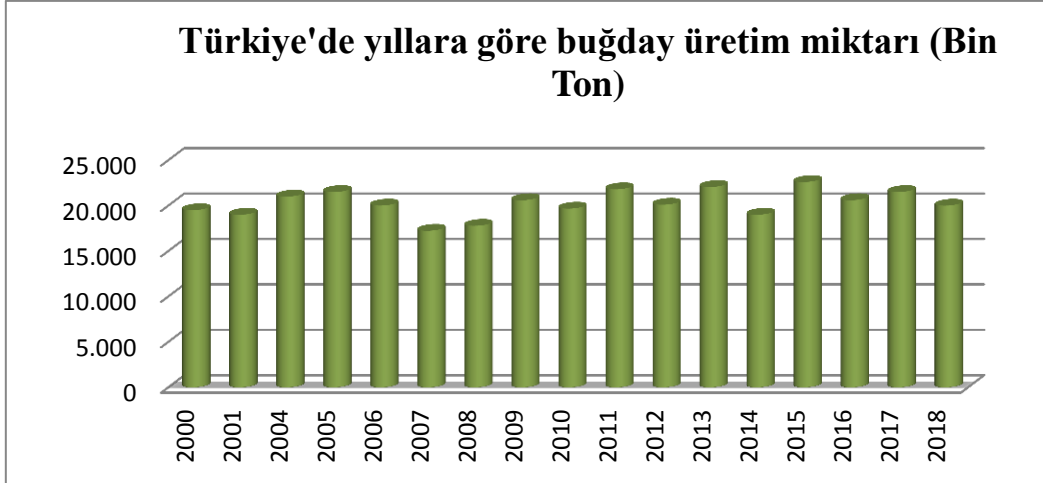
Buğdayın sahip olduğu bu zengin besin değerleri ile dünya nüfusunda, beslenme diyetine göre insanların enerji ihtiyaçlarının yaklaşık % 20'sini karşılamaktadır (Cummins ve Robert- Thomson 2009).

2018 verilerine göre küresel üretimi yılda 743.2 milyon ton olan buğday, tahıllar içinde mısırın arkasından gelerek en çok üretilen ikinci tahıl ürünüdür (FAO, 2018). Ülkeler bazında dünya buğday üretim sıralamasına bakıldığında % 23'lük bir oranla AB ülkeleri dünyanın en çok buğday üreten ülkeleri olmaktadır. Bu sıralamayı % 19'la Çin ve % 15'le Hindistan takip etmektedir (Şekil 1.2).



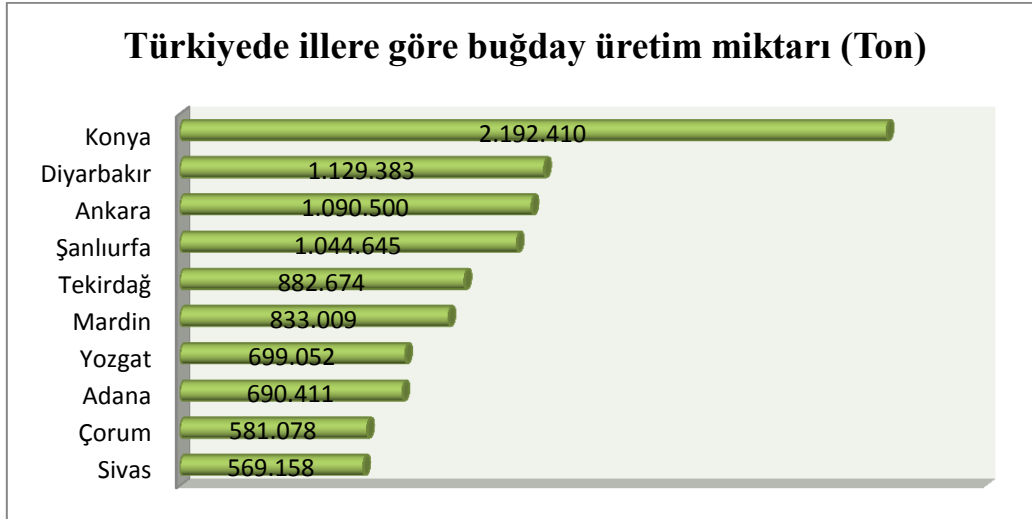
Şekil 1.2. Dünyada başlıca buğday üreten ülkeler toplam üretim içindeki payları (FAO, 2018).

Buğday, Türkiye'de en fazla ekilen tahıl cinsi olup, 2018 yılında dünya üretiminin yaklaşık % 3.1'ne karşılık gelen 20 milyon ton buğday üretilmiştir (Şekil 1.3). Türkiye'de 277 kg/dekarla buğday üretim veriminin dünya ortalamasının altında kaldığı görülmektedir (TUİK, 2018). Benzer şekilde 7.8 milyon hektar alanda üretilen buğday, 20 milyon hektara yakın olan tüm tarım üretim alanımızın yaklaşık % 38.1'ni oluşturmaktadır. Türkiye'de yaklaşık her 5 çiftçiden dördü buğday yetiştirmektedir (Özberk ve ark., 2016).



Şekil 1.3. Türkiye'de yıllara göre buğday üretim miktarı (TUİK, 2018).

Ülkemizde her bölgede yetiştirilebilen buğday yaygın olarak İç Anadolu Bölgesi'nde üretilmektedir. 2018 yılı ekmeçlik buğday üretiminde İç Anadolu Bölgesi % 32'lik pay ile ilk sırada yer almaktadır. Bunu % 18 ile Marmara Bölgesi ve % 15 ile Güneydoğu Anadolu Bölgesi izlemektedir. Üretimin en az olduğu bölgeler Doğu Anadolu ve Ege Bölgeleridir (TUİK, 2018). Türkiye'nin iller bazında tarımsal üretim istatistiklerine bakıldığında ise Mardinin üretilen toplam buğdayın % 3,87'sini üreterek Türkiye'de en çok buğday üretimi yapılan altıncı ilimizdir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Türkiye'de iller bazında buğday üretim miktarları (TUİK, 2018).

Türkiye ekonomisi için de büyük önem taşıyan buğdayın ülkemizde gerek ekmeç sanayisi gerekse bulgur, makarna ve bisküvi sanayisi açısından temel hammadde

oluşu onu vazgeçilmez tarım ürünlerimizden yapmaktadır. Yıllık ortalama 19 milyon ton üretim kapasitemize rağmen bazı yıllarda iç talep karşılanamamakta ve dış alım yapılmaktadır (Şahin ve ark., 2016)

Hızla artan dünya nüfusuna karşılık azalan tarım alanları, birim alandan daha kaliteli ürün ve yüksek verimi zorunlu kılmaktadır. Değişen çevre şartları ve daha dirençli hastalıkların oluşması ise birim alandan alınan verimi etkileyen en önemli sebepler arasındadır. Fungal ve bakteriyel hastalıklardan farklı olarak, bitkilerde hastalık etmeni virüslerin uygulamada etkili bir kimyasal mücadele ile kontrolü günümüzde mümkün değildir. Virüs etmenlerinin yayılımı ve sağlıklı bitkilere bulaşmasını önlemek amacı ile virüslerden arı üretim materyallerinin kullanılması gibi klasik uygulamalar ise her zaman virüs hastalıkları ile mücadelede yeterli olamamaktadır. Virüsel etmenler ile 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 karşıda etkili olması için virüs ve vektörlerinde epidemiyolojileri ortaya konulmalıdır (Erkan, 2008).

Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada buğday üretimini ekonomik olarak sınırlayan virüslerin başında, afitler ile etkili olarak taşınan Arpa sarı cücelik virüsleri (*Barley yellow dwarf viruses*; BYDVs) geldiği görülmüştür. Tahıllarda görülen Luteovirus familyasına ait bu virüslerin dünyada üretimi ekonomik anlamda engelleyen en önemli virüs türleri arasında olduğu tespit edilmiştir. Geniş konukçu dizisine sahip Arpa sarı cücelik virüslerinin Türkiye’de ki tahıl üretim alanlarında da ciddi verim ve kalite kayıplarına neden olduğu görülmüştür (İlbağı, 2017). Bu virüsler başta buğday olmak üzere arpa, yulaf, çavdar, darı, tritikale, mısır, çeltik ve sorgumda hastalığa neden olur ve dane verimini önemli ölçüde düşürür. Bunun dışında konukçusu olan 150 türden fazla çayır mera ve çim bitkilerinde de ot verimini düşürmektedir (Gould ve Shaw 1983).

Dünyada buğday üretiminde en yaygın ve en önemli virüs hastalıklarından olan BYDV’ler bugüne kadar birçok çalışmanın konusunu oluşturmuştur. Ülkemiz ise dünyada buğday üretimi konusunda önemli bir noktada olmasına karşın BYDV’nin

yayılış alanları ve dünyada ki örnekler ile karşılaştırılması hususunda yapılan çalışmaları sınırlı sayıda kalmıştır. Ülkemizde bugüne kadar yapılan çalışmaları genel itibariyle İç Anadolu, Ege, Trakya ve Doğu Anadolu bölgesinde olmasına karşın Türkiye buğday üretimin % 15'ni karşılayan Güneydoğu Anadolu bölgesinde çalışmaları çok kısıtlı kalmıştır.

Yapılan bu çalışma ile; Mardin ilinde buğday üretimi yapılan alanlarda infeksiyon oluşturulan Arpa sarı cücelik virüs (*Barley yellow dwarf virus*, BYDV)'lerinin multipleks RT-PCR yöntemi ile belirlenmesi ve buğdaydaki virüs hastalıklarının yayılış alanlarının ortaya konularak bulunma oranlarının tespiti ve özelde;

- Tespit edilecek virüs izolatlarının genomunda yer alan kılıf protein genin kısmi veya tamamının moleküler klonlama ile nükleik asit baz dizilerinin ortaya konması ve filogenetik analizlerinin gerçekleştirilmesi,
- BYDV'nin moleküler evrimini ve BYDV'nin taksonomik durumunu açıklamayı amaçlamıştır,

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

Buğday (*Triticum aestivum* L.) her türlü toprak ve iklim koşullarında yetişebilen tek yıllık bir bitkidir ve doğada birçok virüsün doğal konukçusudur. Tahıllar içerisinde virüslere duyarlılığı en fazla olan buğday, 55 farklı virüse konukçuluk etme konumundadır (Erkan ve Yılmaz, 2009). Bu virüslerin en önemlilerinden, Türkiye'deki üretim alanlarında Toprak kökenli buğday mozaik virüsü (*Soilborne wheat mosaic virus*, SBWMV) (Kurçman, 1981; Köklü, 2004), Arpa sarı cücelik virüsü (*Barley yellow dwarf virus*, BYDV), Arpa sarı çizgi virüsü (*Barley yellow stripe virus*, BYSV), Mısır mozaik virüsü (*Maize mosaic virus*, MMV) (Erkan ve Yılmaz, 2009), Buğday çizgi mozaik virüsü (*Wheat streak mosaic virus*, WSMV) (Usta, 2013), Buğday cücelik virüsü (*Wheat dwarf virus*, WDV), Tahıl sarı cücelik virüsü (*Cereal yellow dwarf virus*, CYDV), Yulaf nekrotik mottle virüsü (*Oat necrotic mottle virus*, ONMV) (Sathees, 2015), Brom mozaik virüsü (*Brome mosaic virus*, BMV) ve Arpa çizgi mozaik virüsü (*Barley stripe mosaic virus*, BSMV) (Akbaş ve ark., 2005)'lerinin bulunduğu rapor edilmiştir.

Buğday virüsleri genellikle buğday yapraklarında lekelenme, rozetlenme, kloroz (mozaik, çizgi, benek ve sararma gibi), cüceleşme ve nekroza sebep olur. Buğday virüslerinin sebep olduğu bu belirtilerin bazıları abiyotik faktörler ve besin elementi yetersizliği ile karıştırılabilmektedir. Ayrıca bazı durumlarda iki ya da daha fazla buğday virüsünün bitkide birlikte bulunmasıyla oluşan sinerjistik etkiden dolayı bitkinin daha fazla zarar görmeside mümkündür. Genellikle Arpa sarı cücelik virüsü buğday bitkilerinde karışık enfeksiyona neden olmaktadır. Böyle karışık enfeksiyonlarda virüslerin tanımlanması güç ve karmaşıktır. Ancak son yıllardaki moleküler gelişmelerle birlikte virüslerin adlandırılması, karakterizasyonu ve sınıflandırılması kolay bir şekilde yapılabilmektedir (Erkan ve Yılmaz, 2009; Usta, 2013).

Buğday ülkemiz açısından dikkate alındığında ekonomik değeri, üretim miktarı ve toplumumuzun besin diyetinin en başında gelen ekme, makarna, bulgur gibi ürünlerin hammaddesidir. Ekim alanı, toprak koşulları, iklim, uygulanan tarım tekniği ve hastalıklara bağlı olarak buğday verimi yıldan yıla değişmektedir. Özellikle buğday verimini etkileyen önemli etmenlerden biride virüslerdir. Buğdaygil familyasında birçok

kültür bitkisinin bulunması ve bu bitkilerin yaygın bir şekilde yetiştirilmesinden dolayı günümüze kadar birçok virüs hastalığı rapor edilmiştir. Bu virüslerden Luteoviridae familyası içerisindeki BYDV grubu virüsleri birçok tahıl ürününde hastalık etmeni oldukları için ekonomik olarak önemli virüsler olduğu ve verim kayıplarına neden oldukları belirtilmiştir. (McKridy ve ark, 2002; Akbaş ve ark., 2005; Erkan ve Yılmaz, 2009; Thackray ve ark, 2009; Usta, 2013; Sathees, 2015). FAO verileri kullanılarak gıda üretiminde dünyada en büyük ekonomik zarar veren virüslerin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada (Çizelge 2.1) Arpa sarı cücelik virüsleri 4. sırada yer aldığı belirtilmiştir (Rybicki, 2014).

Çizelge 2.1. Bitkisel üretimde en büyük ekonomik zararı veren ilk 10 virüs hastalıkları (Rybicki, 2014)

Virüs	Simge	Familya	Takım
<i>African cassava mosaic virus</i>	ACMD	<i>Geminiviridae</i>	<i>Begomovirus</i>
<i>Banana bunchy top virus</i>	BBTV	<i>Potyviridae</i>	<i>Nanovirus</i>
<i>Banana streak virus</i>	BSV	<i>Caulimoviridae</i>	<i>Badnavirus</i>
<i>Barley yellow dwarf virus</i>	BYDV	<i>Luteovirus</i>	<i>Luteovirus</i>
<i>Cucumber mosaic virus</i>	CMV	<i>Bromoviridae</i>	<i>Cucumovirus</i>
<i>Maize streak virus</i>	MSV	<i>Geminiviridae</i>	<i>Mastrevirus</i>
<i>Maize dwarf mosaic</i>	MRDV	<i>Reoviridae</i>	<i>Fijivirus</i>
<i>Rice tungro spherical virus</i>	RTSV	<i>Sequiviridae</i>	<i>Fijivirus</i>
<i>Rice yellow mottle virus</i>	RYMV	<i>Sequiviridae</i>	<i>Sobemovirus</i>
<i>Sweet potato feathery mottle virus</i>	SPFMV	<i>Potyvirus</i>	-

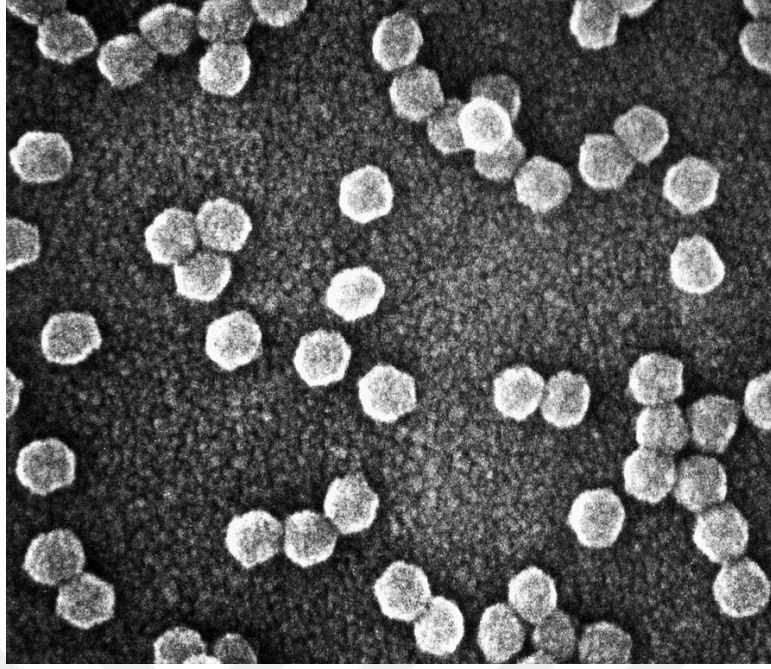
2.1. Arpa sarı cücelik virüs (*Barley yellow dwarf virus*, BYDVs)'lerinin genel özellikleri

Arpa sarı cücelik virüsü (BYDV) ilk olarak 1950 yılında ABD'denin Kaliforniya eyaletinde tahıllar üzerinde yapılan bir çalışmada yeni bir virüs olarak tanımlanmıştır (Oswald ve Houston, 1951). Luteoviridae familyasında sınıflandırılan bu virüsler dünya genelinde tahıl üretimi üzerindeki etkisi nedeniyle birçok çalışmanın konusunu oluşturmuştur. Arpa sarı cücelik virüslerinin buğdayında içinde olduğu *Poaceae* familyasına ait çok sayıda bitki türünde; yabancı otlarda, mera alanlarında, çim alanlarında ve kültüre alınmış 150'den fazla tür üzerinde hastalık yapabildiği tespit edilmiştir. BYDV için özellikle buğday, yulaf, arpa, çeltik ve mısır önemli konukçular

arasındadır. Bunlar arasında da buğday, arpa ve yulaf için önemli ekonomik kayıplara neden olabilmektedir (Koev ve ark., 1998; Chain ve ark., 2006).

Arpa sarı cücelik virüsleri (BYDVs), küresel açıdan önemli bir virüs hastalık gurubudur. Tüm dünyada büyük tahıl üretim alanlarında etkin bir epidemi oluşturma potansiyelinde olan Arpa sarı cücelik virüslerinin buğdaydaki ekonomik etkilerinde % 80'ne varan verim kayıplarının olduğu bildirilmiştir. Arpa sarı cücelik virüslerinin oluşturduğu zarar ve verim kayıpları, infeksiyon zamanı, çevre koşulları ve vektör böceklerinin popülasyon skalasına göre değişmektedir. İnfeksiyon belirtileri olarak bodurluk, yapraklarda renk değişikliği(sararma), kök büyümesinde ve kardeşlenmede azalma görülsede, virüs infeksiyonları asimptomatik olarakta verimi düşüre bilmektedir. (Pike, 1950., Banks ve ark, 1995)

Dünyadaki bu virüslerden kaynaklanan ekonomik kayıpların, moleküler bilgilerin yetersizliği ve diğer biyotik ve abiyotik faktörlerin etkilerine benzeyen belirtileri nedeniyle tahmin edilmesi güçtür. Aynı zamanda, BYD ile ilişkili virüslerin evrimsel potansiyeli, insanlar, hayvanlar ve bitkiler üzerinde hastalıklara neden olan diğer RNA virüsleri gibi çok yüksektir (Elena ve Sanjuan, 2008). Tek sarmal pozitif iplikçi RNA'dan oluşan bir genoma sahip olan BYDV virüsleri 25-28 nm çapında izometrik partiküllere sahiptir (Şekil 2.1). BYDV virüsleri elektron mikroskobu ile incelendiğinde genellikle hücre çekirdeğinde, sitoplazma, ve parankima hücrelerinde görülmektedir (Hogenhout ve ark, 2008; Domier, 2008; Usta, 2013).



Şekil 2.1. *Barley yellow dwarf virus*-PAV virüslerinin elektron mikroskopuyla 200.000 kere büyütülmüş görüntüsü (Domier, 2008).

2.1.1. Luteoviridae familyası

Luteoviridae familyası, biyolojik özellikleri, genom organizasyonu ve serolojik özellikleri ile ayırt edilen üç cins içermektedir. Bunlar Luteovirus, Polerovirus ve Enamovirus' dür. Bu virüsler kendi aralarında 23 türe ve üç cinse ayrılır. Polerovirüs 15 tür, Luteovirus 7 tür ve Enamovirus yalnızca 1 tür içermektedir. Kalan üyeler henüz sınıflandırılmamıştır (Domier, 2012;., Sathees,2015).

Bu gruptaki virüslerin çoğu küresel tarımda ciddi patojenler olarak kabul edilmektedir. Luteovirüsler kendileri ile ilişkili ve ilişkisiz virüslerle karışık enfeksiyonlar oluşturabilmektedir. Örneğin Luteovirüslerden *Beet western yellow virüs* (BWYV) ile *Closteroviridae* familyasından *Beet mild yellow virüs* (BMV) 'ün pancar yapraklarında karışık enfeksiyon oluştura bilmektedir. Bu karışık enfeksiyonlar ciddi hastalık salgınlarına neden olmaktadır (Liu ve ark, 2001; Hauser ve ark, 2000). Bu karışık enfeksiyonların Luteovirüs'lerin ve diğer virüslerin evriminde muhtemelen önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

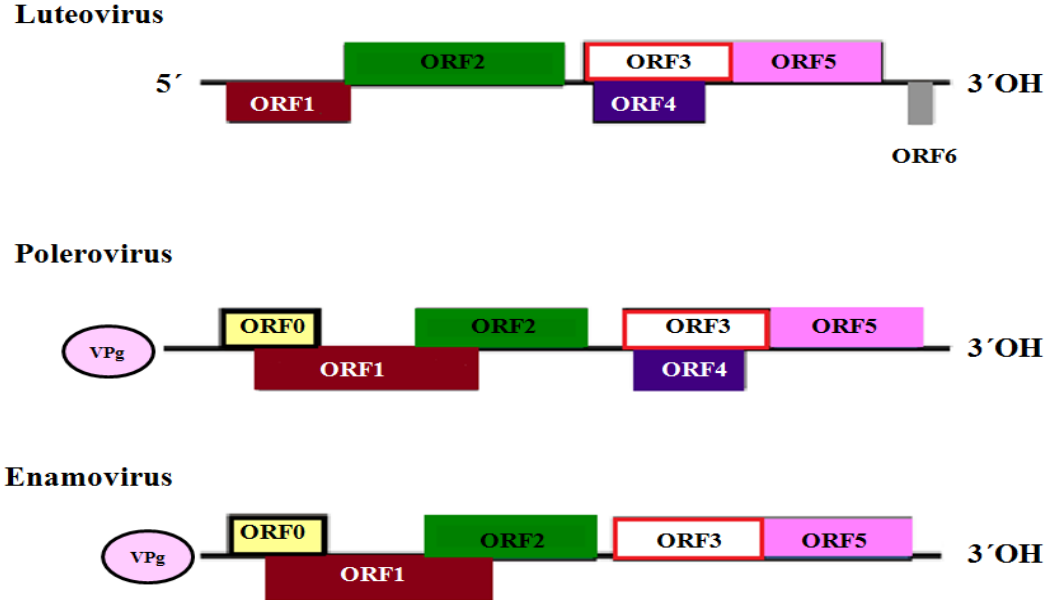
Luteoviridae familyasının sarı cücelik virüsleri (YDV'ler), dünya çapında en yaygın tahıl virüsleri grubunu temsil etmektedir. Bunlar, Luteovirüs cinsinin Arpa sarı cücelik virüslerini (BYDV'ler), Polerovirüs cinsinin Tahıl sarı cücelik virüslerini

(CYDV'ler) ve Buğday sarı cücelik virüslerini (WYDV) içerir. İlk tanımlanan YDV'ler başlangıçta tümüyle BYDV olarak adlandırılırsalarda daha sonra sınıflandırılmada birçok değişiklik meydana gelmiştir. Arpa sarı cücelik virüsleri (BYDVs), Luteoviridae familyasının ekonomik olarak en önemli hastalıklarındandır ve geniş alanlarda etkili olmaktadır (Jensen, 1969; Çapkın, 2015; Sathees,2015). Bu gruptaki virüsler moleküler özelliklerine göre PAV, SGV, RPV, MAV ve RMV olmak üzere beş farklı türe sahiptir. Bu türlerin gruplandırılması ve isimlendirilmesi önceleri kendi vektörüne uygun olacak şekilde yapılmıştır. Bu duruma bağlı olarak her türün belli yaprak biti ya da bazı yaprak biti türlerinin kombinasyonlarıyla taşındığı rapor edilmiştir. Ancak günümüzde yapılan çalışmalarla bu virüs ırkının vektör özelleşmesinin olmadığı ortaya konulmuştur. Son çalışmalarla BYDV virüsleri, genomik yapılarındaki değişiklikler göz önüne alınarak yeniden sınıflandırılmıştır. Böylece her biri tür olarak kabul edilmiştir (Halbert ve ark., 1992; Gray ve ark., 1998, Uzunoğulları ve Gümüş, 2017). Ayrıca ABD’de yapılan son çalışmalarda başta *Barley yellow dwarf virus-RMV* olarak tanımlanan virüsün genomik RNA'sının 5612 nükleotitlik dizi sekans analizi yapılmış ve adının *Maize yellow dwarf virus-RMV* olarak değiştirilip Polerovirus cinsi içerisinde sınıflandırılması önerilmiştir (Krueger ve ark., 2013).

Çizelge 2.2. Çalışma kapsamındaki Luteoviridae familyası üyelerinin taksonomisi (Domier, 2012).

Luteovirus Familyası		
Tür Adı	Kısaltmalar	Cins
Barley yellow dwarf virus-PAV	BYDV-PAV	<i>Luteovirus</i>
Barley yellow dwarf virus-MAV	BYDV-MAV	<i>Luteovirus</i>
Barley yellow dwarf virus-SGV	BYDV-SGV	-
Maize yellow dwarf virus-RMV	MYDV-RMV	<i>Polerovirus</i>
Cereal yellow dwarf virus-RPV	CYDV-RPV	<i>Polerovirus</i>

Luteoviridae familyasındaki virüsler de dahil olmak üzere çok sayıda virüs genomunun genom yapısı ve nükleotit sekansları, yeni nesil dizileme gibi (NGS) moleküler tekniklerin gelişiminin ardından belirlenmiştir. Luteoviridae familyasının üç cinsi, genom yapısı ve nükleotit sekanslar arasındaki farklılıklar ile açıkça ayırt edile bilmektedir. Bu üç cinsinde genom yapısında 4 kDa ile 132 kDa arasında değişen protein kodlama bölgeleri olan open reading frame (ORF) alanlarına sahiptirler (Şekil 2.2). Bu Open reading frame bölgelerinden ORF-1, ORF2, ORF-3 ve ORF-5 tüm cinslerde korunmuştur. *Luteovirüs* cinsinde bulunmayan ORF-0 bölgesinin symptom başlatıcı, konukçu aralığı belirleme ve bitkilerin dayanıklılık mekanizmasından olan gen susturucu özelliğini baskılayan görevler üstlenmektedir. 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).



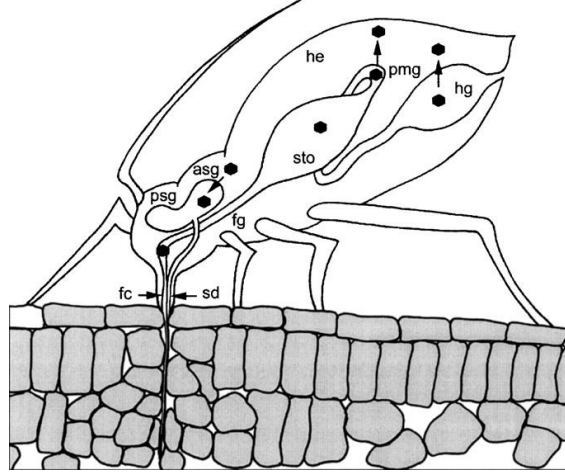
Şekil 2.2. Luteoviridae familyası içindeki *Luteovirus*, *Ploverovirus* ve *Enamovirus* takımlarının genom organizasyonu (Sathess, 2015).

Moleküler karakterizasyon yöntemleri kullanılarak sınıflandırma imkanlarının artması Luteoviridae familyasındaki yeni virüs türlerinin sayısının artmasına ve daha doğru bir sınıflandırmaya olanak vermiştir. Sınıflandırma, virüs epidemiyolojilerinin araştırılması ve uygun yönetim stratejilerinin geliştirilmesi için de önemlidir.

2.1.2. BYDV'nin taşınması

BYDV virüsleri sararma belirtisi gösteren diğer bitki virüs hastalıklarından farklı olarak mekanik yolla, polenle, temasla ve tohumla taşınmaz. BYDV virüsleri sadece yaşayan canlı bitki dokusunda varlıklarını sürdürmektedir. Bu yüzden toprakta veya anızda yaşayamazlar ancak yaprak bitleri tarafından taşınabilmektedir. BYDV, en az 25 tane farklı yaprak biti tarafından bitkiden bitkiye taşındıkları tespit edilmiştir. Taşıyıcı vektörlerin gömlek değiştirmesinden sonra virüs vektör içerisinde canlı kalabilmektedir ancak virüsün 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 virüsü *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus) ve *Sitobion avenae*, yaprak bitleri ile, MAV virüsü *Macrosiphum* (*Sitobion*) *avenae*, yaprak biti ile, SGV virüsü *Schizaphis graminum* ve daha az yoğunlukta *Macrosiphum* (*Sitobion*) *avena*, yaprak bitleri ile, RMV virüsü *Rhopalosiphum maidis* ve daha az yoğunlukta *Rhopalosiphum padi*, *Macrosiphum* (*Sitobion*) *avenae* ve *Acrosternum hilare* vektörleriyle. RPV virüsü ise *Rhopalosiphum padi* ve daha az yoğunlukta *Rhopalosiphum maidis*, *Acrosternum hilare*, yaprak biti vektörleri ile taşınmaktadır (Miller and Rasochová, 1997; Moon ve ark., 2000; Deligöz ve ark., 2011; Siddiqui ve ark., 2011; Çapkın, 2015).

BYDV'nin taşınımı persistent (sirkülatif) şekildedir. Virüs vektörde 2-3 hafta canlı kalabilmektedir. Virüsün taşınması bir sonraki nesile geçmez. Virüs alınmasının 1 günden az sürdüğü latent bir periyod görülmektedir. Ancak virüsün alınması ve iletilmesi 1-2 dakikadan az olduğu için taşınım kolayca gerçekleşmektedir (Deligöz ve ark., 2011; Çapkın, 2015).



Şekil 2.3. Yaprak bitlerinin bitki dokusuna penetrasyonu sırasında virüsün taşınımı (Brault, 2007).

BYDV'nin hastalık oluşturmasında 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 ark., 2009). BYDV grubundaki birkaç virüs türü çoğu zaman aynı bitkide bulunabilmektedir. Bu durumda türlerin farklılığından ortaya çıkan belirtiler hafiften şiddetliye doğru değişebilmektedir. Ancak türler aynı gruptan olursa bitkideki çapraz korunma mekanizması sayesinde bu belirtilerin iyileşmesi mümkün olabilir (Usta, 2013).

2.1.3. BYDV belirtileri

BYDV virüsünün neden olduğu belirtiler virüs ırkına, çevre koşullarına, bitki yaşı, bitki çeşidi, enfeksiyonun olduğu zaman konukçu bitkinin fizyolojik durumu ve konukçu bitki türlerine göre farklılık göstermektedir. BYDV belirtileri bitkideki besin elementlerinin yetersizliğine ve abiyotik koşullara bağlı oluşan belirtilerle karıştırılabilir. Bunun dışında bazı enfekteli konukçu bitkiler görünebilir belirtiler

oluşturmayabilir. Ancak BYDV çoğu konukçuda gelişme geriliği, sararma ve bodurlaşma gibi semptomlarla kendini göstermektedir. Ayrıca semptom gösteren bitkilerin yaprakları üzerindeki bit yoğunluğunda etkenin BYDV olma olasılığını artırmaktadır. En çok göze çarpan semptom yapraklardaki yeşil rengin kaybı, tırtıklı uçların oluşması, yaprakların dik ve sert olmasıyla birlikte yaprakların bazen kızarması sonucu ekili alanların kırmızı yama görüntüsü vermesi önemli semptomlardandır. Yapraklardaki renk değişimi enfekteli konukçuların yaşlı yapraklarında daha belirgindir. Renk değişikliği enfeksiyonun başlamasından 1-3 hafta sonra oluşmaktadır. Bu renk değişiklikleri yulaf yapraklarında kırmızı, turuncu ve mor renge, arpa yapraklarında parlak sarıya, buğday yapraklarında ise sarı ya da kırmızı renge görülmektedir. Enfekteli bitkilerde çiçeklenme, bodurlaşma ve zayıf bir kök sistemi gözlenebilmektedir. Kök sisteminin etkilenmesiyle cüceleşme belirgin olarak gözlenir. BYDV'li fidelerin kök sistemi sürgünlere göre daha çok etkilenir. Fidelerin köklerinde 4 gün sonra gelişme etkilenirken, sürgünde gelişme geriliği 18 gün sonra gözlenmektedir. Buda cüceleşmenin fidelerde daha erken dönemde olduğunu göstermektedir. Cüceleşmenin hafif olduğu durumlarda enfekteli bitkiler sağlıklı bitkilerden ayrıt edilmeyebilir. Ancak şiddetli durumlarda dane ve başak oluşumu engellendiğinden kısırlık meydana gelebilmektedir. BYDV virüs grubundaki ırkların oluşturduğu semptomlara bakıldığında MAV ırkı hafif semptomlara, PAV ırkı şiddetli semptomlara, RMV, SGV ve RPV ırklarının orta şiddetli semptomlara neden olduğu görülmektedir (Chay ve ark., 1996; Hoffman ve Kolb, 1997; Domier, 2008; Usta, 2013; Çapkın, 2015).

2.1.4. BYDV'nin kontrolü

BYDV virüslerinin kontrolü özellikle bitkilerin büyüme aşamasında önemlidir. BYDV'nin kontrolünde yabancı ot kontrolü, ekim zamanının ayarlanması ve dayanıklı bitki çeşitlerinin kullanılması gibi kültürel yöntemler mevcuttur. Bu önlemlerin yanı sıra vektör durumundaki yaprak bitleriyle kimyasal mücadele de önerilmektedir. BYDV virüslerine 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. Bu bağlamda yapılan bazı moleküler çalışmalarda buğday bitkisinde BYDV'ye karşı etkili bir koruma

direnci gösteren 18 dayanıklılık geni tespit edilmiştir. Bunlardan Ryd2 geni, rym4 ve Hv-eIF4E geninin alel formları olan rym5 genlerinin avrupanın bazı yerel çeşitlerinde etkili bir koruma etkiliği gösterildiği tespit edilmiştir (Paltridge ve ark. 1998.; Stein ve ark. 2005; Ordon ve ark. 2005; Deligöz ve ark., 2011; Kai ve ark. 2012).

Türkiyede yerel yulaf genotiplerinin tarımsal özellikleri bakımından değerlendirildiği çalışmada, Arpa sarı cücelik virüslerine karşı dayanıklı gen hatlarının tespiti için iki yıllık bir çalışma sürdürülmüş ve her iki yılın ortalama verilerine göre; yerel yulaf genotipleri içerisinde bu virüs hastalığına dayanıklı 14 genotip 1 skala değeri olarak bu virüs hastalığına karşı tam dayanıklılık göstermişlerdir. Bunlardan bazıları; TL406, TL452, TL453, TL454, TL460, TL550, TL601 ve TL 615 genotipleridir (Dumlupınar ve ark, 2017).

Fakat BYDV için dayanıklı bitki çeşitleri için yapılan önemli tüm çalışmalara rağmen tam dayanıklı çeşitler henüz elde edilememiştir. Tüm bu kontrol yöntemleri ile tam olarak kontrol sağlanamadığı bildirilmiştir (Koev ve ark., 1998; İlbağı ve ark., 2005 Siddiqui ve ark., 2011).

2.2. BYDV üzerine daha önce yapılmış çalışmalar

Parizoto ve ark. (2013), Brezilya'da BYDV-PAV'nün mevsimsel yayılımı ve biyolojik özellikleri üzerine yaptıkları çalışmada, BYDV-MAV, CYDV-RPV ve BYDV-PAV'nin mevsimsel yayılımlarının kışın buğday ve yulaf, yazın ise mısırın üretim alanlarında tespit etmişlerdir. Virüsün yoğunluğunun bitkilerde ve yaprak bitlerinde benzer oranlarda olduğunu, kış üretim sezonunda ise bu oranın zirveye ulaştığını bildirmişlerdir.

Nancarrow ve ark. (2014), buğdayda BYDV-PAV üzerine yüksek sıcaklığın etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar yüksek sıcaklıkta yetiştirilen bitkilerde BYDV-PAV'ın yoğun olduğunu ve normal sıcaklıkta yetiştirilen bitkilerden daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca BYDV-PAV ile ilişkili semptomların yüksek sıcaklıkta yetiştirilen bitkilerde, normal sıcaklıkta yetiştirilen bitkilere göre daha erken görüldüğünü bildirmişlerdir.

Siddiqui ve ark. (2012), Pakistan'ın farklı bölgelerinden izole edilen Arpa sarı cücelik virüsünün kılıf protein geninin klonlama ve filogenetik analizi üzerine yaptıkları

çalışmada, farklı buğday üretim alanlarında BYDV belirtisi gösteren buğday örneklerinde BYDV-PAV, BYDV-SGV, BYDV-MAV, CYDV-RPV, BYDV-GPV ve BYDV-RPV türleri açısından varlığını incelemiştir. Test edilmiş olan 37 örneğin 13 tanesinde BYDV virüslerinden birisi ile infekteli olduğunu ve onların da 10 tanesinde BYDV-PAV bulunduğunu, 3 tanesinde ise BYDV-MAV virüslerinin bulunduğunu saptamışlardır. Virüslerin dizi analizlerine göre 3 izolatın (Nowshera, Fatehjang ve Attock) BYDV-PAS'a maksimum benzerlik (% 92.8-94.6) gösterdiğini, 6 izolatın (Peshawar, Faisalabad ve Islamabad Swabi) BYDV-PAV'a maksimum benzerlik (99.3-99.7) gösterdiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak Pakistan'ın kuzeyinde buğdayın yetiştirildiği alanlarda BYDV-PAV türlerinin daha yoğun olduğunu tespit etmişlerdir.

El-Muadhidi ve ark. (2001), Irak'da baklagil ve tahıl ürünlerini etkileyen virüs hastalıklarını tanımlama amacıyla yaptıkları araştırmada, topladıkları baklagil ve tahıl örneklerini serolojik bir yöntem olan TBIA kullanılarak 12 tane baklagil ve 5 tane tahıl virüsü için test etmişlerdir. Araştırmada kullanılan tahıllarda *Cereal yellow dwarf virus-RPV* (CYDV-RPV) ve *Barley yellow dwarf virus-MAV* (BYDV-MAV) virüslerine nadiren rastlanılmıştır. Araziden toplanan tesadüfi tahıl örneklerinin yaklaşık % 1'inde *Barley yellow dwarf virus-PAV* (BYDV-PAV) saptanmıştır. Araştırmada kullanılan tüm tahıl arazilerinde virüslerin oluturduğu zarar yapılan gözlemlere bağlı olarak % 5'dir.

Koev ve ark. (1998), yulafta Arpa sarı cücelik virüsüne (BYDV-PAV) karşı transgenik bitki kullanımı konu alan araştırmada. Yulaf bitkilerine PAV virüsüne karşı RNA polimeraz enzimi üreten gen transfer etmişlerdir. Çalışmada sonuç olarak; Arpa sarı cücelik virüslerine karşı dayanıklılık gösteren transgenik bitki genotiplerinden T2 ve T3 bitkilerde PAV başlangıç sipmtom gösterse de bitkiler kurtarılmış çiçek ve tohum bağlayabilmiştir. Kontrol gurubundaki yulaf bitkilerin hepsinde olmasada birçoğunda PAV bitkilerin 25 cm uzunluğa gelmeden ölmesine neden olmuştur. Doğal dayanıklılık mekanizmasının BYDV-PAV virüsüne karşı yetersiz olduğu tespit edilmiştir.

Araştırmacılar 1987 ve 1988 yılları boyunca Güney-Batı İngiltere'nin beş bölgesinden mera ve çim otu türünde topladıkların 14 örnekte yaprak biti ile bulaşan Arpa sarı cücelik virüslerinin (BYDV-RPV, BYDV-PAV ve BYDV-MAV benzeri izolatlar) dağılımını ve etkisini ELISA ile incelemiştir. Araştırmanın sonucunda BYDV izolatlarının geniş alanda yaygın olduğu, RPV'nin daha çok güney bölgelerde,

MAV'ın ise daha çok kuzey bölgelerde görüldüğü tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada PAV'ın sadece en güney bölgelerde yaygın olduğu bulunmuştur ve bu dağılımların her iki yılda da tutarlı olduğu bildirilmiştir (Kendall ve ark., 1996).

Araştırmacılar akdeniz tipi iklim koşullarına sahip Güney Batı Avustralya'da üç farklı tarla çalışması yapmışlardır. Bu çalışmalarda *Barley yellow dwarf virus* (BYDV)'nin bir serotipi olan BYDV-PAV'ın buğday dane verimi, buğdayın kalitesi ve vektör yaprak bitlerinin hastalığı yayması üzerine incelemeler yapılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre yaprak bitlerinin erken dönemde buğday bitkisi üzerine göç ettiği, virüsü bitkilere büyüme döneminde bulaştırdığı ve bitkinin kış büyüme periyodu boyunca virüsün aktif kaldığı bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada Akdeniz tipi iklim koşullarına sahip bölgelerde buğday veriminin önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Thackray ve ark., 2005).

Tao ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada Çin'de buğday virüslerinin ve bir fitoplazmanın eşzamanlı tespiti için bir multipleks polimeraz zincir reaksiyonu geliştirmişlerdir. Çin'de Arpa sarı cücelik virüsünün PAV, GAV ve GPV olmak üzere üç irki, Buğday sarı mozaik virüsü (WYMV), Buğday mavi cücelik (WBD), Arpa çizgi mozaik virüsü (BSMV) ve Buğday cücelik virüsü (WDV) ürünlerde büyük kayıplara sebep olan patojen grubunu oluşturmaktadır. Araştırmacılar bu yedi patojenin buğdayda aynı anda tespiti ve ayırt edilmesi için, bu çalışmada bir dizi parametre optimizasyonu ile bir multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (mRT-PCR) metodu geliştirmişlerdir. Bu araştırmanın sonucunda mRT-PCR yönteminin BYDV-PAV, GPV, GAV, WDV, WBD, BSMV ve WYMV'yi aynı anda, hızlı ve nispeten etkili bir şekilde saptayabildiği bildirilmiştir.

İlbağı (2003), Trakya Bölgesi'nde üretilen bazı tahıllarda verim kayıplarına neden olan virüslerin tanımlanmasına dair yaptığı çalışmada, Trakya bölgesindeki tahıl üretim alanlarında yaygın olarak BYDV-PAV virüsünün olduğunu saptamıştır. Bunun dışında WSMV ve *Oat necrotic mottle virus* (ONMV) virüslerinde hastalıklara sebep olduğunu kanıtlamıştır. BYDV-PAV ve WSMV Trakya Bölgesi için ilk kayıt olmuşken, ONMV Türkiye için ilk kayıt olmuştur. Ayrıca İlbağı ve ark. (2006), Trakya bölgesinde mısır virüs hastalıkları üzerinde yaptıkları çalışmada topladıkları örneklerde BYDV-PAV (*Barley yellow dwarf virus*), SCMV (*Sugarcane mosaic virus*), JGMV (*Johnson*

grass mosaic virus) ve MDMV (*Maize dwarf mosaic virus*) infeksiyonlarını da saptamışlardır.

İlbağı (2017), tahıl üretim alanlarında sarı cücelik virüs hastalıklarının (*Yellow dwarf virus diseases*) epidemisi ve mücadelesini araştırdığı 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 187 adet enfekteli bitki yaprağı toplamıştır. 10 adet yulaf (*Avena sativa* L.), 138 adet buğday (*Triticum aestivum* L.) ve 19 adet arpa (*Hordeum vulgare* L.) yaprak örneği toplamıştır. Ayrıca YDVs'nin konukçusu olan çok yıllık *Poaceae* yabancı ot türü kamyştan da 20 adet yaprak örneği toplamıştır. Toplanan bu örneklerden YDVs'den *Barley yellow dwarf virus-MAV* (BYDV-MAV), *Cereal yellow dwarf virus-RPV* (CYDV-RPV) ve *Barley yellow dwarf virus-PAV* (BYDV-PAV) ilk olarak DAS-ELISA testi ile araştırılmıştır. Enfekteli olduklarından şüphelenilen yaprak örnekleri ise RT-PCR testi ile tekrardan doğrulanmıştır. Bu testler sonucunda 187 adet yaprak örneğinin 30 (% 16.04)'unda, CYDV-RPV, 89 (% 47.59)'unda BYDV-PAV ve 4 (% 2.14)'ünde ise oranında BYDV-MAV virüsleri bulunmuştur.

Tekirdağ ilinin 7 ilçesinde 26 buğday tarlasından 260 buğday örneği BYDV-PAV, BYDV-MAV, CYDV-RPV, BSMV, WDV ve BMV virüslerini araştırmak için toplanmıştır. Bu örnekler poliklonal antiserumlar kullanılarak ELISA ile altı virüs varlığı açısından araştırılmıştır. Bu araştırmadaki serolojik testler ile test edilen altı virüsün Tekirdağ'da bulunduğu bildirilmiştir. Bu çalışma sonucunda test edilen virüsler arasında en yaygın olarak BYDV-MAV (260 buğday örneğinin % 25'inde) ardından BYDV-PAV (% 22,3), WDV (% 16,5), CYDV-RPV (% 8,5), BMV (% 3,1) ve BSMV (% 1,5) oranlarında saptanmıştır. Sonuç olarak bu çalışma ile Türkiye' de ilk kez BSMV ve BMV bildirilmiştir (Köklü, 2004).

Deligöz ve ark. (2011), 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 toplamışlardır. Bu çalışma için toplanan buğday örnekleri DAS-ELISA yöntemiyle BYDV-MAV ve BYDV-PAV virüslerine spesifik antiserumlarla test edilmiştir. Araştırma sonucunda Samsun ve Amasya illerinde en yaygın tür olarak BYDV-PAV

bulunmuştur. BYDV-PAV bulunma oranı Amasya ilinde % 4 Samsun ilinde ise % 8.6 olarak belirlenmiştir.

Dayan (2013), Tekirdağ ilinde 8 farklı kışlık ekmeklik buğday çeşitlerinde tahıl virüs hastalıklarının kalite üzerine etkilerinin araştırdığı çalışmada üç farklı bölgeden 200 adet buğday yaprak örnekleri toplamıştır. Bu örnekleri DAS-ELISA testi ile incelemiş ve 200 adet yaprak örneğinin 60 adedinde *Barley yellow dwarf virus-MAV* (BYDV-MAV), *Barley yellow dwarf virus PAV* (BYDV-PAV), *Cereal yellow dwarf virus RPV* (CYDV-RPV), *Wheat dwarf virus* (WDV), *Brome mosaic virus* (BrMV) ve *Wheat streak mosaic virus* (WSMV)'lerinin varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada incelenen buğday yaprak örneklerinin hiçbirinde *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) ve *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV)'leri tespit edilememiştir. Yine aynı çalışmada deneme alanlarındaki 8 farklı kışlık ekmeklik buğday çeşitlerinden 200 farklı dane örnekleri toplanmış ve bu örnekler 9 ayrı kalite analiz testleriyle incelenmiştir. Kalite analiz testleri sonucunda özellikle dane yapısının tahıl virüs hastalıklarından doğrudan etkilediği bildirilmiştir.

Araştırmacılar Türkiye'nin Tekirdağ ilindeki kanarya tohumlarının yapraklarında sararma ve bitkide cüceleşmeye sebep olan virüs hastalıklarını incelemişlerdir. Bu amaçla toplanan örnekler *Cereal yellow dwarf virus-RPV* (CYDV-RPV) ve *Barley yellow dwarf virus- PAV* (BYDV-PAV)'a karşı serolojik olarak test edilmiştir. Test sonucunda örneklerin % 2'sinin CYDV-RPV ve % 48'inin BYDV-PAV ile enfekteli olduğunu ve bu örneklerin % 14'ünün de karışık enfeksiyonlu olduğunu saptamışlardır. Ancak araştırmada toplanan örneklerin % 36'sının enfekte olmadığını bildirmişlerdir (İlbağı ve ark., 2008).

Hamamcı (2012), Trakya Bölgesi ve Tekirdağ İli'ndeki kışlık ekmeklik buğday (*Triticum aestivum L.*) ekim alanlarında sarı cücelik ve cücelik virüs hastalıklarına karşı sergiledikleri tepkileri saptamak amacıyla yaptığı çalışmada 3 farklı bölgede 336 yaprak örneği toplamış. Bu örneklere DAS-ELISA serolojik test yöntemi uygulanmıştır. Bu test sonucunda % 80,17 oranında *Barley yellow dwarf virus PAV* (BYDV-PAV), % 4,83 oranında *Wheat dwarf virus* (WDV) ve % 6,61 oranında *Cereal yellow dwarf virus-RPV* (CYDV-RPV) türleri saptanmıştır. Bunların da enfeksiyon oranlarının toplamı % 8,39 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada BYDV-MAV ve diğer türlere rastlanılmamıştır.

Aydın (2017), Arpa sarı cücelik virüsünün çeltik (*Oryza sativa* L.)’teki durumunu saptamak üzere yapılan bu çalışmada, Trakya Bölgesi’nin Edirne, Kırklareli ve Tekirdağ İlleri’ndeki çeltik tarlalarından 120 adet enfekteli yaprak örnekleri toplanmıştır. Ayrıca bu çalışmada ek olarak çeltik tarlalarının kenarlarında bulunan ve virüslerin epidemisinde rol oynayan belirgin virüs semptomları gösteren yabancı ot türlerinden 6 adet kamyş, 10 adet kanyaş, 2 adet darıcan, 1 adet sirken ve 2 adet yabancı hardal yapraklarından da örnekler toplanılmıştır. Toplamda toplanan 141 adet yabancı ot ve çeltik yaprak örneklerine DAS-ELISA testi uygulanmıştır. DAS-ELISA test sonuçlarına göre 2 adet kanyaş, 1 adet darıcan ve 24 adet çeltik bitkisinde *Cereal yellow dwarf virus*-RPV (CYDV-RPV) saptanmıştır. Yine aynı çalışmada 1 adet kamyş ve 4 adet çeltik örneğinde *Barley yellow dwarf virus*-PAV (BYDV-PAV) virüs saptanmıştır. Ayrıca 1 adet kamyş ve 8 adet çeltik örneğinden ise CYDV-RPV ve BYDV-PAV virüs hastalıklarının karışık enfeksiyonları tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada Trakya Bölgesi çeltik üretim alanlarında % 3.54 oranında BYDV-PAV, % 17,73 oranında CYDV-RPV ve % 6.38 oranında ise karışık (BYDV-PAV+CYDV-RPV) enfeksiyonlar bulunmuştur. Test edilen örneklerin hiçbirinde BYDV-MAV virüsüne rastlanılmamıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar çeltik tarlalarında CYDV-RPV ve BYDV-PAV’ın bulunması Türkiye’deki ilk kayıt özelliği taşımaktadır.

Afyonkarahisar ve Isparta illerindeki buğday üretim alanlarında *Barley yellow dwarf virus*- PAV (BYDV-PAV) ve *Barley yellow dwarf virus*- MAV (BYDV-MAV)’ın tanınması amacıyla yaptıkları çalışmada virüs belirtisi gösteren 94 adet bitki örneği toplamıştır. Toplanan örneklerde DAS-ELISA test yöntemi ile BYDV-PAV ve BYDV-MAV’ın varlığı tespit edilmiştir. Test sonuçlarına göre 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 tespit edilmiştir (Kılıç ve ark., 2018).

Bursa ilinde mısır üretiminde kaliteyi ve verimi olumsuz yönde etkileyen bazı viral hastalıkların varlığını araştırmak üzere yaptıkları çalışmada semptomatik belirti gösteren bitkilerden yaprak örnekleri toplamışlardır. 2012 yılında yapılan bu çalışmada 150 yaprak örneği BYDV-PAV, MDMV, SCMV ve CYDV-RPV virüslerinin varlığı açısından araştırılmıştır. DAS-ELISA testi uygulanan bu örneklerin 15 adedinde % 30 oranında MDMV, 10 adedinde % 20 oranında MDMV+SCMV karışık enfeksiyonları

tespit edilmiş ve sonuç olarak mısır tarlalarındaki simptomatik belirti gösteren bitkilerin 25 adedinde % 50 oranında virüs infeksiyonlarından etkilenme tespit edilmiştir. Ancak örneklerin hiç birinde BYDV-PAV ve CYDV-RPV virüslerine rastlanmamıştır (İlbağı ve Geyik, 2014).

Toksöz ve Yılmaz (2016), Samsun ilinde 184 farklı mısır tarlasında 2009-2010 yıllarında yaptıkları çalışmada, üretim alanlarından 290 adet yaprak örneği toplanmışlardır. Bu örnekler ELISA yöntemi ile test edilmiş ve testin sonucunda, % 4.8'inin MDMV (*Maize dwarf mosaic virus*)'li olduğunu tespit etmişlerdir. Bu örneklerde *Sorghum mosaic virus* (SrMV) ve *Sugarcane mosaic virus* (SCMV)'ye rastlanılmamıştır. Ayrıca 290 örnek içerisinde farklı bölge ve simptomları gösteren 130 örneğin ELISA testi sonucunda ise, % 3.1'inin *Barley yellow dwarf virus* (BYDV)-PAV ve % 7.7'sinin *Maize mosaic virus* (MMV) ırkı ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Fakat test edilen 130 örnekte *Maize stripe virus* (MSpV) ve BYDV-MAV ırkına rastlanmamıştır. II. üretim döneminde silajlık olarak yetiştirilen mısır ürünlerinden ise 111 adet yaprak örneği toplanmış ve ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Bu örneklerin % 0.9'unun BYDV-PAV, % 0.9'unun MDMV ve % 55'inin MMV ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada sadece 1 örnekte % 0.9 oranında MDMV+MMV ikili virüs infeksiyonu tespit edilmiştir. Bu mısır alanlarındaki çalışmada SrMV, SCMV, BYDV-MAV ve MSpV ile enfekteli örnek tespit edilmemiştir.

Buğday alanlarını etkileyen bazı virüslerin tespiti için yapılan bir diğer çalışmada ise Doğu Anadolu'nun Van, Bitlis, Iğdır, Kars, Ağrı, Muş, Erzincan, Elazığ ve Malatya illerinden 900 yeşil aksam ve 78 toprak örneği alınmıştır. Bu örneklerden 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) virüsleri tespit edilmiştir. Testlenen örneklerin hiçbirinde BYDV-MAV, BYDV-RMV, SBWMV ve incelenen toprak örneklerinin hiç birinde *P. graminis* vektörü tespit edilmemiştir. Bu çalışmada Arpa sarı cücelik virüslerinin Türkiyede ilk defa multipleks RT-PCR yöntemiyle araştırması yapılmış böylece bu virüslerin daha güvenli ve ekonomik teşhislerinin yapılması için literatür oluşturmuştur (Usta, 2013).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Survey alanı

2017 yılında Nisan ve Mayıs aylarında önemli ölçüde buğday üretimi yapılan Mardin ili ve ilçelerinde yürütülen survey çalışmalarında, toplanan yaprak örnekleri (Çizelge 3.1), çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Buğday ekim alanı büyüklüğüne göre survey yapılan ilçeleri temsil edecek şekilde 400 taze yaprak örneği toplanmıştır.



Şekil 3.1. Survey yapılan Mardin ili ve ilçelerinin haritası.

3.1.2. Bitkisel Materyal

Survey çalışmalarının ana materyalini buğday bitkisinin yaprakları oluşturmaktadır. Buğday ekim alanlarında Arpa sarı cücelik virüslerinin araştırılması için Mardin ilinde Nisan 2017 tarihinde her tarladan en az 5 taze yaprak örneği almak

suretiyle toplanan örnekler soğuk zincirde Viroloji laboratuvarına getirilmiş daha sonra total RNA ekstraksiyonu yapıncaya kadar -20°C derin dondurucuda saklanmıştır.

Yıllık toplam ekim alanı 50.000 Dekarın üzerinde olan ilçelerde örnekleme yapılmıştır. Bu değer in altında ekim alanına sahip Mazıdağı, Yeşilli ve Ömerli ilçelerinden örnek alınmamıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Survey yapılan illerdeki buğday ekim alanları, toplanan yaprak sayıları

No.	İlçeler	Toplam ekili alan (dekar)	Toplam üretim miktarı (ton)	Toplanan örnek sayısı	İncelenen tarla sayısı
1	Kızıltepe	762.112	387.600	170	30
2	Derik	320.400	77.400	75	14
3	Artuklu	214.500	84.300	45	9
4	Nusaybin	182.800	71.280	40	8
5	Savur	140.180	36.500	30	6
6	Dargeçit	107.125	18.250	25	4
7	Midyat	83.644	12.027	15	3
8	Mazıdağı	28.500	9.600	-	-
9	Yeşilli	7.400	2.500	-	-
10	Ömerli	1.200	1.600	-	-
Toplam		1.844.000	700.087	400	74

3.1.3. Total nükleik asit (TNA) ekstraksiyon çalışmaları

Total nükleik asit (TNA) çalışmaları için Mardin ilinde survey yapılan alanlardan toplanan buğday yaprakları kullanılmıştır. Toplanan örnekler ayrı ayrı steril poşetlerde -20°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.1.4. Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi çalışmaları

Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi, Fermantas firmasının RevertAid First Strand cDNA kiti (Thermo-Fermantas, Vilnius, Lithuania) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm çalışma süresi boyunca -20°C 'de derin dondurucuda saklanan cDNA sentez kiti laboratuvara da kuru buz içerisinde getirilmiştir.

3.1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyon (PCR) çalışmaları

PCR çalışmaları için gereken olan ısıya dayanaklı *Taq* DNA polimeraz enzimi ve dNTP (dATP, dGTP dCTP, dTTP) karışımları, Promega (Madison WI, USA) ve Thermo-Fermantas (Vilnius, Lithuania) firmalarından temin edilmiştir. Nükleik asitlerin çoğaltılmasında Eppendorf Master Cycler Personal marka PCR ve TC3000 marka PCR cihazları kullanılmıştır.

3.1.6. Oligonükleotid Primerlerin kullanımı

Arpa sarı cücelik virüslerinin ve infeksiyonlarının tanımlanması için kullanılan primer dizileri Çizelge 3.2'de verilmiştir. Bu çalışmada kullanılan primerler, çeşitli araştırmacılar tarafından kullanılan primerlerden alınmıştır. Virüs izolatlarının karakterizasyonu için BYDV'lerin kılıf proteinini çoğaltan primerler Vector NTI 10 Programı ile tasarlanmıştır. Kullanılan primerler, kullanımdan önce belirli bir oranda (100 pmol / ul konsantrasyonda) RNaz free su ile seyreltilerek -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.2. BYDV virüslerinin teşhisinde kullanılan spesifik primer çiftleri

Virüsler	Primer İsmi	Dizi	Baz uzunluğu	Kaynak
Grup 1 (BYDV-PAV, MAV, SGV)	YAN-R SHU-F	5'-TGTTGAGGAGTCTACCTATTG-3' 5'-TACGGTAAGTGCCCAACTCC-3'	832 bp	(Malmstrom ve Shu, 2004)
Grup 2 (CYDV-RPV, BYDV- RMV)	S2A-F S2B-F	5'-TCACCTTCGGGCGTCTCTATCAG-3' 5'-TCACCTTCGGGCGTCTCTTTCTG-3'	372 bp	(Malmstrom ve Shu, 2004)
BYDV-PAV	PAV-F PAV-R	5'-ACCTAGACGCGCAAATCAAA-3' 5'-ATTGTGAAGGAATTAATGTA-3'	590 bp	(Malmstrom ve Shu, 2004)
BYDV-SGV	SGV F SGV R	5'-ACCAGATCTTAGCCGGGTTT-3' 5'-CTGGACGTCGACCATTCTT-3'	250 bp	(Deb ve Anderson, 2008)
BYDV-RMV	RMV F RMV R	5'-ACGAGGACGACGACCAAGTGGA-3' 5'-GCCATACTCCACCTCCGATT-3'	365 bp	(Deb ve Anderson, 2008)
CYDV-RPV	RPV F RPV R	5'-ATGTTGTACCGCTTGATCCAC-3' 5'-GCGAACCATTGCCATTG-3'	600 bp	(Usta, 2013)
BYDV-MAV	MAV- F	5'-AATAACCGCAGGAGAAATGG-3'	590 bp	(Malmstrom ve Shu, 2004)

3.1.7. Agaroz jel elektroforez çalışmaları

PCR işlemleri ile çoğaltılan DNA ürünlerinin UV ışınları altında görüntülenmesi ve yüklenmesi için etidyum bromür(% 1) eklenmiş agaroz jel materyal olarak kullanılmıştır. BİO-RAD firmasına ait olan orta büyüklükte elektroforez aparatı Wide Mini Subcell GT ve küçük boyutta Mini-Subcell GT aparatları agaroz jel elektroforezi için kullanılmıştır. Elektroforez işleminde koşturulmuş DNA ürünleri Syngene jel görüntüleme analiz sistemi cihazı (Synoptic Ltd. Cambridge, GB) ile görüntülendi.

3.1.8. Klonlama çalışmaları

Klonlaması yapılacak pozitif izolatların kılıf protein gen bölgeleri spesifik primerler kullanılarak PCR yöntemiyle çoğaltılması sağlanmış daha sonra Herolab marka UVT-20 M/W UV transillüminatör cihazında DNA fragmentlerinin jelden saflaştırılması için görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Klonlama çalışmaları için *E.coli* bakterisinin JM109 suşu ve Promega firmasından satın alınan pGEM T-Easy Vektör sistemi (Katalog No.A3610) kullanılmıştır. Fermantes firmasından satın alınmış GeneJET Plasmid MiniPrep Kiti ve protokolü uygulanmıştır

Fermantas GeneJET Plasmid Mini Prep Kitleri klonlama işleminden sonra elde edilen rekobinant plazmitlerin bakterilerden saflaştırılması için kullanılmıştır. Mikropulser cihazı ile transformasyon işlemi yapılmış ve daha sonra transforme olmuş bakterinler Thermo marka inkübatörlü sallayıcı üzerinde geliştirilmiştir.

3.1.9. DNA dizi analizi ve biyofomatik yöntemlerle filogetik analiz

Klonlaması yapılan virüs izolatlarının DNA dizilemeleri Sentebiolab A.Ş (Bilkent, Ankara) firmasına yaptırdıktan sonra filogenetik analizleri lisanslı CLC Main Workbench 6.2.3, Snapgene, Vector NTI 10 ve Mega 7 programlarının yardımı ile gerçekleştirilmiştir. DNA dizilerinin izolatlarını Genbakasına ait NCBI web sitesine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) girişi yapılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Survey çalışmaları

Survey çalışmaları kapsamında 2017 yılının nisan ve mayıs ayları içerisinde Mardin ili ve ilçelerinden buğday arazilerini temsil edecek şekilde taze yaprak örnekleri toplanmıştır. Kademeli örnekleme yönteminden yararlanarak bulunan incelenecek alan oranı, survey yapılan ilin ilçelerindeki toplam üretim alanının en az % 3'nü kapsayacak şekilde hesaplanmıştır (Bora ve Karaca, 1970).

Her tarladan en az 5-20 örnek alınacak şekilde tarlayı en iyi temsil edebilecek biçimde tarlanın farklı bölgelerinden örnekleme yapılmıştır (Köklü, 2004; Bukvayova ve ark., 2006). Örnekleme sırasında örnek seçimleri simptom gösteren ve göstermeyen bitkilerden rastgele yapılarak toplanmıştır. Toplanan yaprak örnekleri polietilen torbalara konularak soğuk zincirde laboratuvara getirildi. Örneklerin total nükleik asit ekstraksiyonları yapılana kadar zarar görmeden korunabilmesi için -20 derecede depolandı.

3.2.2. Viral infeksiyonların araştırılması

3.2.2.1. Bitki total nükleik asit (TNA) ekstraksiyonu

Mardin ilinde virüs infeksiyonunu belirlemek için toplanan buğday yaprak örneklerine total nükleik asit ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla bitki total nükleik asit ekstraksiyonu Foissac ve ark., (2001)'in bildirdiği silika temelli yonteme göre yapılmıştır. Buna göre 100 mg yaprak dokusuna karşılık 1 ml ekstraksiyon tamponu (grinding buffer) ile plastik torba içerisinde ezilerek homojenize hale getirildi. Homojenize edilen ekstraktan 500 µl hacimde alınan ve üzerine 100 µl % 10 Sodium lauryl sarcosyl solüsyonu ilave edilen tüpler ara sıra sallanmak kaydı ile 10 dakika süreyle 70°C de inkube edildi ve daha sonra 5 dakika süreyle buza daldırıldı. Tüpler 10 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra üstteki sıvının 300 µl'si boş steril eppendorf tüplerine transfer edilip sonrasında içerisine sırasıyla 150 µl etanol, 25 µl resuspanse silica ve 300µl 6M sodium iodide ilave edildi. Karışım, oda sıcaklığında

sallayıcı (shaker) üzerinde 10 dakika inkübe edildi. Tüpler 6000 rpm de 1 dakika santrifüje bırakıldıktan sonra üstteki sıvı (supernatant) atılarak ve 500µl yıkama tamponu (washing buffer) ile oluşan pelletler yıkanıp, 6.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra tekrar eppendorf tüplerindeki pelletler 500µl yıkama tamponu (wash buffer) ile yıkanmıştır. Elde edilecek pelletler, 150 µl RNase-free su ile çözdürüldükten sonra 4 dakika 70°C de benmari de inkübe edilmiştir.

Tüpler 3 dakika 14.000 rpm de santrifüj edildikten sonra, supernatant yeni hazırlanan ependorf tüplerine transfer edilerek pelletlerden uzaklaştırılmıştır. Böylece elde edilen total nükleik asit ekstraksiyonu komplemanter DNA elde edilinceye kadar -20 °C de depolanmıştır.

3.2.2.2. Tamamlayıcı (Komplementer) DNA (cDNA)'nın sentezi

Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi, ticari kit yardımı ile reverse transcriptase enzimi kullanılarak elde edilmiştir. Arpa sarı cücelik virüsleri (BYDV-PAV, BYDV-MAV, BYDV-SGV, CYDV-RPV, BYDV-RMV) Malmstrom ve Shu (2004)'ün kullandığı yöntem göre Arpa sarı cücelik virüslerinin tümünü tanıyan Yan Reverse primeri 5'-TGTTGAGGAGTCTACCTATTTG-3' kullanılarak total RNA'lar dan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Böylece Arpa sarı cücelik virüsü için ayrı ayrı cDNA yapılmasına gerek kalmamıştır.

Buna göre nükleaz-free mikrofuj tüp içersine 1µl 20 pmol/µl spesifik Revers primer eklendi. Daha sonra 2µl total RNA, 1µl 10mM dNTP karışımı eklenmiştir. RNAase free su ile 12 µl'ye tamamlanan karışım köpürtülmeden vortekslendi. Vorteks sonrasında olumsuz bir durumla karşılaşmamak için tüpün cidarlarındaki damlaları tüpün dibine indirmek suretiyle 4-5 bin rpm'de kısa bir dönü yapıldı. Karışım 5 dakika 65 °C PCR cihazında inkübe edildikten sonra buza daldırılarak hızla soğutulmuştur. Daha sonra buz üzerinde bu tüplere her bir örnek için 4µl 5X RT Reaksiyon buffer, 2µl 0.1M DDT, 1µl RNAase inhibitör ve 1µl reverse transcriptase enzimi ilave edilerek reaksiyon karışımı 20 µl ye tamamlanmıştır. Tüpler kısa bir spin yaptıktan sonra PCR cihazında 42°C' de 50 dakika inkübe edilerek transkripsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra aynı PCR cihazında Reverse transkriptaz enzimini inaktive etmek için inkübasyon sonrası tüpler 70 °C sıcaklıkta 15 dakika süreyle bekletilerek reaksiyon

sonlandırılmıştır. Kullanıma hazır olan tamamlayıcı DNA (cDNA)' lar PCR işlemi yapıncaya kadar -80°C de tutulmuştur.

3.2.2.3. Virüslerin multipleks RT-PCR ile araştırılması

Arpa Sarı Cücelik (BYDV) virüslerinden olan BYDV-PAV, BYDV-MAV, BYDV-SGV, CYDV-RPV ve BYDV-RMV türlerinin teşhisleri Malmstrom ve Shu 2004'e göre yapılmıştır. Araştırmacılar 2004 yılında kullandıkları teşhis yöntemlerini, temel ve genişletilmiş multipleks RT-PCR olmak üzere iki farklı sistemde geliştirmişlerdir. Temel multipleks RT-PCR yönteminde virüsleri gruplara (Grup1-Grup2) ayıran ve bu grupların iki farklı DNA fragmentini çoğaltan bir sistem geliştirmişlerdir. Bu sistemde grup1 (BYDV-PAV, BYDV-MAV, BYDV-SGV) virüsleri için Shu-F ve Yan-R primerleri (Çizelge 3.2) kullanılırken grup2 (CYDV-RPV, BYDV-RMV) virüsleri için ise S2a-F ve S2b-F primerleri (Çizelge 3.2) kullanılarak teşhisler yapılmıştır.

Geliştirilmiş multipleks RT-PCR yönteminde ise türe özgü primerler kullanılarak grup1 ve grup2 virüslerinin içinde spesifik teşhislerin yapılmasına olanak sağlanmıştır. Multipleks RT-PCR yöntemi ile yapılan teşhislerde yetersiz bir amplifikasyon olması durumunda da farklı araştırmacıların kullandığı spesifik primerler kullanılarak RT-PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir.

Buna göre multipleks RT-PCR işlemi için bir PCR tüpüne;

- 35.6 μl RNase free su,
 - 5 μl 10X PCR Buffer
 - 3 μl 25mM MgCl_2
 - 1 μl 10mM dNTP
 - 1 μl 20 μM Shu-F
 - 1 μl 20 μM Yan-R
 - 1 μl 20 μM S2a-F
 - 1 μl 20 μM S2b-F
 - 0.4 μl *Taq* DNA polimeraz enzimi (5U/ μl)
- } **Grup 1** (832 bp)
- } **Grup 2** (372 bp)

Bununla birlikte kalıp DNA olarak 2 μl cDNA konulup tüpün hacmi 50 μl tamamlanmıştır. Daha sonra ependorf tüplerin kapaklarının kenarlarındaki sıvıların dibe

inmesini sağlamak için tüpler köpürtülmeden kısa bir dönüye konuldu. En son olarak da hazırlanan tüpler PCR cihazına konulup, virüsün primerlerine uygun sıcaklık döngüsüne konarak çoğaltılması sağlanmıştır. Grup1 ve Grup2 virüslerinin belirlenmesinde Çizelge 3.3.'de verilen virüslere özgü primerler ve sıcaklık döngüleri kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Virüslerin teşhisinde kullanılan primerler, amplifikasyon ürünü, PCR türü, sıcaklık döngüleri ve yararlanılan kaynaklara yönelik bilgiler

Virüsler	Kullanılan Primerler	Amplifikasyon Ürünü	PCR Çeşidi	Sıcaklık Döngüleri
1.grup virüsler	Yan-R Shu-F	832 bp	Klasik multipl eks RT-PCR	94°C5 dk 94°C30 sn 60°C30 sn 72°C30 sn 72°C 7 dk } 35 döngü (Malmstrom ve Shu, 2004)
2.grup virüsler	S2a-R S2b-F	372 bp		
BYDV-PAV BYDV-SGV	Yan R Shu F PAV-F SGV-R	832 bp 590 bp 254 bp	Genişle tilmiş multipl eks RT-PCR	94°C5 dk 94°C60 sn 55°C60 sn 72°C60 sn 72°C 7 dk } 35 döngü (Malmstrom ve Shu, 2004)
BYDV-MAV ve BYDV-SGV	Yan R Shu F MAV-F SGV-R	832 bp 590 bp 254 bp	Genişle tilmiş multipl eks RT-PCR	94°C5 dk 94°C60 sn 55°C60 sn 72°C60 sn 72°C 7 dk } 35 döngü (Malmstrom ve Shu, 2004)

Çizelge 3.3. Virüslerin teşhisinde kullanılan primerler, amplifikasyon ürünü, PCR türü, sıcaklık döngüleri ve yararlanılan kaynaklara yönelik bilgiler (devam)

Virüsler	Kullanılan Primerler	Amplifikasyon Ürünü	PCR Çeşidi	Sıcaklık Döngüleri
BYDV- MAV	MAV Fs MAV Rs	660 bp	RT- PCR	94°C2 dk 94°C30 sn 53°C30 sn 72°C90 sn 72°C 10 dk (Bisniek ve ark., 2004)
BYDV- RMV	RMV R RMV F	365 bp	RT- PCR	94°C2 dk 94°C30 sn 58°C60 sn 72°C30 sn 72°C 10 dk (Deb ve Anderson, 2008)
CYDV- RPV	RPV F RPV R	615 bp	RT- PCR	94°C2 dk 94°C30 sn 53°C60 sn 72°C30 sn 72°C 10 dk (Usta, 2013)
BYDV- SGV	SGV Rs SGV Fs	250 bp	RT- PCR	94°C10 dk 94°C30 sn 55°C30 sn 72°C30 sn 72°C 10 dk (Deb ve Anderson, 2008)

3.2.2.4. PCR ürünlerinin agaroz jel'de elektroforezi, DNA'yı boyama ve görüntüleme

PCR işlemleri bittikten sonra çoğaltılan DNA ürünleri % 1'lik agaroz jel'de elektroforez işleminden geçtikten sonra jel görüntüleme ve analiz sisteminde görüntülenip fotoğraflandı. Bu işlem 1 gram agaroz 100 ml 1X TAE (Tris-

Asetikasit- EDTA) tamponu içine karıştırıldıktan sonra agarozun erimesi ve homojeniteyi sağlamak için mikrodalga fırında yaklaşık 5 dk bekletildikten sonra tekrar 50-60 °C' ye kadar soğuması beklenmiş ve daha sonra jel tepsisine dökülüp çözeltiliye 1 µl EtBr (0.5 µg/ml) eklenerek jelin katılaşması için 20 dakika beklenmiştir. Katılaşma sağlandıktan sonra jel tepsisindeki jelin elektroforez tankına aktarımı yapılmış ve tankın içine jeli üzerini kapatacak şekilde 1X TAE tamponu (Ek 2) eklenmiştir. Daha sonra jelden dikkatli bir şekilde tarak çıkartıldı ve jeldeki çukura; 2 µl DNA ladder 5 µl 6X yükleme tamponu ve 3 µl RNAze fre su ile toplamda 50 µl olarak hazırlanan PCR ürünlerinin 15 µl'si karıştırılıp çukurlara yüklenmiştir. Çukurlara PCR ürünleri yüklendikten sonra 120 voltajlık elektrik akımında 60 dakika süreyle koşturuldu ve jel görüntüleme ve analiz sisteminde görüntülenip fotoğrafları alınmıştır.

3.2.3. Moleküler karakterizasyonlarının yapılması

Mardin ilinde gerçekleştirilen survey çalışmasında tarlalardan Arpa sarı cücelik virüs (BYDV) gurubundan BYDV-PAV, BYDV-SGV, BYDV-RMV ve CYDV-RPV virüsleri, geliştirilmiş multipleks RT-PCR yöntemiyle tespit edilmiştir. Tespit edilen izolatlardan her bir virüse ait rastgele bir izolat seçilip kılıf protein genin kısmi veya tamamının gen karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. Virüslerin kılıf protein genleri için primer dizaynı

Multipleks RT-PCR sonucu pozitif sonuç veren virüs izolatlarının arasından BYDV-PAV, BYDV-SGV, CYDV-RPV ve BYDV-RMV virüslerine ait karakterizasyonların yapıla bilmesi amacı ile virüslerin genomunda bulunan kılıf protein gen bölgesinin tümünü çoğaltacak primer dizaynları yapılmıştır. Primer dizaynı, gen bankasına girilerek daha önce tüm genomu çıkarılmış DNA dizileri, Vektör NTI programı kullanılarak tasarlanmıştır. BYDV-PAV virüs izolatı için gen bankasından NC_004750.1 (Accession number) erişim numaralı tüm genom dizimi alınmış, CYDV-RPV için NC_004751.1 (Accession number) erişim numaralı tüm genom dizimi kaynak alınarak primer dizaynları yapılmıştır. Oluşturulan primerler sentez için ilgili firmaya da gönderilmeden önce Blast yapılarak doğruluğu kontrol edilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. BYDV-PAV, CYDV-RPV, BYDV-SGV ve BYDV-RMV virüs izolatlarının kılıf protein genlerini çoğaltmak amacıyla Vector NTI 10 programı kullanılarak dizayn edilen primerler ile bu primerlerin çoğalttığı bölgelerin uzunluğu

Virüs	Primer Dizisi	Çoğaltılan Gen	Çoğaltılan alanın uzunluğu (bp)
BYDV-PAV	5'-ATGAATTCAGTAGGTCGTAG-3' 5'-GAGGAGTCTACCTATTTGGC-3'	Kılıf protein	603 bp
CYDV-RPV	5'-ATGAGTACGGTCGTCCTTAG-3' 5'-CCCTATTTTGGGTTTTGTAGC-3'	Kılıf Protein	615 bp
BYDV-RMV*	5'-GACGAGGACGACGACCAAGTGGA-3' 5'-GCCATACTCCACCTCCGATT-3'	Kısmi Kılıf Protein	365 bp
BYDV-SGV*	5'-ACCAGATCTTAGCCGGGTTT-3' 5'-CTGGACGTCGACCATTCTT-3'	Kısmi Kılıf Protein	250 bp

3.2.3.2. Virüslerin kılıf protein genin çoğaltılması

RT-PCR yöntemiyle çoğaltılan BYDV-PAV, BYDV-SGV, BYDV-RMV ve CYDV-RPV kılıf protein genleri ticari kitlerle saflaştırıldıktan sonra pGEM-T easy vektörü kullanılarak T-A klonlama yöntemiyle klonlanmıştır.

3.2.3.3. Kılıf protein genin *Taq* polimerizasyon enzimi ile çoğaltılması

Virüs izolatlarının kılıf protein genleri, Go Taq Hot Start polimeraz enzimi PCR ürününün 3' ucuna Adenin bazı ekleyen 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi göstererek PCR yöntemiyle çoğaltılması sağlanmıştır. Buna göre bir PCR tüpüne aşağıdaki malzemeler konulmuştur;

- 29 µl Nuclease free su
- 10 µl 5X Green Go Taq Fleksi Tamponu
- 3 µl 25mM MgCl₂
- 1 µl 10mM PCR nükleotit karışımı
- 1 µl forward primer (100 pmol)

- 1 µl reverse primer (100 pmol)
- 0.25 µl Go Taq Hot Start polimeraz enzimi(5U/ µl)
- 5 µl cDNA

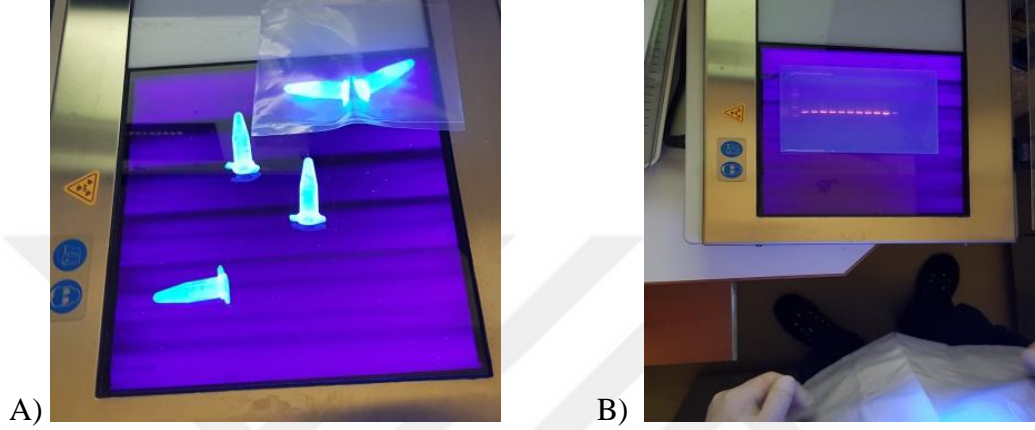
Tüpler daha sonra köpürtülmeden karıştırılıp kısa bir dönü yaptırılıp PCR cihazına yerleştirilmiştir. PCR cihazının kılıf protein genlerini çoğaltması için gereken sıcaklık ayarlaması Malmstrom ve Shu (2004) göre programlanmıştır.

3.2.3.4. DNA fragmentlerinin agaroz jelden saflaştırılması

PCR işleminden sonra elde edilen ürünler jelden saflaştırma işleminden önce % 1'lik agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutulup daha sonra jel görüntülüne cihazında görüntülenip fotoğraflanmıştır. UV ışınları altında görüntülenen DNA bantlarının kalınlığı ve parlaklığı kontrol edilerek steril bistüri yardımıyla dikkatlice kesilip jel kalıbından kesilmiştir (Şekil 3.6). Eppendorf tüplere aktarılan DNA bantları içeren jellerin saflaştırma işleminde Boline İsolate PCR ve jel kitleri (Katalog No, BIO-52029) kullanılmıştır. Jel saflaştırma kit prosedürüne göre;

- DNA bantları içeren eppendorf tüplere 650 µl Gel Solubilizer(Jel Çözücü) eklenmiş ve kuru blok ısıtıcıda 10 dakika boyunca 50 °C sıcaklıkta jel parçalarının iyice çözünmesi sağlanmıştır.
- Jelin çözünmesi sağlandıktan sonra 50 µl binding optimizer(Bağlanma Tamponu) eklenmiştir.
- Daha sonra koleksiyon tüpüne aktarılması için 2 ml'lik koleksiyon tüplerine Spin Kolon A yerleştirilip çözünmüş jelin 750 µl kısmı aktarılmıştır. Spin kolondan filitrenmesi için 1 dakika boyunca 12000 rpm hızda santrifüj edilmiştir. İşlem jelin kalan kısmı için aynen tekrarlanmıştır.
- Spin kolona 700 µl Wash Buffer (yıkama tamponu) eklenilir ve 1 dakika boyunca 12000 rpm hızda santrifüj edildikten sonra biriktirme tüpüne geçen sıvı atılıp ikinci yıkama için işlem tekrarlanılmıştır.
- Yıkama tamponunda bulunan etanolun Spin Kolon A'dan tamam uzaklaştırılmasını sağlamak için maksimum hızda 2 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.

- 1.5 ml'lik eppendorf tüpüne alınan Spin Kolonlara 50 µl elüsyon tamponu eklenip 1 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilir.
- Son olarak DNA'nın kolondan geri kazanılması sağlanmak için 12000 rpm hızda 1 dakika boyunca santrifüj edilip elde edilen DNA ürünleri diğer moleküler çalışmalarda kullanılmak için -20 °C muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2. A) DNA bantları içeren jellerin kesilip eppendorf tüplere aktarımı B) DNA bantlarının UV ışın altında görüntülenmesi.

3.2.3.5. DNA'nın plazmide aktarımı (Ligasyon)

PCR ile çoğaltılan kılıf protein genlerinin aktarımı için Promega firmasının pGEM-T easy vektör sistemi (Katalog No, A1360) ve ligaz enzimi kullanılmıştır.

Buna göre steril PCR tüpü içerisinde;

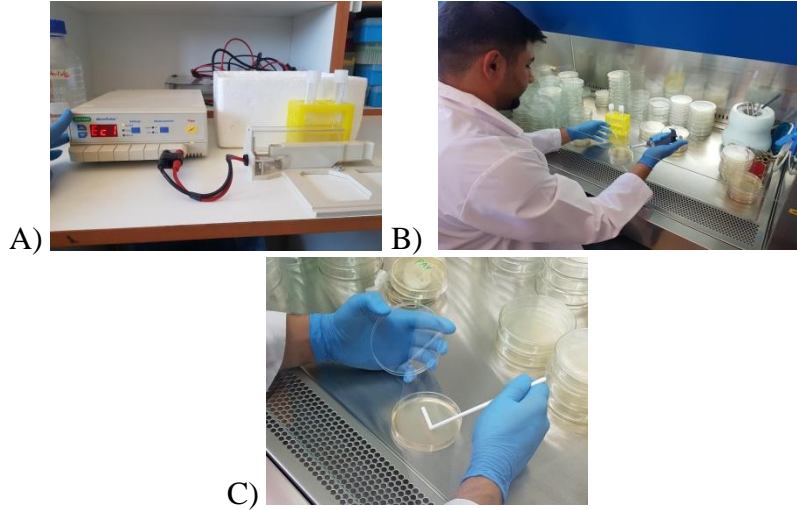
- 5 µl 2X Rapid Ligation Buffer
- 1 µl pGEM-T easy Vektör
- 5 µl 3' ucundan Adenin eklenmiş DNA
- 1 µl T4 DNA ligaz enzimi

Tüm kimyasallar eppendorf tüpe eklenip karışım 12 µl tamamlandıktan sonra tüplere kısa bir dönü yapılmıştır. Rekombinant plazmitlerin oluşumunu sağlamak için 1 gece 4 ° C'de inkübasyona bırakılıp tekrar kullanılincaya kadar -20 ° C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.6. Plazmidin bakteriye aktarılması

Rekombinant plazmidlerin bakteriye aktarımında, kitle sağlanan *Escherichia coli* bakterisinin JM109 suşuna Micropulser cihazı(BioRad) ile elektroşok uygulaması yapılarak transferi sağlanmıştır (Şekil 3.6.). 100 μ l bakteri süspansiyonuna (Ek 4) karşılık 5 μ l rekombinant plazmit karıştırılmış ve 5 dakika boyunca buzda inkübe edilmesi sağlanmış Micropulser cihazında ki kuvetlere aktarılıp elektroşok uygulanmıştır. Uygulanan elektrik akımından sonra bakterilerin optimum gelişimini sağlamak için bakteri süspansiyonuna 900 μ l SOC solüsyonu (Ek 3) eklenip karışım 37 °C’de 150 rpm hızda 2 saat boyunca inkübatörlü sallayıcı platformda gelişimi sağlanmıştır.

Bakteri ekimi için ise ampisilin, IPTG ve X-GAL içeren katı LB petrilere (Ek 3) muhafaza edildikleri buzdolabından alınıp inkübe edilerek 37 °C’de 1 saat bekletilerek ekim için hazır hale getirilir. Hazır hale getirilen petrilere gelişimi sağlanmış bakteri süspansiyonundan 200 μ l alınarak ekimi yapıp steril drisgaski çubuklarıyla petri yüzeyine iyice yayılımı sağlanır (Şekil 3.6.). Son olarak petrilere mavi beyaz kolonilerin oluşması için bir gece boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.3. A) Transformasyon işlemi ve elektroşok uygulaması B) SOC süspansiyonunda gelişime bırakılan bakterilerin ampisilin içeren katı LB ortamında petrilere ekimi C) Bakteri süspansiyonlarının petrilere steril drisgaski çubuklarıyla besiyerine yayılmaları.

3.2.3.7. Rekombinant bakterilerden mavi-beyaz tek kolonilerin oluşturulması ve transforme olmuş kolonilerin çoğaltılması

Ampisilin direnci yalnızca bünyesine pGEM-T easy vektör plazmiti almış bakterilerde mevcuttur. Bu nedenle ampisilin içeren katı LB besi ortamında yalnızca plazmit+PCR ürünü DNA içeren bakteriler veya sadece plazmit alan transforme olmuş iki tür bakteri kolonileri gelişecektir. Bunlardan ilki beyaz koloni oluştururken ikincisi mavi koloniler oluşturacaktır. Besi ortamında beyaz kolonilerin oluşma sebebi, PCR ürünü DNA, plazmitin Lac Z bölgesine yerleşerek bakterinin ortamdaki IPTG ve X-Gal kimyasallarından protein üretimini engelleyerek beyaz renkli protein oluşmasından kaynaklanır mavi kolonilerde plazmitler PCR ürünü DNA'lar içermediğinden IPTG ve X-Gal kimyasallarının kullanımını engelleyecek bir yapıda değildir. Bu sayede PCR ürünü DNA almış plazmitlerin aktarıldığı bakteri kolonileri seçilmiştir. İnsert DNA taşıdıkları düşünülen beyaz kolonilerden steril bir kürdan yardımı ile 100 µl ampisilin ve % 0.8 glycerol içeren 4 ml sıvı LB (Ek 3) bulunan 15 ml'lik kapalı steril tüplere bulaştırılması sağlanmış daha sonra bakterilerin optimum gelişimini sağlamak için bir gece boyunca 37 °C'de 150 rpm hızda inkübasyona bırakılmıştır(Şekil3.8). Beyaz kolonilerin katı besi ortamında alınıp sıvı besi ortamına aktarımı sırasında kontaminasyonu minimize etmek için bütün çalışma steril kabinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. A) Mavi beyaz koloniler B) Besi ortamında gelişen mavi-beyaz kolonilerden beyaz olanların seçimi C) 37° C'de inkübasyon işlemi.

3.2.3.8. Rekombinant plazmitlerin saflaştırılması

Rekombinant plazmitlerin saflaştırılmasında, Fermantes firmasının saflaştırma kitinden ve firmanın önerdiği plazmid izolasyon prosedüründen yararlanılmıştır. Buna göre;

- 2 ml'lik steril eppendorf tüpünde geliştirilmiş bakterilerin transferi gerçekleştirilir. Bakteri hücreleri pellet haline getirilmek adına maksimum hızda santrifüj edilip olabildiğince süpernatantı tüpten uzaklaştırılması sağlanır daha sonra tekrar 2 ml tüplere aktarılıp bakteri hücrelerinin pelletleşmesi sağlanmak için maksimum hızda 3 dakika santrifüj edilir.
- Peletlenmiş hücreler 250 µL Süspansiyon bufferı içinde iyice çözündürüldükten sonra pipet veya vorteks yardımıyla karıştırılır.
- 250 µL Lizis buffer P Solüsyonu eklenilir. Solüsyon viskoz hale gelene ve hafif netleşene kadar tüp 4-6 kez ters yüz edilerek iyice karıştırılır.
- 350 µL Nötralizasyon tamponu eklenilir. Tüpler 4-6 kez ters yüz edilerek iyice karıştırıldıktan sonra santrifüjde maksimum hızda 10 dakika boyunca santrifüj edilir.
- 2 ml'lik koleksiyon tüpü içerisine, santrifüj sonra oluşan üst sıvıyı aktarmak için Spin Kolon P yerleştirilir. 1 dakika boyunca 12000 rpm hızda santrifüj edilen koleksiyon tüplerinde kolondan geçen sıvı atılıp yeniden koleksiyon tüplerine spin kolon yerletirilerek kullanılır.
- 500 µl yıkama tamponu AP, Spin Kolon P'nin üzerine eklenip 1 dakika boyunca 12000 rpm hızda santrifüj edilir. Santrifüj işleminden sonra kolondan geçen sıvı boşaltılarak spin kolon yeniden koleksiyon tüpünün içerisine yerleştirilir. Bu işlem etanol içeren 700 µl yıkama tamponu için tekrar yapılır. Kolonlarda etanolün etkisini yok etmek için 2 yıkamadan sonra maksimum hızda 2 dakika boyunca santrifüj edilir.
- Saflaştırma kitinde bulunan 1.5 ml'lik elüsyon tüplerinin içerisine Spin Kolon P yerleştirilir. Elüsyon tamponu 60 µl miktarınca Spin Kolonun içerisine eklenip 1 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilir. Son olarak plazmid DNA'nın tüpe aktarmak için 12000 rpm hızda 1 dakika boyunca santrifüj edilir.
- İzole edilmiş genomik DNA, diğer çalışmalarda kullanım için -20 °C'de muhafaza edilir.

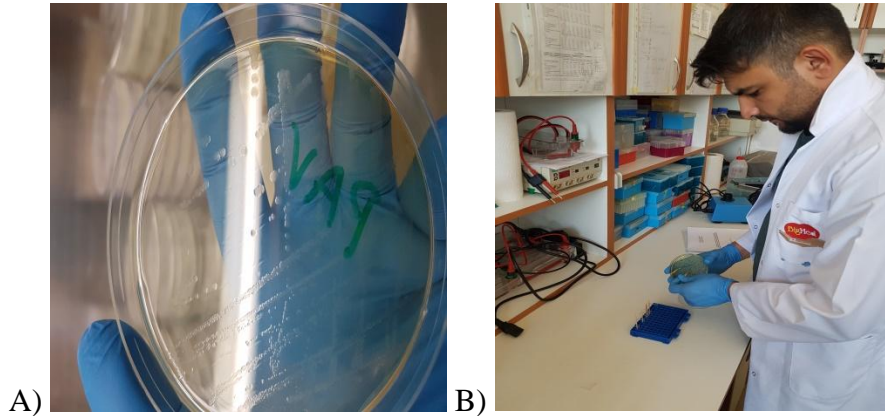


Şekil 3.5. Rekombinant plazmid saflaştırma aşaması.

3.2.3.9. PCR ile klonlanan DNA taşıyan kolonilerin kontrolü

Katı LB'de geliştirilen beyaz renkli kolonilerde rekombinant plazmitlerin varlığı, virüse özgü primerler kullanılarak ilgili genin kolonide taşınıp taşınmadığı daha duyarlı bir yöntem olan koloni PCR ile belirlenmiştir. Her bir izolatu için, en az 5 beyaz koloni seçilmiş ve PCR yöntemi ile test edilmiştir (Şekil 3.6).

Buna göre steril PCR tüplerine; 2.5 μ l 10l 10X PCR Tampon (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 1.5 25 25 mM MgCl₂, 0.5 d dNTP karışımı, her bir spesifik primer çifti (100 MM), 0.2 μ l Taq DNA polimeraz enzimi (5 U / mL), 18.3 ul RNase içermeyen su eklenir. Steril kabinde, katı LB ortamında yetişen beyaz koloniler seçilmiş ve her bir koloni numaralandırılmıştır. Steril kürdan veya pipet ucuna beyaz kolonun ortasına dokunulmuş ve şablon kullanılarak DNA PCR tüpüne karıştırılmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Dönüşümden sonra beyaz koloniler(A), katı LB ortamında geliştirilen beyaz kolonilerden tekli koloni alma(B).

PCR tüpleri kısa bir süre vortekslendikten sonra PCR cihazına yerleştirilmiştir.

PCR cihazı programlandı ve aşağıdaki programa göre çalıştırılmıştır;

- 94 ° C 5 dakika
 - 94 ° C 60 saniye
 - 55 ° C... .60 saniye
 - 72 ° C... .60 saniye
 - 72 ° C 5 dakika
- } 40 döngü

Klonlanan gen ilk seçilen kolonilerde bulunmadıysa, aynı prosedür tekrar edildi. PCR'den sonra elde edilen PCR ürünleri, % 1 agaroz jel üzerinde elektroforez yöntemiyle koşturulmuştur. Daha sonra ultraviyole ışığı altında jel görüntüleme ve analiz sisteminde fotoğraflanmıştır.

3.2.3.10. Klonlanan plazmitlerin DNA dizi analizi

Rekombinant plazmitler moleküler klonlamadan sonra çift yönlü DNA dizilemesi için Sentebiolab (Bilkent-Ankara)'ye gönderilmiştir. Plazmit DNA'nın 25 ul kısmı DNA dizilemesi için gönderilirken kalan 25 ul kısmı başka çalışmalarda kullanılmak üzere -20 ° C'de saklanmıştır. Dizilemeye gönderilen her izolatin promotör bölgelerine spesifik universal primerler ile çift yönlü dizileme yapılarak dizi okuma hataları en aza indirilmeye çalışılmıştır.

Dizi analizi sonrasında, CLC Main Workbench ve Vector NTI farklı bionformatik programlar ile genom bilgileri analiz edilmiştir. CLC Main Workbench programı ile farklı virüs izolatlarının kılıf protein genlerinin nükleotid dizilerinin yüzde olarak benzerlik oranları belirlenmiştir. Mega 7 programı ile de filogenetik ağaçları yapılmıştır. Virüs izolatlarının dünyadaki farklı virüs izolatlarıyla benzerlik ve farklılıklarının tespiti için çoklu dizi karşılaştırılmasını yapabilmek için CLC Main Workbench programından yararlanılmıştır.

3.2.3.11. DNA dizilerinin gen bankasına girilmesi

Farklı Arpa sarı cücelik virüslerinin çoğaltılan kılıf protein genlerinin dizi analizi sonrası elde edilen dizileri, National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gen bankasına girilmesi gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde elimizdeki karakterize edilmiş tüm virüs izolatları tüm araştırmacıların faydalanmasına olanak sağlayacaktır.

3.2.3.12. Kılıf protein genlerinin filogenetik analizi

Mardin ilinde gerçekleştirilen survey çalışmalarında tespit edilen BYDV-SGV, BYDV-PAV, CYDV-RPV ve CYDV-RMV virüs izolatlarından rastgele seçilen örneklerin kılıf protein genleri, Geneious 6.1.5 programında ile karşılaştırma (Multiple Align) yapılmıştır. Gen bankası içerisinde farklı ülkelerde tespit edilen virüs izolatlarının adı geçen program vasıtası ile çoklu nükleotid ve aminoasit dizi karşılaştırmaları yapılmıştır. Soy ağacı oluşturulmasında Neighbor-Joining yöntemi kullanılmış ağaç yapım metodu olarak ise Tamura-Nei algoritmasından yararlanılmıştır. Yapılan soy ağacı oluşturma işleminde güvenilirlik oranını artırmak için 100 tekerrürlü bootstrap analizi uygulanmıştır. Son olarak BYDV-PAV, BYDV-SGV, BYDV-RMV ve BYDV-RPV virüsleri için oluşturulan soy ağaçlarının dünya izolatları ile yakınlık dereceleri ve genetik ilişkileri ortaya çıkarılmıştır.



4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Survey alışmaları

Mardin ilinin Kızıltepe, Derik, Nusaybin, Artuklu, Savur, Dargeçit ve Midyat ilçelerinde buğday ekim alanlarında virüslerin tespiti (BYDV-PAV, BYDV-SGV, BYDV- MAV, BYDV-RMV ve CYDV-RPV) ve bulunma oranlarının belirlenmesi için 2017 yıllarında survey çalışması yapılmıştır. Survey alanlarından örnek toplamak için kademeli örnekleme yönteminden yararlanılmış buna göre incelenecek alan oranı, survey yapılan ilin ilçelerindeki toplam üretim alanının en az % 3'nü kapsayacak şekilde hesaplanmıştır. Her tarladan en iyi temsili sağlamak adına en az 5-20 örnek alınarak simptom gösteren ve göstermeyen bitkilerden rastgele olmak suretiyle 400 örnek toplanmıştır. Survey alanlarında sık sık olmasada bayrak yapraklarda kırmızılaşma, cüceleşme ve yapraklarda klorik çizgili desenler gibi viral enfeksiyon belirtileri gözlenmiştir (şekil 4.1).



Şekil 4.1. Bayrak yaprak kırmızılaşması (A,C,F)(Kızıltepe, Derik, Nusaybin), buğday erken dönemde klorik çizgili desenler ve küçükleme (B)(Savur), Survey çalışmalarının yürütüldüğü buğday ekim alanlarından görüntü (D,e)(Kızıltepe, Derik).

4.2. Arpa Sarı Cücelik Virüslerinin Multipleks Rt-Pcr ve Rt-Pcr Yöntemiyle Araştırılmasına Ait Bulgular

Yapılan RT-PCR ve multiplex-RT-PCR testlerinin sonucunda, Mardin ilinde BYDV-PAV, BYDV-SGV, BYDV-MAV, BYDV-RMV ve CYDV-RPV virüslerinin varlığı araştırıldı. Bölgeden toplanan 400 buğday örneğine uygulanan PCR testleri sonucunda, 400 örnekten 10'unda BYDV-PAV (% 2.5), 7 örnekte BYDV-SGV (% 1.75), 1 örnekte BYDV-RMV(% 0.25) ve 2 örnekte CYDV-RPV(% 0.5) virüsleri tespit edildi. Test edilen numunelerin hiçbirinde BYDV-MAV virüsü tespit edilemedi. Mardin ilinde testlenen 400 buğday yaprak örneklerinden 7'inde BYDV-PAV + BYDV-SGV (% 1.75) tespit edilirken BYDV-PAV + CYDV-RPV karışık enfeksiyonundan yalnızca

1 örnek (% 0.25) tespit edildi. BYDV-PAV + BYDV-SGV + CYDV-RPV karışım enfeksiyonu ise tespit edilemedi. Tüm numuneler multipleks RT-PCR ile test edilmiştir. Mardin ili ve ilçelerinde 2017 yılında yapılan survey çalışmalarında tespit edilen virüsler, enfeksiyon oranları ve test edilen örnek sayısı Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Buna göre, Kızıltepe ilçesinde yapılan survey alanlarından alınan 170 yaprak örneğinden toplam 5 pozitif enfeksiyon tespit edilmiş bunlardan 4'ünde BYDV-PAV (% 2.35), 2'sinde BYDV-SGV (% 1.17), 1'inde BYDV-RPV (% 0.58) ve 1 örnekte BYDV-RMV(% 0.58) virüsleri ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir.

Derik ilçesinde yapılan survey çalışmasından toplanan 75 yaprak örneğinden toplam 2 pozitif enfeksiyon tespit edilmiş bunlardan 2'sinde de BYDV-PAV(% 2.66) ve BYDV-SGV(% 2.66) virüsel enfeksiyonları tespit edilmiştir.

Artuklu ilçesinde survey alanlarından toplanan 45 yaprak örneğinden toplam 1 pozitif enfeksiyon görülmüş olmakla birlikte örnekte BYDV-PAV(% 2.2) + BYDV-SGV (% 2.2) virüsleri tespit edilmiştir.

Nusaybin ilçesinde survey alanlarından toplanan 40 örnekten 3'ünde pozitif enfeksiyon görülmüş bunlardan 2'sinde BYDV-PAV(% 5), 2'sinde BYDV-SGV(% 5) ve 1 örnekte BYDV-RPV(% 2.5) virüsleri tespit edilmiştir.

Savur ilçesindeki survey çalışmasında toplanan 30 yaprak örneğinden 1'inde pozitif enfeksiyon görülmüş ve bu örnekte BYDV-PAV(% 3.3) enfeksiyonu tespit edilmiştir. Dargeçit ilçesinden toplanan 23 yaprak örneği ve Midyat ilçesinden toplanan 15 yaprak örneğinde yapılan teşhis testleri sonucunda herhangi bir enfeksiyon tespit edilememiştir.

4.2.1. Test edilen yaprak örneklerinin Multipleks RT-PCR yöntemleri kullanılarak en az bir Arpa sarı cücelik virüs türleriyle (BYDV-PAV, BYDV-SGV, BYDV-MAV, BYDV-RMV ve CYDV-RPV) enfekteli olup olmadığına dair bulgular

Mardin ilinin ilçelerinde 2017 yılının Nisan-Mayıs aylarında buğday ekim alanlarında yapılan survey kapsamında toplanan yaprak örneklerine Multipleks RT-PCR testleri yapılmıştır. Arpa sarı cücelik virüs türlerine (BYDV-PAV, BYDV-SGV, BYDV-MAV, BYDV-RMV ve CYDV-RPV) yönelik tespit çalışmalarında pozitif

sonuçların görüntüleri aşağıda verilmiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6).



Şekil 4.2. Mardin iline ait yaprak örneklerine uygulanan Multipleks RT-PCR testinin jel görüntüsü, M:(100-1000bp), 1:85, 2:76, 3:78, 4:86, 5:75, 6:67, 7:73, 8:83, 9:87, 10:89, 11:268, 12:222, 13:123, 14:127, 15:181, 16:154, 17:254, 18:118, 19:pozitif kontrol.

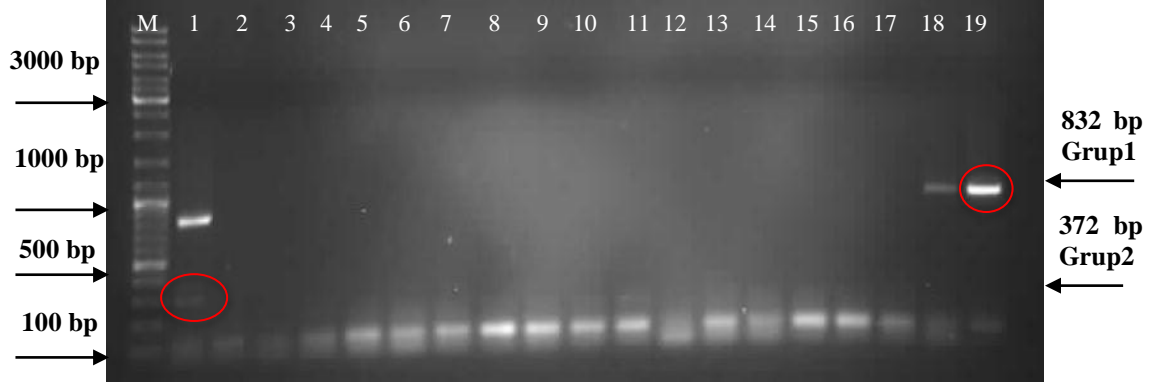
Şekil 4.2.'de agaroz jel görüntüsünde 1., 4. ve 9. sırada bulunan 85, 86 ve 87 nolu pozitif reaksiyon gösteren örnekler, marker göstergesine göre 832 bp DNA fragmenti vererek BYDV virüslerinden en azından biriyle enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Diğer örneklerinin hiçbirinde pozitif reaksiyon belirlenememiştir



Şekil 4.3. Mardin iline ait yaprak örneklerine uygulanan Multipleks RT-PCR testinin jel görüntüsü, M:(100-1000bp), 1:19, 2:104, 3:185, 4:163, 5:28, 6:133, 7:60, 8:135, 9:121, 10:93, 11:95, 12:100 nolu testlenen örnekler, 13:pozitif kontrol, 14:negatif kontrol.

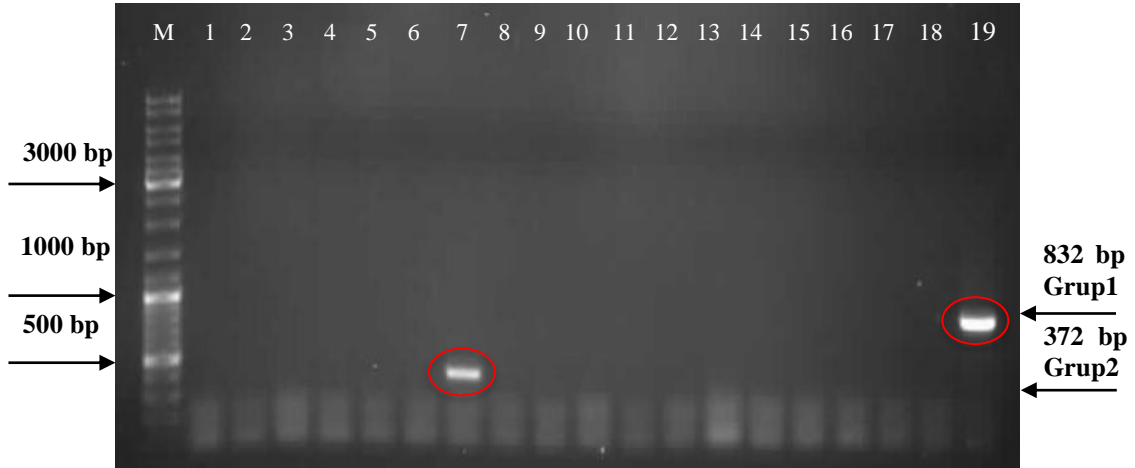
Şekil 4.3.'de agaroz jel görüntüsünde 2., 3. ve 7. sırada bulunan 104, 185 ve 60 nolu pozitif reaksiyon gösteren örnekler, marker göstergesine göre 832 bp uzunluğunda

DNA fragmenti vererek BYDV virüslerinden en azından biriyle enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Diğer örneklerinin hiçbirinde pozitif reaksiyon belirlenememiştir.



Şekil 4.4. Mardin iline ait yaprak örneklerine uygulanan Multipleks RT-PCR testinin jel görüntüsü, M:(100-1000bp), 1:pozitif kontrol, 2:3, 3:119, 4:46, 5:48, 6:54, 7:13, 8:122, 9:11, 10:8, 11:21, 12:22, 13:23, 14:32, 15:18, 16:20, 17:112, 18:61, 19:17, nolu testlenen örnekler.

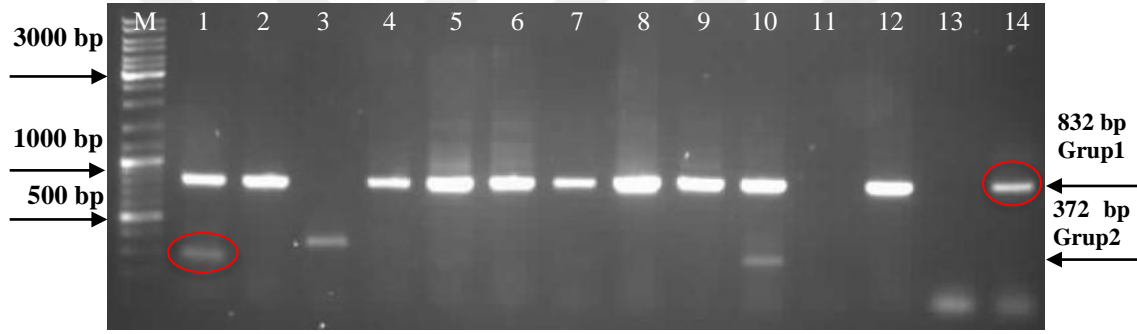
Şekil 4.4.'de agaroz jel görüntüsünde 18. ve 19. sırada bulunan 61 ve 17 nolu pozitif reaksiyon gösteren örnekler, marker göstergesine göre 832 bp DNA fragmenti vererek BYDV virüslerinden en azından biriyle enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Diğer Mardin örneklerinin hiçbirinde pozitif reaksiyon belirlenememiştir.



Şekil 4.5. Mardin iline ait yaprak örneklerine uygulanan Multipleks RT-PCR testinin jel görüntüsü, M:(100-1000bp), 1:255, 2:321, 3:253, 4:327, 5:394, 6:342, 7:279, 8:341, 9:317, 10:310, 11:313, 12:314, 13:322, 14:391, 15:129, 16:387, 17:338, 18:339 nolu testlenen örnekler, 19:pozitif kontrol.

Şekil 4.5.'de agaroz jel görüntüsünde 7. sırada bulunan 279 nolu pozitif reaksiyon gösteren örnek, marker göstergesine göre 372 bp uzunluğunda DNA fragmenti vererek BYDV virüslerinden en azından biriyle enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Diğer örneklerin hiçbirinde pozitif reaksiyon belilenememiştir.

Mardin ili ve ilçelerinde yapılan survey çalışması kapsamında toplanan 400 yaprak örneğine uygulanan Multipleks RT-PCR testlerinin sonucunda; 17, 60, 61, 85, 86, 87, 104, 105, 117, 164, 185 nolu örneklerin 832 bp uzunluğunda DNA fragmentleri vererek grup-1 (BYDV-PAV, BYDV-SGV ve BYDV-MAV) virüslerinden ve 117, 164, 279 nolu örneklerin 372 bp uzuluğunda DNA fragmenti vererek grup-2 (BYDV-RMV ve CYDV-RPV) virüslerinden en azından biriyle bulaşık olduğu tespit edilmiştir(Çizelge 4.1, Şekil 4.6) .



Şekil 4.6. Tüm pozitif reaksiyon gösteren örneklere uygulanan Multipleks RT-PCR testinin jel görüntüsü, M:(100-1000bp), 1:117, 2:85, 3:279, 4:86, 5:87, 6:17, 7:60, 8:61, 9:104, 10:164, 11:7, 12:105, 13:9, 14:185.

Çizelge 4.1. Mardin ilinde buğday virüslerini araştırmak amacı ile survey çalışmalarının yürütüldüğü iller, testlenen örne sayıları, araştırılan virüsler ve tespit edilen virüslerin bulunma oranlar

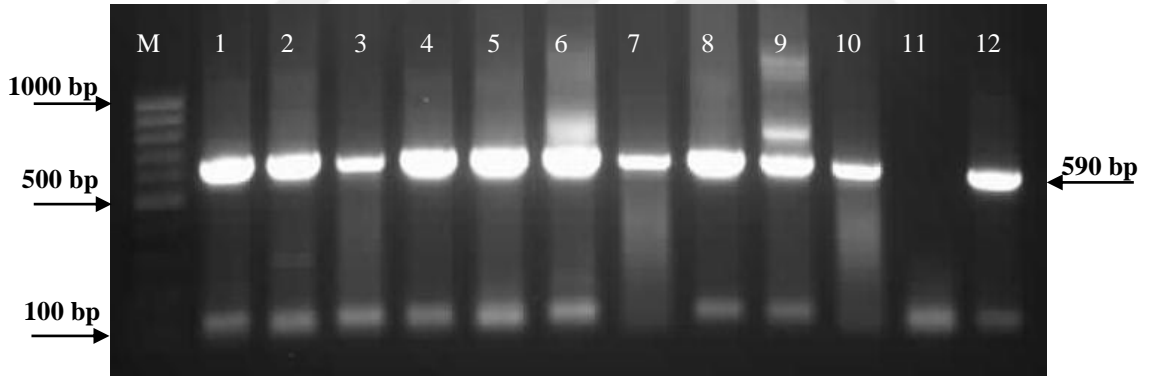
Survey yapılan ilçeler	Testlenen örnek sayısı	BYDV-PAV		BYDV-SGV		CYDV-RPV		PAV+SGV		PAV+RPV		BYDV-RMV		Genel İnfeksiyon	
		*(İB)	(BO)	(İB)	(BO)	(İB)	(BO)	(İB)	(BO)	(İB)	(BO)	(İB)	(BO)	(İB)	(BO)
			%		%										
Kızıltepe	170	4	2.35	2	1.16	1	0.58	2	1.16	1	0.58	1	0.58	5	2.95
Derik	75	2	2.50	2	2.50	-	-	2	2.50	-	-	-	-	2	2.50
Artuklu	45	1	2.22	1	2.22	-	-	1	2.22	-	-	-	-	1	2.22
Nusaybin	40	2	5.0	2	5.0	1	2.50	2	5.0	-	-	-	-	3	7.50
Savur	30	1	3.33	-	3.33	-	-	1	3.33	-	-	-	-	1	3.33
Dargeçit	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Midyat	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam	400	10	2.50	7	1.75	2	0.5	7	1.75	1	0.25	1	0.25	12	3.0

*İB: Toplanan örnekler içersindeki infekteli bitki sayısı, BO: İnfekteli bitki sayısının toplam örnek miktarı içindeki yüzde oranı (%)

4.2.2. Pozitif reaksiyon gösteren örneklerin spesifik primerlerle RT-PCR yöntemi kullanılarak BYDV türlerinin (BYDV-PAV, BYDV-MAV ve BYDV-SGV) belirlenmesine yönelik bulgular

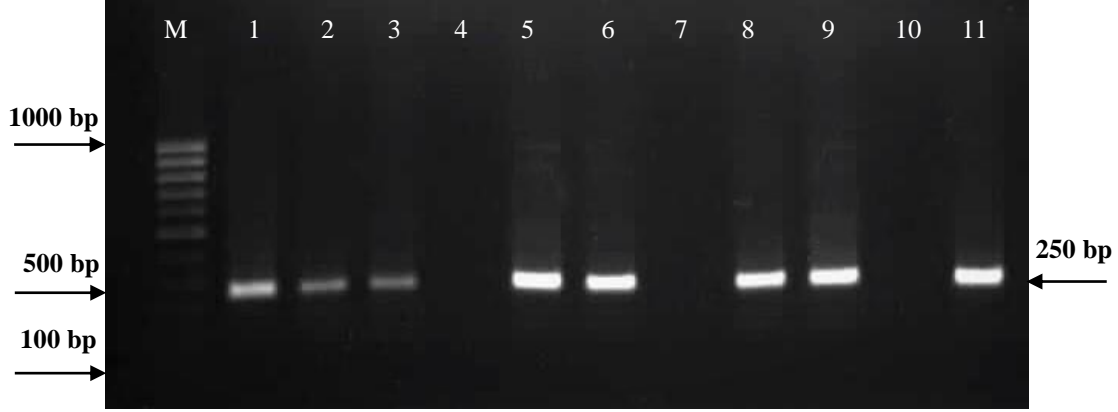
Pozitif reaksiyon gösteren tüm 832 bp ve 372 bp uzunluğunda DNA fragmenti veren örneklerin türe özgü primerlerle RT-PCR testleri yapılmıştır.

RT-PCR testinde Yan R, Shu F, PAV-F ve PAV-R primerleri kullanılmış bunun sonucuda toplam 10 örnekte 590 bp uzunluğunda DNA fragmenti veren BYDV-PAV enfeksiyonları tespit edilmiştir(Şekil 4.7). Yan-R, Shu-F, MAV-F ve SGV-R primerleri kullanılarak gerçekleştirilen RT-PCR testlerde örneklerin hiçbirinde 590 bp uzunluğunda DNA fragmenti veren BYDV-MAV tespit edilememiştir. Kullanılan primelerin RT-PCR testlerinde BYDV-SGV enfeksiyonları için kaliteli sonuçlar elde etmediği anlaşıldığından Deb ve Anderson (2008)'a ait bir primer seti kullanılmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. Mardin ili survey çalışmasında belirlenen tüm pozitif örneklerin spesifik primerlerle uygulanan RT-PCR yönteminde BYDV-PAV türlerinin belirlenmesi, M:(100-1000bp), 1:105, 2:85, 3:164, 4:86, 5:87, 6:17, 7:60, 8:61, 9:104, 10:185, 11: negatif kontrol, 12:Pozitif kontrol.

Şekil 4.7'deki agaroz jelde görüldüğü üzere 11. sırada bulunan negatif kontrol örneği dışındaki, 1:105, 2:85, 3:164, 4:86, 5:87, 6:17, 7:60, 8:61, 9:104, 10:185'nolu pozitif örneklerin hepsinin 590 bp uzunluğunda DNA fragmenti vererek BYDV-PAV ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Agaroz jelde 12. sırada bulunan örnek pozitif kontrol örneğidir.

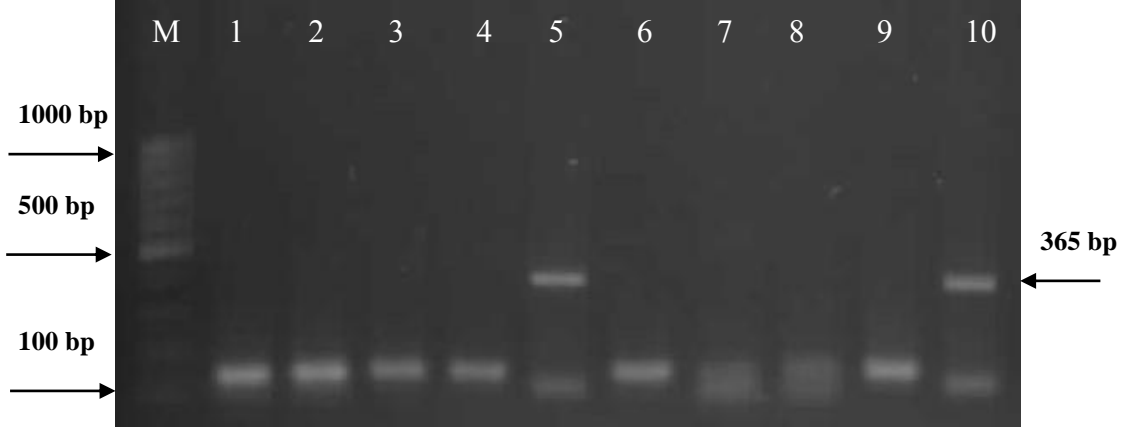


Şekil 4.8. Mardin ili pozitif örneklerine Deb ve Anderson (2008) primerleriyle uygulanan RT-PCR testleriyle BYDV-SGV belirlenmesi, M:(100-1000bp),1:185, 2:17, 3:85, 4:117, 5:87, 6:104, 7:86, 8:60, 9:61, 10: Negatif kontrol, 11: Pozitif kontrol.

Deb ve Anderson (2008)'nin kullandığı SGV-L1 ve SGV-R2 primeler kullanılarak gerçekleştirilen RT-PCR testlerinin sonucunda, 1:185, 2:17, 3:85, 5:87, 6:104, 8:60 ve 9:61 nolu örneklerin 250 bp uzunluğunda DNA fragmenti vererek BYDV-SGV virüsüyle enfekteli olduğu tespit edilmiştir.

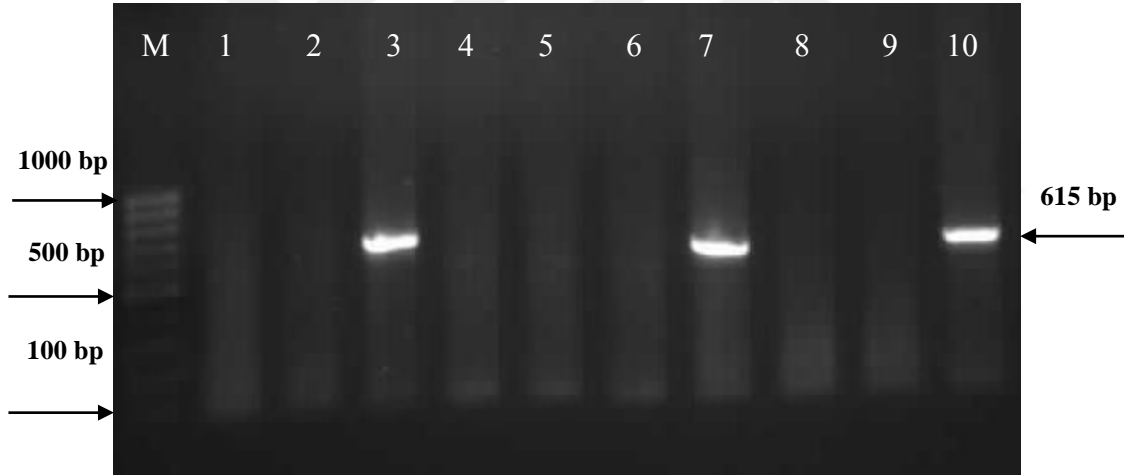
4.2.3. RT-PCR yöntemiyle pozitif örneklerin grup-2 (BYDV-RMV ve CYDV-RPV) virüsleri yönelik çalışmalara ait bulgular

Multipleks RT-PCR testleri sonucunda 372 bp uzunluğunda DNA fragmenti veren örnekler BYDV-RMV ve CYDV-RPV virüslerine karşı RT-PCR yapılarak araştırılmıştır. Kızıltepe ilçesine ait 1 örnekte 365 bp uzunluğunda DNA fragmenti tespit edilmiştir(Şekil 4.9). Ayrıca CYDV-RPV virüsüne yönelik spesifik primerlerle yapılan RT-PCR testleri sonucunda, Kızıltepe ilçesine ait 164 nolu örnekte ve Nusaybin ilçesine ait 117 nolu örnekte 615 bp uzunluğunda DNA fragmenti tespit edilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.9. Şekil 4.9. BYDV-RMV virüsleri için spesifik primerlerle uygulanan RT-PCR testlerinin agaroz jel görüntüsü, M:(100-1000bp), 1:185, 2:17, 3:85, 4:117, 5:279, 6:105, 7:60, 8:87, 9:104 ve 10:pozitif kontrol.

Şekil 4.9'da 5. sırada bulunan 279 nolu Kızıltepe örneğinde 365 bp uzunluğunda DNA fragmenti vererek BYDV-RMV virüsüyle enfekteli olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.10. CYDV-RPV virüsleri için spesifik primerlerle uygulanan RT-PCR testlerinin agaroz jel görüntüsü, M:(100-1000bp), 1:185, 2:104, 3:117, 4:86, 5:279, 6: 105, 7:164, 8:164, 9:negatif kontrol 10:pozitif kontrol.

Şekil 4.10' de agaroz jel görüntüsünde 3. ve 7. sırada bulunan 117 ve 164 nolu örneklerin 615 bp uzunluğunda DNA fragmenti vererek CYDV-RPV virüsüyle enfekteli oldukları bulunmuştur.

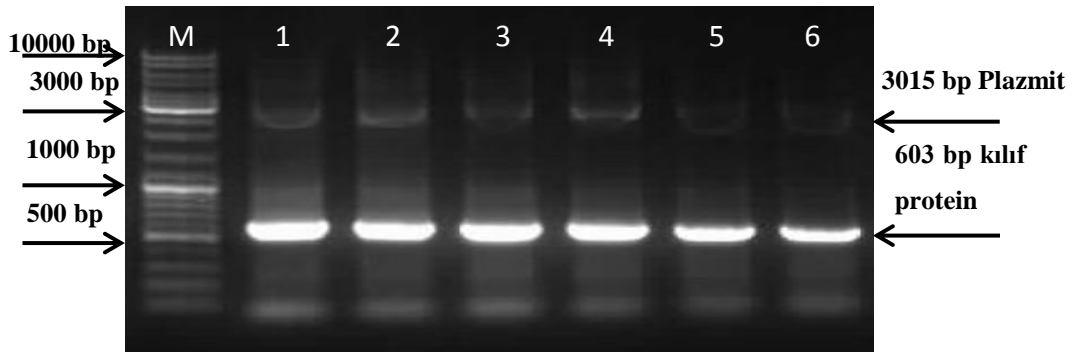
4.3. Rastgele seçilen bazı pozitif örneklerin kılıf protein geninin karakterizasyonu

Mardin ili ilçelerinde buğday ekim alanlarında gerçekleştirilen survey çalışmalarında toplanan tüm yaprak örneklerine multipleks RT-PCR ve RT-PCR testleri uygulanmış ve sonuç olarak BYDV-PAV, BYDV-SGV, BYDV-RMV ve BYDV-RPV tespit edilmiştir. Belirlenen her bir virüs türü için rastgele bir örnek seçilip kılıf protein gen bölgelerinin karakterizasyonu yapılmıştır.

4.3.1. BYDV-PAV kılıf protein karakterizasyonu

Nusaybinin BYDV-PAV ile enfekteli 17 nolu örneği, kılıf protein geninin karakterizasyonu için pozitif örnekler arasından rastgele seçilmiş olup gen bölgesinin tamamı uçtan uca çoğaltılacak şekilde tasarlanmış primerler kullanılarak RT-PCR ile çoğaltılmıştır. pGEM-T Easy vektör sisteminde klonlanmış kılıf protein gen bölgesinin başarısı rekombinant plazmite uygulanan PCR ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.11).

Kılıf protein gen bölgesini içeren plazmite Sentebiolab firmasında çift yönlü dizileme yapılmıştır. DNA dizisi elde edilen BYDV-PAV ile enfekteli Nusaybin izolatu gen bankasına (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) MK732034 ulaşım numarasıyla kaydı yapılmıştır. 17 numaralı BYDV-PAV izolatının kılıf protein geninin 603 bp uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).



Şekil 4.11. Saflaştırılmış plazmite uygulanan PCR'in agaroz jel görüntüsü, M:Marker (100-10000)bp, 1:17(1) nolu nolu koloniden rekombinant plazmit, 2:17(2) nolu koloniden alınmış rekombinant plazmit, 3:17(3) nolu nolu koloniden rekombinant plazmit, 4:17(4) nolu koloniden alınmış rekombinant plazmit, 5:17(5) nolu nolu koloniden rekombinant plazmit, 6:17(6) nolu koloniden alınmış rekombinant plazmit,

Çizelge 4.2. 85 numaralı BYDV-PAV Mardin izolatına ait kılıf protein geni dizisi

Baz sırası bp	Nükleik asit baz dizisi
1-60	atgaattcagtaggtcgtagaggacctagacgagcaaatcaaaatggccaagaaggcgg
61-120	cgccgtagagcaattcggccagtgggtgtgtccaaccaatcgagcaggaccagacga
121-180	cgaaatggtcgacgcgcaggaagaagaggccaattctatacctggatcagcaggcagg
181-240	actgaggtattcatattctcagtcgacaacctaaagccaactctccgggacaatcaaa
241-300	ttggccccagtctatcgcaatgccagcgtttcagacggaataacttaagtcctaccac
301-360	cgttacaagatcacaagtatcggtgttgagtttaagtcacacgcgtccgccactacgtcg
361-420	ggcgtatctttgtgaactgacaccgcgtgaagcaatcagccctgggtagctacatt
421-480	aattccttcaccatcagcaaaactgcctcaaactcctcagagccgaggcgattaatggg
481-540	aaggactccaagaatcaacgatagaccagttctggctgtatacaaggcaaatgggaca
541-603	actactgacactgctggacaattataataaggataaatgtcagtatgttgactcccaatag

Dizilemeden sonra elde edilen dizininin filogenetik analizinin yapılması ve farklı izolatlarla benzerlik oranlarının tespiti için (Şekil 4.12) gen bankasının veri tabanına girilerek farklı bölgelerden 19 farklı izolat seçilmiştir (Çizelge 4.3). 17 numaralı BYDV-PAV izolatının kılıf protein gen bölgesinin dünyadaki diğer izolatlarla gen uzunluğu aynı olanlar seçilmiştir.

17 nolu BYDV-PAV Mardin izolatı için yapılan çoklu nükleik asit karşılaştırmalarında dünyada tespit edilen diğer izolatlar ile benzerlik oranları % 88.72-95.52 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.12). MK732034 ulaşım numaralı BYDV-PAV Mardin izolatının karşılaştırılan izolatlar arasından en çok % 95.52 oranla Almanya KY634926 izolatı ile en düşük ise % 88.72 oranla Fransa AJ007929 izolatı ile benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır. Ayrıca yapılan karşılaştırmada Türkiye Van KC900900 izolatı % 92.54 oranında benzerlik göstermiştir.

Çizelge 4.3. Gen bankasında bulunan BYDV-PAV virüslerinin kılıf protein geninin ulaşım numarası, konukçu, ülke, gen ve uzunluğu konusundaki bilgiler

No	Ulaşım numarası	Konukçu	Ülke	Gen	Uzunluk (bp)
1	JX067852	<i>Triticum aestivum</i>	Brezilya	Kılıf protein	603
2	DQ285671	-	ABD	Kılıf protein	603
3	AJ007929	-	Fransa	Kılıf protein	603
4	KY634901	<i>Hordeum vulgare</i>	Fransa	Kılıf protein	603
5	JQ811489	<i>Zea mays</i>	Pakistan	Kılıf protein	603
6	KY634899	<i>Hordeum vulgare</i>	Çin	Kılıf protein	603
7	KY634904	<i>Hordeum vulgare</i>	İngiltere	Kılıf protein	603
8	KY634886	<i>Lolium multiflorum</i>	Hollanda	Kılıf protein	603
9	KT198985	<i>Triticum aestivum</i>	Pakistan	Kılıf protein	603
10	KT198982	<i>Hordeum vulgare</i>	Pakistan	Kılıf protein	603
11	KY634912	<i>Triticum aestivum</i>	İsveç	Kılıf protein	603
12	KY634926	<i>Zea mays</i>	Almanya	Kılıf protein	603
13	KY634896	<i>Triticum aestivum</i>	Almanya	Kılıf protein	603
14	KY634905	<i>Avena sativa</i>	Almanya	Kılıf protein	603
15	KY634911	<i>Hordeum vulgare</i>	Çek Cumhuriyeti	Kılıf protein	603
16	KP096696	<i>Triticum aestivum</i>	Macaristan	Kılıf protein	603
17	KP096694	<i>Triticum aestivum</i>	Çin	Kılıf protein	603
18	M21347	-	Avustralya	Kılıf protein	603
19	MK732034	<i>Triticum aestivum</i>	Türkiye	Kılıf protein	603
20	KC900900	<i>Triticum aestivum</i>	Türkiye	Kılıf protein	603

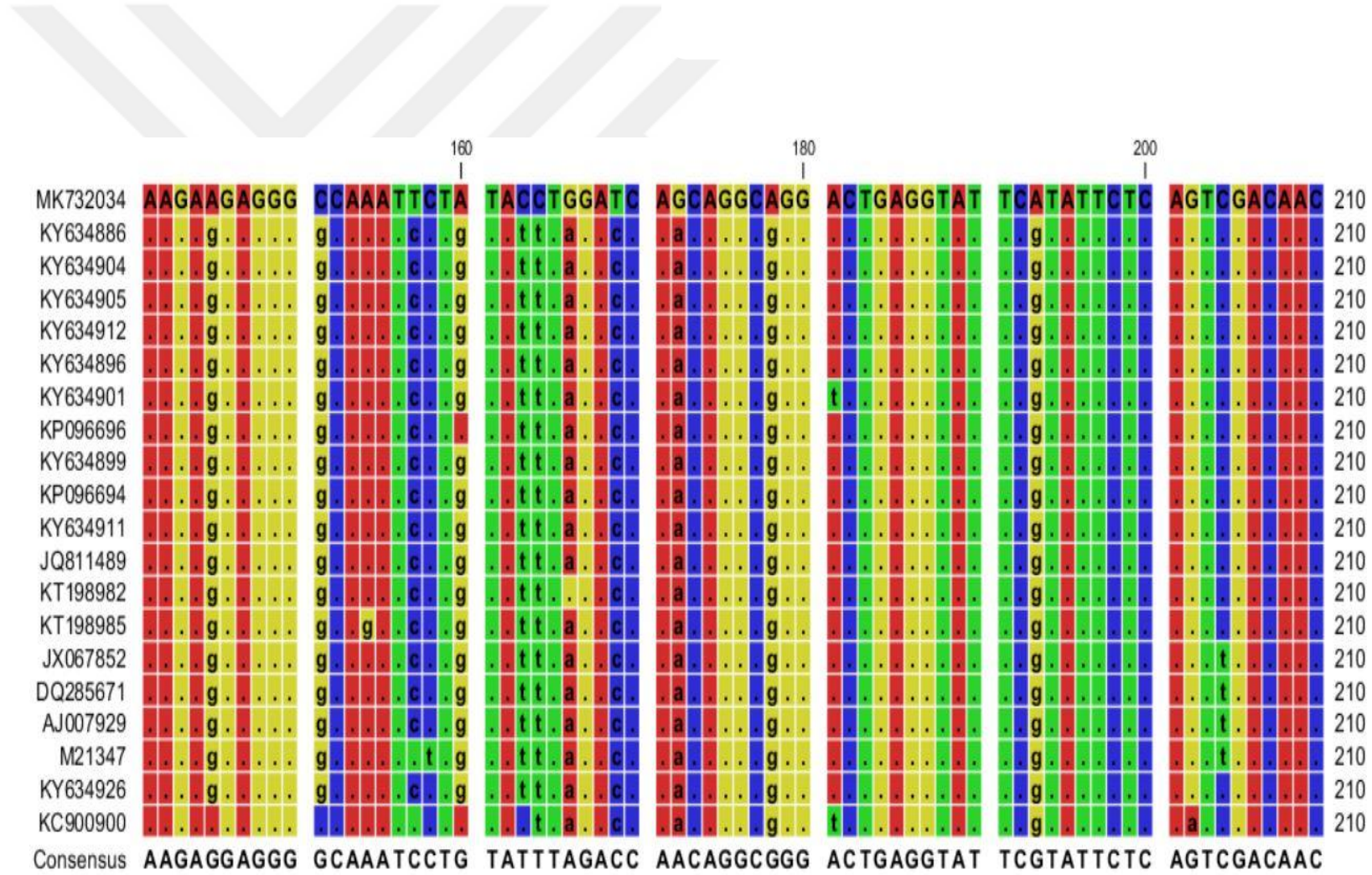
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
KY634905	1	99,83	100,00	99,83	98,67	98,84	98,67	98,67	98,67	98,34	98,18	97,84	97,68	95,19	95,69	95,69	93,86	92,87	89,39	93,03
KY634886	2	99,83	99,83	99,67	98,51	98,67	98,51	98,51	98,51	98,18	98,01	97,68	97,51	95,02	95,52	95,52	93,70	92,70	89,22	92,87
KY634904	3	100,00	99,83	99,83	98,67	98,84	98,67	98,67	98,67	98,34	98,18	97,84	97,68	95,19	95,69	95,69	93,86	92,87	89,39	93,03
KY634912	4	99,83	99,67	99,83	98,84	99,00	98,84	98,84	98,84	98,51	98,34	98,01	97,84	95,36	95,85	95,85	94,03	93,03	89,55	93,20
KY634896	5	98,67	98,51	98,67	98,84	99,50	99,00	99,00	99,00	99,00	98,51	98,18	98,01	95,19	95,69	96,02	94,20	93,70	89,88	93,03
KY634901	6	98,84	98,67	98,84	99,00	99,50	99,17	99,17	99,17	99,17	98,67	98,34	98,18	95,36	95,85	95,85	94,36	93,70	89,88	93,53
KY634899	7	98,67	98,51	98,67	98,84	99,00	99,17	99,67	99,34	98,67	98,84	98,51	98,34	95,52	95,69	96,02	94,86	93,53	89,72	93,03
KP096694	8	98,67	98,51	98,67	98,84	99,00	99,17	99,67	99,34	98,67	98,84	98,51	98,34	95,52	95,69	96,02	94,86	93,53	89,72	93,03
KY634911	9	98,67	98,51	98,67	98,84	99,00	99,17	99,34	99,34	99,00	98,84	98,51	98,34	95,69	96,02	96,02	94,86	93,86	90,05	93,37
KP096696	10	98,34	98,18	98,34	98,51	99,00	99,17	98,67	98,67	99,00	98,51	98,18	98,01	95,19	95,69	95,69	94,20	93,86	90,38	93,53
KT198982	11	98,18	98,01	98,18	98,34	98,51	98,67	98,84	98,84	98,84	98,51	99,00	99,17	95,69	95,85	96,19	94,69	93,37	89,88	92,87
JQ811489	12	97,84	97,68	97,84	98,01	98,18	98,34	98,51	98,51	98,18	99,00	98,51	95,36	95,52	95,85	94,36	93,03	89,22	92,54	
KT198985	13	97,68	97,51	97,68	97,84	98,01	98,18	98,34	98,34	98,34	98,01	99,17	98,51	95,19	95,36	95,69	94,53	93,20	89,39	92,70
AJ007929	14	95,19	95,02	95,19	95,36	95,19	95,36	95,52	95,52	95,69	95,19	95,69	95,36	95,19	98,84	98,51	97,35	91,87	88,72	92,21
DQ285671	15	95,69	95,52	95,69	95,85	95,69	95,85	95,69	95,69	96,02	95,69	95,85	95,52	95,36	98,84	99,00	97,51	92,70	89,55	93,03
JX067852	16	95,69	95,52	95,69	95,85	96,02	95,85	96,02	96,02	96,02	95,69	96,19	95,85	95,69	98,51	99,00	97,18	92,87	89,72	92,87
M21347	17	93,86	93,70	93,86	94,03	94,20	94,36	94,86	94,86	94,86	94,20	94,69	94,36	94,53	97,35	97,51	97,18	92,54	89,39	92,54
KY634926	18	92,87	92,70	92,87	93,03	93,70	93,70	93,53	93,53	93,86	93,86	93,37	93,03	93,20	91,87	92,70	92,87	92,54	95,52	91,04
MK732034	19	89,39	89,22	89,39	89,55	89,88	89,88	89,72	89,72	90,05	90,38	89,88	89,22	89,39	88,72	89,55	89,72	89,39	95,52	92,54
KC900900	20	93,03	92,87	93,03	93,20	93,03	93,53	93,03	93,03	93,37	93,53	92,87	92,54	92,70	92,21	93,03	92,87	92,54	91,04	92,54

Şekil 4.12. CLC Main Workbench 6.7.1 programı ile 17 nolu BYDV-PAV Mardin (MK732034) izolatının dünyadaki PAV izolatlarının (Çizelge 4.3) kılıf protein gen bölgesinin nükleik asit dizilerinin benzerlik oranları

BYDV-PAV Mardin izolatının (MK732034) kılıf protein gen bölgesinde nükleik asit dizi karşılaştırmaları yapılmış ve sonuç olarak 603 bp uzuluğundaki bölgede 59 baz değişikliği tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). CLC Main Workbench 6.7.1 programının yardımı ile yapılan karşılaştırmada (Şekil 4.13) değişen 59 bazın toplam dizi uzunluğunun % 9.8'ne karşılık geldiğini ve bu değişimlerin kılıf protein gen bölgesinin belirli bir bölgede yoğunlaşmadığını gen bölgesinin tamamında gözlene bildiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4. BYDV-PAV Mardin izolatının (MK732034) kılıf protein gen bölgesinde consensusa göre meydana gelen baz değişimleri

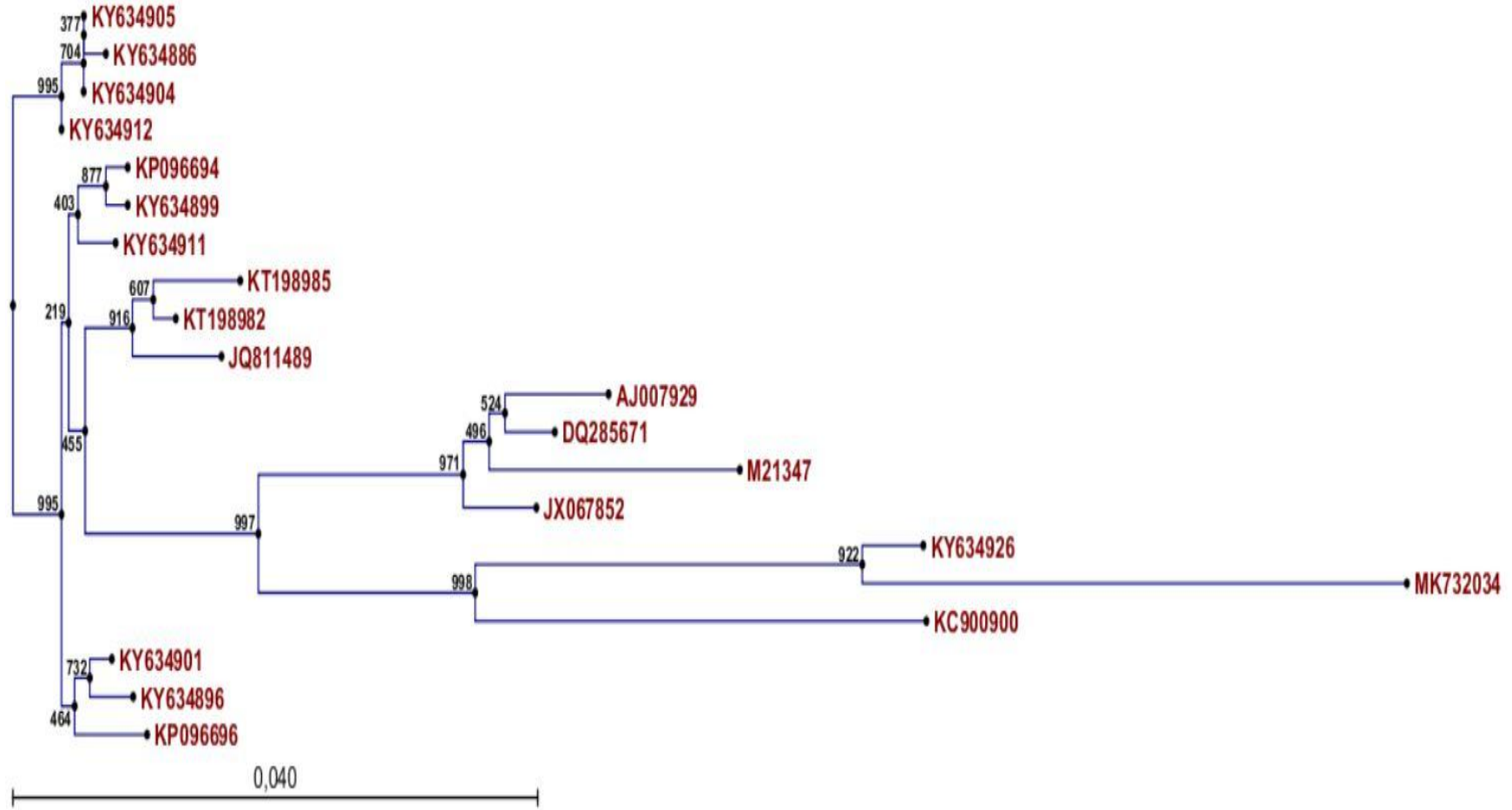
Baz sırası	Consensus	Substitution	Baz sırası	Consensus	Substitution
15	C	T	440	G	A
31	C	A	441	G	A
33	C	A	444	C	T
39	T	C	450	A	C
49	A	C	453	G	A
52	A	C	454	G	T
58	A	C	455	T	C
70	A	G	468	A	G
73	G	A	477	C	T
136	A	G	486	A	C
138	G	A	492	G	A
145	G	A	517	A	C
152	G	C	522	C	A
157	C	T	531	C	A
160	G	A	537	A	G
163	T	C	540	C	A
164	T	C	543	C	T
166	A	G	552	G	T
169	C	T	555	A	T
172	A	G	564	C	T
178	G	A	567	T	A
193	G	A	570	C	A
232	G	A	572	C	G
322	C	G	576	G	A
351	A	C	578	G	A
358	G	T	586	T	A
360	C	G	589	A	T
373	A	G	594	G	T
396	A	G	595	G	C
432	A	C			



Şekil 4.13. CLC Main Workbench 6.7.1 programının yardımı ile BYDV-PAV Mardin izolatının (MK732034) dünyadaki PAV virüslerin kılıf protein gen bölgesi (Çizelge 4.3) ile çoklu nükleotid dizi karşılaştırılması

BYDV-PAV Mardin izolatının Çizelge 4.3'te verilen dünya izolatları ile genetik ilişkisini ortaya koymak amacı ile 1000 tekerrürlü olarak nükleik asit karşılaştırması sonucu elde edilen filogenetik ağaç Şekil 4.17'de verilmiştir. Filogenetik analiz sonucunda nükleik asit arasında meydana gelen nokta mutasyonların fazlalığından dolayı gruplaşmayı artırmıştır.

Oluşan gruplar arasında BYDV-PAV Mardin izolatının (MK732034) içinde bulunduğu ana grupta, Almanya izolatı (KY634926) ile Türkiye izolatı (KC900900) bir grup oluştururken ABD izolatı (DQ285671), Fransa izolatı (AJ007929), Avustralya izolatı (M21347) ve Brezilya izolatı (JX067852) izolatları ayrı bir grup oluşturmuşlardır. Genel olarak izolatların grup oluşturmasında virüsün bulunduğu konukçu ve coğrafik yakınlıklarının etkileri sınırlı kaldığı gözlenmiştir.

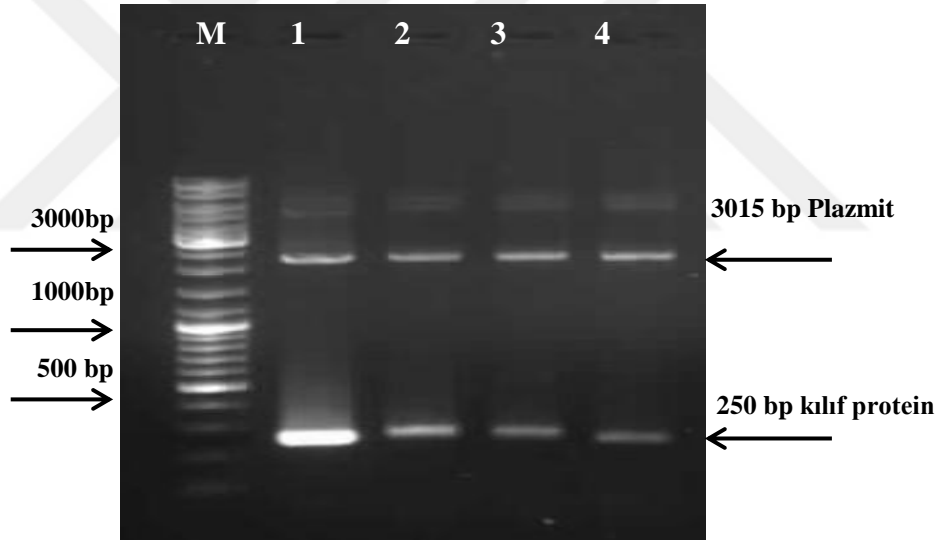


Şekil 4.14. BYDV-PAV (MK732034) izolatu ile dünyadaki PAV izolatlarının (Çizelge 4.3.) kılıf protein geninin nükleik ait dizisi 1000 tekerrürlü olarak Neighbor joining yöntemiyle oluşturulan filogenetik ağacı.

4.3.2. BYDV-SGV kılıf protein karakterizasyonu

Nusaybinin BYDV-SGV ile enfekteli 30 nolu örneği, kılıf protein geninin karakterizasyonu için pozitif örnekler arasından rastgele seçilmiş olup gen bölgesi kısmi olarak çoğaltacak primer çifti kullanılarak RT-PCR ile çoğaltılmıştır. pGEM-T Easy vektör sisteminde klonlanmış kılıf protein gen bölgesinin başarısı rekombinant plazmite uygulanan PCR ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.15).

Kılıf protein gen bölgesini içeren plazmite Sentebiolab firmasında çift yönlü dizileme yapılmıştır. DNA dizisi elde edilen BYDV-SGV ile enfekteli Nusaybin izolatu gen bankasına (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) MK940529 ulaşım numarasıyla kaydı yapılmıştır. 30 numaralı BYDV-SGV izolatının kılıf protein geninin 250 bp uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).



Şekil 4.15. Saflaştırılmış plazmite uygulanan PCR'in agaroz jel görüntüsü, M:Marker (100-10000)bp, 1:30(1) nolu nolu koloniden rekombinant plazmit, 2:30(2) nolu koloniden alınmış rekombinant plazmit, 3:30(3) nolu nolu koloniden rekombinant plazmit, 4:30(4) nolu koloniden alınmış rekombinant plazmit,

Çizelge 4.5. 30 numaralı BYDV-SGV Mardin izolatına ait kılıf protein geni dizisi

Baz sırası	Nükleik asit baz dizisi
1-60	ctggacgtcgaccatttctctgctgggtcctgctcgattgggtggaccacaaccactggccgaattgctcta
61-120	cggcggccttcttggccattttgattgctcgtctaggtcctctacggcctactgaattcattcaccacctc
121-180	tctagtgggtgctgaaactttattgtaataaagtagctgagagctaattgtacaggaatactactataaacc
181-240	ctatcccaaacccggctaagatctggt

Dizilemeden sonra elde edilen dizininin filogenetik analizinin yapılması ve farklı izolatlarla benzerlik oranlarının tespiti için (Şekil 4.16) gen bankasının veri tabanına girilerek farklı bölgelerden 12 farklı izolat seçilmiştir (Çizelge 4.6). 30 numaralı BYDV-SGV izolatının kısmi kılıf protein gen bölgesinin çoğaltılan kısmının dünyadaki diğer izolatlarla gen uzunluğunun aynı olmadığı görülmüştür.

30 nolu BYDV-SGV Mardin izolatı için yapılan çoklu nükleik asit karşılaştırmalarında dünyada tespit edilen diğer izolatlar ile benzerlik oranları % 61.84-100 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.16). MK940529 ulaşım numaralı BYDV-SGV Mardin izolatının karşılaştırılan izolatlar arasında en çok % 100 oranla Polonya KU893143 izolatı ile en düşük ise % 61.84 oranla ABD AY541039 izolatı ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. BYDV-SGV Mardin izolatının diğer bir Türkiye izolatı olan KC900899 ile benzerlik oranları ise % 97,84 ile 4. sıradadır.

Çizelge 4.6. Gen bankasında bulunan BYDV-SGV virüslerinin kılıf protein geninin ulaşım numarası, konukçu, ülke, gen ve uzunluğu konusundaki bilgiler

No	Ulaşım numarası	Konukçu	Ülke	Gen	Uzunluk (bp)
1	AY541039	-	ABD	Kılıf protein	520
2	KX462705	<i>Phragmites australi</i>	Türkiye	Kılıf protein	100
3	KC900899	<i>Triticum aestivum</i>	Türkiye	Kılıf protein	138
4	KX462706	<i>Triticum vulgare</i>	Türkiye	Kılıf protein	116
5	HM488005	<i>Triticum vulgare</i>	Ürdün	Kılıf protein	138
6	KX462702	<i>Avena sativa</i>	Türkiye	Kılıf protein	116
7	KU893143	<i>Triticum vulgare</i>	Polonya	Kılıf protein	138
8	AY541037	-	ABD	Kılıf protein	548
9	AY540130	-	ABD	Kılıf protein	548
10	AY541038	-	ABD	Kılıf protein	550
11	MK940529	<i>Triticum aestivum</i>	Türkiye	Kılıf protein	250
12	U06866	<i>Hordeum vulgar</i>	ABD	Kılıf protein	590
13	JF792368	<i>Cucumis melo</i>	Avustralya	Kılıf protein	837

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
KU893143	1	100,00	99,28	97,84	84,17	79,14	80,58	63,82	63,82	62,50	61,84	61,84
MK940529	2	100,00	99,28	97,84	84,17	79,14	80,58	63,82	63,82	62,50	61,84	61,84
HM488005	3	99,28	99,28	97,12	83,45	78,42	79,86	64,47	64,47	63,16	62,50	62,50
KC900899	4	97,84	97,84	97,12	82,01	76,98	79,86	63,16	63,16	61,84	61,18	61,18
KX462706	5	84,17	84,17	83,45	82,01	94,02	95,73	49,34	49,34	49,34	47,37	47,37
KX462705	6	79,14	79,14	78,42	76,98	94,02	89,74	46,05	46,05	46,05	44,74	44,74
KX462702	7	80,58	80,58	79,86	79,86	95,73	89,74	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
AY541037	8	63,82	63,82	64,47	63,16	49,34	46,05	50,00	100,00	98,57	95,00	95,00
AY540130	9	63,82	63,82	64,47	63,16	49,34	46,05	50,00	100,00	98,57	95,00	95,00
U06866	10	62,50	62,50	63,16	61,84	49,34	46,05	50,00	98,57	98,57	93,57	93,57
AY541038	11	61,84	61,84	62,50	61,18	47,37	44,74	50,00	95,00	95,00	93,57	100,00
AY541039	12	61,84	61,84	62,50	61,18	47,37	44,74	50,00	95,00	95,00	93,57	100,00

Şekil 4.16. CLC Main Workbench 6.7.1 programı ile 30 nolu BYDV-SGV Mardin (MK940529) izolatının dünyadaki SGV izolatlarının (Çizelge 4.6) kılıf protein gen bölgelerinin nükleik asit benzerlik oranları.

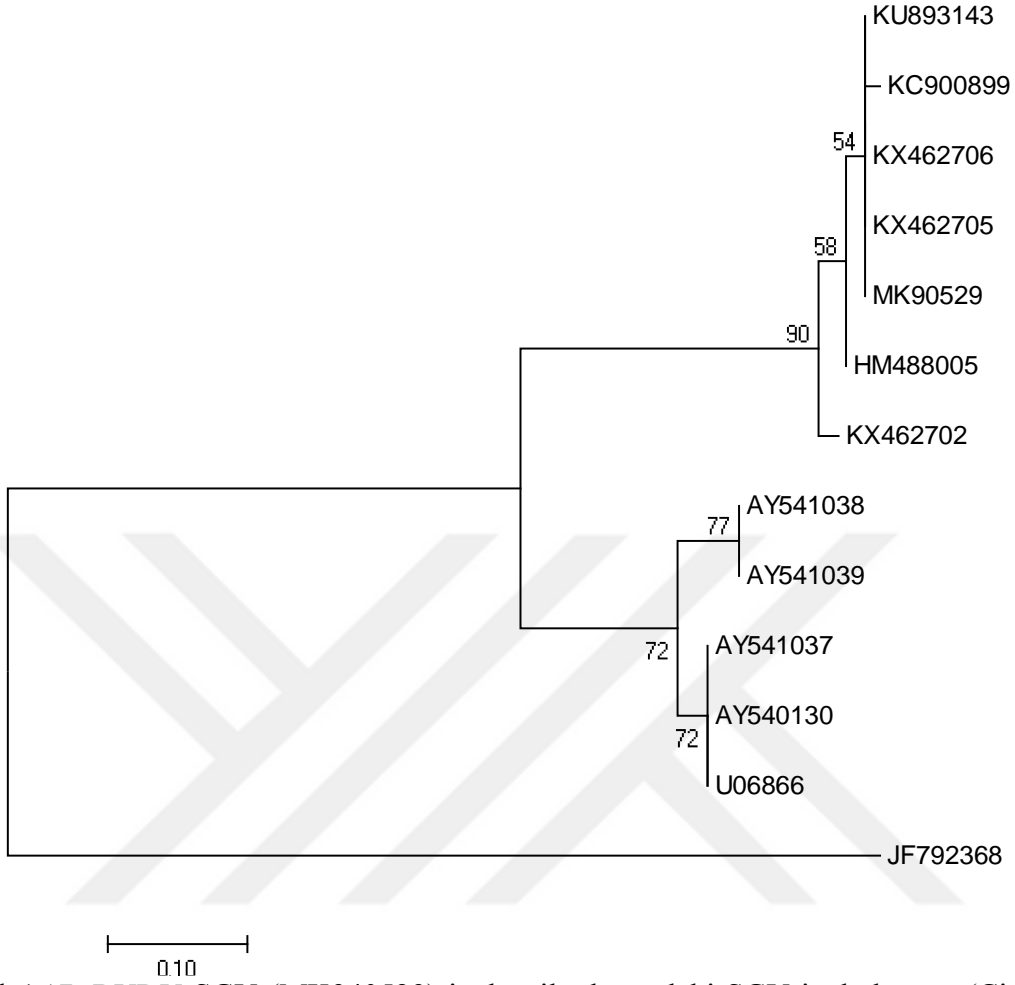
BYDV-SGV Mardin izolatının (MK940529) kılıf protein gen bölgesinde nükleik asit dizi karşılaştırmaları yapılmış ve sonuç olarak 250 bp uzuluğundaki bölgede yalnızca 3 baz değişikliği tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). CLC Main Workbench 6.7.1 programının yardımı ile yapılan karşılaştırmada değişen 3 bazın toplam dizi uzunluğunun % 1.2'sine karşılık geldiğini ve bu değişimlerin kılıf protein gen bölgesinin belirli bir bölgede yoğunlaşmadığını gen bölgesinin tamamında gözlene bildiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. BYDV-SGV Mardin izolatının (MK940529) kılıf protein gen bölgesinde consensusa göre meydana gelen baz değişimleri

Baz sırası	Consensus	Substitution	Baz sırası	Consensus	Substitution
58	N	C	106	N	G
73	N	A			

BYDV-SGV Mardin izolatının Çizelge 4.6'da verilen dünya izolatları ile genetik ilişkisini ortaya koymak amacı ile 100 tekerrürlü olarak nükleik asit karşılaştırması sonucu elde edilen filogenetik ağaç Şekil 4.17'de verilmiştir. Filogenetik analiz sonucunda nükleik asitler arasında ciddi değişimler gözlenmemiş, nokta mutasyonların çok sınırlı kaldığı anlaşılmıştır. Bunda BYDV-SGV virüsünün çoğaltılan kılıf protein gen bölgesinin birçok izolatta farklılık göstermesinin neden olabileceği düşünülmüştür.

MK940529 ulaşım numaralı BYDV-SGV Mardin izolatının Şekil 4.17. verilen diğer dünya izolatlarıyla genetik ilişkisinde soy ağacında iki ana grubun oluştuğu gözlenmiştir. Bu gruplardan Mardin izolatının (MK940529) da içinde olduğu ana grupta ülkemizde daha önce farklı şehirlerde ve farklı konukçularda tespit edilmiş izolatlar aynı grup içerisinde yer almıştır. Bu filogenetik sonuçlarına göre farklı konukçularda tespit edilmiş olsa bile yakın coğrafyada bulunan izolatlar daha yakın benzerlik göstermiştir. Filogenetik ağaç oluşturulurken *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (JF792368) dışgrup olarak kullanılmıştır.



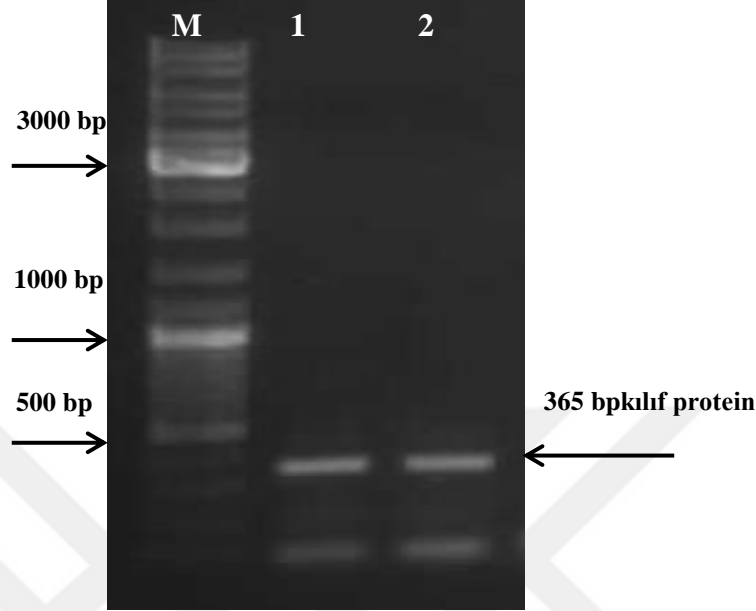
Şekil 4.17. BYDV-SGV (MK940529) izolatu ile dünyadaki SGV izolatlarının (Çizelge 4.6.) kılıf protein geninin nükleik ait dizisi Mega 7 programı yardımı ile 100 tekerrürlü olarak Neighbor joining yöntemiyle oluşturulan filogenetik ağacı.

4.3.3. BYDV-RMV kılıf protein karakterizasyonu

Kızıltepe'nin BYDV-RMV ile enfekteli 279 nolu örneği, kılıf protein geninin karakterizasyonu için pozitif örnekler arasından rastgele seçilmiş olup gen bölgesi kısmi olarak çoğaltacak primerler kullanılarak RT-PCR ile çoğaltılmıştır. pGEM-T Easy vektör sisteminde klonlanmış kılıf protein gen bölgesinin başarısı rekombinat plazmite yapılan PCR ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.18).

Kılıf protein gen bölgesini içeren plazmite Sentebiolab firmasında çift yönlü dizileme yapılmıştır. DNA dizisi elde edilen BYDV-RMV ile enfekteli Nusaybin izolatu gen bankasına (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) MK955886 ulaşım numarasıyla kaydı

yapılmıştır. 279 numaralı BYDV-RMV izolatının kılıf protein geninin 365 bp uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.8).



Şekil 4.18. Safleştirilmiş plazmite uygulanan PCR'in agaroz jel görüntüsü, M:Marker (100-10000)bp, 1:279(1) nolu koloniden rekombinant plazmit, 2:279(2) nolu koloniden alınmış rekombinant plazmit,

Çizelge 4.8. 279 numaralı BYDV-RMV Mardin izolatına ait kılıf protein geni dizisi

Baz sırası	Nükleik asit baz dizisi
1-60	cgaggacggcgaccaagtggaaacactgcaggaagacctggagtcagacgaggctcgcgggagactttgt
61-120	atttcaaaggactctctcacgggcaatgctccggaaaagtcacctcgggcccgtttatcagagtgtgcag
121-180	cattcagtgccggaattctcaaggcctaccatgagtataagatctcaagatcactggagttcatctccgag
181-240	gccgttccaccgcgaaggtccatcgcttatgaacttgatccacacaacaagctctcatccctcgctccacc
241-365	atcaacaaattctcaatcgtaaaggtggcaggagggtctttacgtccaatcaaatcggaggtgaagtatggc

Dizilemeden sonra elde edilen dizininin filogenetik analizinin yapılması ve farklı izolatlarla benzerlik oranlarının tespiti için (Şekil 4.19) gen bankasının veri tabanına girilerek farklı bölgelerden 9 farklı izolat seçilmiştir (Çizelge 4.9)

279 nolu BYDV-RMV Mardin izolatı için yapılan çoklu nükleik asit karşılaştırılmalarında dünyada tespit edilen diğer izolatlar ile benzerlik oranları % 82.4-95.9 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.19). MK955886 ulaşım numaralı BYDV-RMV Mardin izolatının karşılaştırılan izolatlar arasında en çok % 95.9 oranla Kenya'nın MH205607 ve MF974579 ulaşım numaralı

izolatı ile en düşük ise % 65 oranla Brezilya'nın JX067856 izolatu ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.9. Gen bankasında bulunan BYDV-RMV virüslerinin kılıf protein geninin ulaşım numarası, konukçu, ülke, gen ve uzunluğu konusundaki bilgiler

No	Ulaşım numarası	Konukçu	Ülke	Gen	Uzunluk (bp)
1	MH205607	<i>Zea mays</i>	Kenya	Kılıf protein	593
2	MF974579	<i>Zea mays</i>	Kenya	Kılıf protein	593
3	JX067856	<i>Avena sativa</i>	Brezilya	Kılıf protein	357
4	KC921392	<i>Triticum aestivum</i>	ABD	Kılıf protein	599
5	NC_021484	<i>Triticum aestivum</i>	ABD	Kılıf protein	599
6	JX067855	<i>Avena sativa</i>	Brezilya	Kılıf protein	357
7	MK955886	<i>Triticum aestivum</i>	Türkiye	Kılıf protein	365
8	Z14123	-	ABD	Kılıf protein	593
9	L12757	-	ABD	Kılıf protein	512
10	JF792368	<i>Cucumis melo</i>	Avustralya	Kılıf protein	837

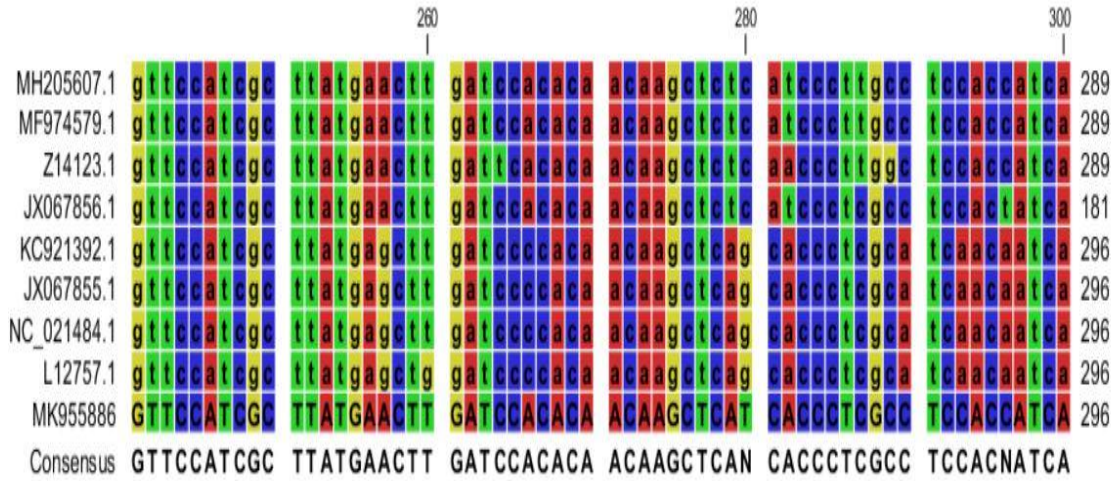
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MH205607.1	1	100,00	95,89	95,25	68,72	82,61	82,61	82,61	79,40
MF974579.1	2	100,00	95,89	95,25	68,72	82,61	82,61	82,61	79,40
MK955886	3	95,89	95,89	92,33	65,75	85,87	85,87	85,87	82,38
Z14123.1	4	95,25	95,25	92,33	66,20	81,25	81,25	81,25	77,78
JX067856.1	5	68,72	68,72	65,75	66,20	57,88	57,88	57,88	55,43
KC921392.1	6	82,61	82,61	85,87	81,25	57,88	100,00	100,00	93,17
JX067855.1	7	82,61	82,61	85,87	81,25	57,88	100,00	100,00	93,17
NC_021484.1	8	82,61	82,61	85,87	81,25	57,88	100,00	100,00	93,17
L12757.1	9	79,40	79,40	82,38	77,78	55,43	93,17	93,17	

Şekil 4.19. CLC Main Workbench 6.7.1 programı ile 279 nolu BYDV-RMV Mardin (MK955886) izolatının dünyadaki RMV izolatlarının (Çizelge 4.9) kılıf protein gen bölgesinin nükleik asit dizilerinin benzerlik oranları.

BYDV-RMV Mardin izolatının (MK955886) kılıf protein gen bölgesinde nükleik asit dizi karşılaştırmaları yapılmış ve sonuç olarak 365 bp uzuluğundaki bölgede 18 baz değişikliği tespit edilmiştir (Çizelge 4.10). CLC Main Workbench 6.7.1 programının yardımı ile yapılan karşılaştırmada (Şekil 4.20) değişen 18 bazın toplam dizi uzunluğunun % 4.95'ne karşılık geldiğini ve bu değişimlerin kılıf protein gen bölgesinin belirli bir bölgede yoğunlaşmadığını gen bölgesinin tamamında gözlene bildiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.10. BYDV-RMV Mardin izolatının (MK955886) kılıf protein gen bölgesinde consensusa göre meydana gelen baz değişimleri

Baz sırası	Consensus	Substitution	Baz sırası	Consensus	Substitution
20	N	A	76	N	A
26	T	G	86	A	C
32	N	A	89	G	A
38	N	G	96	N	A
42	N	T	109	N	A
43	N	C	128	C	T
44	N	A	280	N	T
47	N	T	296	N	C
67	N	T	361	G	A



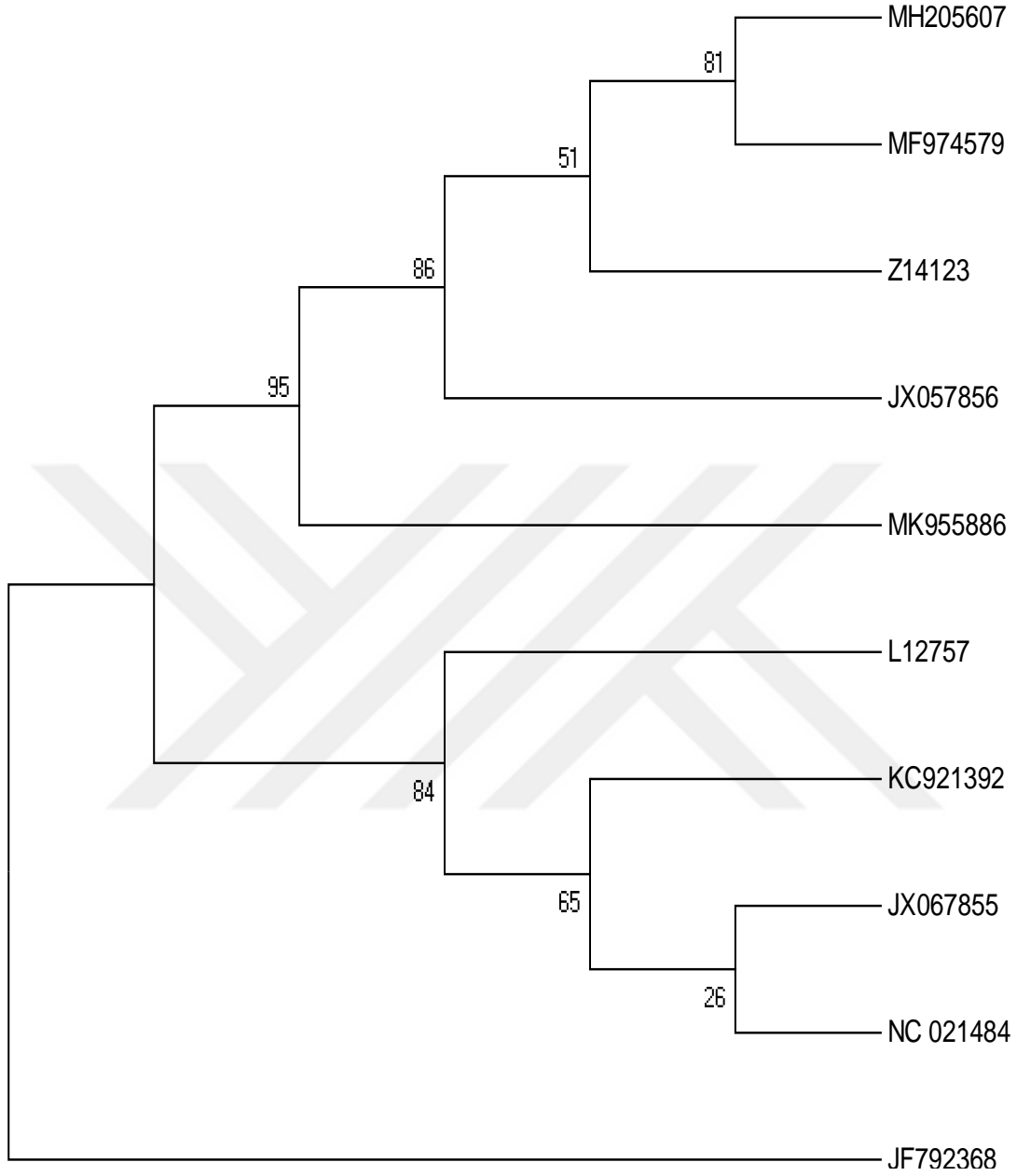
Şekil 4.20. CLC Main Workbench 6 programının yardımı ile BYDV-RMV Mardin izolatının Çizelge 4.9.'daki RMV izolatlarıyla kılıf protein gen bölgelerinin çoklu nükleotit dizi karşılaştırılması.

BYDV-RMV Mardin izolatının Çizelge 4.9'da verilen dünya izolatları ile genetik ilişkisini ortaya koymak amacı ile 100 tekerrürlü olarak nükleik asit dizi

karşılaştırması sonucu elde edilen filogenetik ağaç Şekil 4.21’de verilmiştir. Filogenetik analiz sonucunda nükleik asit dizileri arasında değişimlerden dolayı soy ağacında guruplar oluşturmuştur.

MK955886 ulaşım numaralı BYDV-RMV Mardin izolatının Şekil 4.21.’de verilen diğer dünya izolatlarıyla genetik ilişkisine bakıldığında soy ağacında 2 ana grubun olduğu gözlenmiştir. Bu gruplardan Mardin izolatının (MK955886) da içinde olduğu ana gurubun yüksek benzerlik oranlarından kaynaklı olarak her iki Kenya izolatının (MH205607 ve MF974579) içinde yer alan alan grup içinde kümelenmiştir. Filogenetik ağaç oluşturulurken *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (JF792368) dışgrup olarak kullanılmıştır.





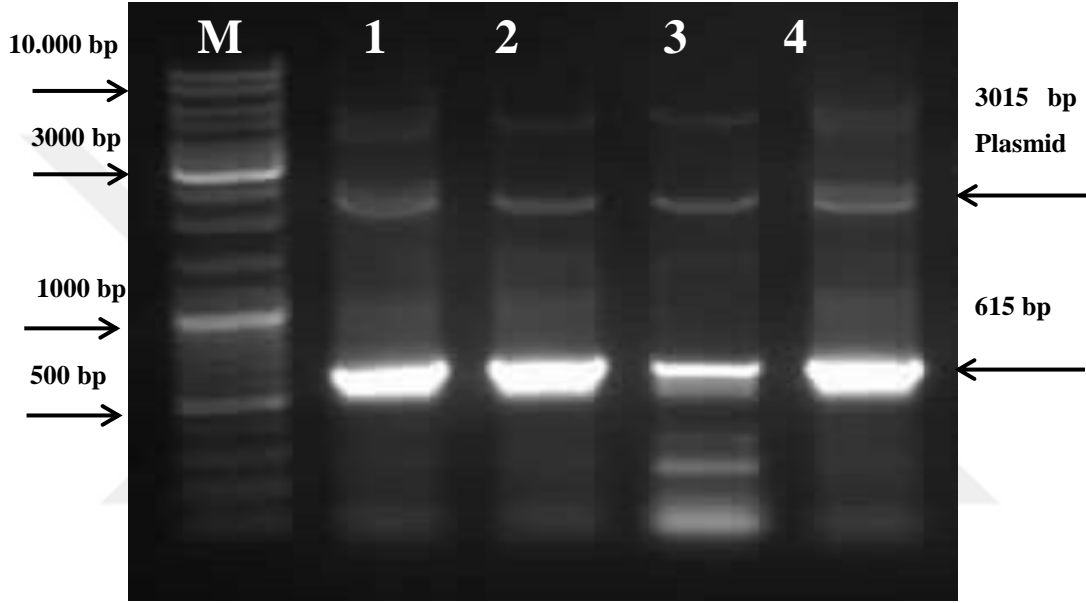
Şekil 4.21. BYDV-RMV (MK955886) izolatu ile dünyadaki RMV izolatlarının (Çizelge 4.9) kılıf protein geninin nükleik ait dizisi Mega 7 programı yardımı ile 100 tekerrürlü olarak Neighbor joining yöntemiyle oluşturulan filogenetik ağaç.

4.3.4. CYDV-RPV kılıf protein karakterizasyonu

Nusaybinin CYDV-RPV ile enfekteli 117 nolu örneği, kılıf protein geninin karakterizasyonu için pozitif örnekler arasından rastgele seçilmiş olup gen bölgesinin tamamı uçtan uca çoğaltılacak şekilde tasarlanmış primerler kullanılarak RT-PCR ile

çoğaltılmıştır. pGEM-T Easy vektör sisteminde klonlanmış kılıf protein gen bölgesinin başarılı klonlanan rekombinant plazmite yapılan PCR ile kontrol edilmiştir (Şekil 4.22).

Kılıf protein gen bölgesini içeren plazmite Sentebiolab firmasında çift yönlü dizileme yapılmıştır. DNA dizisi elde edilen CYDV-RPV ile enfekteli Nusaybin izolatu gen bankasına (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) MK955886 ulaşım numarasıyla kaydı yapılmıştır. 117 numaralı CYDV-RPV izolatının kılıf protein geninin 615 bp uzunluğunda olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.11).



Şekil 4.22. Saflaştırılmış plazmite uygulanan PCR'in agaroz jel görüntüsü, M:Marker (100-10000)bp, 1:117(1) nolu nolu koloniden rekombinant plazmit, 2:117(2) nolu koloniden alınmış rekombinant plazmit, 3:117(3) nolu nolu koloniden rekombinant plazmit, 4:117(4) nolu koloniden alınmış rekombinant plazmit.

Çizelge 4.11. 117 numaralı CYDV-RPV Mardin izolatına ait kılıf protein geni dizisi

Baz sırası	Nükleik asit baz dizisi
1-60	atgagtacggtccttagaactaatggcaatggttcgcgcagacgcagacagagagtcgctcggcgaagg
61-120	tctgctgcaagaacgcagccgtggtgtggtcgtcccaacggcccagccaggcgcagaagacgccgaaga
121-180	ccagctggtcctcggcgtggaagaactccaggatctggaggaggaagccgtggcgaaacattcgtttctca
181-240	aaggactcactcgtgccaactcctctggaagtacacctcgggccgttttatcagaatatccggcattcca
241-300	gaatggagtactcaaggcctaccatgaatataagatcacaattgtatcttacagttcagcagagccctctt
301-360	ccacagcagccggttccatctcttatgagttggacccattgcaagcatcttactcgcacatcaacgatcaat
361-420	aagttcacaatcaccaaaactggtgcgaggagctccagcgaagatgattaacgggttgagtgatccct
421-480	cagatgaagaccaatttcgtattctttacaaggaacggcgttcttctgtggctgatctttcaagattaca
481-540	cttaggtccagctacaaaacccaaaatag

Dizilemeden sonra elde edilen dizininin filogenetik analizinin yapılması ve farklı izolatlarla benzerlik oranlarının tespiti için (Şekil 4.23) gen bankasının veri tabanına girilerek farklı bölgelerden 18 farklı izolat seçilmiştir (Çizelge 4.12). 117 numaralı CYDV-RPV izolatının kılıf protein gen bölgesinin çoğaltılan kısmının dünyadaki diğer izolatlarla gen uzunluğunun aynı olmadığı görülmüştür.

117 nolu CYDV-RPV Mardin izolatı için yapılan çoklu nükleik asit karşılaştırmalarında dünyada tespit edilen diğer izolatlar ile benzerlik oranları % 45.04-96.43 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir (Şekil 4.23). MK732035 ulaşım numaralı CYDV-RPV Mardin izolatının karşılaştırılan izolatlar arasında en çok % 96.43 oranla Türkiye KC900903 izolatı ile en düşük ise % 45.04 oranla Yeni Zelanda EF408187 izolatı ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.12. Gen bankasında bulunan CYDV-RPV virüslerinin kılıf protein geninin ulaşım numarası, konukçu, ülke, gen ve uzunluğu konusundaki bilgiler

No	Ulaşım numarası	Konukçu	Ülke	Gen	Uzunluk (bp)
1	DQ988107	<i>Avena sativa</i>	ABD	Kılıf protein	606
2	DQ988108	<i>Hordeum vulgare</i>	ABD	Kılıf protein	607
3	DQ115527	-	ABD	Kılıf protein	612
4	KY634929	<i>Poa annua</i>	Almanya	Kılıf protein	326
5	DQ988087	<i>Avena sativa</i>	ABD	Kılıf protein	606
6	DQ988105	<i>Avena sativa</i>	ABD	Kılıf protein	606
7	EF408187	<i>Dactylis glomerata</i>	Yeni Zelanda	Kılıf protein	334
8	GU002338	<i>Avena sativa</i>	Yeni Zelanda	Kılıf protein	486
9	DQ988093	<i>Hordeum vulgare</i>	ABD	Kılıf protein	606
10	DQ988088	<i>Hordeum vulgare</i>	ABD	Kılıf protein	606
11	KY564213	<i>Lolium multiflorum</i>	Almanya	Kılıf protein	326
12	KY564214	<i>Lolium multiflorum</i>	Almanya	Kılıf protein	326
13	KY564215	<i>Lolium multiflorum</i>	Almanya	Kılıf protein	326
14	AY450425	-	İran	Kılıf protein	495
15	DQ115534	<i>Avena fatua</i>	ABD	Kılıf protein	324
16	JX294312	<i>Avena sativa</i>	Azerbaycan	Kılıf protein	334
17	HM488009	<i>Triticum aestivum</i>	Pakistan	Kılıf protein	615
18	MK732035	<i>Triticum aestivum</i>	Türkiye	Kılıf protein	320
19	KC900903	<i>Triticum aestivum</i>	Türkiye	Kılıf protein	616

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
MK732035	1	90,57	91,71	90,08	92,03	92,68	92,85	92,52	92,20	91,06	96,43	73,82	74,47	49,92	49,43	49,92	49,76	51,38	45,04
DQ988108	2	90,57	98,70	99,51	95,59	94,73	94,56	94,73	94,40	94,15	90,42	73,97	71,54	51,40	50,25	50,74	51,24	49,34	44,57
DQ115534	3	91,71	98,70	98,21	95,93	93,50	93,33	93,50	93,17	95,28	91,56	73,01	72,68	50,73	49,59	50,08	50,57	48,94	44,23
DQ988093	4	90,08	99,51	98,21	95,10	94,23	94,07	94,23	93,90	93,66	89,94	73,64	71,22	51,07	49,92	50,41	50,91	49,34	44,41
DQ115527	5	92,03	95,59	95,93	95,10	94,61	94,77	94,61	94,28	94,15	92,05	74,67	73,01	51,63	50,49	50,98	50,49	49,67	45,10
DQ988107	6	92,68	94,73	93,50	94,23	94,61	99,84	99,51	99,18	91,38	93,34	77,59	73,66	50,25	49,75	50,25	50,74	50,82	45,72
DQ988105	7	92,85	94,56	93,33	94,07	94,77	99,84	99,34	99,01	91,54	93,51	77,59	73,66	50,41	49,92	50,41	50,58	50,82	45,72
DQ988087	8	92,52	94,73	93,50	94,23	94,61	99,51	99,34	99,67	91,71	93,18	77,59	73,33	50,25	49,75	50,25	50,74	50,99	45,56
DQ988088	9	92,20	94,40	93,17	93,90	94,28	99,18	99,01	99,67	91,38	92,86	77,27	73,01	49,92	49,42	49,92	50,41	50,99	45,56
HM488009	10	91,06	94,15	95,28	93,66	94,15	91,38	91,54	91,71	91,38	91,07	72,85	72,52	51,06	49,92	50,41	50,24	48,62	43,90
KC900903	11	96,43	90,42	91,56	89,94	92,05	93,34	93,51	93,18	92,86	91,07	74,19	75,00	49,84	49,51	50,00	49,84	50,81	45,13
GU002338	12	73,82	73,97	73,01	73,64	74,67	77,59	77,59	77,59	77,27	72,85	74,19	89,92	31,85	31,02	31,52	31,68	63,19	56,65
AY450425	13	74,47	71,54	72,68	71,22	73,01	73,66	73,66	73,33	73,01	72,52	75,00	89,92	30,24	29,76	30,24	30,41	63,43	55,76
KY634929	14	49,92	51,40	50,73	51,07	51,63	50,25	50,41	50,25	49,92	51,06	49,84	31,85	30,24	94,19	95,11	94,80	8,06	8,06
KY564213	15	49,43	50,25	49,59	49,92	50,49	49,75	49,92	49,75	49,42	49,92	49,51	31,02	29,76	94,19	99,08	97,55	7,73	7,73
KY564215	16	49,92	50,74	50,08	50,41	50,98	50,25	50,41	50,25	49,92	50,41	50,00	31,52	30,24	95,11	99,08	98,47	8,22	8,22
KY564214	17	49,76	51,24	50,57	50,91	50,49	50,74	50,58	50,74	50,41	50,24	49,84	31,68	30,41	94,80	97,55	98,47	8,22	8,22
JX294312	18	51,38	49,34	48,94	49,34	49,67	50,82	50,82	50,99	50,99	48,62	50,81	63,19	63,43	8,06	7,73	8,22	8,22	82,63
EF408187	19	45,04	44,57	44,23	44,41	45,10	45,72	45,72	45,56	45,56	43,90	45,13	56,65	55,76	8,06	7,73	8,22	8,22	82,63

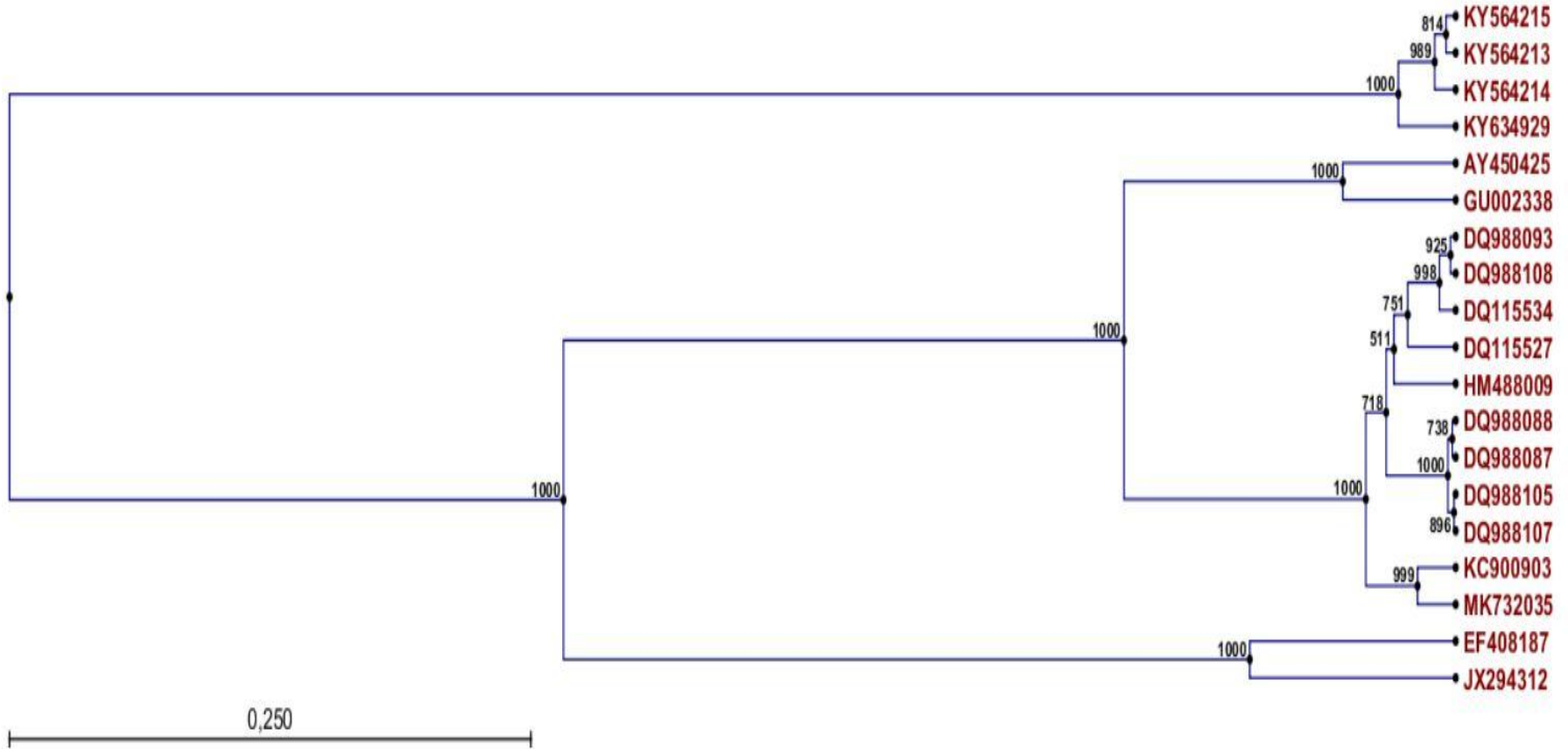
Şekil 4.23. CLC Main Workbench 6.7.1 programı ile 117 nolu CYDV-RPV Mardin (MK955886) izolatinin dünyadaki RPV izolatlarının (Çizelge 4.12) kılıf protein gen bölgesinin nükleik asit dizilerinin benzerlik oranları.

CYDV-RPV Mardin izolatının (MK732035) kılıf protein gen bölgesinde nükleik asit dizi karşılaştırmaları yapılmış ve sonuç olarak 615 bp uzuluğundaki bölgede 31 baz değişikliği tespit edilmiştir (Çizelge 4.13). CLC Main Workbench 6.7.1 programının yardımı ile yapılan karşılaştırmada değişen 31 bazın toplam dizi uzunluğunun % 5'e karşılık geldiğini ve bu değişimlerin kılıf protein gen bölgesinin belirli bir bölgede yoğunlaşmadığını gen bölgesinin tamamında gözlene bildiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.13. CYDV-RPV Mardin izolatının (MK732035) kılıf protein gen bölgesinde consensusa göre meydana gelen baz değişimleri

Baz sırası	Consensus	Substitution	Baz sırası	Consensus	Substitution
22	T	A	511	T	C
24	C	T	517	C	T
73	C	T	523	T	C
80	T	C	529	C	T
81	C	A	535	C	T
93	A	T	538	C	T
109	T	C	541	T	C
130	G	A	547	G	A
142	N	A	556	C	T
162	A	T	562	C	T
179	T	C	565	A	G
201	G	A	571	T	A
231	G	T	590	C	A
276	C	A	592	T	G
499	A	G	595	A	C
508	C	T			

CYDV-RPV Mardin izolatının Çizelge 4.12'de verilen dünya izolatları ile genetik ilişkisini ortaya koymak amacı ile 1000 tekerrürlü olarak nükleik asit karşılaştırması sonucu elde edilen filogenetik ağaçlar Şekil 4.24'de verilmiştir. MK732035 ulaşım numaralı CYDV-RPV Mardin izolatının Şekil 4.24.'de verilen diğer dünya izolatlarıyla genetik ilişkisine bakıldığında soy ağacında 3 ana grubun oluştuğu gözlenmiştir. Bu gruplardan Mardin izolatının (MK732035) da içinde olduğu ana grubun yüksek benzerlik oranlarından kaynaklı çok fazla dallanma oluşturduğunu bunlardan Türkiye izolatı olan KC900903'un Mardin izolatına en yakın diziler olmasından dolayı aynı grupta yer almıştır.



Şekil 4.24. CYDV-RPV (MK732035) izolatu ile dünyadaki RPV izolatlarının (Çizelge 4.12) kılıf protein geninin nükleik ait dizisi 1000 tekerrürlü olarak Neighbor joining yöntemiyle oluşturulan filogenetik ağacı.

Dünyada ve ülkemizde yürütülen survey çalışmalarında sarı cücelik virüslerinin farklı düzeyde enfeksiyon oranları sergilediği görülmüştür. Tahıllarda en önemli kayıplara neden olan bu virüslerin zaman zaman epidemi oluşturdukları görülmüştür. Dünyada Sarı cücelik virüslerinin saptanmış 8 farklı ırkı bulunmaktadır. Türkiye’de ise Arpa sarı cücelik virüsleri: BYDV-PAV, BYDV-MAV, BYDV-SGV, BYDV-RMV ve Tahıl sarı cücelik virüsü: CYDV-RPV olmak üzere 5 ayrı ırkı saptanmıştır (İlbağı, 2017). Dünyada Arpa sarı cücelik virüslerinden bu 5 tür içerisinde en yaygın görülen virüsün ise BYDV-PAV olduğu belirtilmiştir (Conti ve ark., 1990; El-Yamani ve Hill, 1990). Dünyada ve Türkiye’de ciddi ekonomik zararlar oluşturma potansiyeline sahip bu virüsler üzerine birçok çalışma yapılmıştır.

Arpa sarı cücelik virüslerinin en görünür semptomları cücelik ve klorozlaşmadır. Enfeksiyon sonrası belirtiler her zaman belirgin olmasada yapraklarda kalınlaşma, kıvrılmış ve tırtıklı yaprak görünümü oluşturma bilmektedir. Yapraklardaki renk değişimi ise enfekteli konukçuların yaşlı yapraklarında daha belirgindir. Renk değişikliği enfeksiyonun başlamasından 1-3 hafta sonra oluşmaktadır. Bu renk değişiklikleri yulaf yapraklarında kırmızı, turuncu ve mor renge, arpa yapraklarında parlak sarıya, buğday yapraklarında ise sarı ya da kırmızı renginde görülmektedir. Enfekteli bitkilerde çiçeklenme, bodurlaşma ve zayıf bir kök sistemi gözlenebilmektedir (Chay ve ark., 1996; Domier, 2008; İlbağı ve ark. 2005). Mardin ilinde yapılan survey çalışmasında buğday bitkisinde önceki çalışmalara benzer bulgular elde edilmiştir. Survey alanlarında sık sık olmasada bayrak yapraklarda kırmızılaşma, cüceleşme ve yapraklarda klorik çizgili desenler gibi viral enfeksiyon belirtileri gözlenmiştir (Şekil 4.1).

Kumari ve ark. (2006), Yemen’de farklı bölgelerdeki ekmeklik buğday ve arpa mahsullerini etkileyen virüs hastalıklarını belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada örnekler rastgele seçilerek 13 arpa ve 23 ekmeklik buğday örneği tarladan toplanmıştır. Toplanan bu örneklerden tespit edilen en yaygın virüs Arpa sarı cücelik virüsü-PAV olup, arpada % 7 ve ekmeklik buğdayda % 4.3 oranında bulunmuş ve bu virüsü takip eden diğer etmenin Arpa çizgi mozaik virüsü olduğu saptanmıştır. Yine aynı çalışmada Tahıl sarı cücelik virüsü-RPV ve Arpa sarı cücelik virüsü-MAV gibi virüslerin nadir olarak tespit edildiği bildirilmiştir.

Bukvayova ve ark. (2006) Slovakya’da 2001-2004 yılları arasında Arpa sarı cücelik virüsleri ve buğday cücelik virüslerinin tespiti ve oluş sıklığını belirlemek için

yapılan çalışmada. 190 kışlık buğday ve 102 kışlık arpa örneği teslenmiş ve bunun sonucunda en yaygın virüs enfeksiyonunun 2002 yılında % 93 oranında, 2004 yılında % 75 oranında BYDV-PAV virüslerinin olduğu tespit edilmiştir.

Erkan ve Yılmaz (2009), 2005 ve 2006 yıllarında Samsun ili buğday üretim alanlarında enfeksiyon oluşturan virüs hastalıklarının saptanması amacıyla yürüttükleri çalışmada, 2006 yılında 154 bitki örneği toplamışlardır. Bu araştırma sonucunda 5 örnekte (% 3.4) BYDV-PAV, 3 örnekte (% 2) ise BYDV-MAV saptanılmıştır. Çalışmada sadece 1 örnekte BYDV-PAV+MAV (% 0.7) ikili enfeksiyonu gözlenmiştir.

Güneydoğu bölgesinde Diyarbakır ilinde yapılan survey çalışmasında 365 buğday örneği Arpa sarı cücelik virüsleri (BYDV-PAV, BYDV-SGV, BYDV-MAV, BYDV-RMV ve CYDV-RPV) açısından multipleks RT-PCR ve RT-PCR yöntemleri kullanılarak testlenmiştir. Bunun sonucunda buğday yaprak örneklerinin sırasıyla % 3.5, % 2.4 ve % 1.3 oranında BYDV-PAV, BYDV-SGV ve CYDV-RPV ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir. Spesifik primerler kullanılarak RT-PCR yöntemiyle elde edilen BYDV-PAV örneklerinden bir tanesi rastgele seçilip kılıf protein geni karakterize edilmiştir. BYDV-PAV Diyarbakır izolatının dünyadaki 21 farklı PAV izolatlarıyla nükleik asit dizi karşılaştırılmaları sonucunda % 81-98 oranlarında benzerlik görüldüğü belirtilmiştir (Hassan ve ark, 2018)

Mardin ili ve ilçelerinde yapılan survey çalışması sonucunda 400 buğday örneğinde Arpa sarı cücelik virüsleri multipleks RT-PCR ve RT-PCR yöntemiyle araştırılmıştır. Yürütülen testlerin sonucunda, örneklerin % 2.5’de BYDV- PAV, % 1.75’inde BYDV-SGV, % 0.5’inde CYDV-RPV ve % 0.25’inde ise BYDV-RMV virüsleri ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Testlenen örneklerin hiçbirinde BYDV-MAV virüsüne rastlanılmamıştır. Mardin ilinde ilk defa yapılan bu çalışmada elde edilen enfeksiyon oranlarının rastgele seçilerek örnekleme yapılan daha önceki çalışma sonuçlarıyla benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır. Mardin ilinin Nusaybin ilçesinde belirlenen bulaşıklık oranı diğer ilçelere göre nispeten daha yüksek çıkmıştır. Nusaybin ilçesinde buğday üretim alanlarında yabancı ot ve vektör kontrolünün daha az olmasının enfeksiyon oranının daha yüksek çıkmasının muhtemel sebebi olduğu düşünülmektedir. Dargeçit ve Midyat ilçelerinde ise herhangi bir enfeksiyonun tespit edilmemiş olmasının nedeni bu bölgelerin yükseklik ve mikroklimatik özelliklerinin vektör böcekler için uygun olmaması ayrıca düşük yoğunlukta tahıl üretiminin olmasına bağlanmıştır.

Yapılan survey çalışmasında testlenen 400 örneğin içerisinde Kızıltepe örneklerinin 1'inde BYDV-RMV tespit edilmiştir. BYDV-RMV virüsünün en önemli vektörü Mısır yaprak biti (*Rhopalosiphum maidis*) olduğu belirtilmiştir (Siddiqui ve ark., 2011). Bu açıdan bakıldığında başka hiçbir ilçede BYDV-RMV enfeksiyonuna rastlanmamış olmasının Kızıltepe ilçesinde yüksek yoğunluktaki mısır tarımının neden olduğu düşünülmüştür.

İran'da tahıl üretiminde önemli problemlerden biri olduğunu belirtmişlerdir. İran ve Güneybatı Asya'da BYDV virüslerini tanılamak için ilk çalışmayı gerçekleştirmişlerdir. Buğdaydan BYDV-PAV'ın bir izolatu (PAV-IR), arpadan ise CYDV-RPV'nin bir izolatu (RPV-IR) moleküler karakterizasyon için seçilmiştir. ABD, Fransa ve Japonya'dan PAV izolatlarına yüksek oranda (% 96-97) dizi benzerliğini PAV-IR göstermiştir (Rastgou ve ark. 2005).

Bisnieks ve ark. (2004), *Barley yellow dwarf virus-MAV* (MAV) ve *Barley yellow dwarf virus-PAV* (PAV)'ın sekans değişkenliği üzerine bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada Letonya'dan altı ve İsveç'ten dört izolatu kılıf protein genini kodlayan bölgesinden 502 nükleotitin karşılaştırılmasıyla yapılmıştır. MAV içindeki çeşitlilik ABD ve Çin'de saptanan izolatlarla karşılaştırıldığında, ABD ve Çin kaynaklı izolatlara (% 97 sekans benzerliği) göre değişikliğin düşük olduğunu saptamışlardır. MAV'ın aksine PAV izolatları arasındaki değişkenliğin daha büyük olduğunu belirtmişlerdir.

Rastgou ve ark. (2005), İran izolatları BYDV-PAV ve CYDV-RPV virüslerinin kısmi dizilerini ortaya koymuşlardır. Buğdayda PAV izolatından bir tane ve arpada RPV izolatından bir tanesinin seçilerek moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Dizi analizi yapılan İran PAV izolatının USA, Fransa ve Japonya'daki izolatlar ile % 96-97 oranında nükleik asit dizi benzerliği gösterdiği ortaya konulmuştur.

Nagy ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada *Barley yellow dwarf virus* (BYDV)'nin kılıf protein geninin moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda BYDV'nin 5 serotipini (PAV, SGV, RMV, MAV ve RPV) olduğunu tespit etmişlerdir. Buğdayda PAV ve RMV virüslerinin kılıf protein genini çoğaltmış ve elde edilen PCR ürünlerinin dizi analizine göndererek gen bankasında ki başka izolatlarla karşılaştırılmasını yapmıştır. Dünyadaki farklı izolatlarla % 93 gibi yüksek benzerlik oranları olduğunu rapor etmişlerdir.

Áy ve ark. (2008), buğdayda (*Triticum aestivum* L.) tahıl virüslerinin teşhis edilmesinde serolojik ve moleküler metotlar kullanmışlardır. PCR ve ELISA kullanılarak virüs enfeksiyonlarının belirlenmiştir. Test sonucunda PAV virüsünün daha yüksek yoğunlukta bulunduğu belirtilmiştir. ELISA ile test edilen buğday bitkilerinin % 45'i enfekteli bulunurken PCR yöntemiyle testlenen buğday örneklerini % 58'inin pozitif olduğu görülmüştür. Tanılamada önemli bir kullanım potansiyeline sahip olan nükleik asit temelli yöntemlerle yapılan çalışmada PCR yönteminin ELISA'ya oranla iki kat daha güvenilir olduğu ortaya çıkarılmıştır (Jacobi ve ark, 1998).

Yürütülen bir çalışmada farklı türlere ait tohumlar her üç yöntemle (DAS-ELISA, RT-PCR, mekanik inokulasyon) testlenmiş ve RT-PCR yönteminin virüs enfeksiyonlarını saptama oranı % 100 olarak bulunurken, DAS-ELISA'da bu oran % 96 olmuş, mekanik inokulasyonun tanılama başarısı ise % 95 olarak saptanmıştır (Paylan, 2011).

Mardin ili ilçelerinden toplanan buğday örneklerinde Arpa sarı cücelik virüslerinin (BYDV) tespiti Malmstrom ve Shu (2004)'nin geliştirdiği primerlere göre multipleks RT-PCR yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tespit edilen 4 farklı virüse (BYDV-PAV, BYDV-SGV, BYDV-RMV ve CYDV-RPV) ait kılıf protein gen bölgesinin karakterizasyonu için her bir virüse ait pozitif örneklerden rastgele olarak seçilen izolatlar T-A klonlama yöntemi kullanılarak tanımlanmıştır. Buna göre dünyadaki farklı izolatlarla nükleik asit dizi karşılaştırmalarında; BYDV-PAV virüs izolatında 59 baz değişimin olduğu ve % 88-95 oranlarında benzerlik gösterdiği, BYDV-SGV virüs izolatının 3 baz değişimi olduğu ve % 61-100 oranlarında benzerlik gösterdiği, CYDV-RPV virüs izolatında 31 baz değişimi olduğu ve benzerlik indeksinde karşılaştırılan izolatlarla % 45-96 oranlarında benzerlik gösterdiği ve BYDV- RMV virüs izolatında % 82-95.9 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışmanın sonucunda BYDV- PAV, BYDV-SGV, BYDV-RMV ve CYDV-RPV dünya izolatlarıyla yüksek oranda benzerlik olduğunu görülmüştür.

5. SONUÇ

Mardin ilinde bugüne kadar buğday virüslerini araştıran bir çalışma mevcut değildir. Güneydoğu Anadolu Bölgesindeki yapılan çalışmalara bakılınca buğday virüsleri açısından bölgede yapılan ikinci geniş kapsamlı moleküler düzeyde çalışmadır. Mardin ilinde 2017 yılında yapılan survey çalışması kapsamında; Kızıltepe, Derik, Artuklu (Merkez ilçe), Nusaybin, Savur, Dargeçit ve Midyat ilçelerindeki buğday üretim alanlarından kademeli örnekleme yönteminden yararlanılarak toplanan 400 taze yaprak örneği Arpa sarı cücelik virüsleri (BYDV-PAV, BYDV-MAV, BYDV, SGV, BYDV-RMV ve CYDV-RPV) açısından Multipleks-PCR ve RT-PCR yöntemleri ile varlıkları araştırılmıştır. Testlenen örneklerde Mardin ilinde 4 farklı virüs türü (BYDV-PAV, BYDV-SGV, BYDV-RMV ve CYDV-RPV) tespit edilmiş ancak testlenen 400 örneğin hiçbirinde BYDV-MAV virüsüne rastlanılmamıştır.

Survey çalışması kapsamında toplanan 400 buğday bayrak yaprağı örneğinin 10'unda BYDV-PAV (% 2.5), 7'sinde BYDV-SGV (% 1.75), 2'sinde CYDV-RPV (% 0.5) ve 1'inde BYDV-RMV (% 0.25) virüs infeksiyonları tespit edilmiştir. Testlenen pozitif örneklerin 7'sinde BYDV-PAV+BYDV-SGV (% 1.75) ve 1'inde ise BYDV-PAV+CYDV-RPV (% 0.25) karışık infeksiyonları tespit edilmiştir. Mardin ilinde buğday virüslerinin genel infeksiyon oranı % 3.0 olarak bulunmuştur.

İlçeler bazında infeksiyon oranlarına bakıldığında ise genel olarak % 2.22 ile % 7.5 arasında değiştiği görülmüştür. Diğer ilçelere nazaran Nusaybin ilçesinde genel infeksiyon oranı % 7.5 ile en yüksek oranda olduğu anlaşılmıştır. İlçede BYDV-PAV ve BYDV-SGV bulunma oranlarının % 5 olduğu tespit edilmiş ayrıca 2 izolatta da BYDV-PAV+BYDV-SGV karışık infeksiyonu olduğu anlaşılmıştır.

Survey çalışmasında 5 pozitif örneğin tespit edildiği en çok pozitif izolatan bulunduğu Kızıltepe ilçesinde ise genel infeksiyon oranı % 2.95 olarak tespit edilmiştir. 170 yaprak örneğinin toplandığı bu ilçede örneklerin 4'ünde BYDV-PAV (% 2.5), 2'sinde BYDV-SGV (% 1.16), 1'inde CYDV-RPV (% 0.58) ve 1'inde de BYDV-RMV (% 0.58) tespit edilmiştir. Mardin ilindeki survey çalışmasında infeksiyon görülen diğer ilçelerdeki bulaşıklık oranları genel infeksiyon oranı olan % 3'e yakın olup Dargeçit ve Midyat ilçelerinde hiçbir infeksiyon tespit edilmemiştir.

Mardin ili ve ilçelerindeki yapılan bu survey çalışmasında Arpa sarı cücelik virüslerinin (BYDV-PAV, BYDV-SGV, BYDV-RMV ve CYDV-RPV) varlığı tespit edilmiş olup yaygınlık oranları sırasıyla BYDV-PAV için % 2.5, BYDV-SGV için % 1.75, CYDV-RPV için % 0.5 ve BYDV-RMV için ise % 0.25 olduğu belirlenmiştir. Türkiye’de ve dünyanın farklı bölgelerinde olduğu gibi Mardin ilinde de BYDV-PAV virüsü en yaygın Arpa sarı cücelik virüsü olduğu tespit edilmiştir. Survey alanlarında, etmen hastalık belirtileri açısından gözlemlenmiş sonuç olarak buğday bayrak yapraklarında kırmızılaşma, yapraklarda çizgi şeklinde sararmalar, cüceleşme ve kıvrılma simptomlarına rastlanılmıştır.

Survey çalışmaları sonucunda tespit edilen 4 farklı virüse (BYDV-PAV, BYDV-SGV, BYDV-RMV ve CYDV-RPV) ait kılıf protein gen bölgesinin karakterizasyonu için her bir virüse ait pozitif örneklerden rastgele olarak seçilen izolatlar T-A klonlama yöntemi kullanılarak karakterize edilmiştir. Buna göre, BYDV-PAV ve CYDV-RPV Mardin izolatlarının kılıf protein gen bölgesinin tamamı, BYDV-RMV ve BYDV-SGV Mardin izolatlarının ise kılıf protein gen bölgesinin kısmi bölümünün karakterizasyonu yapılmıştır. Çift yönlü dizilenen izolatların kılıf protein gen dizileri BYDV-PAV için MK732034, BYDV-SGV için MK940529, BYDV-RMV için MK955886 ve CYDV-RPV için MK732035 ulaşım numaraları ile NCBI gen bankası veri tabanına kaydı yapılmıştır.

17 numaralı BYDV-PAV Mardin izolatının kılıf protein gen bölgesinin uzunluğunun dünyadaki diğer izolatlarda olduğu gibi 603 bp olduğu tespit edilmiştir. CLC Main Workbench 6.7.1 programın ile yapılan nükleotit dizi karşılaştırmaları sonucunda BYDV-PAV Mardin izolatının dünyadaki diğer izolatlarla nükleotit düzeyinde % 88.72-95.52 oranlarında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca aynı program yardımıyla kılıf protein gen bölgesinde nükleik asit dizi karşılaştırmaları yapılmış ve sonuç olarak 603 bp uzunluğundaki bölgede % 9.98 oranında 59 baz değişikliği olduğu ortaya konmuştur. *Luteoviridae* familyasında *luteovirus* cinsi içerisinde konumlanan BYDV-PAV virüslerinin kılıf protein geninde bulunmayan ORF-0 bölgesinin, RNA susturucu baskılayıcı görevi üstlendiği bilinmektedir. BYDV-PAV virüs izolatındaki baz değişiminin diğer virüslere göre nispeten daha fazla olmasının kılıf proteinin ORF-0 bölgesine sahip olmaması olduğu düşünülmüştür.

117 numaralı CYDV-RPV Mardin izolatinın kılıf protein gen bölgesinin uzuluğunun dünyadaki diğer izolatlarda oluşu gibi 615 bp olduğu tespit edilmiştir. CLC Main Workbench 6.7.1 programın ile yapılan nükleotit dizi karşılaştırmaları sonucunda CYDV-RPV Mardin izolatinın dünyadaki diğer izolatlarla nükleotit düzeyinde % 45.04-96.43 oranlarında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca aynı program yardımıyla kılıf protein gen bölgesinde nükleik asit dizi karşılaştırmaları yapılmış ve sonuç olarak 615 bp uzuluğundaki bölgede % 5.04 oranında 31 baz değişikliği olduğu ortaya konmuştur. Meydana gelen bu baz değişimlerinin kılıf protein genin belirli bir bölgesinde yoğunlaşmadığını gen bölgesinin hertarafında gözlemlendiği tespit edilmiştir.

30 numaralı BYDV-SGV Mardin izolatinın çoğaltılan kısmi kılıf protein gen bölgesinin uzuluğunun 250 bp olduğu tespit edilmiştir. CLC Main Workbench 6.7.1 programın ile yapılan nükleotit dizi karşılaştırmaları sonucunda BYDV-SGV Mardin izolatinın dünyadaki diğer izolatlarla nükleotit düzeyinde % 61.84-100 oranlarında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca aynı program yardımıyla kılıf protein gen bölgesinde nükleik asit dizi karşılaştırmaları yapılmış ve sonuç olarak 250 bp uzuluğundaki bölgede % 1.2 oranında 3 baz değişikliği olduğu ortaya konmuştur.

279 numaralı BYDV-RMV Mardin izolatinın çoğaltılan kısmi kılıf protein gen bölgesinin uzuluğunun 365 bp olduğu tespit edilmiştir. CLC Main Workbench 6 programın ile yapılan nükleotit dizi karşılaştırmaları sonucunda BYDV-RMV Mardin izolatinın dünyadaki diğer izolatlarla nükleotit düzeyinde % 65.75-95.89 oranlarında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca aynı program yardımıyla kılıf protein gen bölgesinde nükleik asit dizi karşılaştırmaları yapılmış ve sonuç olarak 365 bp uzuluğundaki bölgede % 4.9 oranında 18 baz değişikliği olduğu ortaya konmuştur.

Bu çalışmada tespit edilen sonuçlarından yola çıkarak;

- Mardin ili ve ilçelerinde yapılan bu çalışma ile tespit edilen Arpa sarı cücelik virüsleri, buğday tarımında epidemi oluşturacak düzeyde olmadığı tespit edilmiştir. Ancak ilerde dünyanın farklı bölgelerinde oluşturduğu gibi yüksek oranlarda verim kaybı oluşturmayacağı belirsizdir.
- Hastalığın yayılımını etkileyen ana etken olan vektör böceklerin tür çeşitleri ve populasyon miktarları farklılık gösterebilmektedir. Bu da virüs vektörlerinin virüsün bölgedeki yayılımı ve ciddiyetini belirlemektedir. Virüs vektörlerinin

bölgede bulunup bulunmadığı kapsamlı bir çalışması yapılması gerekmektedir. Bu kapsamda virüs vektörlerine karşı entegre mücadeleye büyük önem verilmelidir.

- Arpa sarı cücelik virüsleri *Poaceae* familyası içerisindeki yabancı otlar dahil birçok türde infeksiyon oluşturabilmektedir. Bu virüslerin buğday dışındaki bitkilerde de epidemiyolojilerinin ortaya konulması daha iyi bir mücadele için büyük önem arz etmektedir.
- Tespit edilen bulgular Arpa sarı cücelik virüslerinin ulusal ve uluslararası literatürüne katkıda bulunacak ve virüs epidemiyolojisinin daha iyi ortaya konmasına olanak tanıyacaktır. Elde edilen bulguların virüsün daha ekonomik ve daha hızlı teşhisine için olanak sağlayan multipleks RT-PCR yönteminin kullanımını açısından fayda sağlayacaktır.
- Virüslerle mücadele en ekonomik ve en iyi yöntem olan dayanıklı ve tolerant çeşit bulmaya yönelik çalışmalar artırılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Akbaş, B., İlhan, İ., Güner, Ü., 2005. Orta Anadolu bölgesinde tohumluk olarak kullanılan buğday tohumlarında virüs varlığı. *Bitki Koruma Bülteni*, **45** (1-4): 55-60.
- Altay, F., Bolat, N., 2004. Effect of Soil borne wheat mosaic virus on winter wheat yield and yield Components. *Acta Agronomica Hungarica*, **52** (3): 309–317.
- Anonim, 1996. Türk tarımında buğdayın yeri ve önemi. <http://www.ito.org.tr/itoyayin/0022759.pdf>. İstanbul Ticaret Odası, İstanbul. Erişim tarihi: 1.2.2016.
- Anonim, 2016c. Buğday tarımı. <http://arastirma.tarim.gov.tr/ktae/Belgeler/brosurler/Bu%C4%9Fday%20Tar%C4%B1m%C4%B1.pdf>. Erişim tarihi: 1.2.2016
- 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.
- Aydın, Ö., 2017. *Trakya Bölgesi Çeltik Üretim Alanlarında Arpa Sarı Cücelik Virüs Hastalıkları (Barley Yellow Dwarf Viruses-Bydvs)'Nin Saptanması*. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Banks, P. M., Davidson, J. L., Bariana, H. S., and Larkin, P. J. 1995. Effects of barley yellow dwarf virus on the yields of winter wheat. *Aust. J. Agric. Res.* **46**:935-946.
- Bisnieks, M., Kvarnheden, A., Sigvald, R. and Valkonen, J. P. T., 2004, Molecular diversity of the coat protein-encoding region of Barley yellow dwarf virus-PAV and Barley yellow dwarf virus-MAV from Latvia and Sweden, *Archives of Virology*, **149**(4): 843-853.
- Boyraz, N., 2013. Kocaeli bölgesinde verim ve kaliteyi etkileyen önemli bitki hastalıkları. *I. KOP Bölgesel Kalkınma Sempozyumu*. Kasım 2013, Konya. 224-237.
- Bora, T. Ve İ. KARACA, 1970 *Kültür Bitkilerinde Hastalığın ve Zararın Ölçülmesi*. EGE Üniv. Matb. No: 167, Bornova, 43
- Brault, V., Herrbach, É., Reinbold, C. (2007). Electron microscopy studies on luteovirid transmission by aphids. *Micron*, **38**(3): 302-312.
- Bukvayova, N., Henselova, M., Vajcikova, V., Kormanova, T., 2006. Occurrence of dwarf virus of winter wheat and barley in several regions of Slovakia during the growing seasons 2001-2004. *Plant Soil Environt.*, **52**(9): 392-401.
- 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.
- Chain, F., Riault, G., Jacquot, E. and Trottet, M., 2006, Field trial of serially passaged isolates of BYDV-PAV overcoming resistance derived from *Thinopyrum intermedium* in wheat, *Plant Breeding*, **125**(3): 211–216.
- 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.

- Conti, M. C., D'Arcy, C. J., Jedlinski, H., and Burnett, P. A., 1990. *The "Yellow Plague" of cereals, barley yellow dwarf*. Pages 1-6 in: World Perspectives on *Barley Yellow Dwarf*. P. A. Burnett, ed. CIMMYT, Mexico City D.F.
- Cummins A. G. and Roberts-Thomson I.C, 2009. Prevalence of Celiac Disease in the Asia Pacific Region. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **24**(8): 1347-1351.
- Dayan, S. S., *Tekirdağ İli 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.
- Deligöz, İ., Kahveci Caner, Y. ve Akyol, H., 2011, Samsun ve Amasya illerinde buğday üretim alanlarında enfeksiyona neden olan Barley yellow dwarf virus-PAV ve Barley yellow dwarf virus-MAV virüslerinin araştırılması, *Bitki Koruma Bülteni 2011*, **51**(2): 187-193.
- 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.
- Domier, L.L., 2008. Barley yellow dwarf viruses. *Encyclopedia of Virology*, **3**: 279-286.
- Dumlupınar, Z., Tekin, A., Herek, S., Tanrıku, A., Dokuyucu, T., Akkaya, A. 2017. Evaluating Some Turkish Originated Oat Genotypes for Some Agronomic Traits. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, **5**(7): 763-772.
- Elena, S.F. Sanjuan, R. 2008. Virus evolution, insights from an experimental approach. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **38**: 27-52.
- 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
- El-Yamani, M., Hill, J. H., 1990. Identification and importance of Barley yellow dwarf virus in Morocco. *Plant Dis.* **74**: 291-294.
- Erkan E. ve Kutluk Yılmaz N.D., 2009. Samsun ilinde buğday üretim alanlarında enfeksiyon oluşturan virüslerin saptanması. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi* **24**(2): 67-75
- Erkan, E., 2008. *Samsun ili Buğday Üretim Alanlarında İnfeksiyon 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.
- FAO, 2017. Preliminary 2011 Data now available for selected countries and products. <http://www.fao.org/faostat>. Erişim Tarihi:15.06.2017.
- FAO, 2018. Preliminary Data Now Available For Selected Countries An Products. <http://www.fao.org/statistics/en/> Erişim Tarihi:09.03.2018.
- Gooding M.J. and Davies W.P., 1997. *Wheat Production and Utilization: Systems, Quality And The Environment*, CAB International, Wallingford, UK
- Gould, F. W., Shaw, R. B. 1983. Grass systematics. *Brittonia*, **35**(3), 301-301.

- Gray, S. M., Chapin., J. W., Smith, D. M., Banerjee, N., and Thomas, J. S., 1998. *Barley yellow dwarf luteoviruses* and their predominant aphid vectors in winter wheat grown in South Carolina. *Plant Dis.* **82**: 1328-1333.
- Halbert, S. E., Connelly, B. J., Lister, R. M., Klem, R. E., ve Bishop, G. W. 1992. Vector specificity of barley yellow dwarf virus serotypes and variants in southwestern Idaho. *Annals Of Applied Biology*, **121**(1): 123-132.
- Hamamcı, G., 2012. *Tekirdağ İli'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.
- Hassan, N.O., Usta, M., Al-Maarroof, M.E. ve Güller, A., 2018. The incidence of Barley Yellow Dwarf Viruses (BYDVs) in Wheat Crops in Diyarbakir (Turkey) and Sequence Characterization of BYDV-PAV. *YYÜ Tar. Bil. Derg*, **28**: 140-149.
- Hoffman, T. K., Kolb, F. L., 1997. Effects of Barley yellow dwarf virus on root and shoot growth of winter wheat seedlings grown in aeroponic culture. *Plant Dis.* **81**: 497-500.
- Hogenhout, S.A., Ammar, D., Whitfield, A.E. Redinbaugh, M.G. 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu. Rev. Phytopathol*, **46**: 327-359.
- İlbağı H, Çıtır A., Yorgancı Ü. 2005. Occurrence of virus Infections on cereal crops and their identifications in the Trakya region of Turkey. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. Journal of Plant Diseases and Protection*, **112**: 313-320.
- İlbağı, H., 2003, *Trakya Bölgesinde Üretimi Yapılan Bazı Tahıl Türlerinde Verim Kayıplarına Neden Olan Viral Kökenli İnfeksiyonların Etmenlerinin Tanılanması*, Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Doktora Tezi,
- İlbağı, H., 2003. *Trakya Bölgesinde Üretimi Yapılan Bazı Tahıl Türlerinde Verim Kayıplarına Neden Olan Viral Kökenli İnfeksiyonların 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., Rabenstein, F., Habekuss, A., Ordon, F., Çıtır, A., Cebeci, O., Budak, H., 2008. Molecular, serological and aphid transmission studies of Barley yellow dwarf virus-PAV and Cereal yellow dwarf virus-RPV in Canary Seed (*Phalaris canariensis* L.). *Cereal Research Communications*, **36**: 225-234.
- İlbağı, H., ve Geyik, S., 2014. Türkiye'de Bursa ili mısır (*zea mays* L.) tarlalarında görülen virüs hastalıklarının saptanması. N. K. Ü. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, **11**(1):122-125.
- Jensen, S. G., 1969, Occurrence of virus particles in the phloem tissue of BYDV-infected barley, *Virology*, **38**: 83-91.
- Kai H., Takata K., Tsukazaki M., Furusho M., Baba T. 2012 Molecular mapping of Rym17, a dominant and rym18 a recessive barley yellow mosaic virus (BaYMV) resistance genes derived from *Hordeum vulgare* L. *Theoretical and Applied Genetics*, **124**: 577–583.
- Karakaya, M., Boyraz, N., 1992. Gıda kirlenmesinde pestisitler ve korunma yolları. *Çevre Dergisi*, **4**: 11-15.

- 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., Altındal, D., Yardımcı, N., Akgün, D., 2012. Farklı buğday çeşitleri tohumlarında Wheat streak mosaic virus ve Barley stripe mosaic virus 'ünün DAS-ELISA yöntemi ile araştırılması , U. Ü. *Ziraat Fakültesi Dergisi* , **26** (1): 17-25.
- Koev, G., Mohan, B. R., Dinesh-Kumar, S. P., Torbert, K. A., Somers, D. A. and Miller, A. W., 1998, Extreme reduction of disease in oats transformed with the 5' half of the Barley yellow dwarf virus-PAV genome, *Phytopathology*, **88**(10): 1013-1019.
- Köklü, G., 2004. Occurrence of cereal viruses on wheat in Tekirdag, Turkey. *Phytoprotection*, **85**: 19- 25.
- Krueger, E. N., Beckett, R. J., 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 Pterovirus distantly related to other yellow dwarf viruses. *Frontiers in microbiology*, **4**: 205.
- Kumari, S. G., Muharram, I., Makkouk, K. M., Al-Ansi, A., El-Pasha, R., W. A. Al-Motwkel, W. A. and Kassem, A. H., 2006, Identification of viral diseases affecting barley and bread wheat crops in Yemen, Australasian *Plant Pathology*, **35**(5): 563-568
- Kurçman, S., 1981. Eskişehir ili'nde buğdaylarda görülen buğday mosaic virüs hastalığı üzerine araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni*, **21**(1) : 1-17.
- 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. 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.
- McKirby S.J., Jones, R. A. C., and Nutter, F.W., 2002. Quantification of yield losses caused by barley yellow dwarf virus in wheat and oats. *Plant Dis.* **86**:769-773.
- Menteş ve Yılmaz O., 2011. *Türkiye'de Yetiştirilen Başlıca Buğday Çeşitlerinin Antioksidan Aktivitelerinin ve Fenolik Asit Dağılımlarının Belirlenmesi Ve Ekmeğin Nar Kabuğu Ekstraktı ile Zenginleştirilmesi.* (Doktora Tezi). Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,
- Miller, W.A. and Rasochová, L., 1997. Barley yellow dwarf viruses, *Annual Review of Phytopathology*, **35**: 167-190.
- 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.
- Nagy, A. A., Sharaf, A. N., Soliman, M. H., Shalaby, A. A., Youssef, S. A., 2007. Molecular characterization of *Barley yellow dwarf virus* coat protein gene in wheat and aphids. *Arab J.Biotech*, **10** (1): 207-218.

- Nancarrow, N., Constable, F. E., Finlay, K. J., Freeman, A. J., Rodoni, B. C., Trebicki, P., Vassiliadis, S., Yen, A. L. and Luck, J. E., 2014, The effect of elevated temperature on Barley yellow dwarf virus-PAV in wheat. *Virus Research*, **186**: 97-103.
- Ordon F., Ahlemeyer J., Werner K., Kohler W., Friedt W. 2005. Molecular assessment of genetic diversity in winter barley and its use in breeding. *Euphytica*, **146**: 21–28.
- Oswald, J.W. Houston, B.R. 1951. A new virus disease of cereals, transmissible by aphids. *Plant Dis. Rep.* **35**: 471-475.
- Özberk, F., Karagöz, A., 2016. Buğday Genetik Kaynaklarından Yerel ve Kültür Çeşitlerine; Türkiye'de Buğday ve Ekmek. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **2016, 25** (2):218-233
- Paltridge N.G., Collins N.C., Bendahmane A., Symons R.H. 1998. Development of YLM, a codominant PCR marker closely linked to the Yd2 gene for resistance to barley yellow dwarf disease. *Theoretical and Applied Genetics*, **96**: 1170–1177.
- Parizoto, G., Rebonatto, A., Schons, J. and Lau, D., 2013, Barley yellow dwarf virus-PAV in Brazil: seasonal fluctuation and biological characteristics. *Tropical Plant Pathology*, **38**(1): 11-19.
- Peter, K.A., Gildow, F., Palukaitis, P. Gray, S.M. 2009. The C terminus of the poliovirus 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 losses. *World Perspectives on Barley Yellow Dwarf Virus*. 6-11 July 1987, İtaly. 356-359
- Rastgou, M., Khatabi, B., Kvarnheden, A. and Izadpanah, K., 2005. Relationships of *Barley yellow dwarf virus-PAV* and *Cereal yellow dwarf virus-RPV* from Iran with viruses of the family Luteoviridae, *European Journal of Plant Pathology*, **113**(3): 321-326.
- Rybicki, E. P. 2015. A top ten list for economically important plant viruses. *Archives of virology*, **160**(1): 17-20.
- 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
- 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.
- Siddiqui, N. N., Ilyas, M., Mansoor, S., Azhar, A. and Saeed, M., 2011, Cloning and phylogenetic analysis of coat protein of *Barley yellow dwarf virus* isolates from different regions of Pakistan, *Journal of Phytopathology*, **160**(1): 13–18.
- Sökmen, M., 2005. Genetik yapısı değiştirilmiş bitkiler ve bitki koruma amaçlı kullanımı. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, **20**(3), 105-109.
- Stein N., Perovic D., Kumlehn J., Pellio B., Stracke S., Streng S., Ordon F., Graner A. 2005. The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive Bymovirus resistance in *Hordeum vulgare* (L.). *The Plant Journal*, **42**: 912–922.

- Tao, Y., Man J., Devwu Y., 2012. Development of a multiplex polymerase chain reaction for simultaneous detection of wheat viruses and a phytoplasma in China. *Arch. Virol.* **157**: 1261-1267.
- Thackray, D.J., Diggle, A.J. Jones, R.A.C. 2009. BYDY predictor: a simulation model to predict aphid arrival, epidemics of barley yellow dwarf virus and yield losses in wheat crops in a Mediterranean-type environment. *Plant Pathol.* **58**: 186-202.
- Toksöz, Y., ve Yılmaz, N.D.K., 2016. Samsun ilinde mısır (*Zea mays L.*) üretim alanlarında infeksiyon oluşturan virüslerin belirlenmesi. *Anadolu J Agr Sci*, **31** (2): 199-206.
- TÜİK, 2018. Bitkisel Ürün İstatistikleri. <http://www.tuik.gov.tr/Gosterge.do?>, Erişim Tarihi:09.03.2018.
- Usta, M., 2013. *Doğu Anadolu Bölgesindeki Buğday Üretim Alanlarında Buğday Virüslerinin Multipleks RT-PCR Yöntemi ile araştırılması ve Virüs İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu*. YYÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Uzunoğulları, N., ve Gümüş, M., 2017. Virüs taksonomisinin tarihsel gelişimi ve son durumu. *Bahçe*, **46** (2): 51-57.
- 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.

ÖZ GEÇMİŞ

1992’de Mardin Kızıltepe ilçesinde doğdu. İlkokul ve ortaokul eğitim öğretimini Kızıltepe Sıtkı Türkoğlu Okulu’nda, lise eğitim öğretimini Kızıltepe Anadolu Atatürk Lisesi’nde tamamladı. 2011 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünü kazandı. 2015 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünü bitirdi. Aynı yıl Van YYÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Fitopatoloji alanında Fen Bilimleri Enstitüsü’ne bağlı olarak Yüksek Lisans yapmaya başladı. Şu an halen devam etmekte.



T.C
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 22.10.2019

Tez Başlığı / Konusu: 'MARDİN İLİ BUĞDAY ÜRETİM ALANLARINDAKİ ARPA SARI CÜCELİK VİRÜS (Barley yellow dwarf viruses; BYDVs)'LERİNİN MULTİPLEKS RT-PCR YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI VE BAZI VİRÜS İZOLATLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONLARI"
Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 50 sayfalık kısmına ilişkin, 22.10.2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafındanintihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı % 6 (a.t.t.) dir.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimededen daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

22.07.2019
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Abdülcelal Karaozan
Öğrenci No: 159.101.089
Anabilim Dalı: Dışki Koçuma
Programı: Fito-patoloji
Statüsü: Y. Lisans Doktora

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa USTA

ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR

(Unvan, Ad Soyad, İmza)
Prof. Dr. Sait ŞENSOY
Enstitü Müdürü