



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

**HATAY VE TEKİRDAĞ İLLERİ BAĞ ALANLARINDA ODUN
DOKUSUNDA DEFORMASYONA (RUGOSE WOOD) NEDEN OLAN
VİRÜSLERİN SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
SAPTANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

BAHAR TUNÇ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
ARALIK-2016**



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

**HATAY VE TEKİRDAĞ İLLERİ BAĞ ALANLARINDA ODUN
DOKUSUNDA DEFORMASYONA (RUGOSE WOOD) NEDEN OLAN
VİRÜSLERİN SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
SAPTANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

BAHAR TUNÇ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
ARALIK-2016**

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

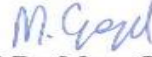
**HATAY VE TEKİRDAĞ İLLERİ BAĞ ALANLARINDA ODUN DOKUSUNDA
DEFORMASYONA (RUGOSE WOOD) NEDEN OLAN VİRÜSLERİN
SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE SAPTANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Bahar TUNÇ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Mona GAZEL danışmanlığında hazırlanan bu tez 29/12/2016 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Mona GAZEL
Başkan



Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN
Üye



Yrd. Doç. Dr. Diğdem İLHAN OKSAL
Üye

Kod No:

Prof. Dr. Erdal SERTKAYA
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 15165

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

29.12.2016

TEZ BİLDİRİMİ

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

Bahar TUNÇ

ÖZET

HATAY VE TEKİRDAĞ İLLERİ BAĞ ALANLARINDA ODUN DOKUSUNDA DEFORMASYONA (RUGOSE WOOD) NEDEN OLAN VİRÜSLERİN SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE SAPTANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Bağ yetiştiriciliğinin oldukça önemli olduğu Hatay ve Tekirdağ illerinde yetiştirilen farklı bağ çeşitlerinde odun deformasyonuna neden olan etmenleri araştırmak amacıyla 2015-2016 yıllarında çalışmalar yürütülmüştür. Yerli ve yabancı bağ çeşitlerinden olmak üzere Hatay'dan toplam 100, Tekirdağ'dan 133 örnek alınmıştır. Odun deformasyonuna neden olan etmenlerden *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine virus D* (GVD) ve *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV)'leri DAS-ELISA ve/veya RT-PCR yöntemleri ile araştırılmıştır. DAS-ELISA sonuçlarına göre Hatay'da farklı bağ çeşitlerinde GVA %4,77 enfeksiyon oranında bulunurken, Tekirdağ ilinden alınan örneklerin hiçbirisinde GVA saptanamamıştır. Hatay ve Tekirdağ illerinden alınan bağ örneklerinin RT-PCR yöntemiyle testlenmesi sonucu sırası ile en çok GVA (%69 ve %17), ve GRSPaV (RSP48-49 primeri ile %39 ve %40,6; RSP13-14 primeri ile %41 ve %12,96) bulunmuştur. GVD sadece Hatay ilinde %4 enfeksiyon oranıyla saptanırken GVB testlenen örneklerde bulunamamıştır. En çok rastlanan çoklu enfeksiyonlar ise GVA+GRSPaV (Hatay'da %37, Tekirdağ'da %12) olarak belirlenmiştir. Yapılan RT-PCR analizleri sonucunda GVA (429 bp), GVD (852 bp) RSPaV48-49 (330 bp) ve RSPaV13-14 (339 bp) için beklenen düzeyde DNA amplifikasyonları gözlenmiştir. GRSPaV'ünün seçilen 4 izolatının DNA dizilemesi yapılmış ve Gen Bankasında kayıtlı referans izolatlarla % 98-99 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

2016, 43 sayfa

Anahtar Kelimeler: Bağ, GVA, GVB, GVD, GRSPaV, ELISA, RT-PCR

ABSTRACT

SEROLOGICAL and MOLECULAR DETECTION and CHARACTERIZATION OF VIRUSES, WHICH ARE CAUSAL AGENTS OF WOOD DEFORMATION (RUGOSE WOOD) IN GRAPEVINE PRODUCING AREAS IN HATAY AND TEKİRDAĞ PROVINCES

Causal agents of rugose wood were investigated in different grape cultivars in Hatay and Tekirdağ provinces where grapevine cultivation is very important in 2015-2016. Totally 100 samples from Hatay and 133 samples from Tekirdağ were collected from foreign and local grape cultivars. Causal agents of rugose wood, *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine virus D* (GVD) and *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV) were tested by DAS-ELISA and/or RT-PCR. According to DAS-ELISA results, GVA was detected with 4,77% infection rate in different grapevine cultivars in Hatay. All tested samples were found negative for GVA in Tekirdağ province. In RT-PCR analysis, the most common virus in Hatay and Tekirdağ provinces was found as GVA (69% and 17%), GRSPaV(with RSP48-49 primer pairs 39% and 40,6%; with RSP13-14 primer pairs 41% and 12,96%). GVD was found only in Hatay province with 4% infection rate and GVB was not found in all tested samples. The most encountered multiple infections were detected GVA+GRSPaV (in Hatay 37%, in Tekirdağ 12%). In RT-PCR analysis of DNA amplification of viruses, GVA (429 bp), GVD (852 bp) RSPaV48-49 (330 bp) ve RSPaV13-14 (339 bp) were obtained. Selected four isolate of GRSPaV were sequenced and they showed 98-99% homology with the reference isolates deposited in GeneBank.

2016, 43 pages

Key words: Grapevine, GVA, GVB, GVD, GRSPaV ELISA, RT-PCR,

TEŞEKKÜR

Tez çalışmanın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, değerli fikir ve katkılarıyla ışık tutan ve yönlendiren danışman hocam sayın Prof. Dr. Mona GAZEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını, değerli görüş ve katkılarını esirgemeyen hocam sayın Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN'a da en içten teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Zir. Müh. H.Deniz KOCABAĞ'a, Zir. Müh. Mehtap ACIOĞLU'na, Zir. Müh. Hülya ÜSTÜNKAYA'ya ve adlarını burada zikredemediğim, ancak yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tezimin her aşamasında ve hayatta beni her konuda destekleyen aileme sabır ve anlayışlarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
1.GİRİŞ	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM	11
3.1.Arazi çalışmaları ve örnekleme	11
3.2. Serolojik Çalışmalar	11
3.2.1. DAS ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzim Linked Immunosorbent Assay) Yöntemi.....	11
3.3. Moleküler Çalışmalar	12
3.3.1. Bağ Örneklerinden Toplam Nükleik Asit İzolasyonu (TNA)	12
3.3.2. Reverse Transcription-Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PCR) Analizleri	14
3.3.2.1. Reverse Transkripsiyon (RT)	14
3.3.2.2. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR).....	14
3.3.3. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Jel Elektroforez.....	15
3.3.4. DNA Dizileme ve BLAST Analizi.....	16
3.3.5. Filogenetik Analiz	16
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	17
4.1. Arazi Çalışmaları	17
4.2. DAS-ELISA sonuçları	18
4.3. Bağ örneklerinden toplam nükleik asit izolasyonu (TNA).....	20
4.4. Bağ örneklerinin RT-PCR ile Testlenmesi	23
4.5. DNA Dizileme ve Filogenetik Analiz	31
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	34
6. KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	40
EKLER.....	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1.	<i>Grapevine rupestris stem pitting associated virus</i> ile enfekteli bağ omcalarında gözlenen gerişme geriliği simptomları (A ve B).	17
Şekil 4.2.	<i>Grapevine rupestris stem pitting associated virus</i> ile enfekteli bağlarda gözlenen A- yapraklarda küçülme B- dane kaybı ve verim azalması simptomları.....	18
Şekil 4.3.	ELISA çalışmalarından görüntüler.....	19
Şekil 4.4.	Tekirdağ'dan alınan bağ sürgünlerinin MacKenzi yöntemi ile modifiye edilen Qiagen Plant mini kiti ile izole edilen 200 numaralı örneğe ait RNA'nın spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçüm grafiği	20
Şekil 4.5.	Hatay'dan alınan bağ sürgünlerinin MacKenzi yöntemi ile modifiye edilen Qiagen Plant mini kiti ile izole edilen 197 numaralı örneğe ait RNA'nın spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçüm grafiği	20
Şekil 4.6.	Tekirdağ'dan alınan bağ sürgünlerinin MacKenzi yöntemi ile modifiye edilen Qiagen Plant mini kiti ile izole edilen 204 numaralı örneğe ait RNA'nın spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçüm grafiği	21
Şekil 4.7.	Hatay'dan alınan bağ sürgünlerinin MacKenzi yöntemi ile modifiye edilen Qiagen Plant mini kiti ile izole edilen 66 numaralı örneğe ait RNA'nın spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçüm grafiği	21
Şekil 4.8.	Hatay' dan alınan bağ sürgünlerinin MacKenzi yöntemi ile modifiye edilen Qiagen Plant mini kiti ile izole edilen 115 numaralı örneğe ait RNA'nın spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçüm grafiği	22
Şekil 4.9.	Hatay'dan alınan bağ sürgünlerinin MacKenzi yöntemi ile modifiye edilen Qiagen Plant mini kiti ile izole edilen 141 numaralı örneğe ait RNA'nın spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçüm grafiği	22
Şekil 4.10.	Hatay ilinden toplanan bağ örneklerinin <i>Grapevine virus A</i> (GVA) 'ya karşı yapılan RT-PCR analizi sonucu elde edilen jel görüntüsü M: Marker; 64, 65, 68, 69, 70, 72, 73, 93, 103, 141, 153 GVA negatif örnekler, 66, 74, 75,77, 79, 82, 85, 87, 90, 98, 112, 126, 119, 128, 130, 133, 147 GVA pozitif örnekler; +C: Pozitif kontrol W: Su kontrol	28
Şekil 4.11.	Tekirdağ ilinden toplanan bağ örneklerinin <i>Grapevine rupestris stem pitting associated virus</i> (GRSPaV)' üne karşı RSP13-14 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi sonucu elde edilen jel görüntüsü M: Marker; 1,7, 37, 152, 153, 157, 158, 190, 193, 196, 197, 199, 205, 209, 23, 20, 33 GRSPaV negatif örnekler, 17, 22, 38 GRSPaV pozitif örnekler; +C: Pozitif kontrol W: Su kontrol.	29

Şekil 4.12. Hatay ilinden toplanan bağ örneklerinin <i>Grapevine rupestris stem pitting associated virus</i> (GRSPaV)'üne karşı RSP48-49 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi sonucu elde edilen jel görüntüsü M: Marker; 66, 68, 73, 74, 88, 98, 112, 128, 130, 153, 103, 141 GRSPaV negatif örnekler, 72, 75, 79, 87, 119, 126 GRSPaV pozitif örnekler; +C: Pozitif kontrol W: Su kontrol	29
Şekil 4.13. Hatay ilinden toplanan bağ örneklerinin <i>Grapevine virus D</i> (GVD)'e karşı yapılan RT-PCR analizi sonucu elde edilen jel görüntüsü M: Marker; 64, 65, 66, 74, 75, 79, 85, 82, 87 GVD negatif örnekler, 77 GVD pozitif örnek; +C: Pozitif kontrol W: Su kontrol.....	30
Şekil 4.14. Tekirdağ bağ örneklerinden elde edilen GRSPaV izolatlarının gen bankasında kayıtlı izolatlarla karşılaştırılması sonucu elde edilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde, MEGA 6 yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendrogramda bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir.....	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Türkiye'nin son beş yıldaki toplam bağ alanları ve yıllık üzüm üretimi.....	1
Çizelge 1.2.	Odun deformasyonları (Rugose wood) kompleksine neden olan hastalık etmenleri ve vektörleri	3
Çizelge 3.1.	Bağlarda farklı virüslerin PCR analizlerinde kullanılan, virüslere spesifik primer çiftlerinin dizilimleri, baz büyüklükleri ve çoğaltılan gen bölgesi	15
Çizelge 4.1.	Hatay ve Tekirdağ ili bağ alanlarından toplanan örneklerin RT-PCR ile testlenmeleri sonucunda GVA, GVB, GVD ve GRSPaV'leri ile enfekteli bulunma durumları	23
Çizelge 4.2.	Hatay ve Tekirdağ ili bağ alanlarından toplanan örneklerin RT-PCR analizleri sonucu farklı virüslerle karışık enfekteli olma durumları	25
Çizelge 4.3.	Tekirdağ ilinden toplanan farklı bağ çeşitlerinin RT-PCR analizleri sonucu çeşitlerde GVA, GRSPaV, GVB ve GVD virüslerinin bulunma durumu.....	26
Çizelge 4.4.	Hatay ilinden toplanan farklı bağ çeşitlerinin RT-PCR analizleri sonucu çeşitlerde GVA, GRSPaV, GVB ve GVD virüslerinin bulunma durumu.....	27

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
bp	: Baz çifti
°C	: Sıcaklık
Da	: Dekar
gr	: Gram
kb	: Kilo baz
M	: Molar
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Mili molar
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
pmol	: Piko mol

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
cDNA	: Komplementer DNA
CP	: Örtü protein
d ₂ H ₂ O	: Çift distile su
DAS-ELISA	: Double Antibody Sandwich-Enzym Linked Immunosorbent Assay
dk	: Dakika
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	: Enzym Linked Immunosorbent Assay
EtBr	: Ethidium Bromid
ETOH	: Ethanol
GFkV	: <i>Grapevine fleck virus</i>
GFLV	: <i>Grapevine fan leaf virus</i>
GLRaV-1	: <i>Grapevine leaf roll-associated virus-1</i>

GLRaV-3	: <i>Grapevine leaf roll-associated virus-3</i>
GLRaV-7	: <i>Grapevine leaf roll-associated virus-7</i>
GRSPaV	: <i>Grapevine rupestris stem pitting associated virus</i>
GVA	: <i>Grapevine Virus A</i>
GVB	: <i>Grapevine Virus B</i>
GVD	: <i>Grapevine virüs D</i>
GVE	: <i>Grapevine virüs E</i>
IgG	: Immunogamma Globulinler
ISE	: Immunosorbent electron microscope
M.Ö	: Milattan Önce
NaCL	: Sodyum klorür
PCR	: Polimeraz zincir tepkimesi
PVP	: Polyvynil-Pyrolidone
RFLP	: Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RNA	: Ribonükleik Asit
RNase	: Ribonükleaz
rpm	: Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
RSP	: <i>Rupestris stem pitting</i>
RT	: Revers Transcription
RT-PCR	: Reverse transcriptase-polyrenose chain reaction
SSCP	: Single-strand conformation polymorphism
TAE	: Tris Asetat EDTA
TBRV	: <i>Tomato black ring virus</i>
UV	: Ultraviyole
V	: Volt

1.GİRİŞ

Yerkürenin bağcılık için en elverişli iklim kuşağı üzerinde bulunan ülkemiz, asmanın gen merkezi olmasının yanı sıra son derece eski ve köklü bir bağcılık kültürüne de sahiptir. Anadolu'da bağcılık kültürünün tarihi oldukça eskiye dayanır. Ülkemizin değişik bölgelerinde yapılan arkeolojik kazılardan Anadolu'da bağcılık kültürünün M.Ö. 3000 yılına kadar dayandığı saptanmıştır. Arkeolojik buluntulardan Anadolu'da Hititler zamanında asma ve şarabın büyük önem taşıdığı, M.Ö. 1800-1550 yıllarında bağcılığın çok gelişmiş olduğu, dini merasimlerde ve sosyal yaşantıda üzüm ve şarabın tanrılara adak olarak sunulduğu kaydedilmektedir. Tarih boyunca Anadolu'da elde edilen üzümlerin bir kısmı kuru ve yaş olarak tüketilmiş, bir kısmı ise pekmez, pestil ve lokum şeklinde değerlendirilmiştir (Oraman, 1965).

Yurdumuzda ihraç edilen ürünlerimiz arasında olan üzümün besin değeri oldukça yüksek olup, yapılan araştırmalara göre A, B, B2 ve C vitaminleri içermektedir. Üzüm sofralık tüketim dışında kurutmalık, şaraplık, şıralık ve konserve olarak da tüketilebildiğinden yılın her ayı beslenmede kullanılmaktadır. Son yıllarda üzüm yaprağı ihraç edilerek te önemli bir gelir elde edilmektedir.

Kültür asmasının anavatanı olarak bilinen ülkemizde bağcılık önemli bir tarım kolu durumundadır. TÜİK istatistiklerine göre üzüm üretimi açısından ülkemizin son beş yıllık üretimi incelendiğinde 2015 yılında ülkemiz bağ alanlarında ve üretimde gerilemenin olduğu gözlenmektedir (Çizelge 1.1.) (Anonim, 2015).

Dünya bağcılığında İspanya, Fransa, İtalya ve Çin'den sonra üretimde beşinci sırayı alan ülkemiz üretim miktarı bakımından 4.234.305 ton ile dünya sıralamasında 6. sırada bulunmaktadır (Anonim, 2014).

Çizelge 1.1. Türkiye'nin son beş yıldaki toplam bağ alanları ve yıllık üzüm üretimi

Yıllar	Alan (da)	Üretim (ton)
2010	4.777.856	4.255.000
2011	4.725.454	4.269.351
2012	4.622.959	4.275.659
2013	4.687.922	4.011.409
2014	4.670.929	4.175.356
2015	4.619.557	3.650.000

Diğer tüm ürünlerde olduğu gibi bağıcılığımızı tehdit eden önemli zararlı ve hastalıklar mevcuttur. Dünyada bağlarda yapılan çalışmalar sonucunda bağlarda (*Vitis* ve *Muscadinia*) 60' tan fazla farklı virüs saptanmıştır. Bu virüsler 3 farklı hastalık kompleksiyle ilişkilendirilmiştir. Bu hastalık kompleksleri;

- 1) Bulaşıcı dejenerasyon (Infectious degeneration) (Avrupa ve Akdeniz nepovirüsleri) ve geriye doğru ölüm (Amerikan nepovirüsleri),
- 2) Yaprak kıvrılma,
- 3) Odun dokusunda deformasyon (Rugose wood) (Martelli, 2014).

Ülkemizde bu hastalık gruplarından bulaşıcı dejenerasyon ve yaprak kıvrıcıklığı virüslerinin serolojik yöntemle saptanması konusunda birçok çalışma yapılmış olup (Özaslan ve Yılmaz, 1995; Çağlayan, 1997; Yılmaz ve ark., 1997; Akbaş ve ark., 2007, 2009) moleküler yöntemlerle bu virüslerin tanınması çalışmaları son yıllarda yapılmaya başlanmıştır (Buzkan ve ark., 2010; Kaya ve Erilmez, 2012).

Rugose wood ile enfekteli bağlarda simptomların daha şiddetli olduğu ve ilkbaharda tomurcukların açılmasının geciktiği gözlenmiştir. Bazen birkaç yıl içinde verim düşer ve bitki ölür. Aşılı bağlarda genellikle tomurcuk birleşimi üzerinde şişkinlik, aşu ve kalem nispi çapı arasında belirgin bir fark görülür. Bazı çeşitlerde kabuk ile aşu birleşimi son derece kalın, mantarimsı ve kaba bir görünüm ile yumuşak bir dokuya sahiptir. Odunsu dokuda tipik olarak çukur ve oluklar şeklinde belirti görülür. Bu değişiklikler aşıda ya da kalemden oluşabilir. Çoğu durumda, bazı çeşitlerde yaprak kıvrıcıklığı ile enfekteli yapraklara benzer şekilde kıvrılma sararma yada kızarıklık göstermesine rağmen yapraklarda spesifik simptomlar görülmeyebilir. Salkımlar daha küçük veya daha az olabilir. Enfekteli omcalarda verimin %55'ten %15'e düştüğü kaydedilmiştir (Walter ve Martelli, 1997; Martelli ve Boudon-Padieu, 2006).

Rugose wood, asmanın yetiştiği her yerde kompleks bir hastalıktır. Özellikle Akdeniz havzası ve Yakın Doğu'da yaygındır ama Kuzey ve Güney Amerika, Uzakdoğu (Çin, Japonya) ve Avustralasya (Avustralya, Yeni Zelanda, Yeni Gine adası, Pasifik Okyanusu)' da da rapor edilmiştir. Simptomlar sıcak iklimlerde daha belirgin olarak görülür. Bağlarda gövde deformasyonları (rugose wood) kompleksine 4 farklı virüsün neden olduğu saptanmıştır: 1) GRSPaV; *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (Meng ve ark., 1998), 2) GVA; Kober stem grooving (Garau ve ark.,

1997), 3) GVB ve GVD; Corky bark, 4) taksonomik sınıflandırması yapılmamış virüs; LN33. Bağlarda saptanan GVE (gövde çukurlaşması) ve GVF (aşı uyumsuzluğu) ise bu hastalık kompleksi ile ilişkili bulunmamıştır. *Foveavirus* cinsinin üyesi olarak kaydedilen GRSPaV son derece önemli bir etmen olup yaygın bir hastalıktır. Vektörü henüz bilinmemektedir. GVA (Kober stem grooving) ve GVB (mantarimsı kabuk) sırasıyla her ikisinde *Vitivirus* cinsinin üyeleri olup yarı kalıcı olarak unlu bitlerle taşınır. *Vitivirus* cinsinin unlu bitlerle taşınan yeni üyesi GVE son yıllarda Japonya'da rugose wood semptomları gösteren bağlarda kaydedilmiştir. LN33 gövde oluklaşması rugose wood hastalık kompleksinin bir üyesidir ve diğerleri gibi çoğaltma materyalleri ile yayılır (Çizelge 1.2.).

Çizelge 1.2. Odun deformasyonları (Rugose wood) kompleksine neden olan hastalık etmenleri ve vektörleri

HASTALIK	ETMEN	VEKTÖR
Rupestris stem pitting	<i>Grapevine rupestris stem pitting associated virus</i> (GRSPaV)	Bilinmiyor
Kober stem grooving	<i>Grapevine virus A</i> (GVA)	<i>Planococcus citri</i> , <i>Pl. ficus</i> , <i>Pseudococcus longispinus</i> , <i>Ps. affinis</i> , <i>Helicococcus bohemicus</i> , <i>Phenacoccus aceris</i> , <i>Neopulvinaria innumerabilis</i> , <i>Parthenolecanium corni</i>
Mantarimsı kabuk	<i>Grapevine virus B</i> (GVB)	<i>Pl. ficus</i> , <i>Ps. Affinis</i>
LN33 gövde oluklaşması	Bilinmiyor	Bilinmiyor
Rugose wood benzeri hastalık	<i>Grapevine virus E</i> (GVE)	<i>Pseudococcus comstocki</i>

Bu etmenlerden *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) mekanik olarak taşınmayan bir etmen olup vektörü bilinmemektedir. GRSPaV, *Betaflexiviridae* familyası *Foveavirus* cinsine ait olup (Martelli ve ark., 2007) bağlarda en yaygın bulunan virüslerden biridir. Bu cinsteki virüsler 800 nm uzunluğunda ipliksi yapıya sahiptir. GRSPaV pozitif polariteli çift sarmallı birvirüs olup 8,7 kb boyutunda ve 3' ucunda poliadeninli yapıya sahiptir (Martelli ve Jelkman, 1998).

Virüsün genellikle birçok *Vitis vinifera* çeşidinde latent bulunması, etmenin aşılama yoluyla yeni tesis edilecek bağ alanlarına taşınabileceği riskini ortaya koymaktadır. Bu virüs sertifikasyon listesinde bulunmasına rağmen Türkiye'deki bağlarda varlığı ve değişkenliği ile ilgili bilgiler henüz mevcut değildir (<http://www.tarim.gov.tr/Belgeler/Mevzuat/Talimatlar/BUGEM>).

Bu çalışma ile bağ yetiştiriciliğinin oldukça önemli olduğu Hatay ve Tekirdağ illerinde yetiştirilen yerli ve yabancı bağ çeşitlerinde odun deformasyonuna neden olan etmenlerden *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine virus D* (GVD) ve *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV)'lerinin DAS-ELISA ve/veya RT-PCR yöntemleriyle saptanması amaçlanmıştır.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Diğer tüm ürünlerde olduğu gibi bağıcılığımızı tehdit eden önemli zararlı ve hastalıklar mevcuttur. Dünyada bağlarda yapılan çalışmalar sonucunda bağlarda (*Vitis* ve *Muscadinia*) 60'tan fazla farklı virüs saptanmış olup bunlardan 17 tanesi 3 büyük hastalık kompleksiyle ilişkili olarak saptanmıştır. Bu hastalık kompleksleri; bulaşıcı dejenerasyon ve geriye doğru ölüm, yaprak kıvrılma ve odun dokusu deformasyonları (Rugose wood)'dır (Martelli, 2014).

Odun dokusu deformasyonları, asmanın yetiştiği her yerde rastlanabilen kompleks bir hastalıktır. Özellikle Akdeniz havzası ve Yakın Doğuda yaygındır ama Kuzey ve Güney Amerika, Uzakdoğu (Çin, Japonya) ve Avustralasya (Avustralya, Yeni Zelanda, Yeni Gine adası, Pasifik Okyanusu)'da da rapor edilmiştir. Simptomlar sıcak iklimlerde daha belirgin olarak görülür. Bağlarda odun deformasyonları kompleksine 4 farklı virüs neden olmaktadır: 1) GRSPaV; *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (Meng ve ark., 1998), 2) GVA; Kober stem grooving (Garau ve ark., 1997), 3) GVB ve GVD; Corky bark, 4) spesifik olmayan virüs; LN33. *Foveavirus* cinsinde yer alan GRSPaV son derece önemli bir etmen olup yaygın olarak bulunmaktadır. Vektörü henüz bilinmemektedir. GVA (Kober stem grooving) ve GVB (mantarimsı kabuk) sırasıyla her ikisinde *Vitivirus* cinsinin üyeleri olarak ortaya çıkmıştır ve yarı kalıcı olarak unlu bitlerle taşınır. *Vitivirus* cinsinin unlu bitlerle taşınan yeni üyesi GVE son zamanlarda rugose wood simptomları ile Japonya'daki bağlarda kaydedilmiştir. LN33 gövde oluklaşması rugose wood hastalık kompleksi içinde yer almakta olup diğerleri gibi çoğaltma materyalleri ile yayılır.

Portekiz'de önemli bağ çeşitlerinde GVA ve GVB varyantlarının moleküler karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Portekiz GVA izolatları gen bankasına kayıtlı izolatlarla karşılaştırıldığında Portekiz izolatlarında birçok recombinant sekans saptanmış olup bu izolatlar coğrafik orijin ile ayrılmaksızın gruplama yapılmıştır. Gen bankasına kayıtlı GVB izolatları ile Portekiz izolatlarının filogenetik analizi sonucu 3 grup elde edilmiş ve Portekiz izolatları Grup I ve Grup II'de yer almış ve recombinant dizilim saptanmamıştır (Duarte ve ark., 2015).

GRSPaV'ü biyolojik indeksleme çalışmaları ile Avustralya'daki bağlarda %67, Almanya'daki bağlarda ise %42 oranında saptanmıştır. İran'da bu etmen saptanamamış

olup, Arjantin, Tayland, Bulgaristan ve İsrail’de yapılan çalışmalarda ise yüksek oranda bulunmuştur (Habibi, 2015). Polonya’da testlenen 460 örneğin 331 tanesinde GRSPaV bulunmuştur (Komorowska ve ark., 2014).

Yunanistan bağlarında RT-PCR yöntemiyle GVA, GVB ve GRSPaV’ünü saptamak amacıyla yapılan bir çalışmada aşılardan doğrudan köklendirilen varyetelerde GVA %37, GRSPaV %11 ve GVB ise %10 oranında saptanmıştır. Ancak aşıli varyetelerde GVA %44, GRSPaV %38, GVB ise %11 oranında bulunmuştur. Amerikan anaçlarında ise en yaygın virüs GRSPaV (%31) bulunurken bunu %4 ile GVA izlemiş ancak testlenen örneklerde GVB bulunmamıştır (Maraki ve ark., 2015).

GVD ile doğal enfekteli Tunus bağlarında virüsün moleküler karakterizasyonu yapılmış ve testlenen 284 örneğinin 112 tanesinde (%39,4) GVD enfeksiyonu saptanmıştır. Yapılan filogenetik analizlerde 2 adet Tunus GVD izolatu Brezilya izolatları (Garg ve Dolc) ile aynı grupta yer almış ve %91 nükleotid benzerliği göstermiştir. Diğer 5 GVD izolatu ise İtalyan izolatu Ab.Gh ile gruplanmış ve %93-98 oranında nükleotid benzerliği göstermiştir. Filogenetik analizlerde kullanılan diğer 3 izolat ağaçta farklı bir grupta yer almıştır (Selmi ve ark., 2015).

Şili’de GRSPaV’ünün varlığı ilk kez 2008 yılında saptanmış olup (Fiore ve ark., 2008) son yıllarda yapılan çalışmalarda testlenen 110 bağ örneğinin 65 tanesinde (%59,1) GRSPaV enfeksiyonu belirlenmiştir. Yapılan filogenetik analizlerde Şili GRSPaV izolatlarının 3 grupta toplandığı oldukça yüksek genetik değişkenlik gösterdiği ortaya konulmuştur (Zamorano ve ark., 2015).

Doğu ve Batı Azerbaycan illeri bağ alanlarında 2014 yaz aylarında önemli bağ yetiştiriciliği yapılan illerden yaprak kıvrılması ve kızarması, mozaik, yelpaze yaprak ve damar bantlaşması semptomları gösteren 176 bağ örneği toplanmıştır. Toplanan örneklerin ELISA yöntemi ile testlenmesi sonucunda testlenen örneklerin %46,7’sinin GVA ve %25,33’ünün GFLV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir (Mikaeili ve ark., 2015).

Kosova’da ticari bağ yetiştiriciliği yapılan alanlarda virüs ve virüs benzeri hastalıkların belirlenmesi amacıyla yapılan bir survey çalışmasından toplanan örneklerin ELISA yöntemiyle testlenmesi sonucu, GVA %11,1 ve GVB %1 oranında saptanmıştır (Dida ve ark., 2012). Yapılan RT-PCR analizleri sonucunda ise testlenen bağların % 80,4 oranında GRSPaV ile enfekteli bulunmuştur. GVA’nın, bağlarda oldukça yaygın

ve ekonomik olarak en önemli virüs hastalıklarından biri olan odun dokusu deformasyonları kompleksi içinde yer alan “Kober gövde oluklaşması (Kober stem grooving)” sendromu ile ilişkili olduğu bulunmuştur. GVB’nin ise bu kompleks içinde yer alan “mantarimsı kabuk (corky bark)” sendromunun olası etmeni olduğu belirlenmiştir (Saldarelli ve ark., 1996).

LN33 bitkileri GVA, GLRaV1, RSP, GVB ve sınıflandırılmayan bir *Tymovirus* ile doğal olarak enfekteli Tramier bağ çeşidinden alınan aşı gözleri ile inokule edilmişlerdir. İnokulasyondan 4 yıl sonra sağlıklı ve enfekteli bağların sürgün ağırlıkları arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir. Mantarimsı kabuk simptomları veya GVB enfeksiyonunun tahrip edici etkileri inokule edilmiş bağlar üzerinde görülmemiştir. Vejetasyon periyodunun başlangıcında alınan dormant sürgünler ELISA veya RT-PCR yöntemi ile bağ virüslerinin saptanması için kullanılmıştır. Kullanılan primerlerin yeterli derecede spesifik olmayışı ve virüsün genetik varyasyonunu yansıtmamasından dolayı GLRaV-1’in saptanmasında ELISA yöntemi RT-PCR yöntemine göre beklenmedik şekilde daha etkili bulunmuştur (Kominek ve ark., 2009).

RSP ile RSPaV-1’ in ilişkisini doğrulamak için önemli bağ yetiştiriciliği yapılan 4 ülkeden RSP indikatör bitkisi (St. George *Vitis rupestris* Scheele) üzerine aşıl原因an bağlar toplanmış ve RT-PCR yöntemi ile RSPaV-1 için testlenmiştir. Kullanılan primer setlerine bağlı olarak, aşıl原因an RSP pozitif bağların % 85 ile %100’ nün RSPaV-1 spesifik dizilime sahip olduğu ortaya koyulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre RSPaV-1’in RSP’nin etmeni olduğu ortaya koyulmuştur (Meng ve ark., 1999a)

GRSPaV’nin 24 izolatından elde edilen 190 cDNA klonunun sekans edilmesi sonucu bağlarda GRSPaV’nün 4 büyük varyant grubu olduğu saptanmıştır (Meng ve ark., 2006).

GVA ile doğal enfekteli İtalyan bağlarında GVA’nın kılıf proteinin genetik çeşitliliği ve populasyon yapısı RT-PCR, RFLP (*MseI*, *AluI*, *AcuI*) ve sekans analizleri ile belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışma kapsamında tüm CP (621 bp) geninin çoğaltılmasını sağlayan yeni bir primer çifti (CP1 F/R) geliştirilmiştir. *AcuI* ile yapılan RFLP analizlerinde 7 farklı (A, B, C, D, E, F ve G) profil saptanmıştır. En yaygın varyant kombinasyonunun izolatların %39’unda A+B şeklinde olduğu saptanmıştır. GVA sekans analizleri sonucunda bitkilerin birden fazla GVA varyantı ile enfekteli olduğu ortaya koyulmuştur (Murolo ve ark., 2008).

Damar nekrozu tüm Avrupa bağ çeşitlerinde latenttir. Etmen 110R anacı (*Vitis rupestris* × *Vitis berlandieri*) hariç birçok Amerikan *vitis* türlerinin hibritlerinde yaprak kenarlarında, küçük damarlarda nekrozlara neden olur. Damar nekrozu güney İtalya’da çok yaygın olup, son yıllarda bitki sağlığı geliştirilmesi kapsamında yapılan bir çalışmada 110R anacına aşılı 218 adet bağ klonunun 109’unda damar nekrozu gözlenmiştir. Yapılan ELISA testlemelerinde aynı bağların birçok virüs ile (GFLV, GVA, GVB, GLRaV-1, GLRaV-3, GLRVaV-7, GFkV) düşük oranda (<%4) enfekteli oldukları saptanmıştır. Damar nekrozu ile pozitif bulunan 110R indikatör bitkilerinde PCR ve Western blot yöntemleri ile GRSPaV’nin varlığını belirlemek amacıyla yapılan testlemelerde, bu virüs ve damar nekrozu belirtileri arasında oldukça yüksek oranda (%98) bir ilişki olduğu ortaya koyulmuştur. GRSPaV’den ari *V. rupestris* bitkilerine tepe aşısı yapılan 110R bitkilerinde damar nekrozu belirtileri gelişmiştir. GRSPaV enfekteli 110R sürgünlerinin semptom gösteren alt yapraklarında saptanabilmiş ancak aynı sürgünün semptomsuz üst yapraklarında saptanamamıştır (Bouyahia ve ark., 2005).

Spesifik oligonükleotidlerle yapılan RT-PCR çalışmaları sonucunda, virüsün RSP hastalığı ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Meng ve ark., 1998; 1999a, Zhang ve ark., 1998, Nolasco ve ark., 2000; Stewark ve Nassuth, 2001). Ayrıca 2 adet GRSPaV izolatının kılıf proteinleri *Escherichia coli*’ye aktarılmış ve fusion protein spesifik poliklonal antiserumun üretilmesinde kullanılmıştır. Bu antiserumlar GRSPaV’nin Western blot, dot-immunobinding ve indirect ELISA ile saptanması için kullanılmıştır (Minafra ve ark., 2000; Meng ve ark., 2003). GRSPaV partikülleri immunosorbent elektron mikroskobu (ISEM) ile de görsel hale getirilmiştir (Petrovic ve ark., 2003).

Yapılan moleküler ve serolojik çalışmalar GRSPaV’nin dünyada oldukça yaygın olduğu ve farklı virüs izolatlarının sekans analizleri sonucunda genomik değişkenliğin %25’e ulaştığı ortaya koyulmuştur (Meng ve ark., 1999b, 2005; 2006; Rowhani ve ark., 1999; Meng ve Gonsalves, 2000; Lima ve ark., 2006; Nolasco ve ark., 2006; Nakaune ve ark., 2008).

Yayınlanmış 2 adet primer çiftinin (RSP13-RSP14 ve RSP2-RSP21) etkinliğinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir diğer çalışmada Kuzey İtalya’dan farklı bölgelerden toplanan 56 bağ çeşidi testlenmiştir. Testlenen örneklerden 48 tanesi RSP13-14 primeri ile pozitif bulunurken 37 tanesi RSP2-21 ile pozitif bulunmuştur. Buna göre RSP13-14 primer çiftinin RSP2-21 primer çiftine göre daha geniş bir saptama kapasitesine sahip

olduğunu göstermiştir. CP geni RT-PCR ile çoğaltılmış ve ampikonlar SSCP (single-strand conformation polymorphism) ile analiz edilmiş ve nükleotid dizi analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, çeşide ve coğrafik orijine bağlı olmaksızın bu virüsün geniş bir değişkenliğe sahip olduğu saptanmıştır. 17 adet İtalyan GRSPaV izolatının sekans analizleri sonucunda izolatlar arasında %78,8-99,7 oranında moleküler benzerlik olduğu, sekans varyantlarının 4 gruba ayrıldığı ortaya koyulmuştur (Terlizzi ve ark., 2010).

Portekiz’de bağ alanlarında GRSPaV’nin varlığının RT-PCR ile belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada testlenen 133 bağ örneğinin 59’unun (%44) bu virüs ile enfekteli olduğu ortaya koyulmuştur (Mansinho ve ark., 1999).

Ülkemizde bu hastalık gruplarından bulaşıcı dejenerasyon ve yaprak kıvrıcıklığı virüslerinin serolojik yöntemle saptanması konusunda birçok çalışma yapılmış olup (Özaslan ve Yılmaz, 1995; Çağlayan, 1997; Yılmaz ve ark., 1997; Akbaş ve ark., 2009) bu virüslerin moleküler yöntemlerle tanılama çalışmaları son yıllarda yapılmaya başlanmıştır (Buzkan ve ark., 2010; Kaya ve Erilmez, 2012).

Hatay ili bağ alanlarında GVA’nın ELISA yöntemi ile testlenmesi kapsamında yapılan bir çalışmada Cardinal, Antep Karası ve Pafu çeşitlerinde GVA’nın en yaygın virüs olduğu ve GVA’nın GLRaV-1,-3 ile karşık enfekteli olduğu saptanmıştır. Testlenen 155 örneğin 5 tanesinin GVA, 11 tanesinin GVA + GLRaV(1+3) ve 1 tanesinin ise GVA + TBRV (*Tomato black ring virus*) ile enfekteli olduğu ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalar ile GVA’nın ELISA yöntemiyle ülkemizde ilk kez tespit edilmiş ve GVA partikülleri virüse spesifik antibody ile dekore edilerek elektron mikroskopla gözlenmiştir (Çağlayan, 1997).

Yurt dışında rugose wood kompleksine neden olan virüsler konusunda oldukça fazla çalışma yapılmış olmasına karşın ülkemizde GRSPaV’nin varlığı konusunda çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Tekirdağ ve Hatay illerinden toplanan yerli ve yabancı bağ çeşitlerinin RT-PCR yöntemiyle testlenmesi sonucunda Antep karası, Pafu, Chardonnay, Pinot Noir, Zinfandel çeşitlerinde GRSPaV’ü %46,97 oranında saptanmıştır (Gazel ve ark., 2015).

Doğu Akdeniz Bölgesi ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde yapılan bir çalışmada ise testlenen örneklerin %35’i GRSPaV ile enfekteli bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen 17 Türk izolatı gen bankasında kayıtlı diğer GRSPaV izolatları

ile karşılaştırıldığında oldukça yakın ilişkili bulunmuş ve izolatların nükleotid benzerliği %87-96 arasında bulunmuştur (Buzkan ve ark., 2015).

Türkiye’de yapılan diğer bir çalışmada ise GRSPaV’nin hızlı ve güvenilir tanısı için NCSI Gen Bankasına kayıtlı farklı varyantlar ait GRSPaV genomları kullanılarak dejenere primer tasarımı gerçekleştirilmiş ve FAM işaretli Universal Probe Library (UPL) probu ile Real-time PCR sisteminde optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Real-time RT-PCR çalışmaları sonucunda yeni tasarlanan dejenere primer çifti ve FAM işaretli UPL probunun 122 asma örneğinin 37’sinde pozitif sonuç verdiği, dejenere olmayan primer çifti ile SYBR Green I boyasının ise sadece 5 örnekte pozitif sonuç verdiği saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar, tasarlanan dejenere primer çiftinin sertifikasyon analizlerinde GRSPaV’nin hızlı ve güvenilir tanısı için başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir (Önder ve ark., 2016).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Arazi çalışmaları ve örnekleme

Arazi çalışmaları Hatay ve Tekirdağ illerinde yoğun olarak bağcılığın yapıldığı ilçelerde yürütülmüştür. Hatay'da Antep Karası ve Pafu, Tekirdağ'da ise Antep Karası, Kalecik Karası, Dimyat, Alicante Bouschet, Chardonnay, Pinot noir, Hamburg Misketi ve Alphonse Lavallee, Cardinal, Çavuş, Gamay, Palieri, Zinfandel, Şiraz gibi önemli yerli ve yabancı, sofralık ve şaraplık üzüm çeşitlerinden virüs belirtisi gösteren omcalardan örnekler alınmıştır. Survey çalışmaları 2014 ve 2015 yılı ilkbahar ve sonbahar dönemlerinde yürütülmüş olup, simptomlar kaydedilmiştir. Her bir omcanın dört farklı yerinden 10-15 cm uzunluğunda sürgün örnekleri alınarak uygun koşullarda laboratuvara getirilmiş ve testleninceye kadar +4 °C'de saklanmıştır. Örnekler kayıt altına alınarak simptomolojik açıdan karakteristik olanlar numaralandırılarak fotoğraflanmıştır. Bu çalışma kapsamında Hatay ilinden toplam 100, Tekirdağ ilinden ise 133 örnek toplanmıştır.

3.2. Serolojik Çalışmalar

3.2.1. DAS ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzim Linked Immunosorbent Assay) Yöntemi

DAS-ELISA testlerinde GVA belirteçleri (IgG ve konjugat) Bioreba-İsviçre'den, GVB belirteçleri ise Sediag-Fransa'dan temin edilmiştir. Her virüs için firmaların protokollerinde belirtilmiş olan sulandırma oranları dikkate alınmıştır. Bütün virüsler için ELISA testleri Clark ve Adams (1977)'a göre aşağıdaki şekilde yürütülmüştür.

- Kaplama tamponu (**Ek 1**) kullanılarak optimum konsantrasyona göre sulandırılmış IgG'ler, ELISA plakalarının her bir çukuruna 100'er µl olacak şekilde eklenmiş ve plakaların üzeri kapatılarak nemli bir ortamda 30°C'de 4 saat inkübe edilmiştir.
- İnkübasyondan sonra yıkama tamponu (**Ek 1**) ile tüm çukurlar en az üç kez yıkanmıştır. Yıkama tamponu (**Ek 1**) üç dakika süreyle çukurlarda bekletildikten

sonra ters çevrilerek plakalar boşaltılmış ve kâğıt havlu üzerine vurmak suretiyle kurutulmuştur.

- Alt alta gelecek şekilde her iki çukura hazırlanan bitki özsuından 100'er µl önceden düzenlenen ELISA planına göre eklenmiş ve plakanın üzeri kapatılarak +4 °C de bir gece boyunca inkübe edilmiştir.
- İnkübasyondan sonra plakalar çukurlar arası karışma olmayacak şekilde 3 kez yıkama tamponuyla (**Ek 1**) aynı şekilde yıkanarak kurutulmuştur.
- Enzimle işaretli IgG (konjugat) firmanın önerdiği sulandırma oranına uygun şekilde konjugat buffer (**Ek 1**) ile sulandırılarak her bir çukura 100'er µl konulmuş ve plakalar 30°C de 5 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyondan sonra yıkama tamponu ile tüm çukurlar aynı şekilde üç kez yıkanmıştır.
- 1 mg/ml p-nitrophenyl phosphate substrat buffer'a (**Ek 1**) eklenmiş her bir çukura 100'er µl konularak 30-60 dk veya gerekli görüldüğünde daha uzun süre oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir.
- Sonuçlar ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyundaki filtre kullanılarak değerlendirilmiştir. Buna göre negatif örneklerin optik densite (OD) ortalamalarının 2 katı ve daha üzerindeki değerleri veren örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir (Clark, 1981).

3.3. Moleküler Çalışmalar

3.3.1. Bağ Örneklerinden Toplam Nükleik Asit İzolasyonu (TNA)

Bağlardan toplanan örneklerden RNA izolasyonu Qiagen RNA Plant mini kitinin firma önerisine göre MacKenzie ve ark. (1997)'nin önerdiği modifiye yöntemle yapılmıştır. İlkbahar döneminde yapraklar, sonbahar ve kış döneminde ise sürgünlerden hazırlanan floem kazıntıları kullanılarak RNA ekstrakte edilmiştir.

- Örnekler sıvı azot ile ezildikten sonra ezilen dokudan 0,150 g alınıp 1,5 ml MacKenzie ekstrasyon bufferı (**Ek 2**) eklenerek ekstrakte edilmiştir.

- Ezilen bitki materyalinden 700 µl ependorf tüplere alınmış ve üzerine 150 µl %20'lik sarkozyl eklenmiş ve hafifçe karıştırılmıştır.
- Tüpler 70°C'deki su banyosunda ara ara karıştırılarak 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir.
- Daha sonra tüpler 14.000 rpm'de 5 dk süreyle santrifüj yapılmıştır.
- Santrifüj işleminden sonra tüplerdeki sıvı kısım pellet hareket ettirilmeden QIAshreader spin kolona (mor renkli) alınmıştır.
- Tüpler 14.000 rpm'de 2dk santrifüj yapılmıştır.
- Tüplerdeki sıvı kısım yeni ependorf tüplere alınmış ve üzerine 0,5 hacim %96'lık ETOH eklenerek pipetle karıştırılmıştır.
- Karışım, 2 ml koleksiyon tüpüne konulan RNasy mini spin kolonuna (pembe renkl) aktarılmıştır.
- Tüpler 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılmış daha sonra sıvı kısım atılmış ve karışımın kalan miktarı ile işlem tekrar edilmiştir
- RNasy mini spin kolonlar yeni ependorf tüplere yerleştirilerek, üzerine 700 µl RW1 buffer eklenmiştir.
- Kolonlar 10.000 rpm' de 2 dk santrifüj yapılmış ve daha sonra sıvı kısım atılmıştır.
- Kolonlar yeni ependorf tüplere aktararak üzerine 500 µl RPE buffer eklenmiş ve 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir Bu işlem iki kez yapılmıştır.
- Yeni ependorf tüplere kolanlar yerleştirilerek üzerine 40 µl RNase'dan ari su eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dk bekletildikten sonra 1 dk 10.000 rpm'de santrifüj yapılmış ve elde edilen RNA'lar kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

Bağlardan extrakte edilen RNA'ların miktar ve kalitelerinin ölçümleri Nanodrop spektrofotometre ile ölçülerek değerlendirilmiştir.

3.3.2. Reverse Transcription-Polimeraz Zincir Tepkimesi (RT-PCR) Analizleri

3.3.2.1. Reverse Transkripsiyon (RT)

Ekstrakte edilen RNA'lardan ilk aşamada cDNA elde edilmiştir. Her bir örnek için 1 µl Random hexamer primer, 6,5 µl d₂H₂O ve 5 µl RNA karıştırılarak PCR cihazında 94 °C'de 5 dakika ve -20 °C'de 5 dakika bekletildikten sonra üzerine 5xRT Buffer'dan (Fermatas) 4 µl, DTT (0.1 mM)'den 2 µl, dNTP (10 mM) 0,5 µl ve RT enziminden 1 µl eklenmiştir. PCR cihazında 42 °C'de 1 saat 72 °C'de 10 dakika olarak programlanmış ve cDNA aşaması tamamlanmıştır.

3.3.3.2. Polimeraz Zincir Tepkimesi (PCR)

GRSPaV, GVA, GVB ve GVD virüslerinin PCR yöntemiyle tespit edilmesinde kullanılan primer baz dizileri Çizelge 3.1'de verilmiştir. PCR karışımı GVA, GVB, GVD, RSPaV 48-49 için; 16,8 µl d₂H₂O, 2,5 µl 10XB (Fermantas), 0,5 µl dNTP (10 mM), 2 µl MgCl₂ (25 mM), virüse özgü 1 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl), 0,2 µl Taq-DNA polymerase (5 U/µl) ve 2 µl cDNA olacak şekilde hazırlanmıştır. RSPaV13-14 için ise; 16,8 µl d₂H₂O, 2,5 µl 10XB (Fermantas), 2 µl dNTP (2,5 mM), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), virüse özgü 0,5 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl), 0,125 µl Taq-DNA polymerase (5 U/µl) ve 2 µl cDNA olacak şekilde hazırlanmıştır.

PCR cihazı;

- GVA için; 1 döngü 94 °C'de 5 dakika; 35 döngü 94 °C'de 30 saniye, 55 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 1 dakika ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika
- GVB ve GVD için; 1 döngü 94 °C'de 5 dakika; 35 döngü 94 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 45 saniye, 72 °C'de 1 dakika ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika
- RSPaV virüsü için kullanılan her iki primer çifti (RSP48-RSP49 ve RSP13-PSP14) için; 1 döngü 94 °C'de 5 dakika; 35 döngü 94 °C'de 30 saniye, 57 °C'de 45 saniye, 72 °C'de 1 dakika ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika olarak programlanmıştır.

Çizelge 3.1. Bağlarda farklı virüslerin PCR analizlerinde kullanılan, virüslere spesifik primer çiftlerinin dizilimleri, baz büyüklükleri ve çoğaltılan gen bölgesi

Virüs adı	Primer Adı	Dizilim (5'-3')	Büyük- lük(bp)	Gen bölgesi	Referans
<i>Grapevine virus A (GVA)</i>	GVA V1	GAC AAA TGG CAC ACT ACG	429	MP/CP Gene	Minafra ve ark., 1994
	GVA C1	AAG CCT GAC CTA GTC ATC TTG G			
<i>Grapevine virus B (GVB)</i>	GVB V1	GTG CTA AGA ACG TCT TCA CAG C	459	CP Gene	Minafra ve ark., 1994
	GVB C1	ATC AGC AAA CAC GCT TGA ACC G			
<i>Grapevine virus D (GVD)</i>	GVD F	GACGCAGGGATGTACCTTAG GACG	852	CP and the RNA binding Protein (RNA-BP)	Fajardo ve ark., 2012
	GVD R	CCTCTACTTATGGAAATTGCG CTC			
<i>Grapevine rupestris stem pitting associated virus (GRSPaV)</i>	RSP 48	AGC TGG GAT TAT AAG GGA GGT	330	CP	Zhang ve ark., 1998
	RSP 49	CCA GCC GTT CCA CCA CTA AT			
<i>Grapevine rupestris stem pitting associated virus (GRSPaV)</i>	RSP 13	GATGAGGTCCAGTTGTTTCC	339	Helicase- like domain of ORF-1	Meng ve ark., 1999a
	RSP 14	ATCCAAAGGACCTTTTGACC			

3.3.3. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Jel Elektroforez

RT-PCR ürünlerinin görüntülenmesi için %1'lik Agaroz jel elektroforez işlemi yapılmıştır. 1 gr Agaroz, 100 ml 1x TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu içerisinde mikrodalga fırında çözündürülüp tarak yerleştirilmiş jel tepsisine düz bir zemin üzerinde dökülerek agarozun polimerizasyonu için 20 dk süre ile bekletilmiştir. Jelin polimerizasyonundan sonra tarak dikkatli bir şekilde alınıp jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir. 1xTAE tamponu tankın içersine jeli kapatacak şekilde döküldükten sonra jel çukurlarına DNA marker ile beraber PCR ürünleri yükleme tamponu ile jel çukurlarına yüklenmiştir. Yükleme tamamlandıktan sonra elektroforez güç kaynağı ile elektroforez tankına 150 V'luk elektrik akımı 40 dakika süreyle uygulanmıştır. Ethidium Bromid (EtBr) 0.5 µg/ml konsantrasyonda 100 ml suya karıştırılmış ve jel bu

karışım içerisinde 5-6 dakika tutularak boyanmıştır. Jel UV ışıktaki görüntülenip oluşan bantlara göre değerlendirilmiştir. Örnekler kullanılan pozitif kontrollerle karşılaştırılarak bant oluşturanlar pozitif, oluşturmayanlar negatif kabul edilerek jel görüntüleme cihazında fotoğraflanmıştır.

3.3.4. DNA Dizileme ve BLAST Analizi

Elde edilen izolatlar baz dizileri yapılmak üzere DNA dizileme yapan İontek, İstanbul firmasına gönderilmiştir. Firmanın gönderdiği baz dizilerinin analizi amacıyla BLAST (NCBI) veritabanı kullanılarak ve gen bankasında kayıtlı DNA'lar ile karşılaştırılmıştır.

3.3.5. Filogenetik Analiz

DNA dizileri “Mega5” Molecular Evolutionary Genetics Analysis programı kullanılarak Neighbour joining metodu ile sınıflandırılmıştır (Tamura ve ark., 2011).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Arazi Çalışmaları

Hatay ve Tekirdağ ili bağ alanları ziyaret edilmiş ve simptomolojik gözlemler sonucu virüs benzeri symptom gösteren bağlardan örnekler toplamakla beraber symptom gözlenmeyen bağlardan ise tesadüfi olarak örnekler alınmıştır. Hatay ili bağ alanlarından toplam 100, Tekirdağ ilinden ise toplam 133 örnek alınmış ve omcalarda gelişme geriliği, yapraklarda küçülme, meyve olgunlaşmasında gecikme ve danelerde küçülme symptomları gözlemlenmiştir (Şekil 4.1. Şekil 4.2.). Survey yapılan bağ alanlarında gözlenen bu symptomlar önceki çalışmalarla uyum içindedir. Yapılan çalışmalarda Rugose wood ile enfekteli bağlarda symptomların daha şiddetli olduğu ve ilkbaharda tomurcukların açılmasının geciktiği, birkaç yıl içinde verimin düştüğü ve bitkinin öldüğü gözlenmiştir. Aşılı bağlarda genellikle tomurcuk birleşimi üzerinde şişkinlik, aşı ve kalem nispi çapı arasında belirgin bir farklılık olduğu, bazı çeşitlerde kabuk ile aşı birleşimi son derece kalın, mantarimsı ve kaba bir görünüm ile yumuşak bir dokuya sahip olduğu, bazı çeşitlerde ise yaprak kıvrıcıklığı ile enfekteli yapraklara benzer şekilde kıvrılma sararma yada kızarıklık göstermesine rağmen yapraklarda spesifik symptomlar görülmediği rapor edilmiştir. Salkımların daha küçük veya daha az olduğu, enfekteli omcalarda verimin %55'ten %15'e düştüğü kaydedilmiştir (Walter ve Martelli, 1997; Martelli ve Boudon-Padieu, 2006).



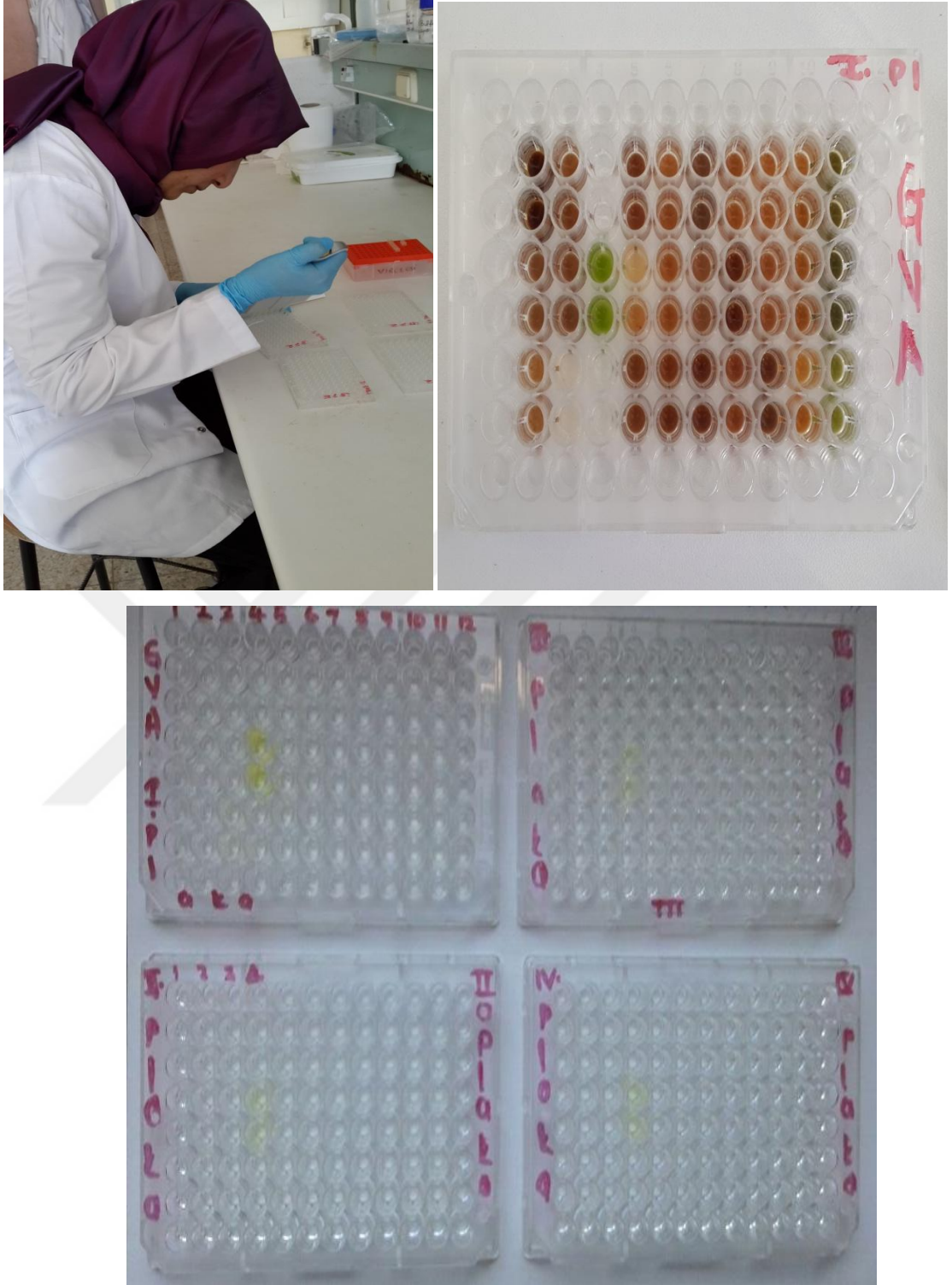
Şekil 4.1. *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* ile enfekteli omcalarda gözlenen gelişme geriliği symptomları (A ve B)



Şekil 4.2. *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* ile enfekteli bağlarda gözlenen A- yapraklarda küçülme B- dane kaybı ve verim azalması belirtileri

4.2. DAS-ELISA sonuçları

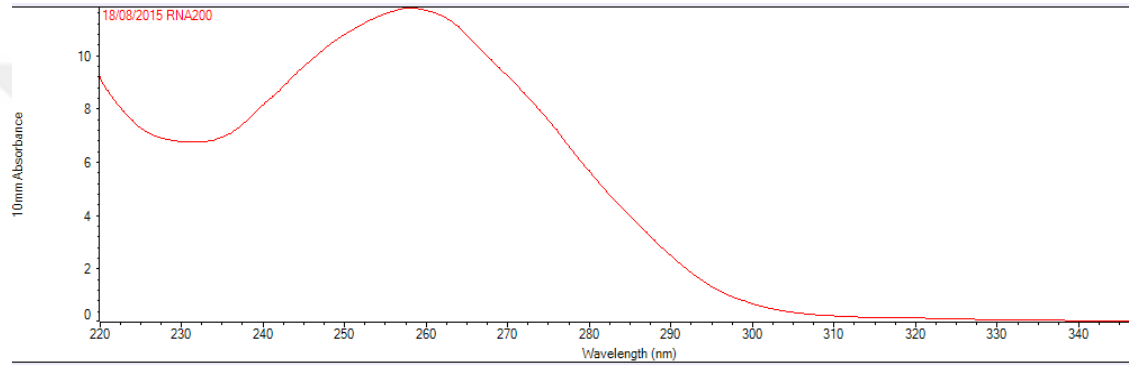
GVB ve GRSPaV'lerine karşı ticari firmalarda henüz antiserum üretilmemesinden dolayı Hatay ve Tekirdağ illerinden toplanan bağ örnekleri bu virüse karşı ELISA yöntemiyle testlenmemiştir. Tekirdağ ilinden toplam 102, Hatay ilinden ise 100 bitki örneği ELISA yöntemiyle sadece GVA açısından testlenmiştir. Hatay ilinde bu virüs ile enfeksiyon oranı %4,67 olarak saptanırken Tekirdağ ilinde bu virüs saptanmamıştır (Şekil 4.3.). ELISA testinde beklendiği gibi pozitif kontrol olarak kullanılan örneklerin absorbans değeri oldukça yüksek bulunurken negatif kontrollerde düşük absorbans değerleri elde edilmiştir. Köklü ve ark. (1999)'nın Trakya bölgesinde bağ alanlarında bulunan virüsleri biyolojik indeksleme ve ELISA testi ile belirlemeye çalışmışlar ve en yaygın virüslerin GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6, GLRaV-7, GVA ve GVB olduğu ve testlenen 165 örnekten 153 tanesinin (%92,7) bir veya birden fazla virüs ile enfekteli olduğunu ortaya koymuşlardır. İki veya daha fazla virüs ile karışık enfeksiyon oranının %75 olduğu ve bu karışımlarda en yaygın virüsün GVA olduğunu bildirmişlerdir.



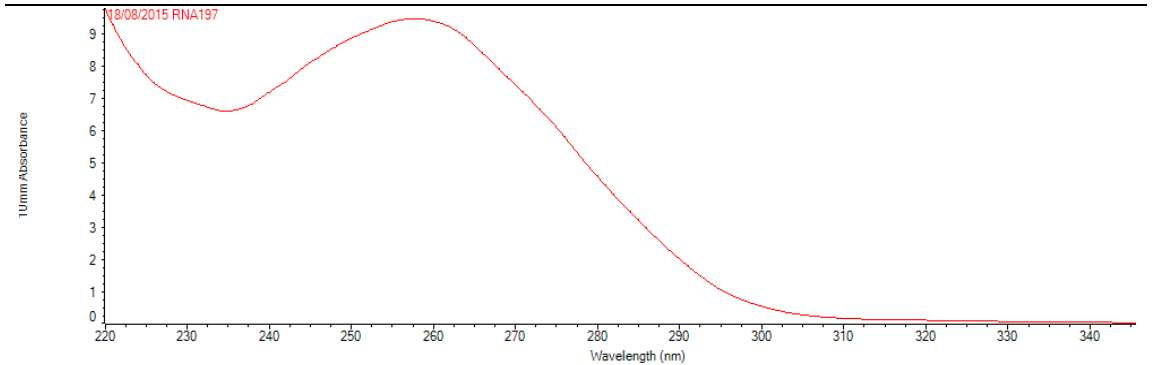
Şekil 4.3. ELISA çalışmalarından görüntüler

4.3. Bağ örneklerinden toplam nükleik asit izolasyonu (TNA)

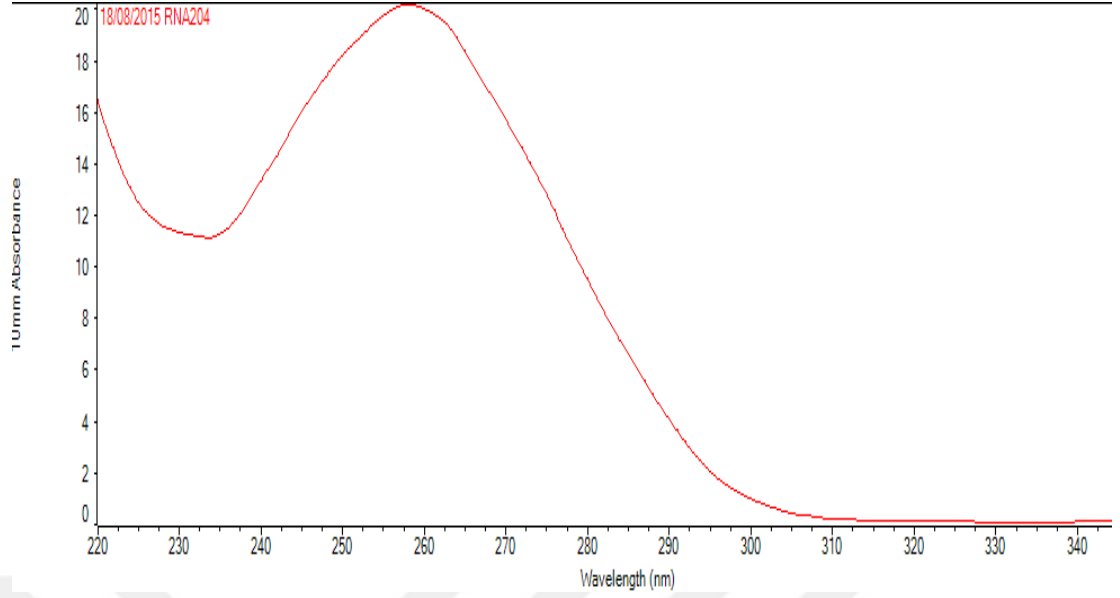
Araziden toplanan bağ örneklerinden yapılan TNA izolasyonunda elde edilen RNA'ların miktarı ve kalitesi nanodrop spektrofotometre ile ölçölmüştür. Ekstrakte edilen RNA'ların bazılarının miktarı ve kalitesi iyi olmakla beraber (Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7.) bazılarının ise oldukça düşük olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8., Şekil 4.9.). Kötü kalite RNA'ya sahip örnekler yeniden ekstrakte edilerek daha iyi kalite ve miktarda RNA elde edilmeye çalışılmıştır.



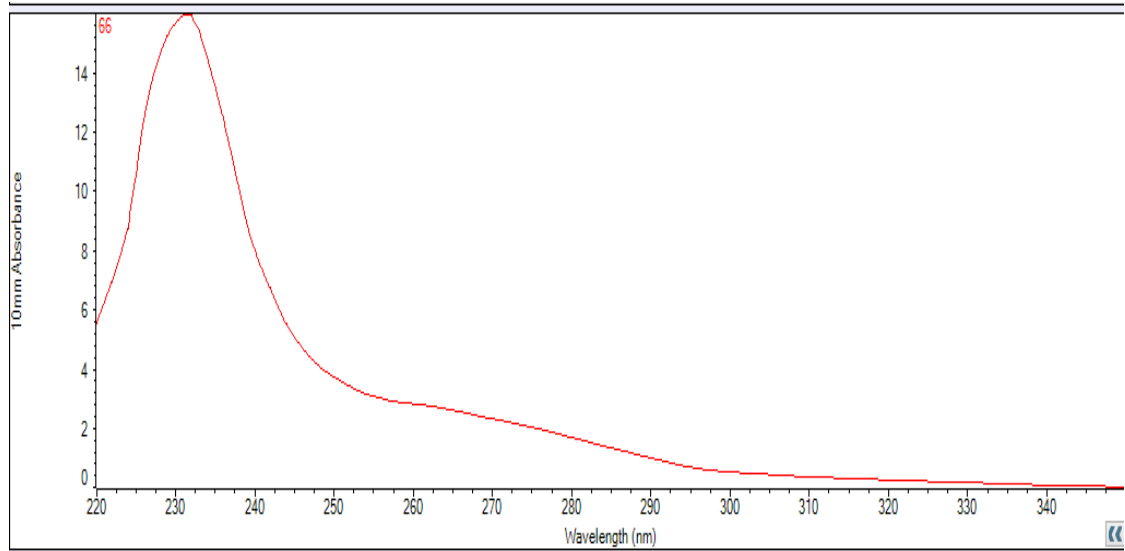
Şekil 4.4. Tekirdağ'dan alınan bağ sürgünlerinin MacKenzi yöntemi ile modifiye edilen Qiagen Plant mini kiti ile izole edilen 200 numaralı örneğe ait RNA'nın spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçüm grafiği



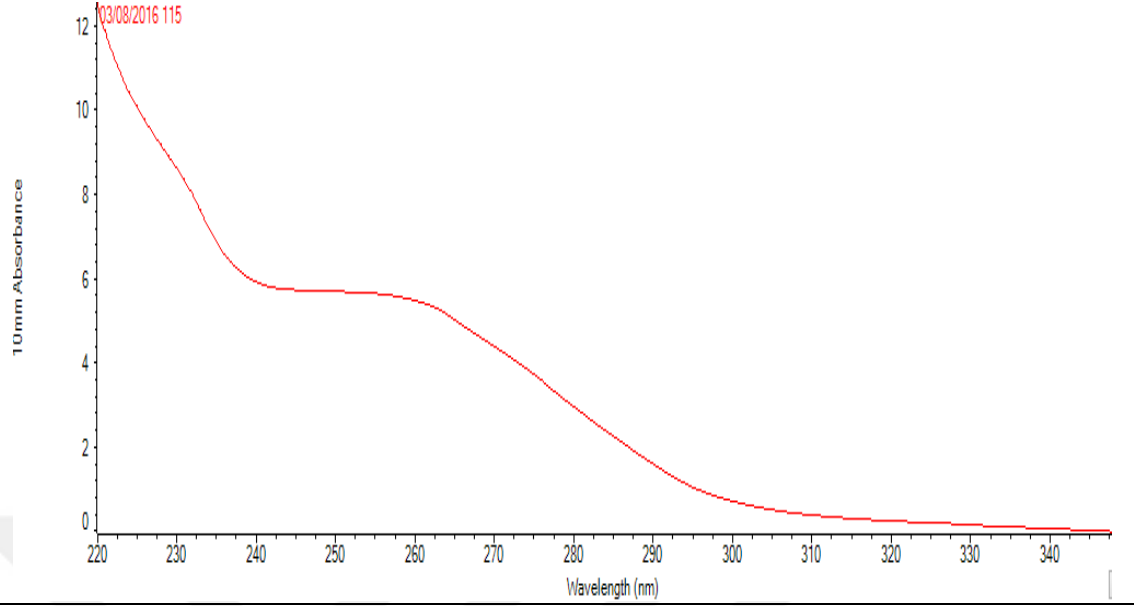
Şekil 4.5. Hatay'dan alınan bağ sürgünlerinin MacKenzi yöntemi ile modifiye edilen Qiagen Plant mini kiti ile izole edilen 197 numaralı örneğe ait RNA'nın spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçüm grafiği



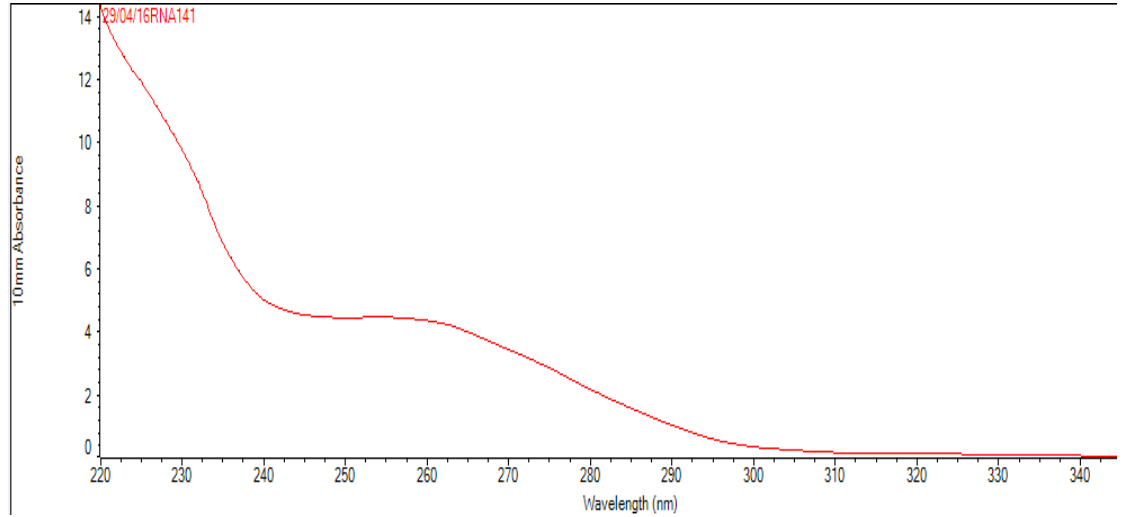
Şekil 4.6. Tekirdağ'dan alınan bağ sürgünlerinin MacKenzi yöntemi ile modifiye edilen Qiagen Plant mini kiti ile izole edilen 204 numaralı örneğe ait RNA'nın spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçüm grafiği



Şekil 4.7. Hatay'dan alınan bağ sürgünlerinin MacKenzi yöntemi ile modifiye edilen Qiagen Plant mini kiti ile izole edilen 66 numaralı örneğe ait RNA'nın spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçüm grafiği



Şekil 4.8. Hatay'dan alınan bağ sürgünlerinin MacKenzi yöntemi ile modifiye edilen Qiagen Plant mini kiti ile izole edilen 115 numaralı örneğe ait RNA'nın spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçüm grafiği



Şekil 4.9. Hatay'dan alınan bağ sürgünlerinin MacKenzie yöntemi ile modifiye edilen Qiagen Plant mini kiti ile izole edilen 141 numaralı örneğe ait RNA'nın spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçüm grafiği

4.4. Bağ örneklerinin RT-PCR ile Testlenmesi

Hatay ve Tekirdağ illerinden toplanan örnekler ile RT-PCR çalışmalarına başlamadan önce, pozitif olduğu bilinen bitki örnekleri kullanılarak laboratuvarıda sistem kurma çalışmaları yapılmıştır. GVA, GVD, GRSPaV için virüslere spesifik primer çiftleri kullanılarak RT işlemi sonucunda elde edilen cDNA'lar ile yapılan PCR analizi sonucunda GVA (429 bp), GVD (852 bp) GRSPaV (RSP48-49 primeri ile 330 bp ve RSP13-14 primeri ile 339 bp) için beklenen düzeyde DNA amplifikasyonları gözlenmiştir. GVB pozitif örnekleri ile yapılan PCR analizleri sonucunda örneklerde herhangi bir amplifikasyon gözlenmemiştir.

Hatay (100 örnek) ve Tekirdağ (133 örnek) illerinden toplanan bağ örneklerinden bir kısmı seçilerek RT-PCR yöntemiyle testlenmiştir. Bu örneklerin GVA, GVB, GVD, GRSPaV ile enfekte olma oranlarının RT-PCR analizleri ile saptanma durumları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Hatay ve Tekirdağ ili bağ alanlarından toplanan örneklerin RT-PCR ile testlenmeleri sonucunda GVA, GVB, GVD ve GRSPaV'leri ile enfekteli bulunma durumları

Virüsler	Hatay (E.Ö.S/T.Ö.S*)	Hatay Enfeksiyon Oranı(%)	Tekirdağ (E.Ö.S/T.Ö.S*)	Tekirdağ Enfeksiyon Oranı(%)
GVA	69/100	69	17/100	17
GVB	-	-	-	-
GVD	4/100	4	0/10	0
GRSPaV (RSP48-49 primeri)	39/100	39	54/133	40,6
GRSPaV (RSP13-14 primeri)	41/100	41	7/54	12,96

*E.Ö.S/T.Ö.S=Enfekteli Örnek Sayısı/Testlenen Örnek Sayısı

Çizelge 4.1.' de görüldüğü gibi Hatay ilinden testlenen bağ örneklerinin RT-PCR yöntemi ile testlenmesi sonucu, bu örneklerde saptanan en yaygın virüs GVA (%69) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10). Testlenen virüslerden GRSPaV için iki farklı primer çifti (RSPaV48-49 ve RSPaV13-14) kullanılmıştır. Bu primerlerle testlenen örneklerde GRSPaV'ünün enfeksiyon oranı kullanılan primere göre farklılık göstermiş olup RSPaV13-14 için %41 iken RSPaV48-49 için %39 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12.). Testlenen örneklerde GVD enfeksiyonu %4 olarak bulunurken (Şekil 4.13.), GVB pozitif kontrollerin optimizasyon çalışmaları yapılmış olup ancak herhangi bir amplifikasyon gözlenmemiştir. Pozitif kontrollerde bir optimizasyon sağlanmamış olmakla birlikte, bağ örnekleri de testlenmiş ve sonuçta hiçbir örnekte pozitif sonuç elde edilmemiştir. Bu nedenle GVB için yeni primerler sentezletilip aynı örneklerin yeni primerlerle tekrar testlenmesi gerekmektedir.

Tekirdağ ili bağ alanlarından toplanan örneklerde saptanan en yaygın virüs GRSPaV olarak belirlenmiş olup, enfeksiyon oranı kullanılan primere göre farklılık göstermiş olup RSPaV48-49 için %40,6 iken, RSPaV13-14 için %12,96 olarak belirlenmiştir. Testlenen örneklerin %17'sinin GVA ile enfekteli olduğu ortaya koyulmuştur. Tekirdağ'dan toplanan örneklerde GVD ve GVB enfeksiyonu saptanmamıştır. Yapılan bu çalışmada GRSPaV'ünün testlenmesinde kullanılan iki primer çiftinden RSPaV48-49'un daha geniş bir saptama kapasitesine sahip olduğu ortaya konulmuştur. Yayımlanmış 2 adet primer çiftinin (RSP13-RSP14 ve RSP2-RSP21) etkinliğinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir diğer çalışmada Kuzey İtalya'dan farklı bölgelerden toplanan 56 bağ çeşidi testlenmiştir. Testlenen örneklerden 48 tanesi RSP13-14 primeri ile pozitif bulunurken 37 tanesi RSP2-21 ile pozitif bulunmuştur. Buna göre RSP13-14 primer çiftinin RSP2-21 primer çiftine göre daha geniş bir saptama kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir (Terlizzi ve ark., 2010).

RT-PCR analizi sonuçlarına göre Hatay ve Tekirdağ illerinden toplanan bağ örneklerinin birden fazla virüs ile enfekteli olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.2.). Çizelge 4.2' de görüldüğü gibi RT-PCR analizleri ile yapılan testlemeler sonucunda karışık enfeksiyonların hepsinde GRSPaV ve GVA'nın yer aldığı görülmüştür. Hatay ili bağ alanlarından toplanan 100 örneğin 31 tanesi GRSPaV'ye spesifik 2 farklı primer ile pozitif bulunmuştur. Testlenen örneklerden 37 tanesinde GVA ve GRSPaV (RSP48-49 primeri) enfeksiyonları saptanırken, 29 örnekte ise GVA ve GRSPaV'nün her iki

primeri ile de pozitif bulunmuştur. 3 örnek hem GVA hem de GVD ile birlikte enfekteli, diğer 3 örnek ise, GVA, GVD ve GRSPaV (RSP48-49 primeri) virüsleri ile karışık enfekteli bulunmuştur. Tekirdağ ilinden alınan 135 bağ örneğinden 7 tanesi GRSPaV' ünün testlenmesinde kullanılan her iki primerle de pozitif sonuç vermiştir. Bunun yanında testlenen 100 örnekten 12 tanesi GRSPaV (RSPaV48-49 primeri ile) ve GVA ile enfekteli bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Hatay ve Tekirdağ ili bağ alanlarından toplanan örneklerin RT-PCR analizleri sonucu farklı virüslerle karışık enfekteli olma durumları

Virüsler	Hatay (K.E.Ö.S/ T.Ö.S*)	Hatay Karışık Enfeksiyon Oranı(%)	Tekirdağ (K.E.Ö.S/T .Ö.S*)	Tekirdağ Karışık Enfeksiyon Oranı(%)
GRSPaV(RSP48-49 ve RSP13-14 primeri)	31/100	26,95	7/133	5.26
GRSPaV (RSP48-49 primeri) ve GVA	37/100	37	12/100	12
GVA ve GVD	3/100	3	-	-
GVA,GVD ve GRSPaV (RSP48-49 primeri)	3/100	3	-	-
GVA, GRSPaV (RSP13-14, RSP48-49 primerleri)	29/100	29	-	-

*K.E.Ö.S/T.Ö.S: Karışık enfeksiyonlu örnek sayısı / Testlenen örnek sayısı

Tekirdağ ili bağ alanlarından toplanan, Antep Karası, Kalecik Karası, Dimyat, Alicante Bouschet, Chardonnay, Pinot noir, Hamburg Misketi ve Alphonse Lavallee, Cardinal, Çavuş, Gamay, Palieri, Zinfandel ve Şiraz çeşitlerinin RT-PCR analizi sonucunda GVA, GRSPaV (iki farklı gen bölgesi), GVB ve GVD virüsleri ile enfekteli olma durumları Çizelge 4.3.' te verilmiştir. Hatay ili bağ alanlarından toplanan Antep Karası ve Pafu çeşitlerinin RT-PCR analizi sonucunda GVA, GRSPaV (iki farklı gen bölgesi), GVB ve GVD virüsleri ile enfekteli olma durumları Çizelge 4.4.'te verilmiştir.

Köklü ve ark. (1999)'nın Trakya Bölgesi bağ alanlarından topladıkları örnekleri biyolojik indeksleme ve ELISA yöntemleri ile testlemişler ve en yaygın virüslerin GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6, GLRaV-7, GVA ve GVB olduğu ve testlenen 165 örnekten 153 tanesinin en az bir veya birden fazla virüs ile enfekteli olduğunu, testlenen örneklerde virüslerin enfeksiyon oranının %92,7 gibi çok yüksek bir oranda olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada iki veya daha fazla virüs ile karışık enfeksiyon oranının %75 olduğu ve karışık enfeksiyonlarda GVA'nın en yaygın virüs olduğu bildirilmiştir.

Çizelge 4.3. Tekirdağ ilinden toplanan farklı bağ çeşitlerinin RT-PCR analizleri sonucu çeşitlerde GVA, GRSPaV, GVB ve GVD virüslerinin bulunma durumu

Asma Çeşit Adı	Testlenen Toplam Örnek Sayısı	Virüslerle Enfekteli Bitki Örnek Sayısı				
		GVA	RSP13-14	RSP48-49	GVB	GVD
Alicante Bouschet	4	2	-	-	-	-
Alphonse Lavallee	7	-	1	2	-	-
Chardonnay	40	1	2	15	-	-
Cardinal	1	-	-	-	-	-
Çavuş	3	-	1	1	-	-
Dimyat	1	-	-	-	-	-
Gamay	3	-	-	1	-	-
Hamburg misketi	3	2	-	2	-	-
Kalecik karası	9	-	-	3	-	-
Palieri	5	3	1	3	-	-
Pinot noir	10	4	2	5	-	-
Zinfandel	2	1	-	1	-	-

Çizelge 4.3. (devam) Tekirdağ ilinden toplanan farklı bağ çeşitlerinin RT-PCR analizleri sonucu çeşitlerde GVA, GRSPaV, GVB ve GVD virüslerinin bulunma durumu

Şiraz	5	-	-	-	-	-
Bilinme-yen çeşit	40	4	-	21	-	-

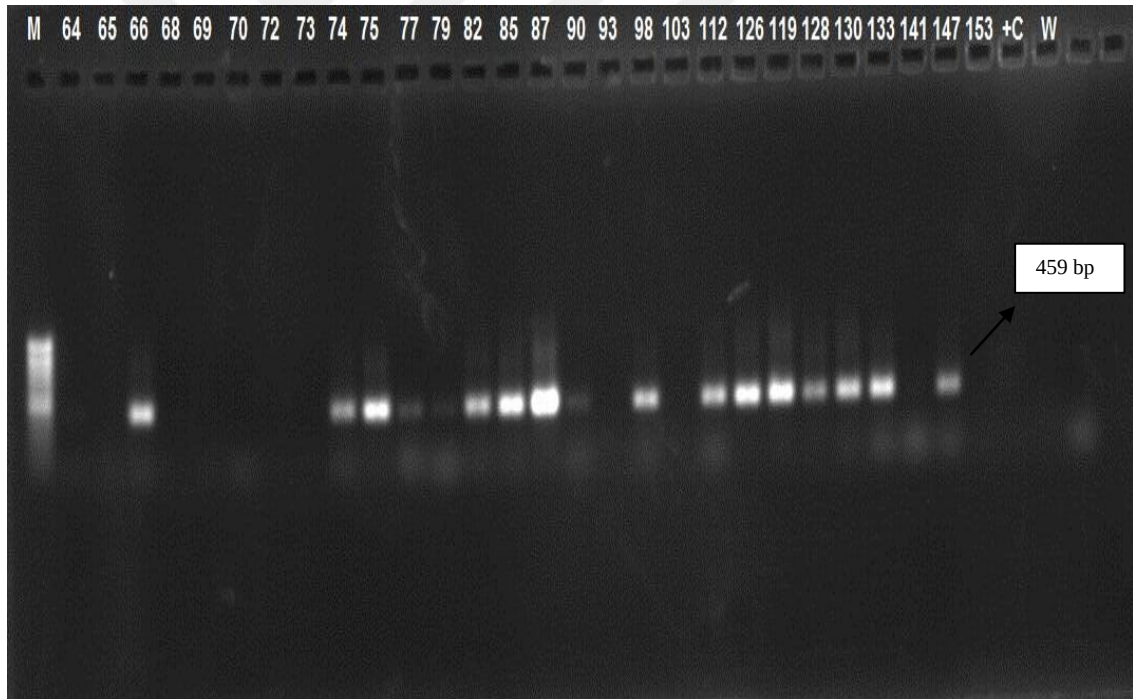
Çizelge 4.4. Hatay ilinden toplanan farklı bağ çeşitlerinin RT-PCR analizleri sonucu çeşitlerde GVA, GRSPaV, GVB ve GVD virüslerinin bulunma durumu

Asma Çeşit Adı	Testlenen Toplam Örnek Sayısı	Virüslerle Enfekteli Bitki Örnek Sayısı				
		GVA	RSP13-14	RSP48-49	GVB	GVD
Antep Karası	47	38	25	30	-	3
Pafu	17	13	10	8	-	1
Bilinme-yen çeşit	36	18	6	1	-	-

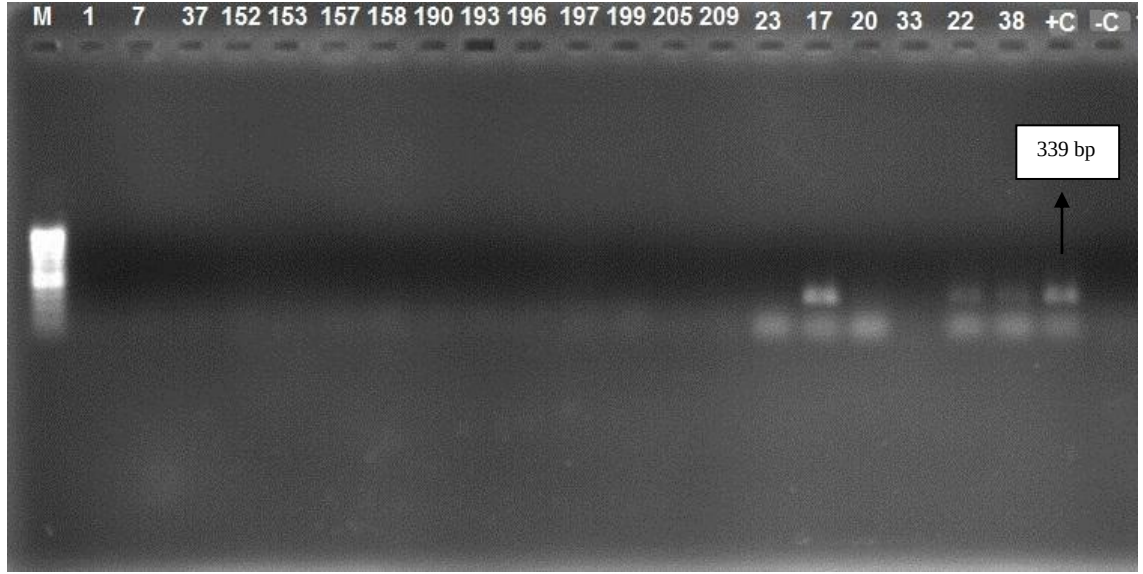
Yapılan RT-PCR analizi sonucunda, Tekirdağ ili bağ alanlarından toplanan örnekler arasından bazı çeşitler virüslerle yoğun enfekteli iken, bazı çeşitler ise virüslerle enfekteli bulunmamıştır. Alicante bouchet çeşidinde testlenen 4 örnek arasından 2 örnek GVA ile enfekteli bulunurken, diğer virüsler ise saptanmamıştır. Alphonse lavallae çeşidinden testlenen 7 örnekte, GVA ve GVD saptanmamış olup, RSP13-14 primeri ile 1 ve RSP48-49 primeri ile 2 örnek pozitif bulunmuştur. Testlenen 40 Chardonay örneğinden GVA yalnızca 1 örnekte pozitif bulunmuş olup, RSP13-14 primeriyle 1, RSP48-49 primeri ile 15 örnek pozitif olarak saptanmıştır. Testlenen 3 Çavuş çeşitinden 1'er örnek RSP13-14 ve RSP48-49 primerleri ile enfekteli bulunmuş olup, GVA saptanmamıştır. Gamay çeşidinde testlenen 3 örnek arasından sadece 1 örnek RSP48-49 primeri ile enfekteli bulunmuştur. Yapılan analizler sonucunda 3 Hamburg misketi örneğinden 2 örnek GVA, 2 örnek RSP48-49 primeri ile enfekteli bulunmuştur. Testlenen 9 Kalecik karası örneğinden 3 örnek RSP48-49 primeri pozitif olarak saptanmıştır. Palieri çeşidinden 5 örnek testlenmiş, 3 örnek GVA ile, 1 örnek RSP13-14 primeri ile ve 3 örnek RSP48-49 primeri ile enfekteli bulunmuştur.

Testlenmiş olan 10 Pinot noir çeşidinden GVA 4 örnekte, RSP13-14 primeri 2 örnekte ve RSP48-49 primeri 5 örnekte pozitif olarak saptanmıştır. Zinfandel çeşidinden 2 örnek testlenmiş olup 1 örnek GVA ile ve 1 örnek RSP48-49 ile enfekteli bulunmuştur. Teslenen 1'er adet Cardinal, Dimyat ve 5 adet Şiraz çeşidine ait örnekler yapılan RT-PCR analizi sonucunda hiçbir virüs ile enfekteli bulunamamıştır. Bunun yanında testlenen ve çeşidi bilinmeyen 40 farklı bağ örneğinin 4 tanesi GVA ile enfekteli bulunurken, 21 tanesinde GRSPaV (RSP48-49 primeri) enfeksiyonu saptanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda GVD hiçbir çeşitte saptanmamıştır.

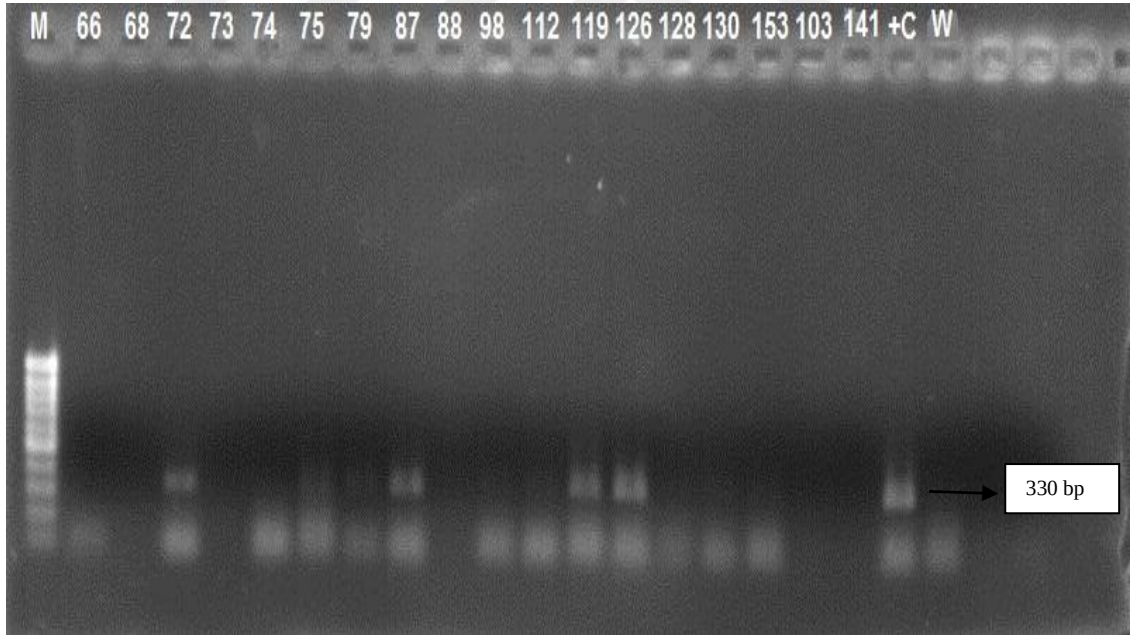
Yapılan RT-PCR analizi sonucunda, Hatay ili bağ alanlarında Antep Karası çeşidinden toplanan 47 örnekte GVA, GRSPaV RSP13-14 primeri ve RSP48-49 primeri ve GVD sırasıyla 38, 25, 30 ve 3 örnekte bulunurken Pafu çeşidinden toplanan 17 örnekte bu virüsler sırasıyla 13, 10, 8 ve 1 örnekte saptanmıştır.



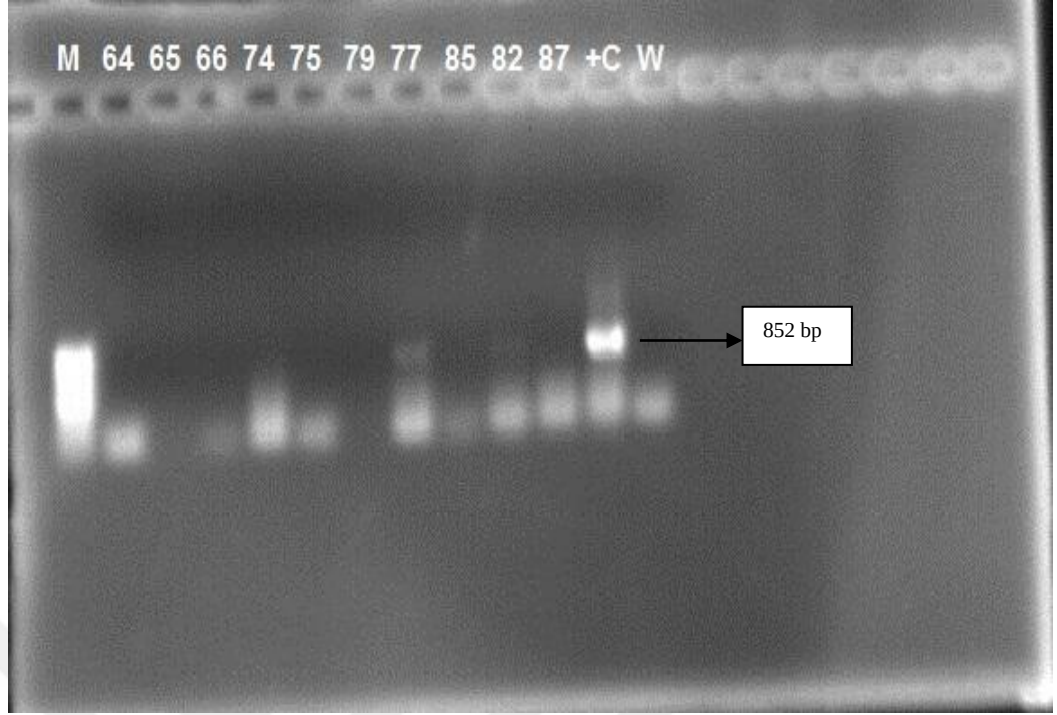
Şekil 4.10. Hatay ilinden toplanan bağ örneklerinin *Grapevine virus A* (GVA) 'ya karşı yapılan RT-PCR analizi sonucu elde edilen jel görüntüsü M : Marker; 64, 65, 68, 69, 70, 72, 73, 93, 103, 141, 153 GVA negatif örnekler, 66, 74, 75, 77, 79, 82, 85, 87, 90, 98, 112, 126, 119, 128, 130, 133, 147 GVA pozitif örnekler; +C: Pozitif kontrol W:Su kontrol



Şekil 4.11. Tekirdağ ilinden toplanan bağ örneklerinin *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV)'üne karşı RSP13-14 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi sonucu elde edilen jel görüntüsü M : Marker ; 1,7, 37, 152, 153, 157, 158, 190, 193, 196, 197, 199, 205, 209, 23, 20, 33, GRSPaV negatif örnekler, 17, 22, 38, GRSPaV pozitif örnekler; +C: Pozitif kontrol W: Su kontrol.



Şekil 4.12. Hatay ilinden toplanan bağ örneklerinin *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV)'üne karşı RSP48-49 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi sonucu elde edilen jel görüntüsü M: Marker ; 66, 68, 73, 74, 88, 98, 112, 128, 130, 153, 103, 141 GRSPaV negatif örnekler, 72, 75, 79, 87, 119, 126 GRSPaV pozitif örnekler; +C: Pozitif kontrol W: Su kontrol



Şekil 4.13. Hatay ilinden toplanan bağ örneklerinin *Grapevine virus D* (GVD)'e karşı yapılan RT-PCR analizi sonucu elde edilen jel görüntüsü M: Marker; 64, 65, 66, 74, 75, 79, 85, 82,87 GVD negatif örnekler, 77 GVD pozitif örnek; +C: Pozitif kontrol W: Su kontrol

Hatay ili bağ alanlarında GVA'nın ELISA yöntemi ile testlenmesi kapsamında yapılan bir çalışmada Cardinal, Antep Karası ve pafu çeşitlerinde GVA'nın en yaygın virüs olduğu ve GVA'nın GLRaV-1,-3 ile karşık enfekteli olduğu saptanmıştır. Testlenen 155 örneğin 5 tanesinin GVA, 11 tanesinin GVA+GLRaV(1+3) ve 1 tanesinin ise GVA+TBRV (*Tomato black ring virus*) ile enfekteli olduğu ortaya konmuştur. Yapılan bu çalışmada GVA ELISA yöntemiyle ülkemizde ilk kez tespit edilmiş olup GVA partikülleri virüse spesifik antibody ile dekore edilerek elektron mikroskopla gözlenmiştir(Çağlayan, 1997).

Gazel ve ark (2015)'nın Tekirdağ ilinde yetiştirilen Antep karası, Pafu, Chardonnay, Pinot Noir ve Zinfandel gibi yerli ve yabancı asma çeşitlerinde RT-PCR yöntemiyle GRSPaV'ünü belirlemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada bu virüsü %46,97 oranında saptamışlardır. Doğu Akdeniz Bölgesi ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yapılan bir çalışmada ise testlenen örneklerin %35'i GRSPaV ile enfekteli bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen 17 Türk izolatu gen bankasında kayıtlı diğer GRSPaV izolatları ile karşılaştırıldığında oldukça yakın ilişkili bulunmuş ve izolatların

nükleotid benzerliği %87-96 arasında bulunmuştur (Buzkan ve ark., 2015). Bu çalışmada elde edilen bulgular önceki çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

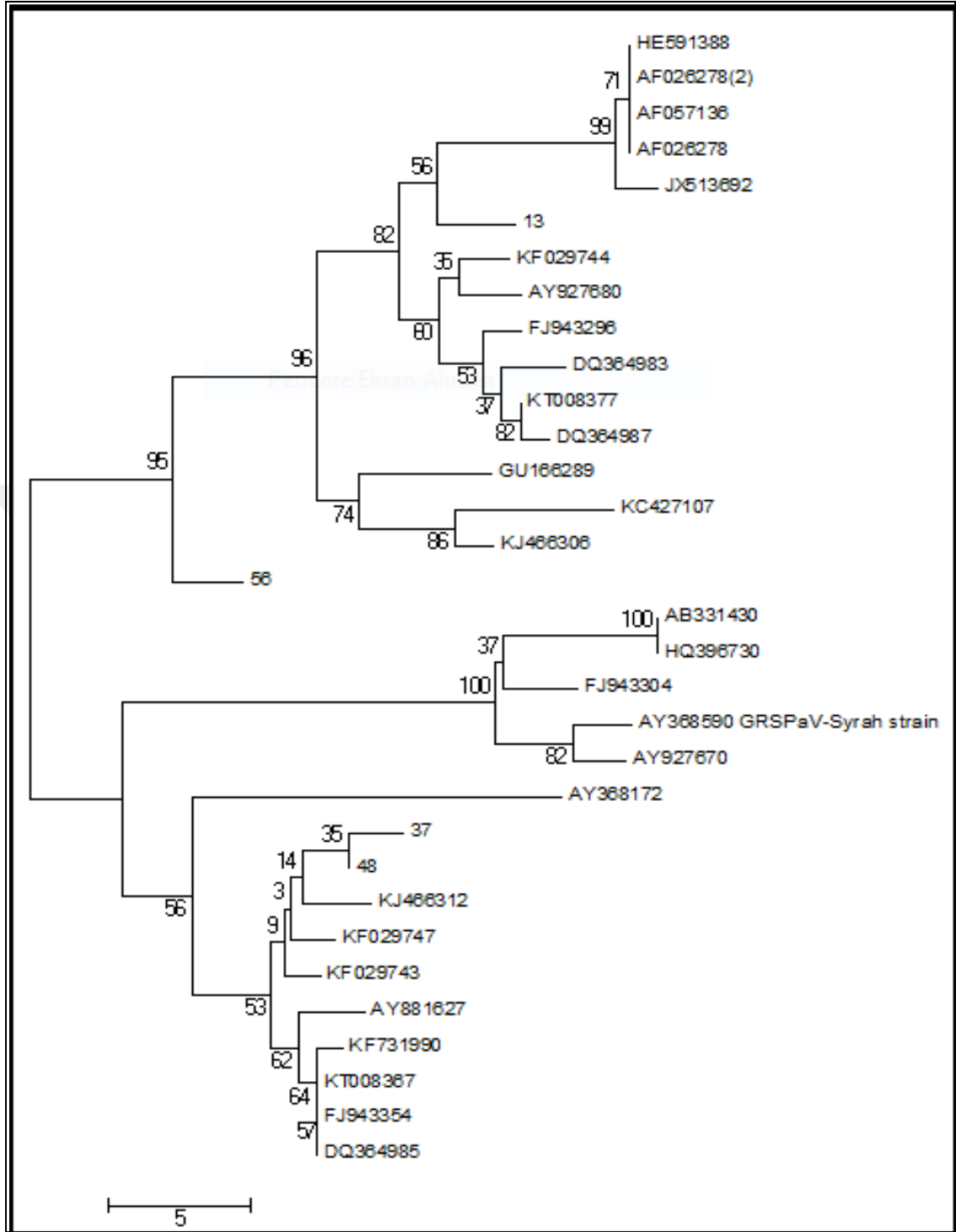
Buzkan ve ark., (2010), Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgesi bağ alanlarında yürüttükleri bir çalışmada GLRaV-1, GLRaV-3, GLRaV-5 ve GVA'yı RT-PCR yöntemiyle saptamışlar ancak GVB açısından testlenen örneklerin hiçbirinde pozitif sonuç alamamışlardır.

Yunanistan bağlarında RT-PCR yöntemiyle GVA, GVB ve GRSPaV'ünü saptamak amacıyla yapılan bir çalışmada aşılardan doğrudan köklendirilen varyetelerde GVA %37, GRSPaV %11 ve GVB ise %10 oranında saptanmıştır. Ancak aşıllı varyetelerde GVA %44, GRSPaV %38, GVB ise %11 oranında bulunmuştur. 6Amerikan anaçlarında ise en yaygın virüs GRSPaV (%31) bulunurken bunu %4 ile GVA izlemiş ancak testlenen örneklerde GVB bulunamamıştır (Moraki ve ark., 2015). Şili'de GRSPaV'ünün varlığı ilk kez 2008 yılında saptanmış olup testlenen 110 bağ örneğinin 65 tanesinde (%59,1) GRSPaV enfeksiyonu belirlenmiştir (Fiore ve ark., 2008).

Azerbaycan'da bağ alanlarından toplanan 176 örneğin ELISA yöntemi ile testlenmesi sonucunda testlenen örneklerin, %46,7 GVA ve %25,33 GFLV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir (Mikaeili ve ark., 2015). Kosova'da ticari bağ yetiştiriciliği yapılan alanlarda virüs ve virüs benzeri hastalıkların belirlenmesi amacıyla yapılan bir survey çalışması toplanan örneklerin ELISA yöntemiyle testlenmesi sonucunda, GVA %11,1 ve GVB %1 oranında saptanmıştır (Dida ve ark., 2012). Yapılan RT-PCR analizleri sonucunda ise testlenen bağların % 80,4 oranında GRSPaV ile enfekteli bulunmuştur. Portekiz'de bağ alanlarında GRSPaV'nin varlığının RT-PCR ile belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada testlenen 133 bağ örneğinin 59'unun (%44) bu virüs ile enfekteli olduğu ortaya koyulmuştur (Mansinho ve ark., 1999).

4.5. DNA Dizileme ve Filogenetik Analiz

PCR analizleri sonucunda GRSPaV'ünün referans kontrolüyle aynı seviyede bant veren izolatlardan 4 tanesi seçilerek (Tekirdağ ili 13, 37, 48 ve 56 nolu bağ izolatları) DNA dizilemeleri yapılmak üzere firmaya gönderilmiştir. Firmadan gelen her bir izolatın nükleotid dizilimi gen bankasında kayıtlı izolatlarla karşılaştırılmıştır. Sekansı yapılan 4 adet GRSPaV izolatı Gen Bankasında kayıtlı izolatlarla nükleotid benzerlikleri %98-94 arasında olmuştur. 13 nolu izolat KF029744.1 Polonya, KT008377.1 Brezilya, AY927680.1 Portekiz, DQ364987 ve DQ364983 İtalya izolatları ve FJ943296.1 A.B.D. izolatlarıyla %98 oranında benzerlik gösterdiği ortaya koyulmuştur. 56 nolu izolatımız KJ466306 İspanya, KF029744 Polonya, AY927680 Portekiz ve GU166289 Brezilya izolatlarıyla %98 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. 37 ve 48 numaralı izolatlar ise KF029747, KF029743 ve KT731990 Polonya, KJ466312 İspanya, KT008367Brezilya izolatlarıyla %99 oranında benzer bulunmuştur (Şekil 4.14). izolatlarımızdan 13 ve 56 nolu izolatlar filogenetik ağaçta birbirine daha yakın bulunurken 37 ve 48 numaralı izolatlar ise diğer 2 izolattan ayrı kolda yer almıştır.



Şekil 4.14. Tekirdağ bağ örneklerinden elde edilen GRSPaV izolatlarının gen bankasında kayıtlı izolatlarla karşılaştırılması sonucu elde edilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde, MEGA 6 yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendrogramda bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ülkemiz, asmanın gen merkezi olmasının yanı sıra eski ve köklü bir bağcılık kültürüne de sahiptir. Gerek dünyada gerekse ülkemizde ekonomik açıdan önemi büyük olan bağ yetiştiriciliğinde yüksek verim ve kalitede ürün elde etmek her zaman mümkün olamamaktadır. Bağ yetiştiriciliğinde hastalık ve zararlılar tarafından neden olunan ekonomik kayıplar yetiştiriciler için oldukça önemlidir. Zararlı böcekler, fungal ve bakteriyel hastalıklarla değişik kimyasallar kullanarak etkili bir savaşım yapılabilmektedir. Ancak virüs ve benzeri etmenlerle doğrudan kimyasal mücadele olanağı bulunmamaktadır. Bağlar pek çok virüs hastalığına konukçuluk etmekte ve önemli düzeyde verim kayıpları meydana gelmektedir. Bağlarda 60'tan fazla virüs saptanmıştır (Martelli, 2014). Bunlar içinde Rugose wood olarak bilinen ve odun deformasyonuna neden olan etmenlerin önemli verim kayıplarına neden olduğu ve bağ yetiştiriciliği yapılan ülkelerde farklı yaygınlık oranlarında bulunduğu saptanmıştır. Bu çalışma kapsamında bağ yetiştiriciliğinin oldukça önemli olduğu Hatay ve Tekirdağ illerinde yetiştirilen farklı bağ çeşitlerinde odun deformasyonuna neden olan etmenlerden *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine virus D* (GVD) ve *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV)'lerinin varlığı ve yaygınlık durumu ile ilgili güncel veriler ve yeni bilgiler elde edilmeye çalışılmıştır.

Hatay ilinden toplanan bağ örneklerinde %69 enfeksiyon oranıyla en yaygın olarak saptanan virüs GVA olarak belirlenmiş olup, bunu %41 enfeksiyon oranıyla GRSPaV izlemiştir. Tekirdağ ilinden toplanan bağ örneklerinde %40,6 enfeksiyon oranıyla en yaygın olarak saptanan virüs GRSPaV olup, bunu %17 enfeksiyon oranıyla GVA takip etmiştir. Hatay ilinde bağlardaki GVD enfeksiyon oranı % 3.48 oranıyla oldukça düşük bulunmuş olup Tekirdağ ilinde bu virüs enfeksiyonuna rastlanmamıştır. GRSPaV'ünün testlenmesinde 2 farklı primer çifti kullanılmıştır. Hatay ilinden toplanan bağ örneklerinin GRSPaV'ünün testlenmesinde kullanılan primer çiftlerinin etkinliğinde bir farklılık görülmezken Tekirdağ ilinden toplanan bağ örneklerinde bu oran RSP48-49 primer çifti için %40,6, RSP13-14 çifti için %12,9 olmuştur.

Bu çalışma sonucunda önemli bağ yetiştiriciliği yapılan ülkemizde rugose wood gövde kompleksine neden olan etmenlerin saptanmasından elde edilen önemli sonuç ve öneriler özetlenecek olursa;

1) Çalışmanın yürütüldüğü Hatay ve Tekirdağ illeri bağ alanlarında odun deformasyonuna neden olan etmenlerden GVA, GVB, GVD ve GRSPaV'lerinin enfeksiyon durumları araştırılmıştır. Testlenen virüslerden GVB her iki ilde de saptanamamış olup GVD sadece Hatay ili bağ alanlarında saptanmıştır. GVA ve GRSPaV'ünün her iki ilden toplanan bağ örneklerinde farklı oranlarda ve tekli veya çoklu enfeksiyonlar şeklinde bulunduğu belirlenmiştir.

2) Bu etmenler arasında GRSPaV'ünün dünyada olduğu gibi çalışmamızı yürüttüğümüz Hatay ve Tekirdağ illerimizde de yaygın olduğu tespit edilmiştir. Mekanik olarak taşınmadığı ve vektörünün bilinmemesinden dolayı etmenin muhtemel aşı kalemiyle yayıldığı düşünülmektedir. Bu nedenle sağlıklı aşı kalemi kullanılması önerilmektedir. GVA'nın unlu bitlerle taşınmasından dolayı, bu böcek türlerine karşı kimyasal mücadele önerilmektedir. GVB pozitif kontrollerin optimizasyon çalışmaları yapılmış, ancak herhangi bir amplifikasyon gözlenmemiştir. Pozitif kontrollerde bir optimizasyon sağlanmamış olmakla birlikte, bağ örnekleri de testlenmiş ve sonuçta hiçbir örnekte pozitif sonuç elde edilmemiştir. Bu nedenle GVB için yeni primerler sentezletilip aynı örneklerin yeni primerlerle tekrar testlenmesi gerekmektedir.

3) Virüslerin etkin bir mücadele yöntemi bulunmadığı için kontrol önlemleri ön plana çıkmaktadır. Başarılı bir kontrol stratejisi geliştirilebilmesi de ancak doğru teşhis yöntemlerinin kullanılması ile mümkündür. Bu nedenle özellikle yurt dışında değişik amaçlarla ithal edilen bağ çeşitlerinin mutlaka ELISA ve RT-PCR yöntemleri kombine bir şekilde kullanılarak testlenmesi gerek ülkemizde mevcut gerekse yeni giriş yapma olasılığı olan virüs hastalıklarının doğru teşhis edilebilmesi açısından son derece önemlidir.

4) Ülkemizin genetik kaynaklarının muhafaza edildiği ve damızlık çeşitlerin bulunduğu bağ alanlarının düzenli olarak ELISA ve PCR yöntemleri ile testlenmesi ve enfekteli bulunanların ivedilikle eradike edilmesi de ülkemize temiz fidanlık dağıtımında önemli rol oynayacaktır.

Bağ yetiştiriciliğin önemli olduğu Hatay ve Tekirdağ illerimizde virüs enfeksiyonlarının daha detaylı araştırılmasının yanı sıra sağlıklı fidan üretiminde izlenecek yolun takip ve teşvik edilmesi de gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Akbaş, B., Kunter, B., Ilhan, D., 2007. Occurrence and distribution of Grapevine Leafroll-associated Viruses 1, 2, 3 and 7 in Turkey. **Journal of Phytopathology**, 155: 122-124.
- Akbaş, B., Kunter, B., Ilhan, D., 2009. Influence of leafroll on local grapevine cultivars in agroecological conditions of Central Anatolia region. **Horticultural Science**, 36 (3): 97-104.
- Anonim, 2014. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>
- Anonim, 2015. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001
- Bouyahia, H., Boscia ,D., Savino ,V., Notte , P.L., Piroloc., Castellano ,M.A., Minafra, A. and Martelli G.P., 2005. Grapevine rupestris stem pitting-associated virus is linked with grapevine vein necrosis. **Vitis**, 44(3) :133-137.
- Buzkan, N., Karadağ, S., Kaya, A., Baloğlu, S., Minafra, A., Ben-Dov, Y., 2010. First Report of the Occurrence of *Grapevine leafroll-associated virus-5* in Turkish Vineyards. **Journal of Phytopathology**. 158: 448–449.
- Buzkan, N., Notte ,L.P., Karadağ, S., Aktan ,A., Saldarelli ,P., Minafra, A., 2015. First Report of *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) in autochthonous grape varieties in Turkey. **18th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Disease of the Grapevine (ICVG)**, Ankara, Türkiye, 184-185.
- 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: 475–83.
- Clark, M.F., 1981. Immunosorbent assay in plant pathology. A.Rev. **Phytopathology**, 19:83-106.
- Çağlayan, K. 1997. Incidence of grapevine leafroll, GVA and *Tomato black ring virus* in the vineyards of Hatay Province. **The Journal of Turkish Phytopathology** 26, 121-128.
- Dida, L., Elbeaino ,T., Frasher, D., Digiario, M., 2012. Viruses of grapevine in Kosovo. **Phytopathologia Mediterranea**, 51:1: 85-90.
- Duarte, V., Silva, I., Santos, M.T., Brazo, J., Eiras-Dias, E., Fonseca, F., 2015. Molecular detection of GVA and GVB variants in Portuguese grapevine varieties. **18th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG)**, Ankara, Turkey, 192-193.
- Fajardo, T.V.M., Eiras, M., Nickel, O., Dubiela, C.R., Souto, E.R., 2012. Detection and partial molecular characterization of *Grapevine fleck virus*, *Grapevine virus D*, *Grapevine leafroll-associated virus -5* and *-6* infecting grapevines in Brazil. **Ciência Rural, Santa Maria**. 42 (12): 2127-2130.
- Fiore, N., Prodan, S., Montealegre, J., Aballay, E., Pino, A.M., Zamorano, A., 2008. Survey of grapevine viruses in Chile. **Journal of Plant Pathology**. 90: 125-130.
- Garau, R., Prota, V.A., Piredda, R., Boscia, D., Prota, U., 1997. On the possible relationship between Kober stem grooving and Grapevine virus A. **Vitis**, 33: 161-163.
- Gazel, M., Elçi, E., Öztürk, L., Çağlayan, K., 2015. First Report of *Grapevine rupestris*

- stem pitting associated virus* (GRSPav) in Turkey. **18th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG)**, Ankara, Türkiye 186-187
- Habili, N., 2015. Failure to detect *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* in Iran may give a clue to the origin of this virus. **18th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG)**, Ankara, Türkiye, 93-94.
- Kaya, A., Erilmez, S., 2012. First Report of *Grapevine leafroll-associated virus 4* in vineyards of Turkey. **Plant Disease**. 96 (8): 1230.
- Kominek, P., Glasa., Kominkova, M., 2009. Analysis of multiple virus-infected grapevine plant reveals persistence but uneven virus distribution. **Acta Virologia** 53: 281-285.
- Komorowska, B., Berniak, H. Golis, T., 2014. Detections of grapevine viruses in Poland. **J. Phytopath**, 162: 326-331.
- Lima, M.F., Alkowni, R., Uyemoto, JK., Golino DA., Osman F., Rowhani A., 2006. Molecular analysis of a California strain of *Rupestris stem pitting associated virus* isolated from declining syrah grapevines. **Archives of Virology**, 151:1889-94.
- Mackenzie, D.J., Mclean, M.A., Mukerji, S., Green, M., 1997. Improved RNA extraction for woody plants for the detection of viral pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. **Plant Disease**. 81: 222-226.
- Mansinho, A., Teixeira-Santos, M., Seueira, Z., Sequeira, C., Correia, P.K., Sequeira O.A., Nolasco G., 1999. Detection of grapevine viruses by RT-PCR of double stranded RNA templates. **Petria (in pres)**.
- Martelli, G.P. and Jelkmann, W. 1998. Foveavirus, a new plant virus genus. **Archives Virol**. 143: 1245-1249.
- Martelli, G.P. and Boudon-Padieu, E., 2006. Directory of infectious diseases of grapevines Options Mediterraneennes. **Series B55**:11-201.
- Martelli, G.P., Adams, M.J., Kreuze, J.F., Dolja V.V., 2007. Family Flexiviridae: a case study in virion and genome plasticity. **Annual Review of Phytopathology**, 45: 73-100.
- Martelli, GP., 2014. Directory of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine and Their Agents. **Journal of Plant Pathology**, 96: 1-136.
- Meng, B., Pange, S.Z., Forsline, PL., Mcferson, JR., Gonsalves D., 1998. Nucleotide sequence and genome structure of grapevine rupestris stem pitting associated virus-1 reveal similarities to apple stem pitting. **Journal of General Virology**, 79: 2059-69.
- Meng, B., Zhu, H.Y., Gonsalves, D., 1999a. Rupestris stem pitting associated virus-1 consists of a family of sequence variants. **Archives of Virology** 144: 2071-2085.
- Meng, B., Johnson, R., Peresini, S., Forsline, P.L. and Gonsalves, D., 1999b. Rupestris stem pitting associated virus-1 is consistently detected in grapevines that are infected with rupestris stem pitting. **European Journal of Plant Pathology** 5: 191-199.
- Meng, B., Rebelo, A.R. and Fisher, H., 2006. Genetic diversity analyses of *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* reveal distinct population structure in scion versus rootstock varieties. **Journal of General Virology**, 87: 1725-1733.

- Meng, B., Gonsalves, D., 2000. Molecular biology and rapid detection of *Rupestris stem pitting associated foveavirus*. **Phytopathology**, 90 (Suppl 6), P52.
- Meng, B., Credi, R., Petrovic, N., Tomazic, I., Gonsalves D., 2003. Antiserum to recombinant virus coat protein detects Rupestris stem pitting associated virus in grapevines. **Plant Disease**, 87: 515-22.
- Meng, B., Li, C., Wang, W., Goszczynski, D., Gonsalves, D., 2005. Complete genome sequences of two new variants of grapevine Rupestris stem pitting associated virus and comparative analyses. **Journal of General Virology**, 86: 1555- 1560.
- Meng, B., Rebelo, A.R., Fisher E., 2006. Genetic diversity analyses of *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* reveal distinct population structure in scion versus rootstock varieties. **Journal of General Virology**, 87:1725-1733.
- Minafra, A. and Martelli, G.P., 2005. *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* is linked with grapevine vein necrosis. **Vitis**, 44(3), 133-137.
- Mikaeili, M., Rastgou , G., Roumi ,V., 2015. Determination of the sistrubition and genetic variation of *Grapevine virus A* and *Grapevine fanleaf virus* in vineyards of East and West Azarbaijan Provinces. **18th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG)**, Ankara, Türkiye, 26-27
- Minafra, A., Casati, P., Elicio, V., 2000. Serological detection of *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV) by a polyclonal antiserum to recombinant virus coat protein. **Vitis** 39:115-8.
- Minafra, A., Saldarelli, P., Grieco, F., Martelli, G. P., 1994. Nucleotide sequence of the 3' terminal region of the RNA of two filamentous grapevine viruses. **Archives Virology**, 137: 249-261.
- Moraki K. N., Avgelis A.D., Biniari A., Chatzivassiliou, E.K., Katis, N.I. and Maliogka V.I., 2015. Improve RT-PCR detection and prevalence of GVA, GVB and GRSPaV in Greek vineyards. **18th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG)** Ankara, Türkiye, 190-191
- Murolo, S., Romanazzi, G., Rowhani, A., Minafra, A., Notte, P.L., Branzanti, M.B., Savino, V., 2008. Genetic variability and population structure of *Grapevine virus A* coat protein gene from naturally infected Italian vines. **European Journal of Plant Pathology**, 120: 137-145.
- Nakaune, R., Inoue, K., Nasu, H., 2008. Detection of viruses associated with rugose wood in Japanese Grapevines and analysis of genomic variability of *Rupestris stem pitting associated virus*. **Journal of General Plant Pathology**, 74: 156-163.
- Nolasco, G., Mansinho, A., Teixeira Santos , M., 2000. Large scale evaluation of primers for diagnosis of rupestris stem pitting associated virus-1. **European Journal of Plant Pathology**, 106: 311-318.
- Nolasc, G., Soares, C., Pervic, N., 2006. *Rupestris stem pitting associated virus* isolates are composed by mixtures of genomic variants which share a highly conserved coat protein. **Archives of Virology**, 151: 83-96.
- Oraman, M.N., 1965. Arkeolojik Buluntuların Işığı altında Türkiye Bağcılığının Tarihçesi Üzerinde Araştırmalar. **Ankara Ün. Ziraat Fak. Yıllığı**. 15(2): 96-108.

- Önder, S., Erilmez, S., Paylan, İ.C., Ceyhan, M., 2016. *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV)'ün UPL Probu ile Real-time RT-PCR Sistemiyle Tanılanmasında Dejenere Primer Tasarımı ve Sertifikasyon analizlerinde kullanımı. **Uluslararası Katılımlı Türkiye 6. Bitki Koruma Kongresi**, 5-8 Eylül, Konya, Türkiye, 564.
- Özaslan, M., Yılmaz, M.A. 1995. Grapevine virus diseases in Adana, Tarsus, Sanliurfa and Adıyaman regions (Adana, Tarsus, Şanlıurfa ve Adıyaman bölgelerinde yetiştirilen bağlara zarar veren virüs hastalıkları). **Türkiye VII. Fitopatoloji Kongresi**, Adana. 306-312.
- Petrivic, N., Meng, B., Ravnikar, M., Mavric, I., Gonsalves, D., 2003. First detection of *Rupestris stem pitting associated virus* particles by antibody to a recombinant coat protein. **Plant Disease**, 87: 510-514.
- Rowhani, A., Zhang, Y.P., Golino, D.A., Uyemoto, J.K., 1999. Diversity among different isolates of *Rupestris stem pitting associated virus*. **Phytopathology**, 89 (Suppl.6), 66.
- Saldarelli P., Minafra, A., Martelli, G.P., 1996. The nucleotide sequence and genomic organization of *Grapevine virus B*. **Journal of General Virology**, 2645-2652.
- Selmi, I., Mahfoudhi, N., Pacifico, D., Dhouibi, H., Digiario, M. and Elbeaino, T., 2015. Molecular Variability of *Grapevine virus D* isolates from naturally infected vineyards in Tunisia. **18th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG)**, Ankara, Turkey. 214-215.
- Stewart, S., Nassuth, A., 2001. RT-PCR based detection of *Rupestris stem pitting associated virus* within field-grow grapevines throughout the year. **Plant Disease**, 85: 61a., c7-20.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: 'Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods'. **Molecular Biology and Evolution** 28: 2731-2739.
- Terlizzi, F., Ratti, C., Filippini, G., Pisi, A., and Credi, R., 2010, Detection and molecular characterization of Italian *Grapevine rupestris stem associated virus* isolates. **Plant Pathology**, 59: 48-58.
- Walter, B. and Martelli, GP., 1997. Clonal and sanitary selection of the grapevine. In : Walter B (ed.) Sanitary Selection of the Grapevine. Protocols for the Detection of viruses and virus-like Diseases. Les Colloques, Paris, France: INRA Editions, 86: 43-95,
- Yılmaz, M.A., Yurtmen, M., Çığsar, İ., Özaslan, M. 1997. A survey of grapevine viruses in Turkey. Extended abstratcs. **12th Meeting of the ICVG**, Lisbon, Portugal. P.113.
- Zamorano, A., Gonzales, X., Quiroga, N., Fiore, N., 2015. Detection and characterization of Chilean isolates of grapevine viroids. **18th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG)**, Ankara, Türkiye, 76-77.
- Zhang, Y., Uyemoto, J.K., Golino, D., Rowhani, A., 1998. Nucleotide sequence and genome structure of *Grapevine rupestris stem pitting associated virus-1* reveal similarities to *Apple stem pitting virus*. **Journal of General Virology**, 79: 2059-2069.

ÖZGEÇMİŞ

Yazar 1989 yılında Bingöl ili Merkez ilçesinde doğdu. İlk ve orta okul ve lise öğrenimini Bingöl’de tamamladı. 2009 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma bölümünü kazandı ve 2013 yılında mezun oldu. 2014 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.



EKLER

EK 1. ELISA Testinde Kullanılan Tampon Çözeltiler ve İçerikleri (1000 ml)

Kaplama Tamponu (Coating Buffer)
pH : 9.6

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

Fosfat-Tuz Tamponu (PBS Buffer)
pH: 7.4

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

Yıkama Tamponu (PBST Buffer)
pH:7.4

PBS Buffer	999.50 ml
Tween 20	0.50ml

Örnek Ezme Tamponu (Extraction Buffer)

pH: 7.4

PBST	1000.0 ml
Polyvinypyrrolidone (MV= 40000 K=40)	20.00 g

Konjugat Tamponu (Conjugate Buffer)
pH: 7.4

PBST	1000.0 ml
Polyvinypyrrolidone (MV= 40000 K=40)	20.00 g
Ovalbumin	2.00 g
NaN ₃	0.20 g

Substrat Tamponu (Substrat buffer)
pH: 9,8

Diethanolamin	97.00 ml
NaN ₃	0.20 g

Karışım d₂H₂O ile 1 litreye tamamlanır.

EK 2. MACKENZIE EZME TAMPONU (100 ml)

Guanidine isothiacyonate	47.26 g
Sodium acetate	2.72 g
25 mM EDTA	0.7305 g
PVP-40	2.5 g

Karışım 100 ml d₂H₂O'ya tamamlanıp oda sıcaklığında saklanmıştır.

EK 3. AGAROS JEL ELEKTROFOREZ (MANIATIS ve ark., 1982)

TAEX50 (100 ml)

0.5 M EDTA pH:8	10 ml
0.6 Glacial acetic acide	5.71 ml
Trizma base	24.2 g

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

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

Bromophenol blue	15 ml
Glycerol	18 g
TAEX50	6 ml

Hazırlanan ortam -20 °C'de saklanmıştır.

Ethidium Bromide çözeltisi (1 mg/ml 200 ml stok için)

0.5XTAE	200 ml
Ethidium bromide	200 µl

Koyu renkli bir kap içinde karanlık ortamda oda sıcaklığında saklanmıştır. 5-10 kullanımdan sonra çözelti tazelenmiştir.

%1 Agarose Jel Elektroforezi

1 gr agaroz, 100 ml 0.5XTAE içinde mikrodalga fırında eritilmiştir. Yaklaşık 40°C sıcaklığa geldikten sonra, elektroforez ünitesinin jel tepsisine dökölüp taraklar yerleştirildikten sonra agarozun 15-20 dakika süreyle donması beklenmiştir. 0.5XTAE ortamı içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

