T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇANAKKALE İLİ ISPANAK ÜRETİM ALANLARINDA PANCAR NEKROTİK SARI DAMAR VİRÜSÜ (BEET NECROTIC YELLOW VEIN VIRUS; BNYVV)'NÜN TESPİTİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Zeynep BAĞLAN
Bitki Koruma Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇANAKKALE İLİ ISPANAK ÜRETİM ALANLARINDA PANCAR NEKROTİK SARI DAMAR VİRÜSÜ (BEET NECROTIC YELLOW VEIN VIRUS; BNYVV)'NÜN TESPİTİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Zeynep BAĞLAN
Bitki Koruma Anabilim Dalı
Tezin Sunulduğu Tarih: **24/06/2019**

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

ÇANAKKALE

Zeynep BAĞLAN tarafından Prof. Dr. Savaş KORKMAZ yönetiminde hazırlanan ve **24/06/2019** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan "**Çanakkale İli Ispanak Üretim Alanlarında Pancar Nekrotik Sarı Damar Virüsü (Beet necrotic yellow vein virus; BNYVV)'nün Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu**" başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Bitki Koruma Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof Dr. Savaş KORKMAZ ……

Başkan

Prof. Dr. Figen MERT ……

Üye

Doç. Dr. İsmail Can PAYLAN ……

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ
Müdür
Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:……

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince Desteklenmiştir. Proje Numarası: FYL-2018-2545

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Zeynep BAĞLAN

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Savaş KORKMAZ, çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen Dr. Ali KARANFİL'e çok teşekkür ederim. Tezimin değerlendirilmesi aşamasındaki önemli katkılarından dolayı Prof. Dr. Figen MERT ve Doç. Dr. İsmail Can PAYLAN'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Tez çalışmam boyunca desteğini esirgemeyen arkadaşlarım Cenk KESKİN ve Mert İÇEN'e teşekkür ederim. Hayatımın her evresinde bana destek olan değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Zeynep BAĞLAN

Çanakkale, Haziran 2019

SİMGELER VE KISALTMALAR

bç	Baz çifti
nt	Nükleotit
aa	Amino asit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
PCR	Polimerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
%	Yüzde oranı
µl	Mikrolitre
ark.	Arkadaşları
CP	Coat Protein
TNA	Toplam nükleik asit
UV	UltraViolet
NJ	Neighbour joining
rpm	Revolutions Per Minute
V	Volt
pmol	Picomol
EtBr	Etidyum Bromür
SDT	Sequence demarcation tool
CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide
sn	Saniye
dk	Dakika
sa	Saat
g	Gram
BNYVV	Beet necrotic yellow vein virus

ÖZET

ÇANAKKALE İLİ ISPANAK ÜRETİM ALANLARINDA PANCAR NEKROTİK SARI DAMAR VİRÜSÜ (BEET NECROTIC YELLOW VEIN VIRUS; BNYVV)'NÜN TESPİTİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Zeynep BAĞLAN
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Prof. Dr. Savaş KORKMAZ
24/06/2019, 44

Ispanak önemli bir kışlık sebze olup ülkemizin her bölgesinde üretimi yapılmaktadır. Ispanak üretiminde verim ve kaliteyi etkileyen birçok hastalık etmeni vardır ve bunlar içerisinden virüsler önemli bir yer tutmaktadır. Bu virüs hastalıklarından bir tanesi "Rhizomonia" olarakta adlandırılan pancar nekrotik sarı damar virüsü (beet necrotic yellow vein virus; BNYVV)'dür. BNYVV'nin ülkemizde ıspanak bitkisinde varlığı serolojik yöntemlerle belirlenmiş ancak moleküler düzeyde bir çalışma yapılmamıştır. Bu amaçla Çanakkale'de il ve ilçe düzeyinde ıspanak yetiştiriciliği yapılan alanlara BNYVV'nin varlığını belirlemek ve tanısını yapmak amacı ile 2017-2018 üretim yılında bir arazi çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu arazi çalışması kapsamında tipik virüs simptomları gösteren ıspanak bitkilerinden 66 örnek alınmıştır. Alınan örneklerdeki BNYVV varlığı virüs proteinine dayalı bir yöntem olan DAS-ELISA testi ile belirlenmiştir. DAS-ELISA testi sonuçlarına göre 66 örneğin 12'si BNYVV ile enfekteli olarak bulunmuştur. Enfekteli bulunan örnekler içerisinden bir tanesi seçilerek (CNK-Spinach-39) örtü protein geni (coat protein; CP) RT-PCR ile çoğaltılmıştır. CP geni çoğaltılan izolatın RT-PCR ürünleri saflaştırılmış ve nükleotid dizileri belirlenmiştir. Elde edilen nükleotit (nt) dizileri kullanılarak seçilen izolata ait CP geninin amino asit (aa) dizileri çıkarılmıştır. Bu nükleotid ve amio asit dizileri dünya BNYVV izolatlarının CP genlerinin nükleotid ve aminoasit dizileri ile karşılaştırılarak, göstermiş oldukları benzerlik oranları ve filogenetik ilişkileri saptanmıştır. Gerçekleştirilen çoklu nt ve aa temelli dizi karşılaştırmaları sonucunda CNK-Spinach-39 izolatının dünya izolatları ile %95-99 oranında benzerlikler gösterdiği belirlenmiştir. Gerçekleştirilen filogenetik analizler sonucunda ise CNK-Spinach-39

izolatının B patotipinde yer aldığı tespit edilmiştir. Bu çalışma ile ülkemizde ıspanakta ilk defa BNYVV'nin B patotipi bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Benzerlik, Filogenetik.

ABSTRACT

DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BEET NECROTIC YELLOW VEIN VIRUS (BNYVV) IN SPINACH PRODUCTION FIELDS OF ÇANAKKALE PROVINCE, TURKEY

Zeynep BAĞLAN

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Plant Protection

Advisor: Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

24/06/2019, 44

Spinach is an important winter vegetable and it is produced in every region in Turkey. There are many diseases affecting the yield and quality in its production. And viruses have an important place among them. One of these virus diseases is beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), called Rhizomania disease. The presence of BNYVV in the spinach plant was determined by serological methods in Turkey, but no studies were conducted at the molecular level. For this purpose, field studies were carried out in 2017-2018 in order to determine the presence of BNYVV in the fields of spinach cultivation at the level of Çanakkale province and its districts. In these field studies, 66 samples were collected from spinach plants showing typical virus symptoms. The presence of BNYVV in the samples was determined by DAS-ELISA test, a method based on virus protein. According to the DAS-ELISA test, 12 out of 66 samples were infected with BNYVV. One of the infected samples was selected (CNK-Spinach-39) and the coat protein gene (CP) was amplified by RT-PCR. The its RT-PCR product was purified and sequenced. The amino acid (aa) sequences of this isolate was deduced based on its nt sequence. These nt and aa sequences were compared with the related sequences of the world BNYVV isolates and their similarities and phylogenetic relationships were determined. As a result of multiple sequence comparisons based on nt and aa, it was determined that CNK-Spinach-39 isolates showed similarities with 95-99% of the world isolates. As a result of the phylogenetic analysis, it was determined that the isolate CNK-Spinach-39 was found in the B pathotype. In this study, the first BNYVV B pathotype was found in spinach in our country.

Keywords: Polymerase Chain Reaction, Similarity, Phylogenetic.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI iii
TEŞEKKÜR iv
SİMGELER VE KISALTMALAR v
ÖZET vi
ABSTRACT viii
ŞEKİLLER DİZİNİ xii
ÇİZELGELER DİZİNİ xiii
BÖLÜM 1
GİRİŞ 1
BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 4
BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM 15
3.1. Arazi Çalışması 15
3.2. DAS-ELISA Testleri 16
3.2.1. Plate'in Antibadi İle Kaplanması 16
3.2.2. Örneklerin Plate'e Yüklenmesi 16
3.2.3. Konjugat (Enzimle İşaretlenmiş Antibadi) Eklenmesi 17
3.2.4. Substrat Eklenmesi 17
3.3. Moleküler Karakterizasyon Çalışmaları 17
3.3.1. Total Nükleik Asit İzolasyonu 17
3.3.2. Reverse Transcriptase-Polymerase Zincir Reaksiyonu 18
3.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi 19
3.3.4. Hedef Gen Bölgesinin Saflaştırılması 20
3.3.5. Sekanslama ve Biyoinformatik Analizler 21
BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 23
4.1. Arazi ve Virüs Tanılama Çalışmaları 23
4.2. Moleküler Karakterizasyon Çalışmaları 23
BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER 38
KAYNAKLAR 40
EKLERİ I

EK 1. Çanakkale ili pancar nekrotik sarı damar virüsü izolatının (CNK-Spinach-39) nükleotid sekans dizilimleri II
EK 2. Çanakkale ili pancar nekrotik sarı damar virüsü izolatının (CNK-Spinach-39) amino asit sekans dizilimleri III
ÖZGEÇMİŞ IV

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Pancar nekrotik sarı damar virüsü'nün genom yapısı ve organizasyonu (Anonim, 2019). 2
Şekil 3.1. Çanakkale ili ıspanak üretim alanlarında gerçekleştirilen sörvey çalışmalarının yer aldığı alanlar..... 15
Şekil 3.2. DAS-ELISA testleri kapsamında ezilen bitki örneklerinin plate'lere yüklenmesi 16
Şekil 3.3. RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi için jele yüklenmesi 20
Şekil 4.1. Arazi çalışmaları kapsamında virüs ve virüs benzeri simptom gösterdiği tespit edilen bazı örneklere ait belirtiler (A: Yapraklarında beyazımtrak mozaik belirtiler gösteren ıspanak bitkisi; B: Yapraklarında yoğun kıvrılmalar görülen ıspanak bitkisi; C: Yapraklarında klorozlar görülen ıspanak bitkisi; D: Yaprak ayalarında daralma ve sivrilmeler gösteren ıspanak bitkisi) 24
Şekil 4.2. Gerçekleştirilen DAS-ELISA testleri sonucunda pancar nekrotik sarı damar virüsü ile enfekteli bulunan bazı örneklere ait ELISA plate görüntüsü. 26
Şekil 4.3. Pancar nekrotik sarı damar virüsü ile enfekteli ıspanak bitkisinin yapraklarında meydana gelen hastalık belirtileri BNYVV ile enfekteli ıspanak bitkisinin yaprak damarlarında hafif bir kalınlaşma ve sarımtrak renk oluşumu görülmektedir. Ayrıca bu alanlar yuvarlak bir çerçeveye alınarak ok ile belirtilmiştir.) 27
Şekil 4.4. DAS-ELISA testleri sonucunda pancar nekrotik sarı damar virüsü (BNYVV) ile enfekteli bulunan örnekler içerisinden seçilen ve örtü protein genleri amplifiye edilen örneklerin jel görüntüleri (M: 5000-100 bç marker. 3, 5, 37, 39 DAS-ELISA testleri sonucunda BNYVV ile enfekteli bulunan izolatlara ait numaralar) 29
Şekil 4.5. Çanakkale ili ıspanak üretim alanlarından elde edilen CNK-Spinach-39 pancar nekrotik sarı damar virüsü'nün dünya izolatları ile örtü protein gen bölgesi nükleotit dizilimlerine göre birbirleri ile göstermiş olduğu benzerlik oranları. 30
Şekil 4.6. Çanakkale ili ıspanak üretim alanlarından elde edilen CNK-Spinach-39 pancar nekrotik sarı damar virüsü'nün dünya izolatları ile örtü protein gen bölgesi aminoasit dizilimlerine göre birbirleri ile göstermiş olduğu benzerlik oranları. 31
Şekil 4.7. Çanakkale ili ıspanak üretim alanlarından elde edilen CNK-Spinach-39 pancar nekrotik sarı damar virüsü'nün dünya izolatları ile örtü protein gen bölgesi nükleotit dizilimlerine göre birbirleri ile göstermiş olduğu filogenetik ilişki... 36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. Çalışma kapsamında kullanılan primer çifti 18
Çizelge 3.2. RT-PCR testlerinde kullanılan bileşenler, miktarları ve RT-PCR koşulları 19
Çizelge 3.3. Çanakkale ili ıspanak üretim alanlarından elde edilen CNK-Spinach-39 pancar nekrotik sarı damar virüsü'nün moleküler karakterizasyonu amacı ile gerçekleştirilen çoklu dizi ve filogenetik analizlerde kullanılan dünya izolatları 22
Çizelge 4.1. Çanakkale ili ve ilçelerinden toplanan ve pancar sarı nekrotik damar virüsü ile enfekteli bulunan örnek sayıları 25
Çizelge 4.2. Çanakkale ıspanak pancar nekrotik sarı damar virüsü ile dünya izolatlarının örtü protein genine ait çoklu amino asit dizi karşılaştırmaları 32
Çizelge 4.3. Çanakkale ıspanak pancar nekrotik sarı damar virüsü ile dünya izolatlarının örtü protein genine ait çoklu amino asit dizi karşılaştırmaları 34

BÖLÜM 1
GİRİŞ

Ispanak (*Spinacia oleracea* L.) dünyada ve ülkemizde bol miktarda üretilen ve tüketilen ana vatanı orta Asya olan kışlık sebzelerden biridir. Ülkemizde tüm bölgelerimizde yetiştirilebilir, ancak aşırı yağış alması nedeniyle Doğu Karadeniz bölgesinde sınırlı üretim yapılmaktadır.

Ülkemizde yaklaşık 161.510 da alanda ıspanak üretimi yapılmaktadır. Bu alanlardan toplam 210.999 ton ıspanak elde edilmektedir. Ülkemizde yetiştiricilik yapılan illere bakıldığında ise ilk sırada 32.607 ton ile İzmir'in yer aldığı görülmektedir. Bu ili 25.876 tonluk üretimi ile Ankara izlemektedir. Ülkemizde fazla ıspanak üretim miktarına sahip üçüncü il ise yaklaşık 25.000 tonluk üretimi ile Samsun'dur. Çanakkale'de ise genel olarak yıllık 1.806 ton ıspanak üretimi gerçekleştirildiği bildirilmiştir. Diğer iller ile bir kıyaslama yapıldığında Çanakkale'de üretim miktarı çok fazla olmasada, elde edilen ürünün yeterli olduğu görülmektedir (TÜİK, 2016).

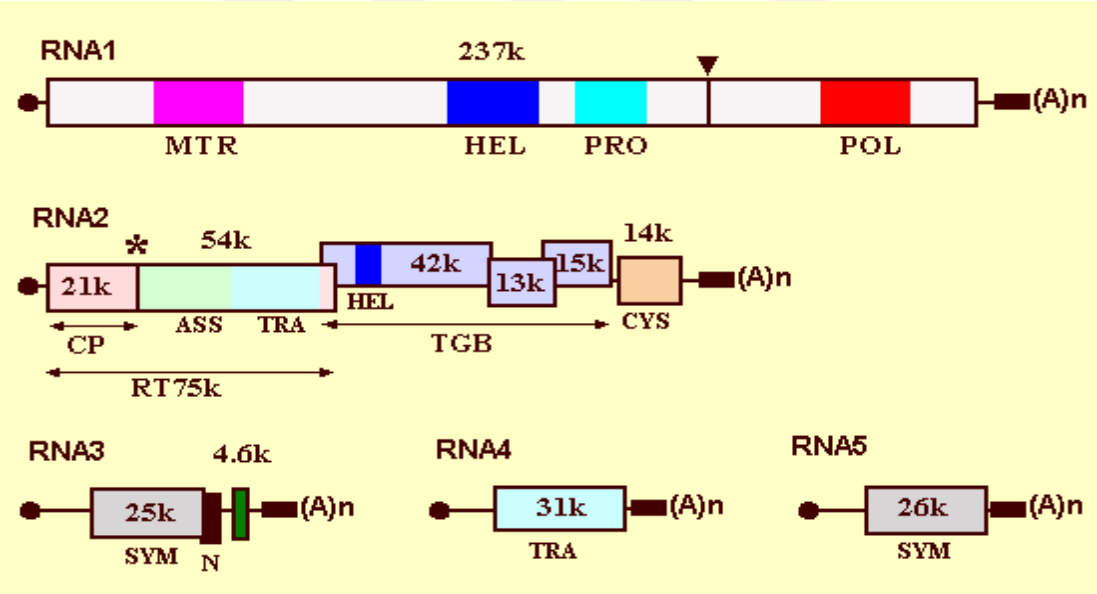
Ispanakta ekonomik zarara sebep olan çok sayıda biyotik (fungus, bakteri ve virüs) hastalık etmeni ve zararlı bulunduğu rapor edilmiştir (Corell ve ark., 1994). Bu etmenler üretimde verim kaybına neden olmakta, ayrıca ürünün de pazar değerini düşürmektedir. Bu etmenler arasından diğer hastalık etmeni ve zararlılara kıyasla kimyasal mücadelesi olmadığı için viral etmenler ön plana çıkmaktadır.

Ülkemizde ve dünyada gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda 10'un üzerinde viral hastalık etmenin ıspanak üretiminde enfeksiyonlara neden olabileceği bildirilmiştir (Whitney ve Duffus, 1986; Dinant ve Lot, 1992; Correll ve ark., 1994). Ispanak üretim alanlarında enfeksiyonlara neden olan bu etmenler arasından özellikle pancar nekrotik sarı damar virüsü (Beet necrotic yellow vein virus; BNYVV), Hıyar mozaik virüsü (Cucumber mosaic virus; CMV) ve Şalgam mozaik virüsü (Turnip mosaic virus; TuMV)'nün ülkemizde sorun olduğu bu zamana kadar gerçekleştirilen çalışmalar sonucu bildirilmiştir (Gökdağ, 2014; Karanfil ve ark., 2016; Kurtoğlu, 2019). Bu virüs hastalıkları içerisinden de BNYVV ülkemizde genellikle şeker pancarının en önemli hastalığı olarak yaygın olarak tespit edilmiş, ancak son yıllarda ıspanak üretim alanlarında da enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmeye başlanmıştır (Karanfil ve ark., 2016).

Polymyxa betae (Keskin) isimli toprak kökenli bir fungusun vektörlüğünü yaptığı BNYVV, taşınma şeklinin birçok virüs hastalığına göre farklı olmasından dolayı ayrı bir önem taşımaktadır. Etmenin ana konukçusu isminden de anlaşılacağı üzerine şeker

pancarıdır. Özellikle etmen şeker pancarında enfeksiyonları sonucunda bitkide aşırı yan (lateral) kök oluşumuna sebep vermektedir. Çoğu zaman bu kök "uzun bir sakal" görünümünü almaktadır. Bu karakteristik simptomlardan dolayı virüs kök azmanlığı anlamında "Rhizomania hastalığı" olarak da isimlendirilmektedir (Putz ve ark., 1990).

Hastalığın ana konukçusunun şeker pancarı olmasına rağmen son yıllarda ıspanak tarımında da enfeksiyonlara neden olduğu bildirilmiştir (Karanfil ve ark., 2016). BNYVV, *Benyvirus* cinsine ait olup, *Tubiviridae* familyasının bir üyesidir (Lennofors, 2006). Etmenin tek sarmal olarak 4 parçalı RNA genomundan oluştuğu bildirilmiştir. Etmenin bazı izolatlarında ek olarak 5. bir RNA genomu da içerebilidği de belirtilmektedir (Şekil 1.1) (Koenig ve ark., 1997; Harju ve ark., 2002). Etmen çubuk şekilli ve 20 nm eninde farklı boyutlarda olabilen partiküllere sahiptir. Etmen ile enfekteli bitkilerde ise özellikle damar boyunca uzanan sarımtrak renk değişimleri görüldüğü bildirilmektedir. Ayrıca enfekteli yaprakların yaşlanması ile bu sarımtrak alanların nekroza dönüştüğü de belirtilmiştir (Whitney ve Duffus, 1991).



Şekil 1.1. Pancar nekrotik sarı damar virüsü'nün genom yapısı ve organizasyonu (Anonim, 2019)

Etmen ile ilgili dünyada yürütülen çalışmaların sonucunda 4 farklı patotipin Avrupa'da filogenetik açıdan yer aldığı belirtilmiştir (Kruse ve ark., 1994; Koenig ve Lennefors, 2000). Bu patotiplerden A, güney ve kuzey batı Avrupa'da, B'nin ise Almanya ve Fransa'da rapor edildiği bilinmektedir. Ülkemizde ise şimdiye kadar sadece A patotipinin bulunduğu bilinmektedir (Özgör,1995). Bu iki patotipe ek olarak daha agresif ve şiddetli

olan P ve J olmak üzere 2 patotip daha mevcuttr. Bunlardan P tipinin Fransa ve Kazakistan'da bulunduğu belirtilmiştir (Koenig ve Lennefors, 2000). Patotip J'nin varlığı ise Japonya, Çin ve ülkemizden bildirilmiştir (Tamada ve ark., 1989; Li ve ark., 2008; Kutluk-Yılmaz ve ark., 2016a). Bu patotiplerden P ve J diğer patotiplere göre fazladan bir RNA segmentine sahiptir.

Rhizomania hastalığının etmeni olan BNYVV'nin konukçu genişliği çok fazla geniş değildir. Etmen konukçularını sistemik olarak enfekte etmektedir. (Tamada ve Baba, 1973). BNYVV konukçularında meydana getirdiği belirtiler bazı durumlarda besin elementi eksiklikleri ile karışabilmektedir (Rush ve Heidel, 1995). Ayrıca etmenin vektör fungus *P. betae*'nin kışlık sporlarında 15 yıl kadar canlı kalabilmektedir (Abe ve Tamada, 1986). Uygun olmayan çevre koşullarında vektör kaynaklı BNYVV enfeksiyonları konukçuların herhangi bir fenolojik döneminde gerçekleşebilmektedir (Putz ve ark., 1990).

Dünyada bu zamana kadar yürütülen araştırmalar sonucunda ıspanak tarımı yapılan alanlarda BNYVV enfeksiyonunun tespit edildiği bilinmektedir. Ülkemizde de ıspanak üretim alanlarında etmeninin varlığı bulunmuş, fakat moleküler karakterizasyon aşamasına yönelik herhangi bir çalışma ise yürütülmemiştir. Bu amaçla Çanakkale ilinde arazi çalışmaları yürütülerek, BNYVV izolatlarının elde edilmesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen BNYVV izolatlarından bir tanesi seçilerek moleküler karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda ilk olarak BNYVV'nin Çanakkale ili ve ilçelerindeki yaygınlığı tespit edilmiş ve ülkemizde ilk kez ıspanak BNYVV izolatının moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV), dünyada ilk defa 1952 yılında Canova tarafından İtalya'da bulunmuştur (Canova, 1959). Daha sonra etmenin Asya, Amerika, Güney ve Merkez Avrupa ve İskandinavya ülkelerindeki varlığı da bildirilmiştir (Asher, 1999).

Putz ve Vuittenez (1980) yapmış olduğu elektron mikroskobu çalışmalarında doğada kendiliğinden etmen ile infektelenmiş pancar ve BNYVV inokule edilmiş olan kazayağı, kuş otu ve ıspanak bitkilerinde etmene ait partikülleri gözlemlemişlerdir.

Bürcky (1987) yapılan bu çalışmada BNYVV ile infekteli dayanıklı ve duyarlı çeşitlerin bitkinin ilk gelişim dönemindeki virüs yoğunluğunu karşılaştırmışlardır. Bunun sonucunda dayanıklı çeşitlerde virüs yoğunluğunun daha az olduğunu rapor etmişlerdir.

Autonell ve ark. (1995) İtalya'da 1993 ve 1994 yıllarında kış ve bahar mevsimlerinde ıspanak üretim alanlarında görülen viral hastalıkları belirlemek amacıyla bir dizi çalışmalar yapmıştır. Farklı konukçularda biyolojik indeksleme yöntemi ile BNYVV varlığını tespit etmişlerdir.

Koening ve ark.(1995), yapmış oldukları bu çalışmada farklı dünya ülkelerinde BNYVV' nin hangi hangi patotiplerde bulunduğunu rapor etmişlerdir. Sonuçlarına göre; Almanya ve Fransa da B patotipinin sık görüldüğünü bu ülkelerin dışındaki çoğu ülkelerde A patotipinin görüldüğünü rapor etmişlerdir. Ayrıca Fransa da küçük bir alanda tamamen farklı bir BNYVV (P) patotipin gözlemlendiği bildirilmiştir.

Asher ve Kerr (1996), yaptıkları bir çalışmada şeker pancarı bitkisinde Rhizomania'ya dayanıklı çeşitlerden seralarda denemeler kurmuşlardır. Bunun sonucunda üretimde Rhizomania'ya dayanıklı çeşitlerin kullanılmasının hem verim açısından hem de virüsün yan köklerde çoğalmasını kontrol altına alınmasında önemli rol oynadığını rapor etmişlerdir.

Koening ve Lennefors (2000) BNYVV ile ilgili olarak yürüttükleri çalışmaların sonucunda Avrupa'da yaygın patotipler olan A, B ve P'nin genom yapılarının oldukça güçlü bir şekilde korunmuş olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, 1980'li yıllarda toplanan BNYVV izolatları ile yeni toplanan BNYVV izolatlarının sekans dizilerinin neredeyse aynı olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar ender olarak görülen P tipin Kazakistan'da bulunduğunu rapor etmişlerdir.

Kutluk ve ark. (2000), 1997-1998 yıllarında Tokat ili şeker pancarı ekim alanlarından bulunan yabancı otları toplayarak ELISA testi ile BNYVV'nin bilinen konukçularına ek yeni

konukçularını araştırmışlardır. Araştırmacılar içlerinden bir tanesinin parazit olduğunu bildirdikleri 14 yabancı ot türünde etmenin enfeksiyonunu tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar; *Chamomilla recutita, Cirsium arvense, Xanthium strumarium, Datura stramonium, Convolvulus arvensis, Tribulus terrestris* ve *Veronica hederifolia*'nın BNYVV'nin konukçusu olduğunu ilk kez bu çalışma ile bildirmişlerdir.

Choueiri ve ark. (2001) Lübnan şeker pancarı üretim alanlarında virüs hastalıklarının varlıklarını belirlemek amacı ile arazi çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar toplamda 115 ticari üretim alanından 1002 örnek almışlar ve bu topladıkları örnekleri ELISA testleri ile BNYVV'nin de içlerinde olduğu beş viral hastalığının yaygınlığını belirlemeye çalışmışlardır. Gerçekleştirilen ELISA testleri sonucunda örneklerin %39.5'inin en az bir viral etmen ile enfekteli olarak tespit etmişlerdir. Araştırmacılar BNYVV enfeksiyonunun oranını ise %17 olduğunu belirtmişlerdir.

Kutluk-Yılmaz ve Yanar (2001) Tokat ilindendeki şeker pancarı üretim tarlalarında BNYVV enfeksiyonunun tespit edilmesi için öncelikle Pazar ve Merkez ilçelerinde olmak üzere Artova, Başçiftlik ve Niksar'ın dahil olduğu 5 ilçede arazi çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar etmenin belirtisini taşıyan şeker pancarı bitkilerinden kök örnekleri almışlardır. Topladıkları örneklerdeki BNYVV enfeksiyonunu DAS-ELISA testleri ile belirlemişlerdir. Gerçekleştirdikleri testler sonucunda Merkez ilçede % 73,17, Pazar ilçesinde ise % 65,41 olarak BNYVV enfeksiyonunu tespit etmişlerdir. Örnekleme yapılan diğer 3 ilçede ise BNYVV enfeksiyonuna rastlamadıklarını bildirmişlerdir.

Subinova ve ark. (2002) Slovakya'da BNYVV'nin alternatif konukçularının tespiti amacı ile bazı arazi çalışmaları gerçekleştirerek BNYVV ile enfekteli olduğu bilinen alanlarda 19 bitki familyasından 45 bitki türünün bulunduğu örnekler almışlardır. Toplanan örnekler ELISA testi ile etmenin varlığı bakımından testlenmiştir. Araştırmacılar özellikle Astaraceae familyasındaki bitkilerin büyük bir çoğunluğunun etmen ile enfekteli olduğu belirtilmiştir. Bu sebeple özellikle BNYVV etmenin mücadelesinde yabancı ot mücadelesinin büyük önem arz ettiğini belirtmişlerdir.

Özer ve Ertunç (2005) BNYVV'nin Amasya bölgesindeki şeker pancarı üretim alanlarında etmenin yaygınlığının belirlenmesi ile araştırmalar yürütmüşlerdir. Araştırmacılar gerçekleştirdikleri arazi çıkışları sonucunda 279 toprak örneği ve 284 şeker pancarı örneği toplamışlardır. Aldıkları toprak numunelerinde etmene hassas Fiona çeşidi şeker pancarı yetiştirmişlerdir. Yetiştirdikleri bitkileri ve aldıkları yaprak örneklerini serolojik bir yöntem olan ELISA ile testlemişlerdir. Gerçekleştirdikleri testler sonucunda toprak örneklerinin % 26'sının, yaprak örneklerinin ise % 10.92'sinin etmen ile enfekteli

olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar BNYVV'nin vektörü olan *Polymyxa betae*'nin varlığını araştırmışlar ve 76 toprak örneğinin % 61,80'inin vektör varlığını tespit etmişlerdir.

Rysanek ve ark. (2005) BNYVV'in fungal vektörü olan *Polymyxa betae* ile ilgili olarak Çek Cumhuriyeti'nde bazı çalışmalar yapmışlardır. Bu amaçla öncelikle şeker pancarı yetiştiriciliği yapılan alanlardan her biri genel olarak 5'er kg olacak şekilde 100 adet toprak numuneleri toplamışlardır. Topladıkları bu topraklardaki fungal vektörün varlığını saptamak amacıyla tuzak bitki yetiştirmişler ve bitkilerin bazılarında fungusa ait yapıları tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Etmenin konukçu genişliği ile ilgili yapmış oldukları çalışmalarda ise ıspanak bitkisinin de BNYVV'nin konukçuları arasında olduğunu rapor etmişlerdir.

Kutluk-Yılmaz ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada Samsun, Amasya, Tokat, Çorum, Yozgat, Çankırı ve Kastamonu illerinde bulunan şeker pancarı üretim alanlarından topladıkları toplam 240 toprak örneğinde BNYVV ve beet soil borne virus (BSBV) virüsleri ile vektör protozoa *P. betae* Keskin varlığını tuzak bitki yöntemiyle tespit etmişlerdir. Rhizomania hastalığına duyarlı Arosa çeşidi, bu toprak örneklerinin bulunduğu saksılara ekilmiş ve ekimden altı hafta sonra ELISA testi yapılarak BNYVV ve BSBV varlığı test edilmiştir. Ayrıca kökler *P. betae* varlığının test edilmesi açısından ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Araştırmacılar sonuç olarak incelenen toprak örneklerinin yalnızca %8.75'inde *P. betae* bulunamadığını belirtmişlerdir. Ayrıca BSBV, BNYVV ve BSBV+BNYVV bulunma oranları sırasıyla %21.6, %9.6 e %21.6 olarak tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Schirmer ve ark. (2005), dünya çapında BNYVV izolatlarının filogenetik ilişkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla etmenle enfekteli 136 bitkiyi dünyanın farklı ülkelerin elde etmişlerdir. Gerçekleştirdikleri moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda BNYVV izolatlarının ait oldukları filogenetik gruplar ile elde edildikleri coğrafik orijinler arasında bir korelasyon tespit etmişlerdir.

Liu ve ark. (2005) 2002-2003 yıllarında, Kaliforniya'nın İmperia Vadisi'nde yetişen BNYVV'ye kısmen dirençli çeşitlere sahip çeşitli şeker pancarı üretim alanlarında, etmenin şiddetli hastalık belirtilerini gözlemişlerdir. Araştırmacılar bu gözlemleri ile *Rz1* geni tarafından sağlanan dayanıklılığın kırıldığı belirtmişlerdir. Etmenin tanısı amacı ile aldıkları topraklarda tuzak bitki yöntemi metodunu kullanışlar ve sonuçları ELISA testleri ile tanılamışlardır. Testler sonucunda araştırmacılar BNYVV'e karşı tolerant olan çeşitlerde etmenin enfeksiyonunu tespit ederek, gözlemlerini doğrulamışlardır. Konukçu reaksiyonları

temel alınarak 8 BNYVV izolatını ileri analizler için seçmişlerdir. Araştırmacılar RT-PCR yöntemi ile seçtikleri izolatları RNA-5 varlığı açısından taramışlar ancak hiçbirinde RNA-5 genomunun varlığını tespit etmemişlerdir. Ayrıca araştırmacılar dayanıklılık kıran izolatların A patotipi ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Tok ve Erkan (2006), 2002 ve 2003 üretim sezonu içerisinde Çanakkale-Biga ve Bursa-Mustafa Kemalpaşa ilçelerinden virüs simptomu gösteren şekerpancarı bitkilerinden toplam 52 adet örnek almışlardır. Biga'dan toplanan 150 da'lık alanda %2,41, Mustafa Kemalpaşa'dan ise 186 da'lık alanda %4,02 oranında virüs enfeksiyonlarının görüldüğünü bildirmişlerdir. Ancak yapılan testlemeler sonucunda BNYVV enfeksiyonuna rastlamadıklarını bildirmişlerdir.

Žižytė ve ark. (2006) Litvanya'da şeker pancarı üretim alanlarında BNYVV ile ilgili olarak bazı çalışmalar gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar, şeker pancarı köklerinde BNYVV benzeri belirtilerini saptamışlardır. Gerçekleştirdikleri DAS-ELISA, lateral flow, elektron mikroskobu ve indikatör bitkilere mekanik inokulasyon çalışmaları ile belirtilerin BNYVV enfeksiyonundan kaynaklandığını doğrulamışlardır. Ayrıca araştırmacılar bu sonucu RT-PCR analizleri ile de doğrulamışlardır. Gerçekleştirilen bu çalışma ile karantina patojeni olduğunu bildirdikleri BNYVV'yi ikinci kez Litvanya'da tespit etmişlerdir.

Kutluk-Yılmaz ve Sökmen (2007a), Karadeniz bölgesindeki şeker pancarı üretim alanlarında yürüttükleri arazi çalışmaları sonucunda 240 adet toprak örneği almışlardır. Aldıkları bu toprakları tuzak test bitkisi ve DAS-ELISA yöntemleri ile testlemişlerdir. Gerçekleştirdikleri testler sonucunda aldıkları toprak örneklerinin % 9.6'sının etmen ile bulaşık olduğunu bildirmişlerdir. Etmenin RNA 5 genomunun varlığının araştırılması amacı ile moleküler bir yöntem olan RT-PCR analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Hedef genom üzerinde bulunan P26 protein gen bölgesine spesifik primerler ile testler gerçekleştirilmiş ve etmene özgü 518 bp karşılık gelen bantları görüntülemişlerdir.

Kutluk-Yılmaz ve ark. (2007b) yaptıkları çalışmalarında BNYVV virüsünün Türkiye'den elde edilen izolatlarında kısmı nükleotid sekans analizlerini yaparak Japonya, Fransa, Kazakistan, İtalya ve Belçika izolatları ile karşılaştırmasını yapmışlardır. Bu amaçla sörvey çalışmalarını 2001 yılında Tokat ili şeker pancarı üretim alanlarında yürütmüşlerdir. Bölgeden alınan toprak örneklerinde RT-PCR ve tuzak bitki yöntemini kullanmışlar ve analizi yapılan toprakların %80'den fazlasının virüs ile bulaşık olduğu tespit etmişlerdir. BNYVV izolatlarının kısmi nükleotid sekans analizleri RNA-3 bölgesi için gerçekleştirmişlerdir. RFLP ve DNA sekans analizleri sonucu bütün örnekler tip A ırkı olarak tespit edildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca sekans analizleri sonucu Türk izolatlarında

p25 bölgesi için 35, 68, 71 ve 179 aminoasit konumlarında bir farklılık tespit edildiğini belirtmişleridir.

Mouhanna ve ark. (2008) Suriye için en önemli tarım ürünü olarak tanımladıkları şeker pancarının geçmiş yıllarda birçok sorun ile özelliklede hastalıklardan dolayı sorunlar yaşadığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar çalışmanın yapıldığı yıla kadar şeker pancarı tarımında virüs hastalıkları ve toprak kökenli funguslar ile ilgili bir çalışma yapılmadığını belirtmişlerdir. Bu amaçla, 1998 yılında virüs ve benzeri hastalık belirtisi gösteren bitkilerden örnekler toplamışlardır. Araştırmacılar sonbaharda 7 farklı ildeki 115 farklı lokasyondan 341 kök örneği, ilkbaharda 173 kök örneği ve her iki sezonda da 39 yaprak örneği toplamışlardır. Araştırmacılar topladıkları örnekleri ELISA testleri ile analiz etmişlerdir. Araştırmacılar içlerinde farklı virüslerin de olduğu BNYVV enfeksiyonunu tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar bu çalışmanın Suriye şeker pancarı üretim alanlarında BNYVV varlığının belirlendiği ilk çalışma olduğunu belirtmişlerdir.

Kaya (2009) Türkiye'de bulunan şeker pancarı üretim alanlarında BNYVV'nin dağılım durumunu tespit etmek için yaptığı çalışmada 1996-1998, 1999-2001 ve 2002-2004 yıllarında farklı illerde bulunan on yedi şeker fabrikasına ait 102 farklı üretim alanından kök örnekleri toplamıştır. Topladığı örnekleri serolojik testler ile testlemiş ve sonuç olarak 1996-1998 yıllarında 4 üretim sahasında %19.30, 1999-2001 yıllarında 9 üretim sahasında % 31.42 ve 2002-2004 yıllarında 15 üretim sahasında ise % 48.66 oranlarında etmenin varlığını tespit etmiştir.

Mehrvar ve ark. (2009) İran'da gerçekleştirmiş oldukları çalışmalar sonucunda BNYVV ve benzeri belirti taşıyan 392 adet şeker pancarı yaprak örneği toplamışlardır. Topladıkları örnekleri ELISA ile testlemişlerdir. Testlemeler sonucunda örneklerin 288 tanesinde etmenin varlığını bildirmişlerdir.

Erbay (2010) İzmir'in Gediz Havzası'nın ıspanak tarımı yapılan üretim alanlarında 2008-2009 yıllarında virüs hastalıklarının enfeksiyon durumlarını tespit etmek amacıyla bazı araştırmalar gerçekleştirmiştir. Virüs hastalığı belirtileri olan şekil bozukluğu, klorotik lekeler, yapraklarda kıvrılma, gelişme geriliği ve mozaik belirtisi gösteren ve belirti göstermeyen 91 adet örnek almışlardır. Araştırmacı yapmış olduğu virüs tanılama çalışmalarının sonucunda BNYVV, CMV, TMV, BWYV ve TuMV infeksiyonlarını tespit etmiştir. Toplanan örneklerin 42'sinin virüs ile infekteli olduğunu bildirmiştir. Tespit ettiği virüslerin enfeksiyon oranlarını ise; 27 örnekte BNYVV, 8 örnekte CMV, 2 örnekte TMV, 1 örnekte BWYV ve 1 örnekte TuMVolarak bildirmiştir. Ayrıca 3 örnekte karışık enfeksiyon tespit ettiğini rapor etmiştir. Araştırmacı sonuç olarak İzmir ve Manisa illerinde BNYVV,

CMV, TMV, TuMV ve BWYV etmenlerinin enfeksiyon oranlarının sırası ile %30, %9, %2, %1 ve %1 olarak bulunduğunu bildirmiştir. Örneklerin % 3'ünde birden fazla virüsle bulaşık infeksiyona rastlarken, örneklerin % 54'lük kısmında herhangi bir virüse rastlamadığını bildirmiştir.

Liu ve ark. (2010), 2009 yılında Kaliforniya eyaletinin farklı yerlerinde bulunan ıspanak (*Spinacia oleracea*) alanlarından topladıkları virüs hastalığı simptomu gösteren bitki örneklerinde BNYVV virüsünün varlığını araştırmışlardır. Araştırmacılar ıspanak üretim alanlarındaki bitkilerde oldukça farklı tipte simptomlar görüldüğünü belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar arazi çalışmalarında bitkilerin neredeyse %44'lük bir kısmının viral hastalık benzeri simptom gösterdiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar TEM (transmission electron microscopy) ile yapılan gözlemlerde simptom bulunan ıspanakların bitki özsuyunda sert uzun şekilli partiküller gözlendiğini bildirmişlerdir. Simptop gösteren ıspanak bitkilerinden alınan örneklerle yapılan ELISA testleri sonucu BNYVV virüsünün varlığını tespit etmişlerdir. Ayrıca yapılan RT-PCR testleriyle bu sonuçları doğrulamışlardır. Dört BNYVV ıspanak izolatı kullanılarak gerçekleştirilen sekans analizlerini takiben, ıspanak BNYVV izolatlarının gen bankası veri tabanındaki diğer BNYVV izolatları ile nükleotit düzeyinde %97-99, amino asit düeyinde ise %94-100 oranlarında benzerlikler elde edildiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmanın Kaliforniya eyaletinde bulunan ıspanak alanlarında BNYVV virüsünün tespit edildiği ilk çalışma olduğunu ve virüsün eyalette bulunan ıspanak üretimini tehdit edebileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar BNYVV'nin vektör fugusun zoosporları ile taşınabilidiği için ıspanak üretimi için yeni bir tahripkar hastalık olabileceğini belirtmişlerdir.

Chiba ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada dünyanın farklı yerlerinden topladıkları 73 izolatın P25-RNA3, P31-RNA4, CP-RNA2 ve P26-RNA5 genlerindeki sekans varyasyonunu araştırmışlardır. Çalışmada RNA3-p25 geninin virülans ve avülans faktörleri kodladığı ortaya koymuşlardır. BNYVV izolatları için genetik çeşitliliği nispeten az bulmuşlardır. Seleksiyon baskısı ise BNYVV genine ve coğrafi bölgeye bağlı olarak büyük ölçüde değişkenlik gösterdiğini bildirmişlerdir. P25'in en güçlü pozitif seleksiyona maruz kaldığı İtalya ırkının izolatları, Rz1-konukçu direnç genini farklı derecelerde aşabilirken, diğer coğrafi olarak sınırlanmış ırkların aşamadığını saptamışlardır. Direnci kıran varyantlar, 67 ve 68. konumlardaki p25 amino asit değişiklikleri ile meydana geldiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak, BNYVV'nin ilk olarak Doğu Asya'da geliştiği, ayrıca son zamanlarda direnci kıran varyantların da ortaya çıkmasıyla ekili bir şeker pancarı patojeni haline geldiği sonucuna varmışlardır.

Yardimci ve Culal (2011), 2006 ve 2007 yıllarında göller yöresinde yaptıkları çalışmada şeker pancarında Rhizomania hastalığına neden olan BNYVV virüsünün yaygınlığını araştırmak için yaptıkları çalışmada hastalıklı olduğu düşünülen 203 adet yaprak, kök ve toprak örneği toplamışlardır. Bu topraklarda tuzak bitki olarak Kasandra şeker pancarı çeşidi yetiştirilerek vektör protozoa Polymyxa betae Keskin varlığının incelenmesi amacıyla kökler lactofuchsin ile boyanarak ışık mikroskobu altında incelenmişlerdir. BNYVV virüsünün varlığının incelenmesi İçin RT-PCR ve DAS-ELISA testleri gerçekleştirmişlerdir. DAS-ELISA testlerinde incelenen 85 örneğin %41.87'sinde BNYVV enfeksiyonu bulmuşlardır. Negatif sonuç veren örneklerin RT-PCR ile incelenmesi sonucunda ise enfeksiyon oranı %50 olarak bulunmuştur. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlara dayanarak, RT-PCR kullanılarak yapılan tanılamanın daha hassas sonuçlar verdiği bildirmişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar Türkiye'nin en büyük şeker pancarı yetiştirme alanı olan göller bölgesinde BNYVV virüsünün varlığı saptadıklarını belirtmişlerdir.

Pavli ve ark. (2011) Yunanistan'da bulunan şeker pancarı alanlarındaki Rhizomania hastalığının mevcut durumunun belirlenmesi amacıyla 2004-2006 yılları arasında sörvey çalışması yapmışlardır. Çalışmada RT-PCR ve nested-PCR yöntemleri kullanılmıştır. Çalışmada iklim koşullarına bağlı olarak hastalığın geliştiğini ancak Rz1 dayanıklılık genine bağlı olarak hastalığın büyük ekonomik kayıplara neden olmadığını tespit etmişlerdir. Elde edilen BNYVV izolatlarının hiçbirinin RNA 5 içermediğini ve tamamının A fenotipi olarak sınıflandırıldığını bildirmişlerdir.

Mou ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada farklı ıspanak türleri ve BNYVV ırkları arasındaki interaksiyonu ve hastalığın ıspanak tohumları vasıtasıyla taşınıp taşınmadığını araştırmışlardır. Çalışmada sekiz ticari ıspanak çeşidi BNYVV ile enfekte olduğu bilinen bir alana dikilmiş ve bitkilerde çeşitli simtomlar gözlemişlerdir. Hastalık gelişim oranında çeşitliler arası %8 ila %44 arasında değişen önemli farklılıklar tespit etmişlerdir. Ayrıca BNYVV virüsünün ıspanak tohumları ile taşınmadığını belirlemişlerdir.

Yardımcı ve ark. (2012) Eskişehir ili şeker pancarı tarım alanlarındaki viral etmenlerin tespit edilmesi amacı ile 2010 yılında arazi çalışmaları gerçekleştirmişler ve viral hastalık benzeri belirti taşıyan bitkilerden 94 adet yaprak örneği toplamışlardır. Araştırmacılar topladıkları örnekleri içlerinde BNYVV'nin olduğu farklı virüslerin enfeksiyonunun belirlenmesi amacı ile DAS-ELISA yöntemi ile testlemişlerdir. Testlemeler sonucunda alınan örneklerde viral hastalıkların tek ya da karışık infeksiyonlarını saptamışlardır. Alınan örneklerde BNYVV'nin % 4.26 oranında tek başına enfeksiyon meydana getirdiği bildirmişlerdir.

Akça ve ark. (2014) yaptıkları çalışmalarında toprak solucanı Lumbricus terrestris L.'nin pancar nekrotik sarı damar virüsünün (BNYVV) çoğalmasına olan etkilerini ve toprak mikrobiyal aktivitesi üzerine etkilerini kontrollü koşullar altında incelemişlerdir. Bu amaçla kurulan denemede, BNYVV içeren toprak, BNYVV ve toprak solucanı içeren toprak ve temiz toprağa yarı dirençli Leila ve duyarlı Arosa çeşitleri dikilerek bitki ve kök ağırlıkları ile virüs içerikleri karşılaştırılmışlardır. Teşhisleri ELISA testleri ile yapmışlardır. Sonuç olarak L. terrestris içeren topraklarda bitki ve kök ağırlıklarını önemli ölçüde yüksek bulmuşlardır. Ayrıca solucan katkılı toprakların daha yüksek mikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Bununla birlikte toprak solucanlarının BNYVV enfeksiyonuna istatistiki olarak bir etki göstermediğini ortaya koymuşlardır.

Özdemir (2014) Marmara bölgesindeki Kırklareli, Tekirdağ ve Edirne ve illeri şeker pancarı üretimi yapılan alanlarda 2013 yılı üretim sezonu içerisinde virüs ve benzeri simptom gösteren 126 adet yaprak örneği toplamıştır. Yaptığı testlemeler sonucunda yaprak örneklerinin 25 tanesinde BNYVV'nin tek başına infeksiyon meydana getirdiğini bildirmiştir. Sekiz yaprak örneğinde ise BNYVV + BYV, 1 örnek BNYVV+BWYV ve 14 adet örneğin ise BNYVV+BWYV+BYV karışık enfeksiyonlarının olduğu rapor etmiştir.

Gökdağ ve ark. (2014), yürüttükleri bu çalışmada Çanakkale ilinde 2013-2014 üretim döneminde ıspanak üretim alanlarından sararma, mozaikleşme, nekroz oluşumu vb. belirtiler gösteren ıspanaklardan yaprak örnekleri almışlardır. Gerçekleştirilen laboratuvar çalışmaları sonucunda 23 adet örnekte TuMV, CMV, BNYVV'nin tek tek veya karışık kombinasyonda infeksiyon meydana getirdiğini belirtmişlerdir.

Gümüş ve ark. (2014) Türkiye'de üretilen ıspanak bitkilerini enfekte eden virüslerin tespiti için yaptıkları çalışmalarında 2008 ve 2010 yıllarında hastalık belirtisi gösteren toplam 192 örnek toplayarak RT-PCR yöntemiyle tanılama yapmışlardır. Çalışma sonucunda toplanan örneklerde BNYVV, CMV, TMV, BWYV, TuMV virüslerinin varlığını tespit etmişlerdir. Ayrıca bazı bitkilerde virüslerin karışık enfeksiyona neden olduğunu gözlemişlerdir. Ayrıca bu çalışma literatürde, Türkiye ıspanak alanlarındaki virüs hastalıklarının tespiti için yapılan ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır.

Zhuo ve ark. (2015) yaptıkları çalışmalarında Çin BNYVV izolatlarının dört genomik bölgesine göre (RNA2-CP, RNA3-p25, RNA4-p31 ve RNA5-p26) çoklu sekans dizi karşılaştırmalarını yapmışlardır. Gerçekleştirdikleri dizi analizleri sonucu bazı izolatların, farklı genotiplere ve / veya farklı p25 tetrad motiflerine sahip varyantların karışık enfeksiyonları olduğu tespit etmişlerdir. Toplamda, BNYVV Çin popülasyonunda 12 farklı p25 tetrad tespit etmişler ve bunlardan dördünü yeni olarak tanımlamışlardır. Dünyanın

farklı yerlerindeki izolatlar ile bulunan dört gene (RNA2-CP, RNA3-p25, RNA4-p31 ve RNA5-p26) dayalı filogenetik analizler ile Çin izolatlarından p25 ve p26 gen bölgesine dayalı soyağaçlarından sırasıyla iki yeni alt grup ve yeni bir grup tanımlandığını bildirmişlerdir. Ayrıca coğrafi olarak birbirinden uzak bölgelerden elde edilen popülasyonların genetik olarak birbirlerine benzer bulunduğunu rapor etmişlerdir.

Stevanato ve ark. (2015) yaptıkları çalışmalarında şeker pancarında Rhizomania hastalığına karşı en yaygın kullanılan dayanıklı çeşitler olan 'Rizor' ve 'Holly'deki Rz1 dayanıklılık genlerinin kökenlerinin belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada filogenetik analizler yapmışlardır. Gerçekleştirdikleri çalışmalar sonuçları SNP analizleri ile değerlendirilmiştir. Moleküler varyans analizi ve temel koordinat analizi sonucunda Rizor ve Rz1'in birbirinden bağımsız direnç kaynakları olarak değerlendirilemeyeceğini belirtmişlerdir.

Darabi ve ark (2015) bu çalışmada şeker pancarı tarlalarında bulunan yabancı otlarda BNYVV' nin konukçu olup olmadığını araştırmışlardır. Şeker pancarı tarlalarından alınan ve yüksek enfeksiyon tespit edilen yabancı otları *Beta vulgaris subsp. maritima, Amaranthus retroflexus, Portulaca oleracea, Chenepodium* türleri olarak bildirmişlerdir. *Solanum nigrum, Convolvulus arvensis, Hibiscus trionum* ve *Heliotropum europaeum* türlerinde enfeksiyonun görülmediğini bildirmişlerdir. Ayrıca *B.maritima* fidanları enfekte olmuş toprağa ekmişler ve iki ay içerisinde bitkide gözle görülür mozaikleşme, damar sararması, rozetleşme ve bodurluk gözlemlemişlerdir. *B.maritimadaki* virüs konsantrasyonu diğer türlerden daha fazla olarak bildirmiştir.

Zare ve ark. (2015) yaptıkları çalışmalarında Rhizomania hastalığına neden olan BNYVV virüsünün kontrolü için intron-hairpin RNA (ihpRNA) yapısını kullanarak RNAi teknolojinin kullanım olanaklarını araştırmışlardır. Bu yapılar RNA-2'nin transkribe edilmemiş 5' bölgesinin veya P21 örtü proteinini kodlayan yan dizinin farklı uzunluklarına ve oryantasyonlarına dayandırılmıştır. Çalışmada hem geçici hem de kararlı dönüşüm yöntemleri, transgen varlığına bağlı olarak Rhizomania karşı etkili bir direnç meydana getirmiştir. Yapılar içinde, küçük intronik döngülere sahip ihpRNA yapıları meydana getirenlerin, en yüksek direnç frekanslarını ürettiği belirlemişlerdir. Ek olarak transgenlerin kalıtsallığının ve meydana getirdiği direncin, nesiller boyunca sabit bir şekilde devam ettiği doğrulamışlardır.

Kutluk-Yılmaz ve ark. (2016a), 2009 yılının Eylül ve Ekim aylarında Samsun ilinde yaptıkları çalışmada ıspanak (*Spinacia oleracea*) tarlalarında yetişen yabani turp (*Raphanus raphanistrum*) bitkilerinde sarı damar bantları şeklinde görülen virüs simptomları tespit

etmişlerdir. Yapılan laboratuvar çalışmalarında söz konusu alandan toplanan R. raphanistrum'un yaprak örneklerinde DAS-ELISA testi kullanılarak BNYVV varlığı tespit etmişler ve bu sonucu RT-PCR ile doğrulamışlardır. Ayrıca restriksiyon fragment uzunluğuna bağlı polimorfizm analizi ile Raphanus izolatının, tip A ırkından olduğunu belirlemişlerdir. Örneklerde vektör varlığını araştırmak için RT-PCR analizini kullanmışlar. Araştırmacılar, gerçekleştirdikleri bu çalışma ile yabani turpun BNYVV virüsünün konukçusu olduğunu ilk kez ortaya koymuşlardır.

Kutluk-Yılmaz ve ark. (2016b) yaptıkları çalışmada Türkiye'deki pancar üretim alanlarından topladıkları örneklerde BNYVV ve BSBV hastalıklarının yaygınlığını araştırmışlardır. 2005, 2010 ve 2011 yıllarında üretim mevsimi boyunca 32 farklı bölgeden toplam 632 örnek ile yapılan çalışmada, ELISA ve kök boyama teknikleri kullanılarak BNYVV ve BSBV hastalıkları ile vektör olarak fungus *P. betae* varlığını bildirmişlerdir. BSBV ve BNYVV tespit edilen toprak örneklerinin yüzdesi sırasıyla %38 ve %49,8 olarak bulmuşlardır. Ayrıca *P. betae*'nin örnekleme yapılan şeker pancarı alanlarında % 87.7 bulunma oranı ile çok yaygın olarak görüldüğünü tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar BNYVV RNA-5 bileşeninin varlığını, p26 bölgesi için bu bölgeye özel primerler kullanılarak RT-PCR analiziyle araştırmışlardır. RNA-5 içeren BNYVV populasyonların Türkiye'deki şeker pancarı üretim alanlarında oldukça yaygın olduğu ortaya koymuşlardır.

Kutluk-Yılmaz ve ark. (2018) dayanıklılığın kırılmasına neden olan BNYVV izolatların tespit edilmesi amacıyla yaptıkları çalışmada 2004–2005 ve 2010–2011 yıllarında 29 farklı bölgeden toplam 235 adet BNYVV bulunan toprak örneğinden izolatlar elde etmişlerdir. BNYVV'ye dirençli (Rz1, Rz1 + R2, Rz1 + C48 + minör genler) ve duyarlı (rz1) şeker pancarı çeşitleri, tuzak bitki yöntemi kullanılarak BNYVV içeren topraklarda yetiştirilmiş ve BNYVV enfeksiyonunun varlığı DAS-ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Test edilen toprak örneklerinde bulunan, Rz1 geni içeren çeşitte %54.7, Rz1 ve Rz2 içeren çeşitte %51.9, Rz1 + C48 + Minör genler içeren çeşitte %18.9 oranında hastalık geliştiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca BSBV etmeninin varlığını DAS-ELISA yöntemiyle test etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, BNYVV RNA-5 bileşeninin varlığını, p26 bölgesi için spesifik primerler kullanılarak RT-PCR ile incelemişlerdir. Sonuç olarak BNYVV dayanıklılık kıran izolatların oldukça yaygın olduğunu ve BNYVV RNA-5'in dayanıklılığın kırılmasına doğrudan bir etkisinin olmadığı tespit etmişlerdir.

Ahmad ve ark. (2018) Pakistan'ın en büyük pancar üretim alanlarında 2013-2014 üretim sezonunda BNYVV enfeksiyonunun tespiti amacı ile arazi çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Yapraklarında kloroz ve deformasyonlar görülen bitkilerden örnekler

almışlardır. Araştırmacılar topladıkları örnekleri ELISA testleri ile etmenin varlığı açısından testlemişlerdir. Testler sonucunda topladıkları 10 örneğin 4 tanesinin BNYVV ile enfekteli olduğunu bildirmişlerdir. ELISA testlerini doğrulamak amacı ile topladıkları örnekleri daha duyarlı bir yöntem olan RT-PCR testleri ile de gen spesifik primerler kullanarak testlemişlerdir. Moleküler testlemeler sonucunda da ELISA testinde BNYVV ile enfekteli bulunan 4 örnek için de kullandıkları gen spesifik primere karşılık gelen 600 bç büyüklüğünde bantlar elde etmişlerdir. Elde ettikleri bir RT-PCR ürününü çift yönlü sekans analize tabi tutarak, izolatın sekans dizilerini belirlemişler ve bu sekans dizisini gen bankasına kaydetmişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri sekans dizisinin gen bankasında taratılması sonucunda dünya BNYVV izolatları ile nükleotid düzeyinde % 98,00, amino asit düzeyinde ise % 98,94 oranında izolatlar arasında benzerlikler görüldüğünü belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar bu çalışmanın Pakistan'da BNYVV izolatlarının moleküler karakterizasyonu ile ilgili ilk çalışma olduğunu belirtmişlerdir.

Weiland ve ark. (2019) Kuzey Dakote ve Minnesota'da BNYVV streynlerinin varlıklarını ve dağılımlarını belirlemek amacı ile bazı araştırmalar gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar belirtilen alanlardan 594 adet toprak örneği almışlardır. Araştırmacılar bu toprak örneklerinde BNYVV varlığını araştırırken, aynı zamanda tespit ettikleri BNYVV izolatlarında P25 genindeki varsyasyonu da araştırmışlardır. Araştırmacılar topladıkları toprak örneklerinde hastalık etmeninin oranını % 10,6 olarak bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar şeker pancarında BNYVV'e karşı dayanıklılık genleri olan *Rz1* ve *Rz2* genlerinin varlığının P25 geninde genetik varyasyonun azalmasında rol oynadığını belirtmişlerdir.

Nouayti ve ark. (2019) Fas'ın Tadla bölgesindeki şeker pancarı tarlalarından 55 toprak örneği almışlardır. Araşrımacılar alınan 55 örneğin 40'ının BNYVV ile enfekteli olduğunu bildirmişler ve elde ettikleri izolatların patotiplerini araştırmışlardır. Araştırmacılar topladıkları örneklerin büyük bir kısmının A patotipi olduğunu, elde edilen izolatlardan sadece %9'unun B patotipi olarak tespit edildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar BNYVV ile enfekteli olarak bulunan 40 örneğin bazılarının birden fazla virüs ile daha karşık enfeksiyon halinde bulunduğunu da bildirmişlerdir.

BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM

Gerçekleştirilen bu çalışmalar temel olarak 3 aşamada yürütülmüştür. Çalışmanın ilk aşamasını oluşturan arazi çalışması Çanakkale ili ve ilçelerinde yapılmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında, toplanan örneklerde BNYVV enfeksiyonunu tespit etmek amacı ile DAS-ELISA ile örneklerin BNYVV varlığı bakımından testlenmesi gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın üçüncü kısmında moleküler karakterizasyon çalışmalarına giriş yapılmıştır. Bu amaçla hedef gen bölgesi amplifiye edilen bir izolatın (CNK-Spinach-39), RT-PCR ürünleri kullanılarak seçilen izolatın sekans dizileri belirlenmiştir. Çalışmanın son aşamasında ise seçilen BNYVV izolatının CP (coat protein; örtü protein) genlerine ait sekans dizilimleri kullanılarak çoklu dizi ve filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir.

3.1. Arazi Çalışması

Arazi çalışmaları 2017-2018 üretim sezonunda Çanakkale ili ve ilçelerinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Bu alanlardaki ıspanak bitkileri makroskobik olarak incelenmiş BNYVV ve virüs benzeri simptom gösteren ıspanaklar örneklenmiştir. Örneklemeler tesadüfi olarak gerçekleştirilmiş ve alınan örnekler ve virüs tanı ve karakterizasyon çalışmaları için 4^0C'de saklanmıştır.



Şekil 3.1. Çanakkale ili ıspanak üretim alanlarında gerçekleştirilen sörvey çalışmalarının yer aldığı alanlar

3.2. DAS-ELISA Testleri

Toplanan örneklerdeki BNYVV enfeksiyonu DAS-ELISA testleri ile Clark ve Adams (1977)'nin belirttiği temel metot ve kitlerin sağlandığı Bioreba (İşviçre) firmanın önerileri doğrultusunda aşağıda anlatıldığı gibi 4 aşamada gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Plate'in Antibadi İle Kaplanması

Teste plate'in BNYVV'ye özgü antibadi ile kaplanması ile başlanmıştır. Bunun için her bir kuyuya 200 µl kaplama solüsyonu+antibadi eklenmiştir. Bu aşamayı takiben plate 36°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra plate 4'er dakika aralıkla üçer defa yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır.

3.2.2. Örneklerin Plate'e Yüklenmesi

Arazi çalışmalarında elde edilen ıspanak örnekleri havan ve havaneli kullanılarak ELISA kitinde bulunan ekstraksiyon tampon çözeltisi içinde ezilmiştir. Ezilen bitki örnekleri etiketlenmesi yapılmış tüplere alınmış, plate'lere konuluncaya kadar 4^0C'de muhafaza edilmiştir. Her bir ıspanak örneği için platelerde iki kuyu kullanılmış ve kuyulura ezilen bitki örneklerinden 200 µl alınıp eklenmiştir (Şekil 3.2). Örnek yükleme işlemi gerçekleştirildikten sonra plate'e BNYVV pozitif ve negatif kontrol konularak 4°C'de bir gece bekletilmiştir. Bu işlemin ardından plate, 4'er dakika aralıkla üçer defa yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır.



Şekil 3.2. DAS-ELISA testleri kapsamında ezilen bitki örneklerinin plate'lere yüklenmesi

3.2.3. Konjugat (Enzimle İşaretlenmiş Antibadi) Eklenmesi

İlk olarak konjugat solüsyonu firmanın belirttiği şekilde sulandırılıp BNYVV'ye özgü konjugat IgG eklenerek plate'e yükleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemi takiben plate 36°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon işlemini takiben plate 4'er dakika aralıkla üç defa yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır.

3.2.4. Substrat Eklenmesi

Bu aşamada tablet substrat kullanılmıştır. Tablet substrat firmanın önerileri doğrultusunda sulandırılarak her bir plate kuyusuna 200 µl ilave edilmiştir. Plate'de renk değişimi gözlenen örneklerde, BNYVV'nin kesin olarak belirlenmesi için plate 405 nm dalga boyunda MEDISPEC ESR 200 ELISA okuyucusunda okunarak absorbans değerleri belirlenmiştir. Elde edilen absorbans okumalarına göre negatif kontrolün en az iki katı üzerindeki değerlere sahip olan örnekler BNYVV ile infekteli olarak değerlendirilmiştir.

3.3. Moleküler Karakterizasyon Çalışmaları

DAS-ELISA testi kullanılarak gerçekleştirilen virüs tanılama çalışmaları sonuçlarına göre BNYVV ile enfekteli olan örnekler içersinden bazıları seçilerek, RT-PCR ile moleküler karakterizasyonlarının yapılabilmesi amacı ile hedef gen bölgelerinin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. RT-PCR analizlerine total nükleik asit izolasyonu ile başlanmıştır. Total nükleik asit izolasyonu Li ve ark. (2008a)'nın önerileri doğrultusunda CTAB metodu ile gerçekleştirilmiştir. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain reaction (RT-PCR) aşaması kitlerin sağlandığı firmanın (Qiagen, Kanada) önerileri dikkate alınarak BNYVV 'ye özgü gen spesifik primer çifti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Total Nükleik Asit İzolasyonu

Toplanan örneklerdeki BNYVV infeksiyonunun moleküler karakterizasyonu amacı ile ilk olarak BNYVV ile enfekteli olduğu ELISA testlerinde belirlenerek seçilen örneklerden total nükleik asit (TNA) izolasyonu Li ve ark. (2008)'nın belirttiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak seçilen örneklerden 1 g alınarak, 1 ml CTAB buffer + 2 µl DDT ile porselen havanlar kullanılarak bitki örneklerinin ezilmesi ile yönteme başlanmıştır. Ezilen bitki örnekleri ve izolasyon solüsyonunu içeren karışım steril eppendorf tüplere alınarak 1 dk vortekslenmiş ve -20^{o}C'de 30 dk bekletilmiştir. Bekleme süresinin sonunda donan homojenizat çözülünceye kadar vortekslenmiştir. Homojenizatın çözülmesinden sonra örnekler 65^{o}C'de 30 dk bekletilmiş ve her 5 dk'da bir vortekslenmiştir.

Bu sürenin ardından tüpler 12.000 rpm'de 6 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda homojenizatın supernatant kısmından 500 µl alınarak yeni eppendorf tüpe alınmıştır. Üzerine eşit hacimde 24:1 oranında hazırlanan kloroform:izoamilalkol eklenerek tüpler alt üst edilerek, 12.000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatanttan 250 µl alınarak yeni eppendorf tüpe aktarılmıştır. Üzerine 175 µl soğuk izopropanol eklenerek pipetleme yapılmış ve 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Tüplerdeki pelet kısmına zarar vermeden, süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Tüplerde kalan pelet iki defa 1000 µl %70'lik etil alkol ile yıkanmıştır. Her yıkamadan sonra 12.000 rpm'de santrifüj edilerek, etil alkol uzaklaştırılmıştır. Tüplerdeki alkolün tamamen uzaklaştırılması amacı ile 5-10 dk arasında tüpler oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Sürenin sonunda pelet 50 µl Tris-HCI (20 mM, Ph: 8) ile çözdürülmüştür. Elde edilen total nükleik asitler derin dondurucuda -80ºC'de saklanmıştır.

3.3.2. Reverse Transcriptase-Polymerase Zincir Reaksiyonu

TNA izolasyonunu takiben seçilen BNYVV izolatlarının örtü protein geninin RT-PCR ile amplifikasyonu sağlanmıştır. Bu amaçla Qiagen (Kanada) firmasından sağlanan tek aşamalı RT-PCR kiti kullanılmıştır. RT-PCR aşaması üretici firmanın önerileri doğrultusunda etmenin CP genine spesifik primer çifti kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Çalışma kapsamında kullanılan primer çifti

Kodu	Dizisi	Yönü	Hedef Gen Bölgesi	Referans
BN2/F1	ATGTCGAGTGAAGGTAGATATATG	İleri	Örtü Protein Geni (567 bç)	Schirmer ve ark. (2005)
BN2/R3	ATTGTCCGGGTGGACTGGTTC	Geri		

Bu amaçla ilk olarak bir RT-PCR karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım 14 µl steril saf su, 5 µl 5x QIAGEN tek aşamalı RT-PCR solüsyon, 1 µl dNTP karışım (her bir dNTP'den 10 mM), 1 ul primer karışımı (20 pmol stok), 1 µl QIAGEN tek aşamalı RT-PCR Enzim karışımı, 1 µl RNase inhibitor ve 3 µl'de TNA'dan oluşmuştur.

Hazırlanan karışım 0,2 ml'lik PCR tüplerine konularak, thermal cycler'da BNYVV CP geninin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla thermal cycler ilk olarak 30 dk 50°C ve 15 dk 95°C'de bekleyecek şekilde ayarlanmıştır. Bu aşamayı takiben 39 döngü

olacak şekilde Schirmer ve ark. (2005)'nın belirttiği şekilde 94°C'de 1 dk, 59°C'de 1 dk ve 72°C'de 45 sn ve son aşamada da 72°C'de 10 dk bekleyecek şekilde ayarlanmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. RT-PCR testlerinde kullanılan bileşenler, miktarları ve RT-PCR koşulları

Bileşenler	**Hacim**	**RT-PCR Koşulları**
Steril saf su	14 µl	
5x QIAGEN tek aşamalı RT-PCR solusyonu	5 µl	1. 30 dk - 50°C 2. 15 dk - 95°C
dNTP karışım (her bir dNTP'den 10 mM)	1 µl	
Primer Karışımı (Forward-Reverse)	1 µl	
QIAGEN tek aşamalı RT-PCR enzim karışımı	1 µl	3. 94°C - 1 dk 4. 59°C - 1 dk 5. 72°C - 45 sn 39 Döngü
RNase inhibitor	1 µl	
Total RNA	2 µl	
Toplam Hacim	25 µl	6. 72°C – 10 dk 7. 10°C - süresiz

3.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi

RT-PCR ile istenilen gen bölgesi amplifiye edilen izolatların RT-PCR ürünleri 100-5000 bç'lik DNA büyüklük markörleriyle birlikte %1.5'lik agaroz jelde 100 voltta ayrıştırılarak EtBr ile boyanmış ve ultraviyole ışık altında Major Scıence UVDI jel görüntüleme cihazında etmenin CP geninin 567 bç'lik kısımına ait bantlar fotoğraflanmıştır (Şekil 3.3**).**



Şekil 3.3. RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi için jele yüklenmesi

3.3.4. Hedef Gen Bölgesinin Saflaştırılması

Amplifiye edilen BNYVV CP genlerine ait bir izolatın (CNK-Spinach-39) RT-PCR ürünü E.Z.N.A PCR saflaştırma kiti (Omega Bio, ABD) kullanılarak üretici firmanın belirttiği şekilde purifiye işlemine tabi tutulmuştur. Bu amaçla ilk olarak 20 µl RT-PCR ürünü ilk olarak 1.5 ml'lik steril eppendorf tüpe alınmıştır. Üzerine 80 µl CP solüsyonu eklenerek vortekslenmiş, takiben çok kısa bir santrifüj yapılmıştır. Elde edilen karışım HiBind DNA Mini Column'a aktarılmış ve maksimum hızda oda sıcaklığında 1 dk santrifüj edilmiştir. Bu aşamayı takiben kolona 700 µl yıkama solüsyonu ilave edilerek, maksimum hızda santrifüj edilmiştir. Gerçekleştirilen bu yıkama aşaması 2 kez tekrar edilmiştir. Yıkama işlemini takiben kolonun tamamen kuruması için bir kez de maksimum hızda 2 dk boş santrifüj gerçekleştirilmiştir. Tamamen kurutulan kolona 20 µl Elution solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 2 dk inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda kolon 1 dk maksimum hızda santrifüj edilerek, RT-PCR ürünlerinin saflaştırılma aşaması tamamlanmıştır. Elde edilen son ürün kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

3.3.5. Sekanslama ve Biyoinformatik Analizler

Saflaştırılan RT-PCR ürününün DNA baz dizilimi Ref-Gen Biyoteknoloji (Ankara, Türkiye) firmasından hizmet alımı ile çift yönlü olacak şekilde sekanslanması ile elde edilmiştir. Sekanslama sonucunda elde edilen ham veriler CLC Main Workbench programında birleştirilmiştir. Elde edilen CNK-Spinach-39 BNYVV izolatının CP geninin nükleotit dizileri, ilgili bögeye karşılık gelen gen bankasındaki dünyanın farklı bölgelerine ait BNYVV izolatlarının (Çizelge 3.3) sekansları ile bir araya getirildikten sonra Sequence Demarcation Tool, version 1.2 (SDTv1.2) programı ile analiz edilerek benzerlik oranları ortaya konulmuştur (Muhire et al., 2014). BNYVV izolatlarının çoklu sekans dizileri Vector NTI programında da dizilenmiştir. Ayrıca dünya ve CNK-Spinach-39 BNYVV izolatları arasındaki filogenetik ilişkiler Neighbor-joining metoduyla kiamura iki algoritması uygulanarak 1000 tekrarlı bootstrap analizi ile belirlenmiştir. Oluşturulan filogenetik ağaçlarda beet soil-borne mosaic virus; BSBMV (Genbankası erişim no: JF513083) dış grup olarak filogenetik ağacın doğruluğunu arttırmak amacı ile kullanılmıştır. Filogenetik analizler Mega7 programında gerçekleştirilmiştir (Kumar et al. 2016).

Çizelge 3.3. Çanakkale ili ıspanak üretim alanlarından elde edilen CNK-Spinach-39 pancar nekrotik sarı damar virüsünün moleküler karakterizasyonu amacı ile gerçekleştirilen çoklu dizi ve filogenetik analizlerde kullanılan dünya izolatları

Ülke	**İzolat**	**Patotip**	**Erişim Numarası**	**Referans**
Çin	Wu2	A	EF473095	Li et al., 2008b
Çin	YJZCP-4	A	KP316636	Zhou et al., 2015
Çin	GZCCP-3	A	KP316623	Zhou et al., 2015
Slovakya	SLN1	A	AB563019	Chiba et al., 2011
Türkiye	TUK	A	AB563026	Chiba et al., 2011
İtalya	IV4	A	AB563002	Chiba et al., 2011
Avusturya	A2	A	AY696072	Schirmer et al., 2005
Belçika	B3	B	AY696079	Schirmer et al., 2005
Belçika	Rutten	B	AJ634737	Meunier et al., 2005
Almanya	GT85	B	AJ810284	Lennefors et al., 2005
Çin	BTCP-9	B	KP316557	Zhou et al., 2015
Japonya	S44	B	AB018624	Miyanishi et al., 1999
Çin	IMHHCP-3	B	KP006486	Zhou et al., 2015
Çin	Hoh2	B	EF473092	Li et al., 2008b
Çin	CH6	B	AB562989	Chiba et al., 2011

BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Arazi ve Virüs Tanılama Çalışmaları

Çanakkale ili ve ilçelerinde gerçekleştirilen arazi çalışmaları kapsamında BNYVV veya virüs benzeri belirti taşıyan toplam 66 ıspanak örneği toplanmıştır. (Çizelge 4.1). Çanakkale Merkez ile birlikte toplam 7 ilçede örnekleme yapılmış ve en çok örnekleme 23 örnek ile Merkez ilçede yapılırken en az örnekleme ise 3 örnek ile Ezine ilçesinden yapılmıştır.

Gerçekleştirilen arazi çalışmalarında oldukça farklı tipte virüs ve virüs-benzeri simptom gösteren bitkilere rastlanılmış ve bu bitkilerden örnekler alınmıştır (Şekil 4.1). Genel olarak Çanakkale ili ve ilçeleri ıspanak üretim alanlarında virüs hastalıklarından kaynaklandığı düşünülen farklı tipte simptomlar gözlenmiştir. Bölgemizde daha önceden gerçekleştirilen bazı çalışmalarda da bu belirtilere ıspanak bitkilerinde sıklıkla görüldüğüde rapor edilmiştir (Erbay, 2010; Güngör ve ark., 2017; Gökdağ, 2014; Kurtoğlu, 2019).



Şekil 4.1. Arazi çalışmaları kapsamında virüs ve virüs benzeri simptom gösterdiği tespit edilen bazı örneklere ait belirtiler (A: Yapraklarında beyazımtrak mozaik belirtiler gösteren ıspanak bitkisi; B: Yapraklarında yoğun kıvrılmalar görülen ıspanak bitkisi; C: Yapraklarında klorozlar görülen ıspanak bitkisi; D: Yaprak ayalarında daralma ve sivrilmeler gösteren ıspanak bitkisi)

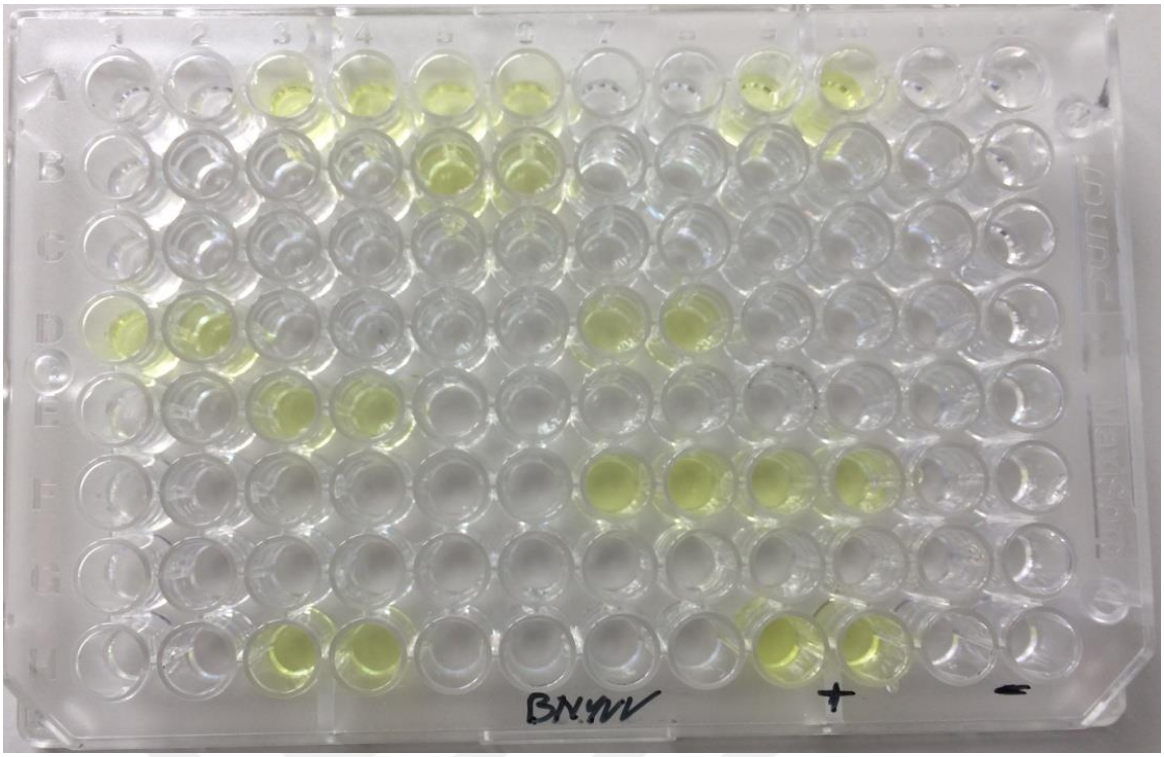
Gerçekleştirilen DAS-ELISA ile BNYVV enfeksiyonu tanılama çalışmaları sonucunda toplanan 66 örneğin 12'si BNYVV ile enfekteli olarak bulunmuştur. En fazla örnekleme yapılan Merkez ilçeden toplanan 23 örneğin 7'si BNYVV ile enfekteli olarak bulunmuştur. Merkez ilçenin dışında Çan'dan toplanan 7 örneğin 2'si, Bayramiç'ten toplanan 4 örneğin 2'si ve Ayvacık'tan toplanan 5 örneğin 1'i BNYVV ile enfekteli olarak bulunmuştur. En fazla örnek toplanan ikinci ilçe (toplam 16 örnek) Biga'da ise enfekteli

örnek bulunamamıştır. Ayrıca diğer ilçelerden Lapseki ve Ezine'de de enfekteli örnek bulunamamıştır. Toplanan örneklerde enfeksiyon oranına bakıldığında Bayramiç'ten toplanan 4 örneğin 2'si enfekteli bulunmuş ve oran % 50,00 olarak gerçekleşmiştir. Bunu sırasıyla Merkez ilçe (%30,43), Çan (28,57) ve Ayvacık (%20,00) ilçeleri izlemiştir. Toplam enfeksiyon oranı ise %18,18 olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Çanakkale ili ve ilçelerinden toplanan ve pancar nekrotik sarı damar virüsü ile enfekteli bulunan örnek sayıları

İlçeler	**Enfekteli Örnek/Toplanan Örnek**	**Toplanan Örneklerdeki Enfeksiyon Oranı (%)**
Merkez	7/23	30,43
Ayvacık	1/5	20,00
Çan	2/7	28,57
Biga	0/16	0
Lapseki	0/8	0
Bayramiç	2/4	50,00
Ezine	0/3	0
Toplam	12/66	18,18

Toplanan örneklerin DAS-ELISA ile testleme aşamasında enfekteli örnekler substrat aşamasından sonra birkaç dakika içinde sararmaya başlamış (Şekil 4.2) ve absorbans değerleri 30 dakika sonra negatif kontroluün 3-4 katına yükselmiştir. Genellikle potyvirus enfeksiyonlarında bitki içinde virüs konsantrasyonu çok yoğun olduğu için platelerde yoğun renk değişimi, gözle görülebilecek şekilde oluşmaktadır (Lunello ve ark., 2002). Her ne kadar son yıllarda bitki virüslerinin tanısında RT-PCR, real time-PCR gibi moleküler yöntemler daha fazla kullanılmaya başlansa da DAS-ELISA'da özellikte teşhis ya da tanı için arazi örneklemelerinde BNYVV için geniş alanlarda başarıyla kullanılabilmektedir (Kutluk-Yılmaz ve Yanar, 2001; Özer ve Ertunç, 2005).



Şekil 4.2. Gerçekleştirilen DAS-ELISA testleri sonucunda pancar nekrotik sarı damar virüsü ile enfekteli bulunan bazı örneklere ait ELISA plate görüntüsü

Genel olarak Çanakkale ili ve ilçelerinde bazen küçük tarlalar şeklinde olsa bile yaygın olarak ıspanak tarımı yapılmaktadır. Ancak örneklemenin yapıldığı yıllarda genel olarak ıspanak tarımı yapılan alanların dağılımında bir dalgalanma olduğu için ilçelerden yapılan örnekleme sayıları arasında farklılıklar meydana gelmiştir. Ayrıca Çanakkale il ve ilçelerinde çok sayıda ıspanak tarlalarına çıkış yapılmış ancak bazı tarlalarda simptom görülmemesi nedeniyle örnek toplanmamıştır.

Arazi çalışmaları kapsamında ıspanaklarda genel olarak sararma, bodurlaşma, yapraklarda mozaik belirtileri, besin elementi noksanlığına benzer belirtiler, yaprak damarlarında kalınlaşma ile birlikte sarımtrak renk oluşumu simptomları gözlenmiştir. DAS-ELISA testlemeleri sonucunda bu belirtilerden bodurlaşma, mozaik belirtisi ve besin elementi noksanlığı belirtisi simptomları gösterenler BNYVV için genellikle negatif sonuç verirken sararma ve damarlarda kalınlaşma simptomu gösterenler pozitif sonuç vermiştir. Bununla birlikte çok hafif virüs benzeri simptom gösteren bazı bitkiler de enfekteli olarak bulunmuştur. Şekil 4.3'de virüs tanılama çalışmalarında etmen ile enfekteli olarak bulunan ıspanak bitkilerindeki belirtiler görülmektedir.



Şekil 4.3. Pancar nekrotik sarı damar virüsü (BNYVV) ile enfekteli ıspanak bitkisinin yapraklarında meydana gelen hastalık belirtileri (BNYVV ile enfekteli ıspanak bitkisinin yaprak damarlarında hafif bir kalınlaşma ve sarımtrak renk oluşumu görülmektedir. Ayrıca bu alanlar yuvarlak bir çerçeveye alınarak ok ile belirtilmiştir.)

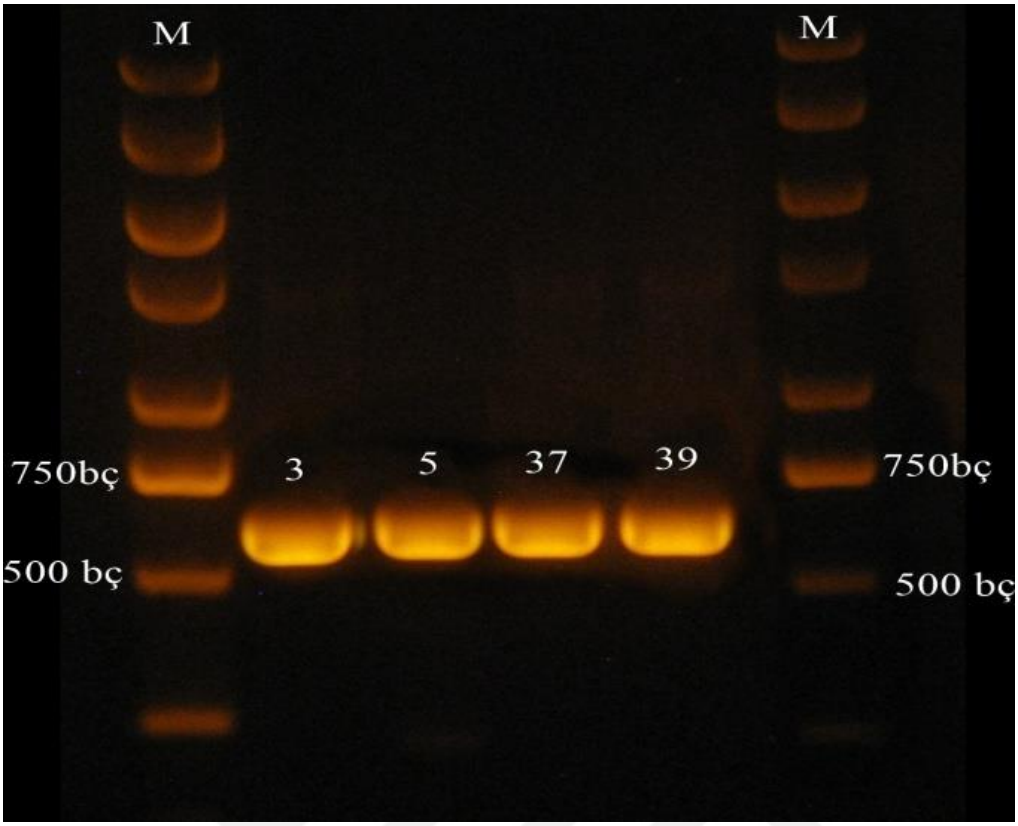
Bu çalışma kapsamında toplanan 66 örneğin sadece 12'si BNYVV ile enfekteli olarak bulunmuştur. Diğer örnekler tipik virüs ve virüs benzeri simptom göstermesine rağmen BNYVV için negatif çıkmıştır. Bunun en önemli nedeni bu bitkilerin diğer virüslerle infekteli olabileceğidir. Ispanakta BNYVV yanında gerek ülkemizde gerekse dünyada bir çok virüsün enfeksiyon yaptığı bilinmektedir. Ülkemizde Ege Bölgesinde (Gediz Havzası) ıspanak yetiştiriciliği yapılan alanlarda yapılan bir çalışmada şekil bozukluğu, klorotik lekeler, yapraklarda kıvrılma, mozaik, gelişme geriliği ve damar aralarında sararma belirtisi gösteren örnekler toplanmış ve örnekler RT-PCR ile testlenmiştir. Testlemeler sonucunda BNYVV, CMV, TMV, BWYV ve TuMV infeksiyonlarını tespit etmiştir (Erbay, 2010). Çanakkale ili ıspanak üretim alanlarında gerçekleştirilen bir başka çalışmada CMV ve TuMV etmenlerinin varlığı saptanmıştır (Gökdağ ve ark., 2016). Samsun ili ıspanak üretim

alanlarında gerçekleştirilen bir başka çalışmada da CMV ve TuMV enfeksiyonu tespit edilmiştir (Güngör ve ark., 2017). Yapılan bu çalışmalar ülkemizde ıspanak bitkisinde BNYVV'nin dışında bir çok virüsün enfeksiyon yaptığını göstermektedir. Dünya da yapılan bir çok çalışmada da BNYVV'nin dışında cucumber mosaic virüs (CMV), beet curly top virüs (BCTV), tobacco mosaic virüs (TMV), turnip mosaic virus (TuMV), Lettuce mosaic virüs (LMV), beet western yellow virüs (BWYV) ve tomato spotted wilt virüs (TSWV)'ın ıspanakta enfeksiyon oluşturduğu bir çok çalışmada belirtilmiştir (Tamada ve Baba, 1973; Wilson, 1983; Parella ve ark., 2003).

Hastalığın yaygınlık durumu ile ilgili Çanakkale ili ve ilçelerinde ıspanak üretim tarlalarında 2013 ve 2015 üretim sezonlarında gerçekleştirilen benzer bir çalışmada araştırmacılar topladıkları 52 örneğin 18 tanesinin BNYVV ile enfekteli olduğunu bildirmişlerdir (Karanfil ve ark., 2016). Araştırmacıların gerçekleştirdikleri çalışma ile bu çalışmanın sonuçları birbirleri ile benzerlik göstermekte olup, Çanakkale'deki ıspanak üretim alanlarında BNYVV enfeksiyonunun yaygın olduğu görülmektedir. Benzer şekilde Samsun ilinde gerçekleştirilen başka bir çalışmada da ıspanak alanlarında BNYVV enfeksiyonuna rastlanıldığı belirtilmiştir (Kutluk Yılmaz ve ark., 2016b). Farklı bölgelerde gerçekleştirilen bu çalışmalardan da anlaşılacağı üzerine ülkemiz ıspanak üretim alanlarında BNYVV enfeksiyonunun yaygın olarak meydana geldiği söylenebilir.

4.2. Moleküler Karakterizasyon Çalışmaları

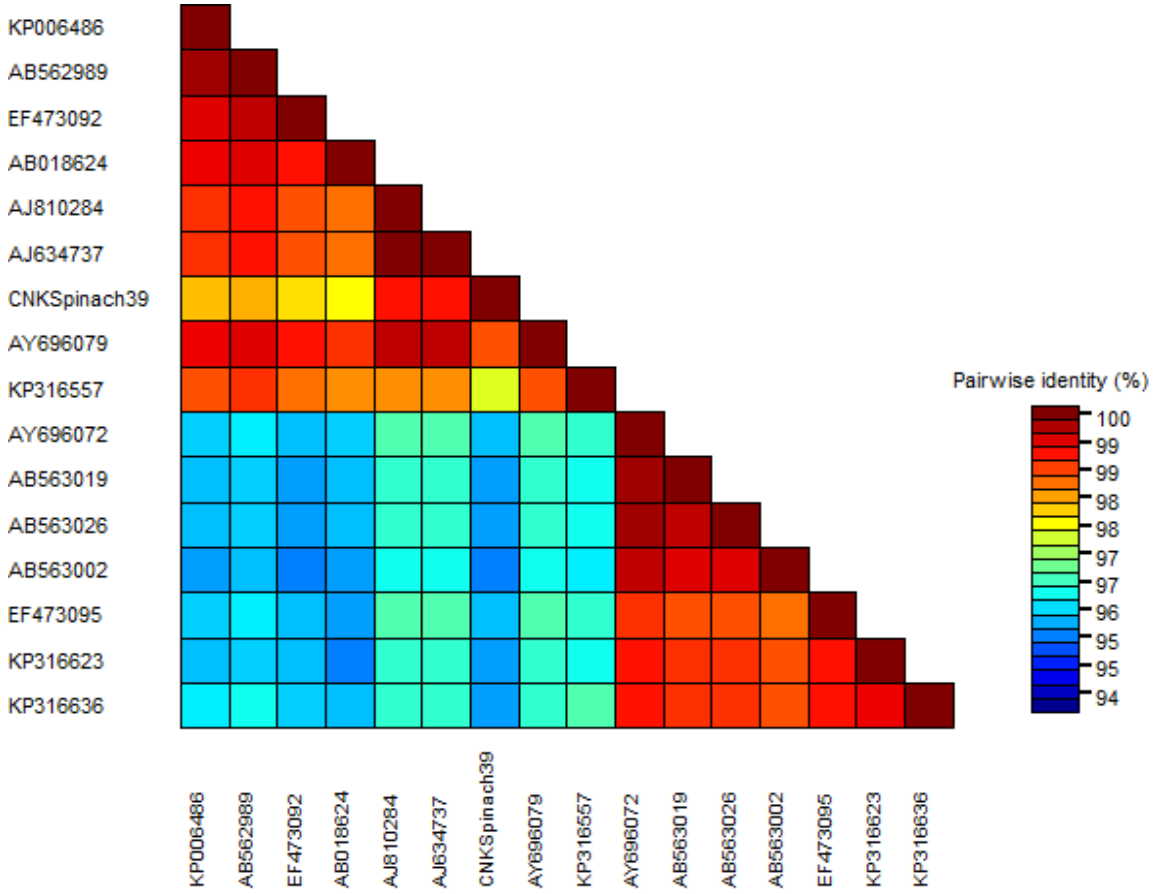
DAS-ELISA testleri sonucu BNYVV ile enfekteli olarak bulunan 4 izolatın RT-PCR ile CP genleri amplifiye edilmiş ve seçilen bir izolatın (CNK-Spinach-39) hizmet alımı yolu ile sekans dizileri çift yönlü olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. DAS-ELISA testleri sonucunda pancar nekrotik sarı damar virüsü (BNYVV) ile enfekteli bulunan örnekler içerisinden seçilen ve örtü protein genleri amplifiye edilen örneklerin jel görüntüleri (M: 5000-100 bç marker. 3, 5, 37, 39 DAS-ELISA testleri sonucunda BNYVV ile enfekteli bulunan izolatlara ait numaralar)

Elde edilen ham sekans verileri birleştirilerek BNYVV CP genine karşılık gelen 567bç büyüklüğünde nükleotit (nt) sekans verisi elde edilmiştir. Elde edilen bu sekans verileri kullanarak CNK-Spinach-39 izolatının CP geninin kodladığı amino asit (aa) dizilimleri ortaya çıkarılmıştır. Dünyada da BNYVV izolatlarının moleküler karakterizasyonu amacı ile kullanılan gen bölgelerinden bir tanesinin de CP geni olduğu bilinmektedir (Borodynko ve ark., 2009; Lennofors ve ark., 2005).

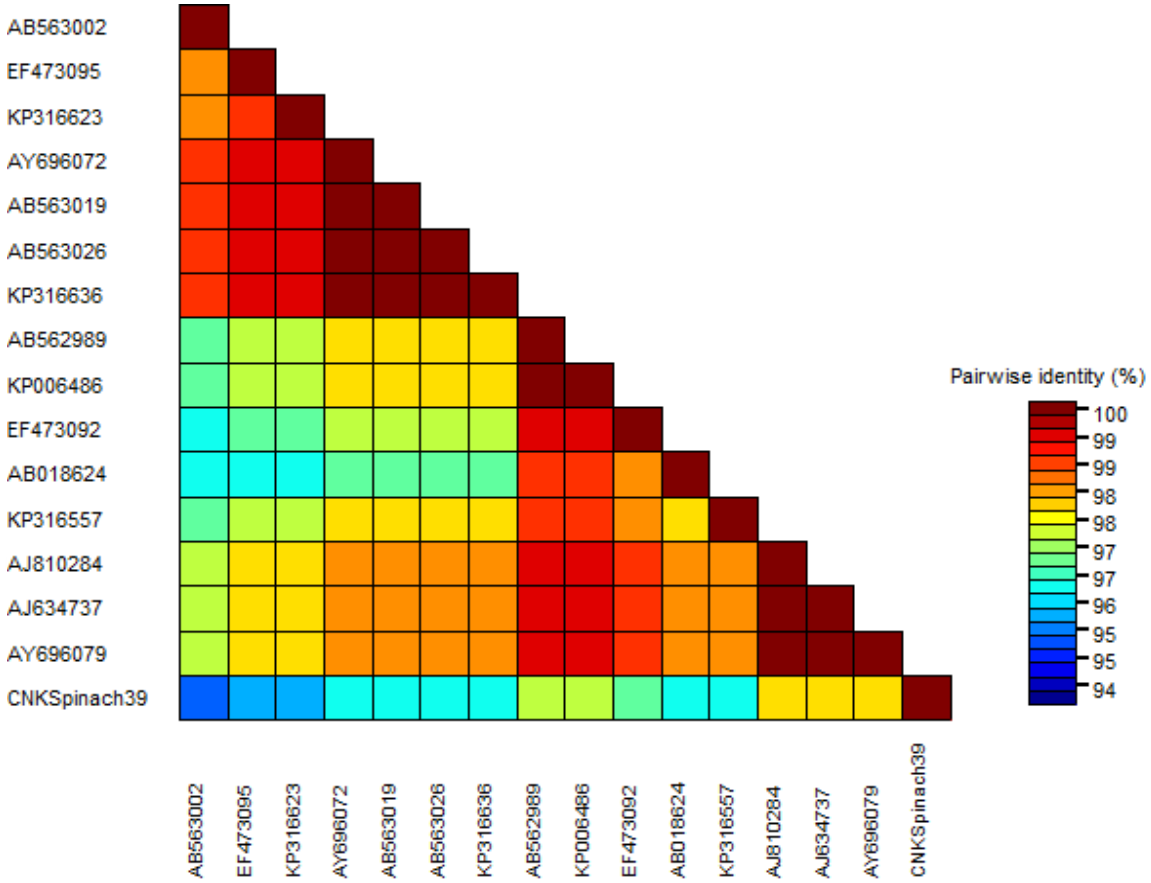
Dünya izolatları ile gerçekleştirilen karşılaştırmalı nt ve aa dizi analizleri ile CNK-Spinach-39 izolatının dünya izolatları ile nt düzeyinde %99'varan oranda benzerlikler gösterdiği saptanırken, aa düzeyinde ise %98'e varan oranda benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). Benzerlik analizleri renk matriksleri daha detaylı olarak incelendiğinde de matrikslerde bariz olarak iki farklı grubun olduğu görülmüştür. Gruplar arasındaki benzerliklerin genel olarak %97 civarında olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.5. Çanakkale ili ıspanak üretim alanlarından elde edilen CNK-Spinach-39 pancar nekrotik sarı damar virüsünün dünya izolatları ile örtü protein gen bölgesi nükleotit dizilimlerine göre birbirleri ile göstermiş olduğu benzerlik oranları

Nükleotit temelli gerçekleştirilen benzerlik analizleri sonucunda CNK-Spinach-39 BNYVV izolatı en fazla benzerliği %99 ile AJ810284 erişim numaralı Almanya ve AJ634737 erişim numaralı Belçika izolatları ile gösterirken, en az benzerliği ise %95 ile AB563002 erişim numaralı İtalyan izolatı ile göstermiştir.

Amino asit temelli gerçekleştirilen benzerlik analizleri sonucunda CNK-Spinach-39 BNYVV izolatı en fazla benzerliği %98 ile AJ810284 erişim numaralı Almanya, AJ634737 ve AY696079 erişim numaralı Belçika izolatları ile göstermiştir. En az benzerliği ise %95 ile AB563002 erişim numaralı İtalyan izolatı ile göstermiştir.



Şekil 4.6. Çanakkale ili ıspanak üretim alanlarından elde edilen CNK-Spinach-39 pancar nekrotik sarı damar virüsünün dünya izolatları ile örtü protein gen bölgesi aminoasit dizilimlerine göre birbirleri ile göstermiş olduğu benzerlik oranları

Dünyada BNYVV izolatlarının CP gen bölgesine göre gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda da izolatların farklı seviyelerde benzerlikler gösterdiği bildirilmiştir. Bu çalışmalardan bir tanesi Polonya'da gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışmada şeker pancarını enfekte eden içlerinde BNYVV'ninde olduğu 4 farklı virüsün CP genine göre moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmada elde ettikleri 3 BNYVV izolatının kendi içlerinde ve dünya izolatları ile %96-100 arasında değişen oranlarda benzerlikler gösterdiğini tespit etmişlerdir (Borodynko ve ark., 2009). Lennofors ve ark. (2005) Fransa, Almanya ve ABD'den elde ettikleri BNYVV izolatlarının CP genini temel alarak moleküler karakterizasyonlarını gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar bu izolatların birbirleri ve dünya BNYVV izolatları ile %95-100 oranlarında benzerlikler gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar gerçekleştirdikleri bu çalışmanın sonucunda BNYVV izolatlarının CP geninde elde edilen sekans varyasyonlarının CP

geninin tamamına dağıldığını, CP geninin herhangi bir spesifik bölgesine özel olmadığını belirtmişlerdir.

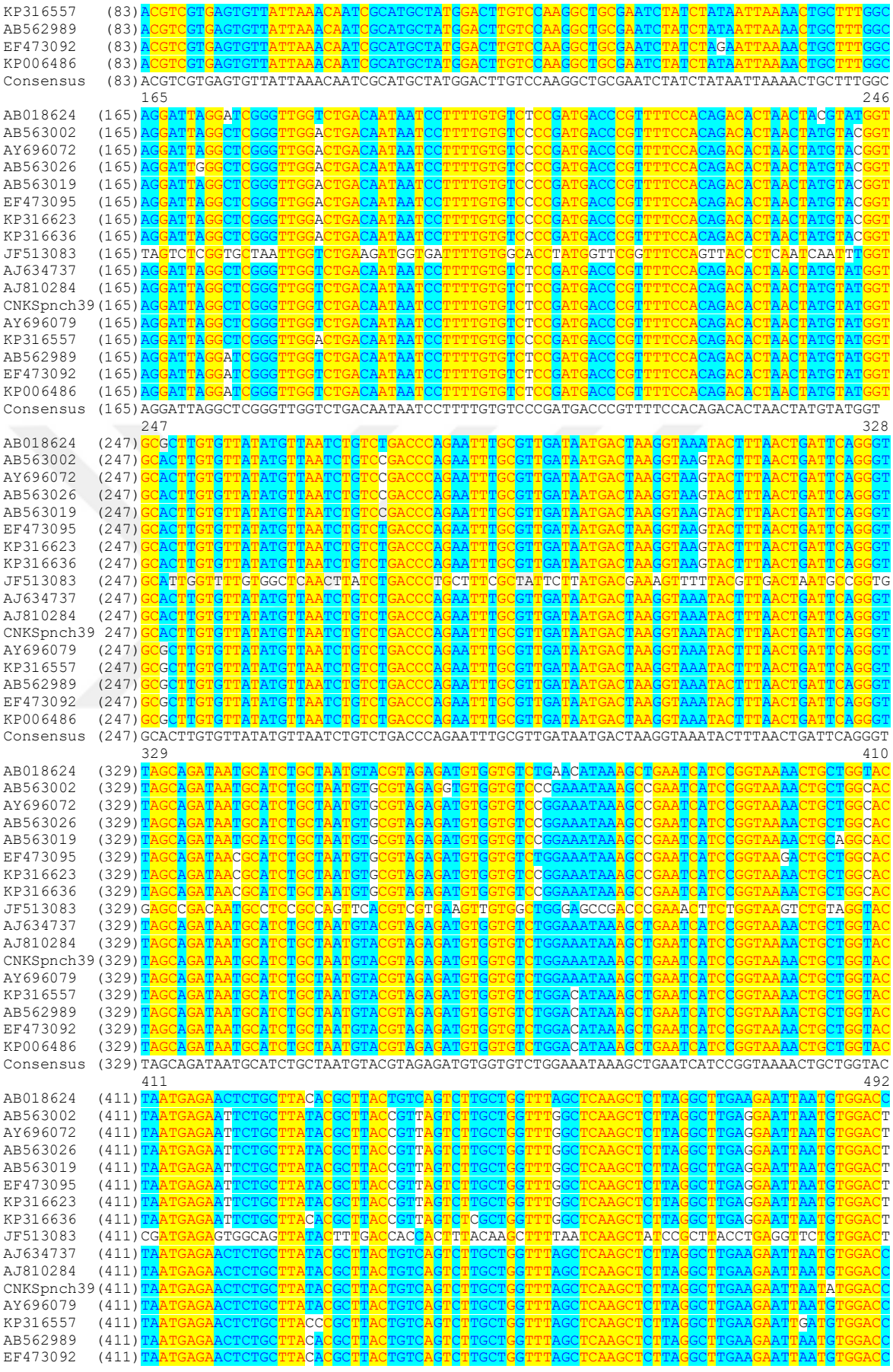
Ahmad ve ark. (2018) tarafından Pakistan'da BNYVV enfeksiyonunun tespiti amacı ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada da; araştırmacılar elde ettikleri bir BNYVV izolatının moleküler karakterizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar yürüttükleri çalışmaların sonucunda dünya BNYVV izolatları ile nükleotid düzeyinde %98, amino asit düzeyinde ise % 99'a varan oranlarda izolatlar arasında benzerlikler görüldüğünü belirtmişlerdir. Ülkemizde BNYVV izolatlarının moleküler karakterizasyonu amacı ile gerçekleştirilen çalışmalar ise RNA3 genomunda bulunan P25 gen bölgesine göre gerçekleştirildiği için ülkemiz izolatları ile bir kıyaslama yapmak mümkün olmamıştır. Ancak dünyada gerçekleştirilen çalışmalar ile bu çalışma kapsamında BNYVV izolatlarının CP genine göre birbirleri ile göstermiş olduğu benzerlik oranları birbirlerine paralellik göstermektedir.

Çanakkale ili ıspanak BNYVV izolatının çoklu dizi karşılaştırmaları Çizelge 4.2'de nükleotit düzeyinde, Çizelge 4.3'de amino asit düzeyinde verilmiştir. Gerçekleştirilen bu çoklu dizi analizlerinde aynı nükleotit ve amino asit sekansları aynı renkte verilirken, farklı olanlar ise farklı renklerde gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Çanakkale ıspanak pancar nekrotik sarı damar virüsü ile dünya izolatlarının örtü protein genine ait çoklu amino asit dizi karşılaştırmaları

```
                    1                                                                 82
AB018624      (1)ATGTCGAGTGAAGGTAGATATATGACATGGAAGGATATGTCACATAATAAGTTTATGACCGATCGATGGGCTCGTGTTTCGG
AB563002      (1)ATGTCGAGTGAAGGTAGATATATGACATGGAAGGATATGTCACATAATAAGTTTATGACCGATCGATGGGCCCGTGTTTCGG
AY696072      (1)ATGTCGAGTGAAGGTAGATATATGACATGGAAGGATATGTCACATAATAAGTTTATGACCGATCGATGGGCCCGTGTTTCGG
AB563026      (1)ATGTCGAGTGAAGGTAGATATATGACATGGAAGGATATGTCACATAATAAGTTTATGACCGATCGATGGGCCCGTGTTTCGG
AB563019      (1)ATGTCGAGTGAAGGTAGATATATGACATGGAAGGATATGTCACATAATAAGTTTATGACCGATCGATGGGCCCGTGTTTCGG
EF473095      (1)ATGTCGAGTGAAGGTAGATATATGACATGGAAGGATATGTCACATAATAAGTTTATGACCGATCGATGGGCCCGTGTTTCGG
KP316623      (1)ATGTCGAGTGAAGGTAGATATATGACATGGAAGGATATGTCACATAATAAGTTTATGACCGATCGATGGGCCCGTGTTTCGG
KP316636      (1)ATGTCGAGTGAAGGTAGATATATGACATGGAAGGATATGTCACATAATAAGTTTATGACCGATCGATGGGCCCGTGTTTCGG
JF513083      (1)ATGGTTGATGAAGGTAGATATATGACATGGAAAGATGCAACTCATAATAAGTTGATGACCGACCGATGGGCACGCGTATCAA
AJ634737      (1)ATGTCGAGTGAAGGTAGATATATGACATGGAAGGATATGTCACATAATAAGTTTATGACCGATCGATGGGCTCGTGTTTCGG
AJ810284      (1)ATGTCGAGTGAAGGTAGATATATGACATGGAAGGATATGTCACATAATAAGTTTATGACCGATCGATGGGCTCGTGTTTCGG
CNKSpinach39(1)ATGTCGAGTGAAGGTAGATATATGACATGGAAGGATATGTCACATAATAAGTTTATGACCGATCGATGGGCTCGTGTTTCGG
AY696079      (1)ATGTCGAGTGAAGGTAGATATATGACATGGAAGGATATGTCACATAATAAGTTTATGACCGATCGATGGGCTCGTGTTTCGG
KP316557      (1)ATGTCGAGTGAAGGTAGATATATGACATGGAAGGATATGTCACATAATAAGTTTATGACCGATCGATGGGCCCGTGTTTCGG
AB562989      (1)ATGTCGAGTGAAGGTAGATATATGACATGGAAGGATATGTCACATAATAAGTTTATGACCGATCGATGGGCTCGTGTTTCGG
EF473092      (1)ATGTCGAGTGAAGGTAGATATATGACATGGAAGGATATGTCACATAATAAGTTTATGACCGATCGATGGGCTCGTGTTTCGG
KP006486      (1)ATGTCGAGTGAAGGTAGATATATGACATGGAAGGATATGTCACATAATAAGTTTATGACCGATCGATGGGCTCGTGTTTCGG
Consensus     (1)ATGTCGAGTGAAGGTAGATATATGACATGGAAGGATATGTCACATAATAAGTTTATGACCGATCGATGGGC CGTGTTTCGG
                    83                                                                164
AB018624     (83)ACGTCGTGAGTGTTATTAAACAATCGCATGCTATGGACTTGTCCAAGGCTGCGAATCTATCTATAATTAAAACTGCTTTGGC
AB563002     (83)ACGTCGTGAGTGTTATTAAACAATCGCATGCTATGGACTTGTCCAAGGCTGCGAATCTATCTATAATTAAAACTGCTTTGGC
AY696072     (83)ACGTCGTGAGTGTTATTAAACAATCGCATGCTATGGACTTGTCCAAGGCTGCGAATCTATCTATAATTAAAACTGCTTTGGC
AB563026     (83)ACGTCGTGAGTGTTATTAAACAATCGCATGCTATGGACTTGTCCAAGGCTGCGAATCTATCTATAATTAAAACTGCTTTGGC
AB563019     (83)ACGTCGTGAGTGTTATTAAACAATCGCATGCTATGGACTTGTCCAAGGCTGCGAATCTATCTATAATTAAAACTGCTTTGGC
EF473095     (83)ACGTCGTGAGTGTTATTAAACAATCGCATGCTATGGACTTGTCCAAGGCTGCGAATCTATCTATAATTAAAACTGCTTTGGC
KP316623     (83)ACGTCGTGAGTGTTATTAAACAATCGCATGCTATGGACTTGTCCAAGGCTGCGAATCTACCTATAATTAAAACTGCTTTGGC
KP316636     (83)ACGTCGTGAGTGTTATTAAACAATCGCATGCTATGGACTTGTCCAAGGCTGCGAATCTATCTATAATTAAAACTGCTTTGGC
JF513083     (83)GCGTCCAGGCGACCATTAACCAGGCTTTGAGCCTCGATCTGTCTAAAGCCGCAAGCTTACCTGTTATTAAGGCCAATTTTAG
AJ634737     (83)ACGTCGTGAGTGTTATTAAACAATCGCATGCTATGGACTTGTCCAAGGCTGCGAATCTATCTATAATTAAAACTGCTTTGGC
AJ810284     (83)ACGTCGTGAGTGTTATTAAACAATCGCATGCTATGGACTTGTCCAAGGCTGCGAATCTATCTATAATTAAAACTGCTTTGGC
CNKSpinach3983)ACGTCGTGAGTGTTATTAAACAATCGCATGCTATGGACTTGTCCAAGGCTGCGAATCTATCTATAATTAAAACTGCTTTGGC
AY696079     (83)ACGTCGTGAGTGTTATTAAACAATCGCATGCTATGGACTTGTCCAAGGCTGCGAATCTATCTATAATTAAAACTGCTTTGGC
```

Çizelge 4.2'nin devamı



Çizelge 4.2'nin devamı

```
KP006486  (411)TAATGAGAACTCTGCTTACACGCTTACTGTCAGTCTTGCTGGTTTAGCTCAAGCTCTCAGGCTTGAAGAATTAATGTGGACC
Consensus (411)TAATGAGAACTCTGCTTATACGCTTACTGTCAGTCTTGCTGGTTTAGCTCAAGCTCTTAGGCTTGAAGAATTAATGTGGACC
                 493                                                                       567
AB018624  (493) CGGGATAAGTTTGAGGACCGGTTCAAGTTACCATGGACACCTGTTCAAGGTAGAACCAGTCCACCCGGACAATAG
AB563002  (493) CGGGATAAGTTTGAGGACCGGTTGAAGTTACCATGGACACCTGTTCAAGGTAGAACCAGTCCACCCGGACAATAG
AY696072  (493) CGGGATAAGTTTGAGGACCGGTTGAAGTTACCATGGACACCTGTTCAAGGTAGAACCAGTCCACCCGGACAATAG
AB563026  (493) CGGGATAAGTTTGAGGACCGGTTGAAGTTACCATGGACACCTGTTCAAGGTAGAACCAGTCCACCCGGACAATAG
AB563019  (493) CGGGATAAGTTTGAGGACCGGTTGAAGTTACCATGGACACCTGTTCAAGGTAGAACCAGTCCACCCGGACAATAG
EF473095  (493) CGGGATAAGCTTGAGGACCGGTTGAAATTACCATGGACACCTGTTCAAGGTAGAACCAGTCCACCCGGACAATAG
KP316623  (493) CGGGATAAGTTTGAGGACCGGTTGAAATTACCATGGACACCTGTTCAAGGCAGAACCAGTCCACCCGGACAATAG
KP316636  (493) CGGGATAAGTTTGAGGACCGGTTGAAATTACCATGGACACCTGTTCAAGGTAGAACCAGTCCACCCGGACAATAG
JF513083  (493) CGTGATAAGTTTGAACGGGAGTGGAATCTGCCATGGACCCCTACTAGGGGTGTTACCGTTCCACGCACCAATTAG
AJ634737  (493) CGGGATAAATTTGAGGACCGGTTCAAATTACCATGGACACCTGTTCAAGGTAGAACCAGTCCACCCGGACAATAG
AJ810284  (493) CGGGATAAATTTGAGGACCGGTTCAAATTACCATGGACACCTGTTCAAGGTAGAACCAGTCCACCCGGACAATAG
CNKSpnch39(493) CGGGCTAAATTTGAGGACCGGTTCAAATTACCATGGACACCTGTTCAAGGTAGAACCAGTCCACACCGACAATGG
AY696079  (493) CGGGATAAGTTTGAGGACCGGTTCAAATTACCATGGACACCTGTTCAAGGTAGAACCAGTCCACCCGGACAATAG
KP316557  (493) CGGGATAAGTTTGAGGACCGGTTCAAATTACCATGGACACCTGTTCAAGGTAGAACCAGTCCACCCGGACAATAG
AB562989  (493) CGGGATAAGTTTGAGGACCGGTTCAAATTACCATGGACACCTGTTCAAGGTAGAACCAGTCCACCCGGACAATAG
EF473092  (493) CGGGATAAGTTTGAGGACCGGTTCAAATTACCATGGACACCTGTTCAAGGGAGAACCAGTCCACCCGGACAATAG
KP006486  (493) CGGGATAAGTTTGAGGACCGGTTCAAATTACCATGGACACCTGTTCAAGGTAGAACCAGTCCACCCGGACAATAG
Consensus (493) CGGGATAAGTTTGAGGACCGGTTCAAATTACCATGGACACCTGTTCAAGGTAGAACCAGTCCACCCGGACAATAG
```

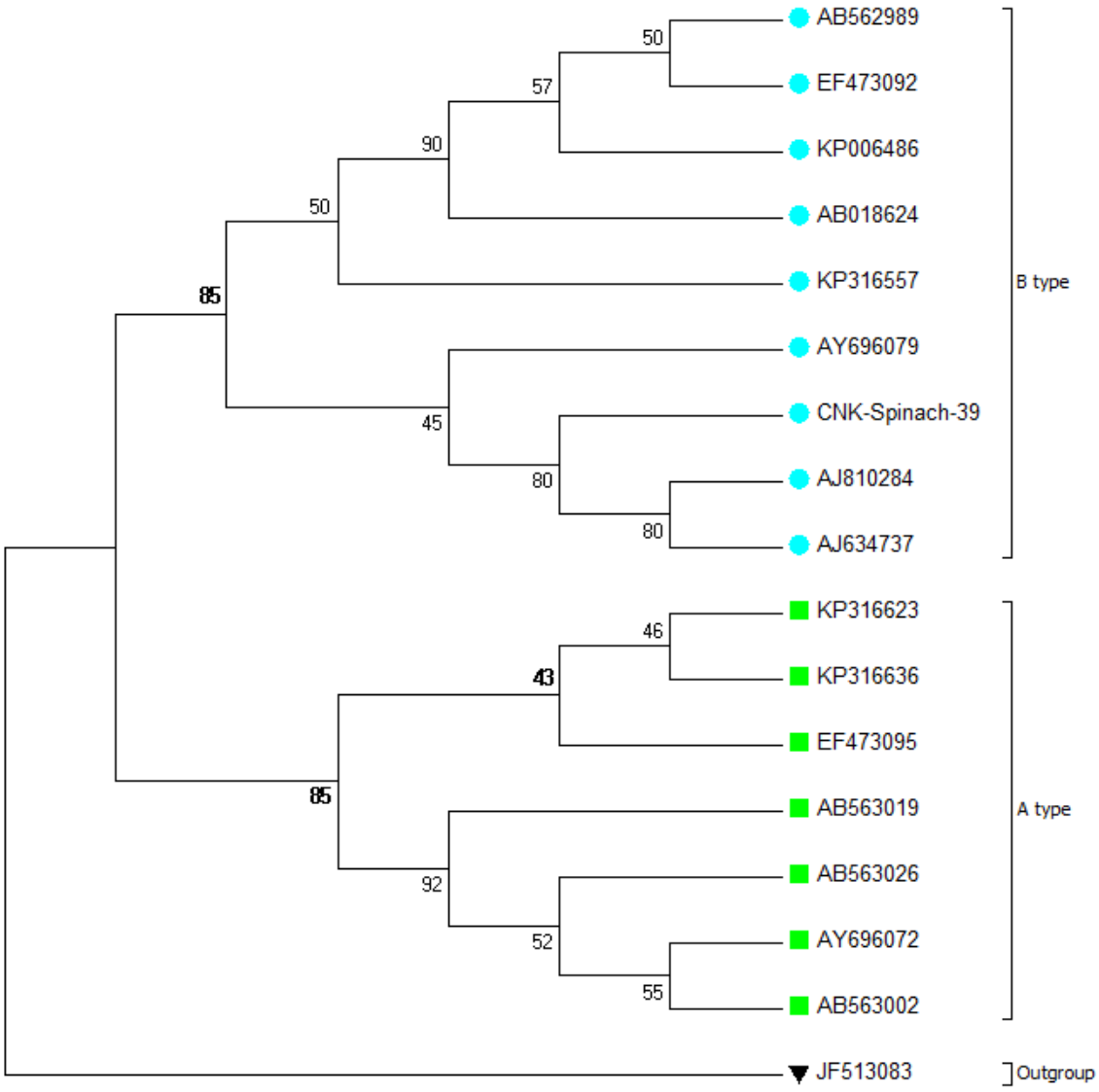
Çizelge 4.3. Çanakkale ıspanak pancar nekrotik sarı damar virüsü ile dünya izolatlarının örtü protein genine ait çoklu amino asit dizi karşılaştırmaları

```
                  1                                                                  63
AB018624    (1)   MSSEGRYMTWKDMSHNKFMTDRWARVSDVVSVIKQSHAMDLSKAANLSIIKTALAGLGSGWSD
AB562989    (1)   MSSEGRYMTWKDMSHNKFMTDRWARVSDVVSVIKQSHAMDLSKAANLSIIKTALAGLGSGWSD
AB563002    (1)   MSSEGRYMTWKDMSHNKFMTDRWARVSDVVSVIKQSHAMDLSKAANLSIIKTALAGLGSGWTD
AB563019    (1)   MSSEGRYMTWKDMSHNKFMTDRWARVSDVVSVIKQSHAMDLSKAANLSIIKTALAGLGSGWTD
AB563026    (1)   MSSEGRYMTWKDMSHNKFMTDRWARVSDVVSVIKQSHAMDLSKAANLSIIKTALAGLGSGWTD
AJ634737    (1)   MSSEGRYMTWKDMSHNKFMTDRWARVSDVVSVIKQSHAMDLSKAANLSIIKTALAGLGSGWSD
AJ810284    (1)   MSSEGRYMTWKDMSHNKFMTDRWARVSDVVSVIKQSHAMDLSKAANLSIIKTALAGLGSGWSD
AY696072    (1)   MSSEGRYMTWKDMSHNKFMTDRWARVSDVVSVIKQSHAMDLSKAANLSIIKTALAGLGSGWTD
AY696079    (1)   MSSEGRYMTWKDMSHNKFMTDRWARVSDVVSVIKQSHAMDLSKAANLSIIKTALAGLGSGWSD
CNKSpnch39  (1)   MSSEGRYMTWKDMSHNKFMTDRWARVSDVVSVIKQSHAMDLSKAANLSIIKTALAGLGSGWSD
EF473092    (1)   MSSEGRYMTWKDMSHNKFMTDRWARVSDVVSVIKQSHAMDLSKAANLSRIKTALAGLGSGWSD
EF473095    (1)   MSSEGRYMTWKDMSHNKFMTDRWARVSDVVSVIKQSHAMDLSKAANLSIIKTALAGLGSGWTD
KP006486    (1)   MSSEGRYMTWKDMSHNKFMTDRWARVSDVVSVIKQSHAMDLSKAANLSIIKTALAGLGSGWSD
KP316557    (1)   MSSEGRYMTWKDMSHNKFMTDRWARVSDVVSVIKQSHAMDLSKAANLSIIKTALAGLGSGWTD
KP316623    (1)   MSSEGRYMTWKDMSHNKFMTDRWARVSDVVSVIKQSHAMDLSKAANLPIIKTALAGLGSGWTD
KP316636    (1)   MSSEGRYMTWKDMSHNKFMTDRWARVSDVVSVIKQSHAMDLSKAANLSIIKTALAGLGSGWTD
Consensus   (1)   MSSEGRYMTWKDMSHNKFMTDRWARVSDVVSVIKQSHAMDLSKAANLSIIKTALAGLGSGWSD
                  64                                                                 126
AB018624   (64)   NNPFVSPMTRFPQTLTTYGALVLYVNLSDPEFALIMTKVNTLTDSGLADNASANVRRDVVSEH
AB562989   (64)   NNPFVSPMTRFPQTLTMYGALVLYVNLSDPEFALIMTKVNTLTDSGLADNASANVRRDVVSGH
AB563002   (64)   NNPFVSPMTRFPQTLTMYGALVLYVNLSDPEFALIMTKVSTLTDSGLADNASANVRRGVVSRN
AB563019   (64)   NNPFVSPMTRFPQTLTMYGALVLYVNLSDPEFALIMTKVSTLTDSGLADNASANVRRDVVSGN
AB563026   (64)   NNPFVSPMTRFPQTLTMYGALVLYVNLSDPEFALIMTKVSTLTDSGLADNASANVRRDVVSGN
AJ634737   (64)   NNPFVSPMTRFPQTLTMYGALVLYVNLSDPEFALIMTKVNTLTDSGLADNASANVRRDVVSGN
AJ810284   (64)   NNPFVSPMTRFPQTLTMYGALVLYVNLSDPEFALIMTKVNTLTDSGLADNASANVRRDVVSGN
AY696072   (64)   NNPFVSPMTRFPQTLTMYGALVLYVNLSDPEFALIMTKVSTLTDSGLADNASANVRRDVVSGN
AY696079   (64)   NNPFVSPMTRFPQTLTMYGALVLYVNLSDPEFALIMTKVNTLTDSGLADNASANVRRDVVSGN
CNKSpnch39 (64)   NNPFVSPMTRFPQTLTMYGALVLYVNLSDPEFALIMTKVNTLTDSGLADNASANVRRDVVSGN
EF473092   (64)   NNPFVSPMTRFPQTLTMYGALVLYVNLSDPEFALIMTKVNTLTDSGLADNASANVRRDVVSGH
EF473095   (64)   NNPFVSPMTRFPQTLTMYGALVLYVNLSDPEFALIMTKVSTLTDSGLADNASANVRRDVVSGN
KP006486   (64)   NNPFVSPMTRFPQTLTMYGALVLYVNLSDPEFALIMTKVNTLTDSGLADNASANVRRDVVSGH
KP316557   (64)   NNPFVSPMTRFPQTLTMYGALVLYVNLSDPEFALIMTKVNTLTDSGLADNASANVRRDVVSGH
KP316623   (64)   NNPFVSPMTRFPQTLTMYGALVLYVNLSDPEFALIMTKVSTLTDSGLADNASANVRRDVVSGN
KP316636   (64)   NNPFVSPMTRFPQTLTMYGALVLYVNLSDPEFALIMTKVSTLTDSGLADNASANVRRDVVSGN
Consensus  (64)   NNPFVSPMTRFPQTLTMYGALVLYVNLSDPEFALIMTKVNTLTDSGLADNASANVRRDVVSGN
                  127                                                                188
AB018624  (127)   KAESSGKTAGTNENSAYTLTVSLAGLAQALRLEELMWTRDKFEDRFKLPWTPVQGRTSPPGQ
AB562989  (127)   KAESSGKTAGTNENSAYTLTVSLAGLAQALRLEELMWTRDKFEDRFKLPWTPVQGRTSPPGQ
AB563002  (127)   KAESSGKTAGTNENSAYTLTVSLAGLAQALRLEELMWTRDKFEDRLKLPWTPVQGRTSPPGQ
AB563019  (127)   KAESSGKTAGTNENSAYTLTVSLAGLAQALRLEELMWTRDKFEDRLKLPWTPVQGRTSPPGQ
AB563026  (127)   KAESSGKTAGTNENSAYTLTVSLAGLAQALRLEELMWTRDKFEDRLKLPWTPVQGRTSPPGQ
AJ634737  (127)   KAESSGKTAGTNENSAYTLTVSLAGLAQALRLEELMWTRDKFEDRFKLPWTPVQGRTSPPGQ
```

Çizelge 4.3'ün devamı

```
AJ810284   (127) KAESSGKTAGTNENSAYTLTVSLAGLAQALRLEELMWTRDKFEDRFKLPWTPVQGRTSPPGQ
AY696072   (127) KAESSGKTAGTNENSAYTLTVSLAGLAQALRLEELMWTRDKFEDRLKLPWTPVQGRTSPPGQ
AY696079   (127) KAESSGKTAGTNENSAYTLTVSLAGLAQALRLEELMWTRDKFEDRFKLPWTPVQGRTSPPGQ
CNKSpnch39 (127) KAESSGKTAGTNENSAYTLTVSLAGLAQALRLEELIWTRAKFEDRFKLPWTPVQGRTSPHRQ
EF473092   (127) KAESSGKTAGTNENSAYTLTVSLAGLAQALRLEELMWTRDKFEDRFKLPWTPVQGRTSPPGQ
EF473095   (127) KAESSGKTAGTNENSAYTLTVSLAGLAQALRLEELMWTRDKLEDRLKLPWTPVQGRTSPPGQ
KP006486   (127) KAESSGKTAGTNENSAYTLTVSLAGLAQALRLEELMWTRDKFEDRFKLPWTPVQGRTSPPGQ
KP316557   (127) KAESSGKTAGTNENSAYPLTVSLAGLAQALRLEELMWTRDKFEDRFKLPWTPVQGRTSPPGQ
KP316623   (127) KAESSGKTAGTNENSAYTLTVSLAGLAQALRLEELMWTRDKFEDRLKLPWTPVQGRTSPPGQ
KP316636   (127) KAESSGKTAGTNENSAYTLTVSLAGLAQALRLEELMWTRDKFEDRLKLPWTPVQGRTSPPGQ
Consensus  (127) KAESSGKTAGTNENSAYTLTVSLAGLAQALRLEELMWTRDKFEDRFKLPWTPVQGRTSPPGQ
```

Daha öncede belirtildiği gibi ülkemizde BNYVV izolatlarının moleküler karakterizasyonlarında CP geninin genellikle kullanılmamasından dolayı gen bankası veri tabanında Türk BNYVV izolatlarına ait çok sayıda sekans verisi olmamasına rağmen, bunların büyük bir çoğunluğu p25 ve p26 gen bölgelerine aittir. Sadece AB563026 erişim numaralı izolat CP gen bölgesine ait olup ülkemiz orjinlidir (Chiba et al., 2011). Bu izolatta filogenetik ve benzerlik analizlerine dahil edilmiştir. Dünya izolatları ile gerçekleştirilen filogenetik ilişkilerin araştırılması sonucunda ise CNK-Spinach-39 izolatı patotip B olarak blunmuştur (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Çanakkale ili ıspanak üretim alanlarından elde edilen CNK-Spinach-39 pancar nekrotik sarı damar virüsünün dünya izolatları ile örtü protein gen bölgesi nükleotit dizilimlerine göre birbirleri ile göstermiş olduğu filogenetik ilişki

Filogenetik ilişkilerin belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen biyoinformatik analizler sonucunda CNK-Spinach-39 BNYVV izolatının AB562989, EF473092, KP006486 ve KP316557 erişim numaralı Çin izolatı, AB018624 erişim numaralı Japonya, AY696079 ve AJ634737 erişim numaralı Belçika ve son olarak AJ810284 erişim numaralı Almanya izolatları ile B patotipinde yer almıştır. Ayrıca oluştulan filogenetik ağaç daha detaylı incelendiğinde B patotipinin kendi içinde iki alt gruba ayrıldığı görülmektedir. Bu iki gruptan birincisi AB562989, EF473092, KP006486 ve KP316557 erişim numaralı Çin izolatı ve AB018624 erişim numaralı Japonya izolatlarından oluşurken, ikinci grubun ise

AY696079 ve AJ634737 erişim numaralı Belçika ve son olarak AJ810284 erişim numaralı Almanya izolatı ile Türk izolatından oluştuğu görülmektedir. Bu bağlamda B patotipinde birinci alt grubun Asya orijinli izolatlardan oluştuğu, ikinci grubun ise Avrupa orijinli izolatlardan oluştuğu görülmektedir. Ancak BNYVV izolatlarının CP genine göre patotiplerinin belirlenmesinde izolatların orijinlerinin bir etkisi olmadığı söylenebilir. Çünkü Çin izolatlarının bir kısmı patotip B bulunurken, diğer bir kısmı ise patotip A olarak filogenetik ağaçta yer almıştır. Benzer şekilde bu çalışma kapsamında elde edilen CNK-Spinach-39 BNYVV izolatını patotip B grubunda yer alırken, ülkemiz orijinli olan AB563026 erişim numaralı BNYVV izolatı ise A patotipinde yer almıştır. Bu bağlamda BNYVV izolatlarının patotip oluşumlarında CP geninde meydana gelen varyasyonların tek etken olduğu düşünülmektedir.

Dünyada BNYVV izolatlarının filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen çalışmalarda da aynı ülke izolatlarının farklı filogenetik gruplara dağılım gösterebildiği bildirilmiştir. Borodynko ve ark. (2009) tarafından Polonya'da gerçekleştirilen bir çalışmada Polonya BNYVV izolatlarının bir kısmı patotip A olarak bulunurken, bazılar ise patotip B olarak bulunduğu bildirilmiştir. Lennefors ve ark. (2005) tarafından dünyanın farklı ülkelerinden elde edilen BNYVV izolatlarının moleküler karakterizasyonları amacı ile gerçekleştirilen bir başka çalışmada da izolatların A ve B patotiplerine ait olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Lennefors ve ark. tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada da Çin izolatlarının bir kısmının A, diğer bir kısmının ise B patotipine ait olduğu bildirilmiştir. Bu bağlamda dünyada gerçekleştirilen farklı çalışmalardan elde edilen sonuçlar da bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçları destekler niteliktedir.

Sonuç olarak Çanakkale ili ve ilçeleri ıspanak üretim alanlarında gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda bizim bilgilerimize göre; ülkemizde ilk defa BNYVV'nin B patotipi tespit edilmiştir.

BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Gerçekleştirilen bu çalışma kapsamında Çanakkale ili ve ilçeleri ıspanak üretim alanlarından viral hastalık belirtisi taşıyan 66 örnek toplanmıştır. İlimizdeki ıspanak üretimindeki dalgalanmalara bağlı olarak, ilçelerden toplanan örnek sayıları arasında bir paralellik sağlanamamıştır. Ayrıca bunda sadece viral hastalık benzeri simptom taşıyan bitkilerin toplanması da başka bir faktör olarak göz önünde bulundurulmalıdır. Sörveyler süresince bazı üretim alanlarında oldukça tipik viral hastalık benzeri belirti taşıyan bitkiye rastlanırken, bazı tarlalarda hiç belirti gözlenmemiştir. Örneklemelerde üretimi yapılan ıspanak bitkilerinin çeşitleri dikkate alınmamıştır. Bazı tarlalarda çok tipik belirti görülmesi bazılarında ise hiç belirti görülmemesi muhtemelen hastalığın taşınması ve çeşitler arasında hastalığa tolerant-dayanıklı ya da duyarlı çeşitlerin bulunması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Toplanan örneklerdeki pancar nekrotik sarı damar virüsü'nün enfeksiyonu belirlemek amacı ile DAS-ELISA testleri gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen bu testler sonucunda toplanan 66 örneğin 12'sinin BNYVV ile enfekteli olduğu bulunmuştur. BNYVV enfeksiyonu örnek alınan 7 ilçenin 4'ünde tespit edilmiştir. Etmenin enfeksiyonunun tespit edildiği ilçeler; Merkez, Ayvacık, Çan ve Bayramiç'tir. Biga, Lapseki ve Ezine ilçelerinde ise etmenin enfeksiyonu tespit edilmemiştir. BNYVV ile enfekteli örnek sayısı en fazla 7 örnek ile Merkez ilçede tespit edilmiştir.

Gerçekleştirilen sörvey çalışmalarında toplanan ve virüs tanılama testleri sonucunda enfekteli olan örneklerde tipik olarak yapraklarda sarımtrak alanların varlığı görülmüştür.

BNYVV ile enfekteli olduğu bulunan örnekler içinden bir tanesi (CNK- Spinach-39) seçilerek CP geni RT-PCR ile amplifiye edilmiştir. Amplifiye edilen bu gen bölgesinin sahip olduğu sekans dizilimleri hizmet alımı ile belirlenmiştir. Gen bankasında dünyanın farklı bölgelerinden elde edilerek, depo edilen BNYVV izolatlarının ilgili gen bölgesine karşılık gelen sekans dizilimleri de elde edilerek, benzerlik ve filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen benzerlik analizleri sonucunda CNK-Spinach-39 BNYVV izolatının dünya izolatları ile nt ve a.a. düzeyinde % 95-99 oranında benzerlikler gösterdiği belirlenmiştir. Filogenetik analizler sonucunda ise ülkemizde ilk kez BNYVV'nin B patotipi belirlenmiştir.

Diğer bitki hastalıklarının aksine virüs hastalıklarının kimyasal mücadelesi bulunmamaktadır. Bu sebeple sanitasyon ve kültürel önlemlere ağırlık verilmesi virüs

hastalıklarına karşı uygulanacak en ucuz, etkin ve basit mücadele yöntemlerini oluşturmaktadır. Bu çalışma kapsamında enfeksiyonu tespit edilen ve moleküler olarak karakterize edilen BNYVV ise toprak kökenli bir etmen olduğu için mücadelesinde en önemli önlem bu hastalıktan ari olduğu bilinen alanlarda ıspanak yetiştiriciliği yapılmasıdır. BNYVV'nin toprak kökenli vektörü olan *P. betae* isimli fungus olmasına rağmen, vektör mücadelesi yapmak hem ekonomik olmayacağı hem de etkin sonuçlar vermeyeceği için tavsiye edilmemektedir.

Yüksek lisans tezi kapsamında gerçekleşen bu çalışma ile Çanakkale ili ve ilçelerindeki ıspanak üretim alanlarında BNYVV'nin varlığı tespit edilerek, moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışma ile ülkemizde ilk kez BNYVV'nin B patotipi bulunmuştur. Bundan sonra gerçekleştirilmesi muhtemel çalışmalarda ıspanak tarımında enfeksiyon meydana getiren virüslere karşı dayanıklılık ve çeşit ıslahı gibi çalışmalara ağırlık verilmesinin önemli olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abe H., Tamada T., 1986. Association of Beet Necrotic Yellow Vein Virus with Isolates of *Polymyxa betae* Keskin. Japanesse of Journal Phytopathology. 52 (2): 235-247.

Ahmad S., Ali A., Ahmad M., Ullah N., Afridi U.K., Bostan N., Qureshi R., Tawwab S., Ahmad I., Zubair M., 2018. Characterization of Beet Necrotic Yellow Vein Virus in Pakistan. Journal of Plant Pathology, 100 (2): 357-357.

Akca İ., Yilmaz N.D.K., Kızılkaya R., 2014. Evaluation of Suppression of Rhizomania Disease by Earthworm (*Lumbricus terrestris* L.) and Its Effects on Soil Microbial Activity in Different Sugar Beet Cultivars. Archives of Agronomy and Soil Science, 60 (11): 1565-1575.

Anonim 2019. http://www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpvno=391&figno=13. Erişim Tarihi: 09.04.2019

Asher M.J.C., Thompson K., 1987. Rhizomania in Europe, British. Sugar Beet Review, 55 (48) : 24-28.

Asher M.C.J., Kerr S., 1996. Rhizomania Progress with Resistant Varieties. British Sugar Beet Review, 64 (2): 19-22.

Asher M., 1999. Sugar-beet Rhizomania The Spread of A Soilborne Disease. Microbiology Today, 26: 120-122.

Autonell C.R., Turina M., Fantino M.G., 1995. Spinach Virus Infections in Italy. Plant Disease, 45 (1): 43-47.

Borodynko N., Rymelska N., Hasiów-Jaroszewska B., Pospieszny H., 2009. Molecular Characterization of Three Soil-Borne Sugar Beet-Infecting Viruses Based on the Coat Protein Gene. Journal of Plant Pathology, 91 (1) : 191-193.

Bürcky K., 1987. BNYVV Resistenz Indizierende Merkmale und Deren Mögliche Nützung Zur Selektion Rhizomania Toleranter Zuckerrüben. Proceedings of the 50th Congress of the IIRB, 11-12.

Canova A., 1959. Appunti Di Patologie Della Barbabietola. Informatore Fitopatologica 9: 390- 396.

Chiba S., Kondo H., Miyanishi M., Andika I.B., Han C., Tamada T., 2011. The Evolutionary History of Beet Necrotic Yellow Vein Virus Deduced From Genetic Variation, Geographical Origin and Spread, and the Breaking of Host Resistance. Molecular Plant-Microbe Interactions, 24 (2): 207-218.

Choueiri E., Younis H., Issa S., Hassan S.H., El Takach T., Saad A., Hanna L., 2001. Occurrence and Distribution of Sugar Beet Viruses in Lebanon [Beta vulgaris L.]. Phytopathologia Mediterranea, 40 (3): 260-264.

Clark M.F., Adams A.N., 1977. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. Journal of General Virology, 34 (3): 475-483.

Correll J.C., Morelock T.E., Black M.C., Koike S.T., Brandenberger L.P., Dainello F.J., 1994. Economically Important Disease of Spinach. Plant Disease, 78 (7): 653-659.

Darabi S., Jamali M., Bazrafshan M., Mahmoudi S.B., 2015. Detection of Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) in Some Common Weeds of Sugar Beet Fields in Fars Province. Journal of Sugar Beet, 30 (2): 81-88.

Dinant S., Lot H., 1992. Lettuce Mosaic Virus. Plant Pathology, 41 (5): 528-542.

Erbay E., 2010. Gediz Havzası Ispanak Üretim Alanlarında Görülen Virüs Hastalıklarının Belirlenmesi Üzerinde Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Türkiye.

Gökdağ S., 2014. Çanakkale İli Ispanak Alanlarında Görülen Viral Hastalıklar. Yüksek

Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Türkiye.
Gökdağ S., Karanfil A., Korkmaz S., 2014. Çanakkale İli Ispanak Alanlarındaki Şalgam Mozaik Virüsü ve Hıyar Mozaik Virüsü Varlığının Belirlenmesi, VII. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Çanakkale, Türkıye, 25-29 Ağustos 2015, ss.129.
Göksel Ö., Ertunç F., 2004. Amasya Şeker Fabrikası Şeker Pancarı Ekim Alanlarında Rhizomania Hastalığının Belirlenmesi. Tarım Bilimleri Dergisi, 11 (3): 339-343.
Gümüş M., Erbay E., Erkan S., Paylan I.C. 2014. Occurrence of Viruses Infecting Spinach in Western Anatolia of Turkey: The First Field Survey Report. Journal of Food, Agriculture & Environment, 12 (1): 272-275.
Harju V.A., Mumford R.A., Blockley A., Boonham N., Clovert G.R.G., Weekes R., Henry C.M., 2002. Occurrence in the United Kingdom of Beet Necrotic Yellow Vein Virus İsolates Which Contain RNA 5. Plant Pathology, 51: 811.
Karanfil A., Gökdağ S., Korkmaz S., 2016. Çanakkale İli Ve İlçeleri Ispanak Üretim Alanlarındaki Pancar Nekrotik Sarı Damar Virüsü (Beet Necrotic Yellow Vein Virus; BNYVV) Enfeksiyonunun Araştırılması. Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi, 592, 5-8 Eylül, Konya.
Kaya R., 2009. Distribution of Rhizomania Disease in Sugar Beet Growing Areas of Turkey. Eurasian Journal of Soil Science. 15(4): 332-340.
Koenig R., Lüddecke P., Haeberle A.M., 1995. Detection of Beet Necrotic Yellow Vein Virus Strains, Variants and Mixed İnfections by Examining Single-Strand Conformation Polymorphisms Of İmmunocapture RT-PCR Products. Journal of General Virology, 76 (8): 2051-2055.
Koenig R., Lüdecke P., Haeberle A.M., 1997. Detection and Characterization of a Distinct Type of Beet Necrotic Yellow Vein Virus RNA 5 in a Sugar Beet Growing Area in Europe. Archives of Virology, 142 (7): 1499-1504.
Koenig R., Lennefors B.L., 2000. Molecular Analyses of European A, B And P Type Sources of Beet Necrotic Yellow Vein Virus And Detection of the Rare P Type İn Kazakhistan. Archives of Virology, 145 (8): 1561–1570.
Kruse M., Koenig R., Hoffman A., Kaufmann A., Commandeur U., Solevyev A.G., Savenkov I., Burgermeister W., 1994. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Reverse Transcription-PCR Products Reveals the Existence of Two Major Strain Groups of Beet Necrotic Yellow Vein Virus. Journal of General Virology, 75 (8): 1835–1842.
Kumar S., Stecher G., Tamura K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Molecular Biology and Evolution, 33 (7): 1870–1874.
Kutluk N.D., Erkan S., Biçken S., Haas H.U., Hurle K., 2000. Weeds As Hosts for Rhizomania Agent. Proceedings 20th German Conference On Weed Biology And Weed Control, 17: 167-171.
Kutluk-Yılmaz N.D., Yanar Y., 2001. Study on the Distribution of Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) in Sugar Beet Growing Area of Tokat –Turkey. Journal of Turkish Phytopathology, 30 (1): 21-25.
Kutluk-Yılmaz N.D., Saracoglu S., Sevik M.A., Arli-Sokmen M., 2005. A Survey on the Incidences of Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV), Beet Soilborne Virus (BSBV) and Their Vector, *Polymyxa Betae* Keskin in Sugar Beet Fields in Northern and Central Parts of Turkey. Working Group On Plant Viruses with Fungal Vectors, 146.
Kutluk-Yılmaz N.D., Sökmen M.A., 2007a. Orta Karadeniz Bölgesi Şeker Pancarı Üretim Alanlarında Belirlenen Beet Necrotic Yellow Vein Virus İzolatlarında RNA-

5'in Araştırılması. Türkiye II. Bitki Koruma Kongresi, 27-29 Ağustos, Isparta, S.303.
Kutluk-Yılmaz N.D., Meunier A., Schmit J.F., Stas A., Bragard C., 2007b. Partial Nucleotide Sequence Analysis of Turkish Isolates of Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) RNA-3. Plant Pathology, 56 (2): 311-316.
Kutluk-Yılmaz N.D., Sokmen M.A., Kaya R., Sevik M.A., Tunali B., Demirtaş S., 2016a. The Widespread Occurrences of Beet Soil Borne Virus and RNA-5 Containing Beet Necrotic Yellow Vein Virus Isolates in Sugar Beet Production Areas in Turkey. European Journal of Plant Pathology, 144 (2): 443-455.
Kutluk-Yılmaz N.D., Altop E.K., Phillippo C.J., Mennan H. 2016b. New Natural Weed Host *Raphanus raphanistrum* L.(Brassicaceae) for Beet Necrotic Yellow Vein Virus And its Vector *Polymyxa Betae* Keskin. Turkish Journal Of Agriculture and Forestry, 40 (1): 120-126.
Kutluk-Yılmaz N.D., Arli-Sokmen M., Kaya R., Sevik M.A., Tunali B., Demirtas S., 2016c. The Widespread Occurrences of Beet Soil Borne Virus And RNA-5 Containing Beet Necrotic Yellow Vein Virus Isolates in Sugar Beet Production Areas in Turkey. European Journal of Plant Pathology, 144 (2): 443–455.
Kutluk-Yılmaz N.D., Uzunbacak H., Arli-Sokmen M., Kaya R., 2018. Distribution of Resistance-Breaking Isolates of Beet Necrotic Yellow Vein Virus Differing in Virulence in Sugar Beet Fields in Turkey. Acta Agriculturae Scandinavica Section B—Soil & Plant Science, 68 (6): 546-554.
Kurtoğlu A., 2019. Çanakkale İli Ispanak Üretim Alanlarında Hıyar Mozaik Virüsü (Cucumber Mosaic Virus; CMV) Enfeksiyonunun Tanılanması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Türkiye.
Lennefors B.L., Savenkov E.I., Mukasa S.B., Valkonen J.P.T., 2005. Sequence Divergence of Four Soilborne Sugar Beet-Infecting Viruses. Virus Genes, 31 (1): 57-64.
Lennefors B.L., 2006. Molecular Breeding for Resistance To Rhizomania in Sugar Beets. Swedish University of Agricultural Sciences, 2006. Doctoral Thesis, 41pp. Uppsala.
Li R., Mock R., Huang Q., Abad J., Hartung J., Kinard G., 2008a. A Reliable and in Expensive Method of Nucleic Acid Extraction for the PCR-Based Detection of Diverse Plant Pathogens. Journal of Virological Methods, 154 (1-2): 48-55.
Li M., Liu T., Wang B., Han C., Li D., Yu J., 2008b. Phylogenetic Analysis of Beet Necrotic Yellow Vein Virus Isolates From China. Virus Genes, 36 (2): 429-432.
Liu H.Y., Sears J.L., Lewellen R.T., 2005. Occurrence of Resistance-Breaking Beet Necrotic Yellow Vein Virus of Sugar Beet. Plant Disease, 89 (5): 464-468.
Liu H.Y., Mou B., Richardson K., Koike S.T., 2010. First Report of Beet Necrotic Yellow Vein Virus Infecting Spinach in California. Plant Disease, 5: 640.
Lunello P., Ducasse D.A., Helguera M., Nome S.F., Conci V.C., 2002. An Argentinean Isolate of Leek Yellow Stripe Virus From Leek Can Be Transmitted To Garlic. Journal of Plant Pathology, 84 (1): 11-17.
Mehrvar M., Valizadeh J., Koening R., Bragard C.G., 2009. Iranian Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV): Pronunced Diversity of the p25 Coding Region in A-type BNYVV and Identification of P-type BNYVV Lacking A Fifth RNA Species. Archives of Virology, 154: 501-506.
Mou B., Richardson K., Benzen S., Liu H., 2011. Effects of Beet Necrotic Yellow Vein Virus in Spinach Cultivars. Plant Disease, 96 (5): 618-622.
Mouhanna A.M., Nasrallah A., Langen G., Schlösser E., 2002. Surveys for Beet Necrotic Yellow Vein Virus (The Cause of Rhizomania), Other Viruses, and Soil-Borne

Fungi Infecting Sugar Beet in Syria. Journal of Phytopathology, 150 (11-12), 657-662.
Muhire B.M., Varsani A., Martin D.P., 2014. SDT: A Virus Classification Tool Based on Pairwise Sequence Alignment and Identity Calculation. Plos One, 9 (9): 0108277.
Nouayti F., Tahiri A., Madani I., Blenzar A., Lahlali R., 2019. Detection and Prevalence of Viruses Associated with Sugar Beet in the Tadla Region of Morocco. Journal of Plant Pathology, 101 (1): 173-177.
Özdemir H., 2014. Trakya Bölgesi Şeker Pancarı Üretim Alanlarında Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV), Beet Western Yellows Virus (BWYV) ve Beet Yellows Virus (BYV) Hastalıklarının Saptanması Üzerine Araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Türkiye.
Özer G., Ertunç F., 2005. Amasya Şeker Fabrikası Şeker Pancarı Ekim Alanlarında Rhizomonia Hastalığının Belirlenmesi. Tarım Bilimleri Dergisi, 11 (3): 339-343.
Özgör O.E., 1995. Türkiye Şeker Pancarı Hastalıkları. Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş. Genel Müdürlüğü, 218: 33-47.
Parrella G., Gognalons P., Gebre-Selassié K., Volvas C., Marchoux G., 2003. An update of the host Range of Tomato Spotted Wilt Virus, Journal of Plant Pathology, 85: 227-264.
Pavli O.I., Stevanato P., Biancardi E., Skaracis G.N., 2011. Achievements and Prospects in Breeding for Rhizomania Resistance in Sugar Beet. Field Crops Research, 122 (3): 165-172.
Putz C., Vuittenez A., 1980. The Intracellular Location of Beet Necrotic Yellow Vein Virus. Journal of General Virology, 50 (1): 201-204.
Putz C., Merdinoğlu O., Lemaire O., Stocky G., Valentin P., Wiedemann S., 1990. Beet Necrotic Yellow Vein Virus, Causal Agent of Sugar Beet Rhizomania. Rewiew Plants Pathology, 69 (5): 247-254.
Rush C.M., Heidel G.B., 1995. Furovirus Diseases of Sugar Beets in the United States. Plant Disease, 79 (9) : 868-875.
Rysanek P., Homa I., Zouhar M., 2005. Study of Sugar Beet Viruses Transmitted by *Polymyxa betae* in the Czech Republic. IV Internatıonal Symposium on Sugar Beet Protection, Held from 26-28 September.
Schirmer A., Link D., Cognat V., Moury B., Beuve M., Meunier A., Bragard C., Gilmer D., Lemaire O., 2005. Phylogenetic Analysis of Isolates of Beet Necrotic Yellow Vein Virus Collected Worldwide. Journal of General Virology, 86 (10): 2897-2911.
Stevanato P., De Biaggi M., Broccanello C., Biancardi E., Saccomani M., 2015. Molecular Genotyping of “Rizor” and “Holly” Rhizomania Resistances in Sugar Beet. Euphytica, 206 (2), 427-431.
Subinova V., Bojnansky V., Kollerova E., 2002. Weeds-Alternative Hosts of Rhizomania Virus (BNYVV) in the Slovak Republic. Agriculture-Journal for Agricultural Sciences, 48 (11): 566-572.
Tamada T., Baba T., 1973. Beet Necrotic Yellow Vein Virus From "Rhizomania" Affected Sugar Beet in Japan. Japanesse of Journal Photopathology, 39: 325-352.
Tamada T, Abe H, Saito M, Kiguchi T, Harada T., 1989. Production and Pathogenicity of Isolates of Beet Necrotic Yellow Vein Virus with Different Numbers of RNA Components. Journal of General Virology, 70: 3399–3409.
Tok S., Erkan S., 2006. Bursa ve Çanakkale İllerinde Bazı Yörelerde Yetiştirilen Şeker Pancarı Bitkilerindeki Virüs Hastalıklarının Saptanması. Ege Üniversitesi,

Ziraat Fakültesi Dergisi, 43 (1): 45-53.
TÜİK, 2016. https://biruni.tuik.gov.tr/medas (Erişim Tarihi:01.10.2018).
Weiland J.J., Bornemann K., Neubauer J., Khan M.F., Bolton M., 2019. Prevalence and Distribution of Beet Necrotic Yellow Vein Virus Strains in North Dakota and Minnesota. Plant Disease, https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0360-RE
Whitney E.D., Duffus J.E., 1991. Rhizomania (beet necrotic yellow vein virus). Compendium of Beet Diseases and Insects, APS Pres, 2009 76p, USA.
Wilson A.D., 1983. Studies of Two Cucumber Mosaic Virus Isolates From Spinach in the Winter Garden Area of Texas. PhD Thesis, Texas A&M University, College Station.
Yardımcı N., Kılıç H.C., 2011. Identification of Beet Necrotic Yellow Vein Virus in Lakes District: A Major Beet Growing Area in Turkey. Indian Journal of Virology, 22 (2): 127.
Yardımcı N., Çulal-Kılıç H., Ürgen G., 2012. Eskişehir İli Şeker Pancarı Üretim Alanlarında Görülen Bazı Virüs Hastalıklarının DAS-ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 5(1), 42-50.
Yılmaz N.D., Erkan S., 2003. Şeker Pancarında Rhizomania hastalığı. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 20 (1): 64-72.
Zare B., Niazi A., Sattari R., Aghelpasand H., Zamani K., Sabet M. S., Kazemi-Tabar, S. K., 2015. Resistance Against Rhizomania Disease Via RNA Silencing in Sugar Beet. Plant Pathology, 64 (1): 35-42.
Zhuo N., Jiang N., Zhang C., Zhang Z. Y., Zhang G. Z., Han C. G., Wang Y., 2015. Genetic Diversity and Population Structure of Beet Necrotic Yellow Vein Virus in China. Virus Research, 205, 54-62.
Žižytė M., Staniulis J., Zitikaitė I., 2006. Identification of Beet Necrotic Yellow Vein Virus Isolate Detected in Lithuania. Agronomy Research, 4: 475-478.

EKLERİ

EK 1. Çanakkale ili pancar nekrotik sarı damar virüsü izolatının (CNK-Spinach-39) nükleotid sekans dizilimleri

ATGTCGAGTGAAGGTAGATATATGACATGGAAGGATATGTCACATAATAAGTT
TATGACCGATCGATGGGCTCGTGTTTCGGACGTCGTGAGTGTTATTAAACAATC
GCATGCTATGGACTTGTCCAAGGCTGCGAATCTATCTATAATTAAAACTGCTTT
GGCAGGATTAGGCTCGGGTTGGTCTGACAATAATCCTTTTGTGTCTCCGATGAC
CCGTTTTCCACAGACACTAACTATGTATGGTGCACTTGTGTTATATGTTAATCT
GTCTGACCCAGAATTTGCGTTGATAATGACTAAGGTAAATACTTTAACTGATTC
AGGGTTAGCAGATAATGCATCTGCTAATGTACGTAGAGATGTGGTGTCTGGAA
ATAAAGCTGAATCATCCGGTAAAACTGCTGGTACTAATGAGAACTCTGCTTAT
ACGCTTACTGTCAGTCTTGCTGGTTTAGCTCAAGCTCTTAGGCTTGAAGAATTA
ATATGGACCCGGGCTAAATTTGAGGACCGGTTCAAATTACCATGGACACCTGT
TCAAGGTAGAACCAGTCCACACCGACAATGG

EK 2. Çanakkale ili pancar nekrotik sarı damar virüsü izolatının (CNK-Spinach-39) amino asit sekans dizilimleri

MSSEGRYMTWKDMSHNKFMTDRWARVSDVVSVIKQSHAMDLSKAANLSIIKTA
LAGLGSGWSDNNPFVSPMTRFPQTLTMYGALVLYVNLSDPEFALIMTKVNTLTDS
GLADNASANVRRDVVSGNKAESSGKTAGTNENSAYTLTVSLAGLAQALRLEELI
WTRAKFEDRFKLPWTPVQGRTSPHRQW

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Zeynep BAĞLAN

Doğum Yeri: DENİZLİ / ACIPAYAM

Doğum Tarihi: 21.07.1994

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: ÇOMÜ Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: ÇOMÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI -Diğer

b) Bildiriler -Uluslararası -Ulusal

c) Katıldığı Projeler

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: Şahlar Tarım Metal İnşaat Hafriyat Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi (2017)

Çiçek Demeti Süs Bitkileri Limited Şirketi (09.2018- hala çalışıyor)

İLETİŞİM

E-posta Adresi: zeynep324@hotmail.com