



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

**BAĞLARDA YENİ SAPTANAN VİRÜSLERİN HATAY VE TEKİRDAĞ
İLİ BAĞ ALANLARINDA PCR YÖNTEMİYLE SAPTANMASI VE
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

HAMİDE DENİZ KOCABAĞ

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATAY
EYLÜL-2015**



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

**BAĞLARDA YENİ SAPTANAN VİRÜSLERİN HATAY VE TEKİRDAĞ
İLİ BAĞ ALANLARINDA PCR YÖNTEMİYLE SAPTANMASI VE
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

HAMİDE DENİZ KOCABAĞ

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

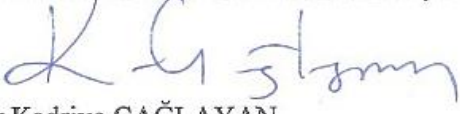
**HATAY
ARALIK-2016**

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAĞLARDA YENİ SAPTANAN VİRÜSLERİN HATAY VE TEKİRDAĞ İLİ
BAĞ ALANLARINDA PCR YÖNTEMİYLE SAPTANMASI VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Hamide Deniz KOCABAĞ
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

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


Prof.Dr.Kadriye ÇAĞLAYAN
Başkan


Prof.Dr.Mona GAZEL
Üye


Prof.Dr. Hikmet Murat SİPAHIOĞLU
Üye

Kod No:

Prof. Dr. Erdal SERTKAYA
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 15200

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.

Hamide Deniz KOCABAĞ

ÖZET

BAĞLARDA YENİ SAPTANAN VİRÜSLERİN HATAY VE TEKİRDAĞ İLİ BAĞ ALANLARINDA PCR YÖNTEMİYLE SAPTANMASI VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Son yıllarda yeni nesil sekans analiz tekniklerinin yaygın olarak kullanılması bağlarda ve diğer bitki türlerinde bir çok bilinmeyen yeni virüsün saptanmasına neden olmuştur. Bağlarda bu teknoloji ile saptanan yeni virüsler *Grapevine pinot gris virus* (GPGV), *Grapevine syrah virus 1* (GSyV-1), *Grapevine red blotch-associated virus* (GRBaV) ve *Grapevine roditis leaf discoloration associated virus* (GRLDaV)'dür. Bu çalışmanın amacı Tekirdağ ve Hatay ili bağ alanlarında bu yeni virüslerin varlığının PCR ve sekans analiz yöntemleriyle saptanması ve karakterizasyonlarının yapılmasıdır. Virüs symptomuna benzer belirtiler gösteren bağlardan Tekirdağ ilinden 191, Hatay ilinden ise 111 örnek toplanmıştır. Testlenen örneklerden Tekirdağ ilinden toplanan yerli ve yabancı bağ örneklerinde %43,62 oranında GPGV, %17,07 oranında ise GSyV1 saptanmıştır. Hatay ilinden toplanan örneklerde ise sadece %11 oranında GSyV1 saptanmış ve testlenen örnekler GPGV, GRBaV, GRLDaV açısından temiz bulunmuştur. Tekirdağ örneklerinin RT-PCR analizleri sonucunda kısmi kılıf protein genini çoğaltan 411 bp, kısmi hareketlilik protein genini çoğaltan 302 bp ve replikaz genini çoğaltan 618 bp büyüklüğünde PCR amlikonları elde edilmiştir. Bu ürünlere doğrudan iki yönlü sekans analizi uygulandığında her üç gen bölgesinin de nukleotid dizilimlerinin gen bankasında kayıtlı farklı GPGV izolatları ile yüksek oranda homoloji gösterdiği saptanmıştır.

2016 , 54 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Vitis vinifera*, GPGV, GSyV-1, GRBaV, GRLDaV, Türkiye

ABSTRACT

MOLECULAR DETECTION and CHARACTERIZATION of NEW EMERGING VIRUSES by PCR ANALYSIS in HATAY and TEKİRDAĞ VINEYARDS

The improvements on the next generation sequencing or high-throughput output technologies allowed the discovery of several unknown viruses in plants and also in grapevines. A new emerging grapevine disease identified as *Grapevine pinot gris virus* (GPGV), *Grapevine syrah virus 1* (GSyV-1), *Grapevine red blotch-associated virus* (GRBaV) and *Grapevine roditis leaf discoloration virus* (GRLDaV). The aim of the present study was to investigate the occurrence and characterization of these viruses in Tekirdağ and Hatay viticulture production areas by PCR and DNA sequencing analysis. Totally 191 and 111 grapevine samples showing virus-like symptoms were collected from Tekirdağ and Hatay provinces, respectively. Among the tested samples GPGV and GSyV-1 were detected in both local and imported cultivars by the infection rate of 43,62% and 17,07% in Tekirdağ, respectively. . In Hatay province, only GSyV-1 was detected by the infection rate of 11% and all tested samples were found negative for GPGV, GRBaV, GRLDaV. RT-PCR results showed that DNA fragments of 411 bp, 302 bp and 618 bp corresponding to the part of the coat protein (CP) gene, part of the movement protein gene (MP) and 5' UTR and the N-terminus of the replicase gene of GPGV were successfully amplified in Tekirdağ samples, respectively. All PCR products of GPGV were directly sequenced on both strands. All the nucleotide sequences of CP, MP and 5' UTR and N-terminus of replicase genes shared the highest sequence identity with different GPGV isolates deposited in GenBank.

2016, 54 pages

Keywords: *Vitis vinifera*, GPGV, GSyV-1, GRBaV, GRLDaV, Turkey

TEŞEKKÜR

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

Çalışmalarım sırasında yardımlarını, değerli görüş ve katkılarını esirgemeyen hocam sayın Prof. Dr. Mona GAZEL'e de en içten teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Zir. Müh. Bahar TUNÇ'a, Zir. Müh. Mehtap ACIOĞLU'na, sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tezimin her aşamasında ve hayatta beni her konuda destekleyen aileme sabır ve anlayışlarından dolayı sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	X
1.GİRİŞ	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
3.MATERYAL VE YÖNTEM	9
3.1. Arazi çalışmaları ve örnekleme	9
3.2. Moleküler Çalışmalar	9
3.2.1. Bağ Örneklerinden Nükleik Asit (NA) İzolasyonu	9
3.2.1.1.Qiagen RNA Ekstraksiyon Kiti ile modifiye Mackenzie yöntemiyle RNA İzolasyonu	10
3.2.1.2 Qiagen DNA Ekstraksiyon Kiti ve Nikotin tamponu ile Modifiye DNA İzolasyonu	11
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) Analizleri	12
3.2.2.1. Reverse Transkripsiyon (RT; Reverse Transcription)	12
3.2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyon	12
3.2.3. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Jel Elektrophorez	15
3.2.4. GPGV için Moleküler Klonlama Çalışmaları	16
3.2.4.1. PCR ile Çoğaltılan CP, MP ve REP Gen Bölgelerinin pGEM–T Vektörlerine Klonlanması	16
3.2.4.2. pGEM – T Easy vektöre klonlama işlemi	16
3.2.4.3. Transformasyon	17
3.2.4.4. Plasmid İzolasyonu ve Klonların Analizi	17
3.2.5 DNA Dizileme ve BLAST Analizi	18
3.2.6. Filogenetik Analiz	18
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	19
4.1. Arazi Çalışmaları	19
4.2. RT- PCR ve PCR Analizleri	22
4.2.1. Bağ örneklerinden RNA ve DNA İzolasyonu	23
4.2.2. RT-PCR ve PCR analizleri	25
4.2.2.1. RNA virüsü olan GSyV-1 ve GPGV için RT-PCR analizleri	35
4.2.2.2. DNA virüsleri olan GRBaV ve GRLDAaV'nin PCR Analizleri	53
4.2.4. GPGV'nin Filogenetik Analizi	59
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	61
ÖZGEÇMİŞ	69
EKLER	70

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1.	Tekirdağ ili bağ alanlarında gözlenen virüs benzeri belirtiler. A- Yapraklarda küçülme, boğum aralarında kısalma ve seyrek dane oluşumu B- Meyvede gelişme bozukluğu ve yapraklarda klorotik lekeler C- yapraklarda deformasyon ve klorotik lekeler D- Yelpaze yaprak oluşumu ve dane oluşumunda düzensizlik.....	21
Şekil 4.2.	Kırmızı üzüm çeşitlerinde yapraklarda kızarma ve gelişme geriliği. A-B: Yapraklarda kızarma ve seyrek dane oluşumu C-D: Yaprak damarlarında kızarmalar E: Bitkide gelişme geriliği F: Yaprakta kırmızı beneklenmeler	22
Şekil 4.3.	Kalecik karası çeşidinden RNeasy Qiagen ticari kit (Qiagen Sci-Almanya) kullanılarak izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D).....	23
Şekil 4.4.	Antep karası çeşidinden RNeasy Qiagen ticari kit (Qiagen Sci-Almanya) kullanılarak izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D).....	23
Şekil 4.5.	Tekirdağ ilinden toplanan ve çeşidi bilinmeyen bir bağ örneğinden DNeasy Qiagen ticari kit (Qiagen Sci-Almanya) kullanılarak izole edilen DNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D).....	24
Şekil 4.6.	<i>Grapevine roditis leaf discoloration associated virus</i> pozitif kontrollerinin nictotin tamponuyla DNA izolasyonundan elde edilen DNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD).....	24
Şekil 4.7.	GRLDaV'nin PCR analizleri için optimizasyon çalışmaları. M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya), -K1,2: Negatif kontrol; +KBQ:Qiagen yöntemi ile pozitif kontrol olarak kullanılan bitkiden izole edilen DNA; +KBN:Nikotin tamponu ile pozitif kontrol olarak kullanılan bitkiden izole edilen DNA; +KP:Pozitif kontrol olarak kullanılan plazmid DNA; S: Su kontrol.....	25
Şekil 4.8.	Hatay ve Tekirdağ illerinde farklı üzüm çeşitlerinin <i>Grapevine syrah virus-1</i> 'ün kılıf protein genini çoğaltan Sy5922-F/Sy6295R primeri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu. M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 66, 75, 77, 85, 87, 98, 112, 119, 130, 126, 147: testlenen bitki örnekleri; S: Su kontrol; +K: Pozitif kontrol.....	42
Şekil 4.9.	Hatay ili Antep karası üzüm çeşidinin <i>Grapevine syrah virus-1</i> 'ün saptanmasında kullanılan primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu. M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 75, 87, 98, 131, 137, 147, 119: testlenen bitki örnekleri; S: Su kontrol; +K: Pozitif kontrol.....	42
Şekil 4.10.	Hatay ili Antep karası üzüm çeşidinin <i>Grapevine syrah virus-Q</i> ırkına spesifik primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu. M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 75, 87, 98, , 132, 137, 147, 119: testlenen bitki örnekleri; S: Su kontrol; +K: Pozitif kontrol	42

Şekil 4.11.	Hatay ili bağ örnekleri <i>Grapevine syrah virus-1</i> 'ün saptanmasında kullanılan primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu. M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 93, 103, 169: testlenen bitki örnekleri; S: Su kontrol; 121: Pozitif kontrol.....	43
Şekil 4.12.	Hatay ili bağ örnekleri <i>Grapevine syrah virus-Q</i> irkına spesifik primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu. M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 93, 103, 169: testlenen bitki örnekleri; S: Su kontrol; 119: Pozitif kontrol.....	43
Şekil 4.13.	Tekirdağ bağ örneklerinin <i>Grapevine pinot gris virus</i> kılıf protein (CP) genini çoğaltan primer çifti (GPG-6609F/GPG7020R) kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu. M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 139, 145, 138, 140, 146, 148, 150, 149, 152, 154, 155, 156, 157, 162, 165, 168, 169, 173, 174, 177, 190, 193, 194, 195, 196, 200, 201, 202, 203, 205, 206: testlenen bitki örnekleri; +K: Pozitif kontrol, S: Su kontrol,	52
Şekil 4.14.	Tekirdağ bağ örneklerinin <i>Grapevine pinot gris virus</i> hareketlilik protein (MP) genini çoğaltan primer çifti (GPG-5637F/GPG-5939R) kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu. M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 139, 141, 149, 152, 158, 165, 169, 173, 180, 191, 195, 202: testlenen bitki örnekleri; +K: Pozitif kontrol, S: Su kontrol.....	52
Şekil 4.15.	Tekirdağ bağ örneklerinin <i>Grapevine pinot gris virus</i> replikaz (REP) genini çoğaltan primer çifti (GPG-14F/GPG-632R) kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu. M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 139, 141, 145, 149, 152, 158, 162, 165, 171, 177, 232, 235: testlenen bitki örnekleri; +K: Pozitif kontrol, S: Su kontrol.....	52
Şekil 4.16.	hatay bağ örneklerinin <i>Grapevine pinot gris virus</i> kılıf protein (CP) genini çoğaltan primer çifti (GPG-6609F/GPG7020R) kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu. M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 175, 176, 177, 178, 179, 180, 81, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 122, 123, 124, 125 : testlenen bitki örnekleri; +K: Pozitif kontrol, S: Su kontrol.....	53
Şekil 4.17.	Hatay ili bağlarından toplanan örneklerin <i>Grapevine roditis leaf discoloration associated virus</i> 'ne karşı Badna-R-Up ve Badna-R-Do primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizlerinin elektroforez jel görüntüsü. M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 64, 65, 66, 68, 69,70, 72, 73, 74, 77, 79, 82, 87, 85, 90, 93, 98, 103, 112, 128,133, 141, 153: testlenen bitki örnekleri; +K: Pozitif kontrol, S: Su kontrol	54
Şekil 4.18.	Tekirdağ ili bağlarından toplanan örneklerin <i>Grapevine roditis leaf discoloration associated virus</i> 'ne karşı Badna-R-Up ve Badna-R-Do primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizlerinin elektroforez jel görüntüsü. M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 64, 65, 66, 68, 69,70, 72, 73, 74, 77, 79, 82, 87, 85, 90, 93, 98, 103, 112, 128,133, 141, 153: testlenen bitki örnekleri; +K: Pozitif kontrol, S: Su kontrol	54

- Şekil 4.19. Tekirdağ ili bağlarından toplanan örneklerin *Grapevine redblotch associated virus*'ne karşı GVGF1/GVGR1 primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizlerinin elektroforez jel görüntüsü. M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 118, 121, 139, 141, 143, 145, 149, 152, 158, 165, 171, 172, 177, 162, 165, 183, 190, 193, 196, 198, 201, 202, 205: testlenen bitki örnekleri; 1/40, 1/100, 1/200: Farklı oranlarda sulandırılmış pozitif kontrol, S: Su kontrol..... 56
- Şekil 4.20. Tekirdağ ili bağlarından toplanan örneklerden izole edilen DNA'ların *Grapevine redblotch associated virüs*-kılıf protein (GRBaV-CP) primeri kullanılarak yapılan PCR sonucunun elektroforez jel görüntüsü. M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 1-10, 1P, 2P, 186, 187, 188, 199, 211, 212, 213, 214: testlenen bitki örnekleri; S: Su kontrol, +K: pozitif kontrol 56
- Şekil 4.21. Tekirdağ ili bağlarından toplanan örneklerden izole edilen DNA'ların *Grapevine redblotch associated virus*-replikaz geni (GRBaV-REP) primeri kullanılarak yapılan PCR sonucunun elektroforez jel görüntüsü. M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya) ; 1-10, 1P, 2P, 186, 187, 188, 199, 211, 212, 213, 214: testlenen bitki örnekleri; -C: Su kontrol, +K: pozitif kontrol 56
- Şekil 4.22. GRBaV ve GRLDaV pozitif bitki kontrollerinden modifiye Mackenzie RNA ekstraksiyon yöntemiyle izole edilen total RNA'ların RT-PCR analizleri. M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); (CP+C: Grapevine red blotch asosciated-coat protein pozitif, +c1/100: Grapevine red blotch asosciated-coat protein 1/100 sulandırılmış pozitif, rep+c: *Grapevine red blotch asosciated*-replikaz proteini pozitif, +c1/100: *Grapevine red blotch asosciated*-replikaz proteini 1/100 sulandırılmış pozitif; 9-10: Tekirdağ bağ örnekleri; S: Su kontrol R11,R12:*Grapevine roditis leaf discoloration virus* pozitif kontrol) 57
- Şekil 4.23. *Grapevine pinot gris virus* (GPGV)'nin Tekirdağ örneklerinden RT-PCR sonrası pozitif bulunan 145 nolu palieri çeşidinden yapılan klonlama işleminde mavi ve beyaz koloni gelişimi göstermiştir. GPGV-CP, GPGV-MP, GPGV-REP bölgeleri için klonlanan örneklerdeki koloni oluşumu 58
- Şekil 4.24. *Grapevine pinot gris virus* (GPGV)'nin Tekirdağ örneklerinden RT-PCR sonucu pozitif bulunan Shiraz çeşitli 149 nolu örnekten yapılan klonlama işleminde GPGV-CP, GPGV-MP, GPGV-REP bölgelerinde oluşan mavi ve beyaz koloni gelişimi..... 58
- Şekil 4.25. *Grapevine pinot gris virus* (GPGV)'nin kılıf protein geni (CP) (A) ve hareketlilik geni (movement protein gene-MP) (B) sekans dizilerinin Gen Bankası (NCBI) veri tabanında kayıtlı bazı GPGV izolatlarının CP ve MP bölgesine ait nükleotit dizileri esas alınarak oluşturulan filogenetik ağaç. Filogenetik analizde, MEGA 6 yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendrogramda bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiş ve % 50' nin altındaki değerler ağaçta yer almamıştır. 60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Türkiye’de Son Altı Yıldaki Bağ Alanları (Da) Ve Üzüm Üretimi	1
Çizelge 1.2.	Bağlarda Ekonomik Olarak Önemli Zarar Yapan Virüsler.....	2
Çizelge 3.1.	Bağlarda Yeni Tespit Edilen Virüslerin PCR Analizlerinde Kullanılan Primer Çiftlerinin Nükleotid Dizilimleri ve Baz Büyüklükleri	12
Çizelge 3.1.	(Devam) Bağlarda Yeni Tespit Edilen Virüslerin PCR Analizlerinde Kullanılan Primer Çiftlerinin Nükleotid Dizilimleri ve Baz Büyüklükleri	13
Çizelge 4.1.	Tekirdağ ve Hatay İli Bağ Alanlarından Toplanan Örneklerinin Çeşitleri ve Testlendikleri Virüs.....	26
Çizelge 4.1.	(Devam) Tekirdağ ve Hatay İli Bağ Alanlarından Toplanan Örneklerinin Çeşitleri ve Testlendikleri Virüs	27
Çizelge 4.1.	(Devam) Tekirdağ ve Hatay İli Bağ Alanlarından Toplanan Örneklerinin Çeşitleri ve Testlendikleri Virüs	28
Çizelge 4.1.	(Devam) Tekirdağ ve Hatay İli Bağ Alanlarından Toplanan Örneklerinin Çeşitleri ve Testlendikleri Virüs	29
Çizelge 4.1.	(Devam) Tekirdağ ve Hatay İli Bağ Alanlarından Toplanan Örneklerinin Çeşitleri ve Testlendikleri Virüs	30
Çizelge 4.1.	(Devam) Tekirdağ ve Hatay İli Bağ Alanlarından Toplanan Örneklerinin Çeşitleri ve Testlendikleri Virüs	31
Çizelge 4.1.	(Devam) Tekirdağ ve Hatay İli Bağ Alanlarından Toplanan Örneklerinin Çeşitleri ve Testlendikleri Virüs	32
Çizelge 4.1.	(Devam) Tekirdağ ve Hatay İli Bağ Alanlarından Toplanan Örneklerinin Çeşitleri ve Testlendikleri Virüs	33
Çizelge 4.1.	(Devam) Tekirdağ ve Hatay İli Bağ Alanlarından Toplanan Örneklerinin Çeşitleri ve Testlendikleri Virüs	34
Çizelge 4.2.	Tekirdağ ve Hatay ili bağ alanlarından toplanan örneklerin RT-PCR ve PCR ile testlenmeleri sonucunda GSyV, GPGV, GRBaV, GRLDaV’leri ile testlenen örnek sayıları ve tespit edilen virüslerin bulunma oranları.....	35
Çizelge 4.3.	Tekirdağ Ve Hatay İli Bağ Alanlarından Toplanan Örneklerin <i>Grapevine Syrah Virus 1</i> İçin Gvq, Gsyv-1 Ve Gsyv-Cp Genine Spesifik Primerlerle Testlenen Örneklerin RT-PCR Sonucu.....	37
Çizelge 4.3.	(Devam) Tekirdağ Ve Hatay İli Bağ Alanlarından Toplanan Örneklerin <i>Grapevine Syrah Virus 1</i> İçin Gvq, Gsyv-1 Ve Gsyv-Cp Genine Spesifik Primerlerle Testlenen Örneklerin RT-PCR Sonucu.....	38
Çizelge 4.3.	(Devam) Tekirdağ Ve Hatay İli Bağ Alanlarından Toplanan Örneklerin <i>Grapevine Syrah Virus 1</i> İçin Gvq, Gsyv-1 Ve Gsyv-Cp Genine Spesifik Primerlerle Testlenen Örneklerin RT-PCR Sonucu.....	39
Çizelge 4.3.	(Devam) Tekirdağ Ve Hatay İli Bağ Alanlarından Toplanan Örneklerin <i>Grapevine Syrah Virus 1</i> İçin Gvq, Gsyv-1 Ve Gsyv-Cp Genine Spesifik Primerlerle Testlenen Örneklerin RT-PCR Sonucu.....	40
Çizelge 4.3.	(Devam) Tekirdağ Ve Hatay İli Bağ Alanlarından Toplanan Örneklerin <i>Grapevine Syrah Virus 1</i> İçin Gvq, Gsyv-1 Ve Gsyv-Cp Genine Spesifik Primerlerle Testlenen Örneklerin RT-PCR Sonucu.....	41

Çizelge 4.4.	Tekirdağ Ve Hatay İllerinde Toplanan Bağ Örneklerinin Grapevine Pinot Gris Virus İle Yapılan Rt-Pcr Sonucu.....	44
Çizelge 4.4.	(Devam) Tekirdağ Ve Hatay İllerinde Toplanan Bağ Örneklerinin Grapevine Pinot Gris Virus İle Yapılan Rt-Pcr Sonucu.....	45
Çizelge 4.4.	(Devam) Tekirdağ Ve Hatay İllerinde Toplanan Bağ Örneklerinin Grapevine Pinot Gris Virus İle Yapılan Rt-Pcr Sonucu.....	46
Çizelge 4.4.	(Devam) Tekirdağ Ve Hatay İllerinde Toplanan Bağ Örneklerinin Grapevine Pinot Gris Virus İle Yapılan Rt-Pcr Sonucu.....	47
Çizelge 4.4.	(Devam) Tekirdağ Ve Hatay İllerinde Toplanan Bağ Örneklerinin Grapevine Pinot Gris Virus İle Yapılan Rt-Pcr Sonucu.....	48
Çizelge 4.4.	(Devam) Tekirdağ Ve Hatay İllerinde Toplanan Bağ Örneklerinin Grapevine Pinot Gris Virus İle Yapılan Rt-Pcr Sonucu.....	49
Çizelge 4.4.	(Devam) Tekirdağ Ve Hatay İllerinde Toplanan Bağ Örneklerinin Grapevine Pinot Gris Virus İle Yapılan Rt-Pcr Sonucu.....	50
Çizelge 4.4.	(Devam) Tekirdağ Ve Hatay İllerinde Toplanan Bağ Örneklerinin Grapevine Pinot Gris Virus İle Yapılan Rt-Pcr Sonucu.....	51

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

bp	: baz çifti
°C	: Sıcaklık
da	: Dekar
g	: Gram
kb	: kilo baz
M	: Molar
mM	: Mili molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
ng	: Nanogram
pmol	: Piko mol

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ArMV	: <i>Arabis mosaic virus</i>
AILV	: <i>Artichoke italian latent virus</i>
BLMV	: <i>Blueberry latent mottle virus</i>
cDNA	: Complementary deoksiribonükleik asit
CP	: Coat protein (örtü protein)
DTT	: Dikloro difenil trikloroethan
d ₂ H ₂	: Çift distile su
EtBr	: Ethidium Brom
ETOH	: Ethanol
EDTA	: Ethylenediamintetra acetic acid
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asid

H_2O	: su
GPGV	: <i>Grapevine pinot gris virus</i>
GPGV-CP	: <i>Grapevine pinot gris virus-coat protein</i>
GPGV-MP	: <i>Grapevine pinot gris virus-moment protein</i>
GPGV-REP	: <i>Grapevine pinot gris virus-replikaz protein</i>
GRBaV	: <i>Grapevine red blotch associated virus</i>
GRBaV-CP	: <i>Grapevine red blotch associated virus-coat</i>
GRBaV-REP	: <i>Grapevine red blotch associated virus-replikaz</i>
REP	: Replikaz geni
GVCV	: <i>Grapevine vein clearing virus</i>
GRLDaV	: <i>Grapevine roditis leaf discoloration virus</i>
GCFaV	: <i>Grapevine cabernat frank associated virus</i>
GFLV	: <i>Grapevine fanleaf virus</i>
GLRaV	: <i>Grapevine leafroll associated virus</i>
GfKV	: <i>Grapevine fleck virus</i>
GBLV	: <i>Grapevine bulgarian latent virus</i>
GCMV	: <i>Grapevine crome latent virus</i>
GVA	: <i>Grapevine virus A</i>
GVB	: <i>Grapevine virus B</i>
GVC	: <i>Grapevine virus C</i>
GVD	: <i>Grapevine virus D</i>
GSyV-1	: <i>Grapevine syrah virus 1</i>
GVQ	: <i>Graevine syrah virus Q</i>
GINV	: <i>Grapevine berry inner necrosis virus</i>
GRSPaV	: <i>Grapevine rupestris stem-pitting associated virus</i>
GRVFV	: <i>Grapevine rupestris vein-feathering virus</i>
KCl	: Potasyum Klorür
$K_2 HPO_4$	: Potasyum dibazik fosfat
NCBI	: National Centerfer Biotechnology Information
NGS	: New generation sequencing
NJ	: Nighbor Joining
NaCl	: Sodyum klorür

NaOH	: Sodyum Hidroksit
M.Ö.	: Milattan önce
MP	: Moment protein (hareket protein)
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
RNA	: Ribonükleik asit
RNase	: Ribonükleaz
RT	: Revers Transcription
RT-PCR	: Revers Transcription polynase chain reaction
PCR	: Polynase chain reaction
SD	: Syrah Decline
REP	: Replikaz
TAE	: Tris Asetat EDTA
UV	: Ultraviole
V	: Volt
ToRSV	: <i>Tomato black ringspot virus</i>
TBRV	: <i>Tomato black ring virus</i>
TRSV	: <i>Tomato ring spot virus</i>
PRMV	: <i>Peach rosette mosaic virus</i>
RpRSV	: <i>Raspberry ringspot virus</i>
SLRSV	: <i>Strawberry latent ringspot virus</i>
Rpm	: Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
PVP	: Polyvynil-Pyrolidone

1.GİRİŞ

Bağcılık için yerkürenin en elverişli iklim kuşağı üzerinde bulunan ülkemiz, asmanın gen merkezi olmasının yanı sıra son derece eski ve köklü bir bağcılık kültürüne de sahiptir. Kültür asmasının anavatanı olarak tanımlanan ülkemizde bağcılık önemli bir tarım kolu durumundadır. Anadolu'da bağcılık kültürünün tarihi oldukça eskidir. 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 üzümler çoğunlukla kuru ve yaş olarak tüketilmiş, bir kısmı da pekmez, pestil ve lokum şeklinde değerlendirilmiştir (Oraman, 1965).

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). Bu çalışma kapsamında örnekleme yapılan Hatay ilinde sofralık ve şaraplık 51.595 dekar ekili bağ alanı bulunmakta olup yıllık üretim 49.482 ton iken Tekirdağ ilinde sofralık ve şaraplık toplam 37.679 dekar ekili bağ alanı bulunmaktadır ve 35.817 ton üretim ile bu iki il ülkemiz bağcılığına önemli katkı sağlamaktadır (Anonim, 2015).

Çizelge 1.1. Türkiye’de son altı yıldaki bağ alanları (da) ve üzüm üretimi (ton)

YILLAR	Alan(da)	ÜRETİM (ton)			
		Toplam	Sofralık	Kurutmalık	Şaraplık
2010	4.777.856	4.255.000	2.249.530	1.543.962	461.508
2011	4.725.454	4.296.351	2.268.967	1.562.064	465.320
2012	4.622.959	4.234.305	2.219.813	1.613.833	400.659
2013	4.687.922	4.011.409	2.132.602	1.423.578	455.229
2014	4.670.929	4.175.356	2.166.749	1.563.480	445.127
2015	4.619.557	365.000	1.891.910	1.334.563	423.527

Dünya bağcılığında İtalya, Fransa, ABD ve İspanya'dan sonra üretimde beşinci sırayı alan ülkemizde üzüm, sofralık ve kurutmalık olarak iç tüketim ve dış satımda önemli rol alırken diğer kullanımlar dışında şarapçılık da son yıllarda önemli gelişmeler göstermeye başlamıştır. Diğer tüm ürünlerde olduğu gibi bağ yetiştiriciliğini de tehdit eden önemli zararlı ve hastalıklar mevcuttur. Bu etmenler arasında özellikle hücre içinde yaşayan enfektiyöz organizmalar (virüsler, viroidler, sadece floem ve ksilemde bulunan prokaryotlar) göze çarpmakta ve bitkilerin yaşam kalitesini azaltarak verimde azalmalara neden olmaktadır.

Günümüzde bağları enfekte eden 62 kadar virüs saptanmıştır (Martelli, 2010). Bu virüslerin hemen hemen yarısı *Nepovirus*, *Sadwavirus*, *Closterovirus*, *Ampelovirus*, *Vitivirus*, *Maculavirus* ve *Foveavirus* cinsine ait virüslerdir. Bu virüsler tarafından neden olunan 22 adet hastalık bilinmektedir ve bunlardan sadece bir kaçı ekonomik anlamda zarar yapmaktadır. Bu hastalıklar oluşturdıkları belirtilere ve etmenlerine göre farklı gruplarda incelenmektedir. Bağlarda ekonomik anlamda zarar veren bazı virüsler Çizelge 1. 2'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Bağlarda ekonomik olarak önemli zarar yapan virüsler

<i>Grapevine fanleaf virus</i> (GFLV)	<i>Arabis mosaic virus</i> (ArMV),
<i>Grapevine leafroll associated virus</i> (GLRaV)	<i>Artichoke italian latent virus</i> (AILV)
<i>Tomato black ringspot virus</i> (TorRSV)	<i>Strawberry latent ringspot virus</i> (SLRSV)
<i>Raspberry ringspot virus</i> (RpRSV)	<i>Peach rosette mosaic virus</i> (PRMV)
<i>Grapevine fleck virus</i> (GfKV)	<i>Tomato black ring virus</i> (TBRV)
<i>Tomato ringspot virus</i> (TRSV)	<i>Blueberry latent mottle virus</i> (BLMV)
<i>Grapevine bulgarian latent virus</i> (GBLV)	<i>Grapevine crome latent virus</i> (GCMV)
<i>Grapevine stem pitting virus</i> [Ruggose wood complex (<i>Rupestis</i> stem pitting, <i>Corky bark</i> kober stem grooving, <i>LN 33</i> stem grooving) <i>Grapevine virus A</i> (GVA), <i>Grapevine virus B</i> (GVB), <i>Grapevine virus C</i> (GVC), <i>Grapevine virus D</i> (GVD)]	

Bilinen bu virüslerin yanı sıra dünya bağ alanlarına son yıllarda giriş yapmış olan ve tanımlanmış bazı yeni virüsler bulunmaktadır. Bu virüsler, *Grapevine syrah virus 1*

(GSyV-1), *Grapevine Red blotch associated virus* (GRBaV), *Grapevine pinot gris virus* (GPGV) ve *Grapevine roditis leaf discoloration associated virus* (GRLDaV)'dur. Bu etmenlerden GSyV-1, ilk kez 2009 yılında ABD de iki farklı araştırmacı grubu tarafından tanımlanmıştır. Bu gruplardan birisi şiraz üzüm çeşidinde (Syrah) *Grapevine syrah virus-1* (GSyV-1) diğeri ise yabani asmalarda *Grapevine virus Q* (GVQ) olarak adlandırılan iki farklı virüsün varlığını bildirmiştir (Al Rwahnih ve ark., 2009; Sabanadzovic ve ark., 2009). Tespit edilen bu yeni virüslerden ilki '*Grapevine syrah virus-1*' olarak adlandırmış ve *Tymoviridae* familyası *Marafavirus* cinsi içine dahil edilmiştir. Bu virüs 2010 yılında Şili, 2015 yılında ise Orta Avrupa ülkelerinden Slovakya ve Çek Cumhuriyeti'nde saptanmıştır (Glasa ve ark., 2015). GRBaV'nin neden olduğu "bağ kırmızı beneklenme hastalığı (*red blotch disease*)" ise 2008 yılından beri Kuzey Amerika bağ alanlarında görülmektedir. Bununla birlikte hastalığa neden olan virüsün tanımlanması ve adlandırılması 2012 yılında sonuçlandırılarak etmen virüs *Geminiviridae* familyasına dahil edilmiş ve *Grapevine red blotch-associated virus* (GRBaV) olarak adlandırılmıştır (Rwahnih ve ark., 2012b). Bu virüsün en yaygın tespit edildiği kırmızı üzüm çeşitleri Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Malbec, Merlot, Mourvèdre, Petite Sirah, Petit Verdot, Pinot Noir ve Zinfandel; beyaz çeşitler ise Chardonnay, Riesling, Semillon ve Viognier'dir. GRBaV, ABD ve Kanada'da koleksiyon bağları, damızlık bloklar, fidanlıklar ve ticari bağlarda tespit edilmiştir (EPPO, 2015). *Grapevine pinot gris virus* (GPGV), yeni nesil sekans analiz yönteminin bitki virolojisi alanında yoğun olarak kullanılmaya başlaması ile birlikte ilk kez 2012 yılında saptanmış yeni bir virüstür. GPGV'nin İtalya izolatının tüm genom sekans analizi yapılmış ve bu virüsün *Trichovirus* cinsine giren *Grapevine berry inner necrosis virus* (GINV) ile çok yakın akraba olduğu bildirilmiştir (Giampetruzzi ve ark., 2012). Avrupa'da çoğunlukla şaraplık üzüm çeşitlerinde saptanan bu virüs şu ana değin Avrupa dışında sadece Kore'de üzüm salkımlarında nekrozlar şeklinde simptom oluşturan sofralık "Tamnara" üzüm çeşidinde saptanmıştır (Cho ve ark., 2013). İlk kez Kuzey İtalya'da Pinot gris üzüm çeşidinde saptandığı için bu isimle anılmaktadır. Son iki yıl içinde ise Kore (Cho ve ark., 2013), Slovenya (Plesko ve ark., 2014), Slovakya ve Çek Cumhuriyeti'nde (Glasa ve ark., 2014) ve Fransa'da (Beuve ve ark., 2015) saptanmıştır. 1980'li yılların başlarında Yunanistan'da "Roditis" ve "Savastiano" üzüm çeşitlerinde '*Roditis leaf discoloration (RLD)*' olarak adlandırılan bir hastalık gözlenmiş

ve bu hastalıktan sorumlu virus 2015 yılında tanımlanarak *Grapevine roditis leaf discoloration associated virus* (GRLDaV) olarak adlandırılmıştır (Maliogka ve ark., 2016).

Ülkemizde bağ alanlarının birçok virüsle bulaşık olduğu farklı araştırma grupları tarafından bildirilmiştir. Bağ alanlarımızda virüslerin belirlenmesi için yapılan bazı bölgesel survey çalışmalarında biyolojik indeksleme ve serolojik yöntemler kullanılarak *Grapevine leafroll associated virus* (GLRaV), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine fleck virus* (GfKV), *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV), *Grapevine virus A*, *Tomato black ring virus* (TBRV) saptanmıştır (Martelli, 1987; Gürsoy, 1988; Özaslan ve ark., 1993; Akbaş ve Erdiller, 1993; Azeri ve Çiçek, 1995; Yılmaz, 1997; Çağlayan, 1997; Köklü ve ark., 1998; Özarslan, 1998; Çığsar ve ark., 2002; Akbaş ve ark., 2007; Buzkan ve ark. 2010; Kaya ve Erilmez 2012; Sertkaya ve ark. 2008). Ülkemizde moleküler tanı yöntemleri kullanılarak yapılan tanı çalışmaları son yıllarda başlamış olup (Buzkan ve ark., 2010; Kaya ve Erilmez., 2012) ülkemize yeni giriş yapan virüs hastalıkları ile ilgili ilk çalışmalar bu tez kapsamında planlanmıştır. Bu çalışmanın amacı *Grapevine syrah virus 1* (GSyV-1), *Red blotch associated virus* (GRBaV), *Grapevine pinot gris virus* (GPGV), *Grapevine roditis leaf discoloration virus* (GRLDaV) gibi son yıllarda bağ alanlarına giriş yapan yeni virüslerin Hatay ve Tekirdağ ili bağ alanlarındaki yaygınlık durumunun PCR analizleri ile belirlenmesi ve tespit edilen virüslerin moleküler karakterizasyonunun yapılmasıdır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Ülkemiz, bağ yetiştiriciliğinde dünyanın önde giden ülkeleri arasında yer almakta olup, son yıllarda tanımlanan yeni viral etmenlerle ilgili ülkemizde yayınlanmış bir çalışma bulunmaktadır.

Syrah Decline (SD) hastalığı ilk kez Fransa'da 1993 yılında saptanmıştır (Renault-Spilmont Boursiquot, 2003). Bu hastalığın bazı üzüm çeşitlerinde latent symptom oluşturduğu, aşı gözleri ve unlu bit (*Planococcus* spp.) ile duyarlı bağ çeşitlerine taşınabildiği bildirilmiştir (Goszczynski ve Jooste, 2003). Bu hastalık ilerleyen yıllarda ABD (Battany ve ark., 2004), Avusturalya (Habibi ve ark., 2006), Güney Afrika (Goszczynski, 2007) ve İspanya'da (Gramaje ve ark., 2009) tespit edilmiştir. Kaliforniya bağlarında 2004 yılında tespit edilen ve SD olduğu düşünülen hastalık belirtileri aşı noktasında şişkinlik, odun dokusunda kırılabilirlik ve çukurlaşmalar, yapraklarda kızarma, kavrulma ve geriye doğru ölüm olarak tanımlanmıştır. Simptom gösteren bağ çubuklarından alınan enine kesitlerde floem ve kambium dokularında aşırı gelişme ve lastiksi bir görünümde olan sürgünlerde yeterince lignin oluşturmadığı görülmüştür (Goussard ve Bakker, 2006). Bu belirtiler Fransa'da tespit edilenlerle benzerlik göstermesine karşın aynı hastalıklar olmadığı bildirilmiştir. Fransa'da SD belirtileri gösteren bağlarda bu belirtilerle ilişkili hiç bir patojen tespit edilememiştir. İspanya'da bazı fungal patojenler de SD ile ilişkili bulunmuştur. (Gramaje ve ark., 2009). 2009 yılında ABD de iki farklı araştırmacı grubu tarafından tanımlanan ve bu gruplardan birisi Shiraz üzüm çeşidinde (Syrah) *Grapevine syrah virus-1* (GSyV-1) diğeri ise yabani asmalarda *Grapevine virus Q* (GVQ) olarak adlandırılan iki farklı virüsün varlığını bildirmiştir (Al Rwahnih ve ark., 2009; Sabanadzovic ve ark., 2009). ABD'de geriye ölüm belirtileri gösteren şiraz üzüm çeşitlerinde simptomlardan sorumlu virusleri tespit edebilmek amacıyla yürütülen NGS(Next Generation Sequencing - Yeni sekans analizleri) analizleri sonucunda 7 farklı RNA genomu tespit edilerek 4 tanesinin virus, 3 tanesinin de viroid genomu olduğu bildirilmiştir (Al Rwahnih ve ark., 2009). Hastalık belirtileri ile ilişkili bulunan virüslerden iki tanesi önceden bildirilmiş olan *Grapevine rupestris stem-pitting associated virus* (GRSPaV) ve *Grapevine rupestris vein-feathering virus* (GRVfV) olarak belirlenmiş ve üçüncü virüsün ise yeni bir virüs olduğu, GRVfV ile yakın

homoloji gösterdiği bildirilmiş ve geçici olarak *Grapevine Syrah virus 1* (GSyV-1) olarak adlandırılmıştır. Güney Afrika’ da SD belirtileri gösteren Şiraz üzüm çeşitlerinde *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3) ve *Grapevine virus A* (GVA) da saptanmıştır (Prosser ve ark., 2007; Goszczynski, 2007; Maree ve ark., 2008).

Grapevine red blotch-associated virus (GRBaV) son zamanlarda tespit edilen bir viral patojendir. (Krenz ve ark., 2012). Bu küresel şekilli DNA virüsünün “red blotch (kırmızı benek)” hastalığı ile ilişkili olduğu görülmüştür (Al Rwahnih ve ark., 2013). Red blotch hastalığı ilk kez 2008 yılında ABD’de Cabernet Sauvignon çeşidinde gözlenmiş ve “yaprak kıvrıcılık” hastalığına benzetilmiş ancak semptomlu bitkilerin hiç birisinden GLRaV grubuna ait virüsler tespit edilememiştir (Al Rwahnih ve ark., 2013). Semptomlu örneklerin dsRNA’ları kullanılarak yapılan sekans NGS analizlerinde önceden bilinmeyen ve *Geminiviridae* familyasının üyelerine çok yakından benzeyen monopartit bir ssDNA viromu tespit edilmiştir. Yeni saptanan bu virüse *Grapevine red blotch-associated virus* adı verilmiştir (Al Rwahnih ve ark., 2012a). GRBaV’nin Kuzey Amerika’da *Vitis* türlerinde meyve olgunlaşmasında gecikme, meyve suyunun şekerinde azalma ve yaprak kıvrıcılığına benzer belirtiler gösterdiği bildirilmektedir (Sudarshana ve ark., 2015). Bugüne kadar GRBaV Kuzey Amerika dışında sadece hiçbir ülkede tespit edilememiştir.

Grapevine pinot gris virus (GPGV) NGS analiz yönteminin bitki virolojisinde kullanılmaya başlanmasıyla ilk kez 2012 yılında saptanmıştır. İlk kez Kuzey İtalya’da Pinot gris üzüm çeşidinde saptandığı için bu isimle anılmaktadır (Giampetruzzi ve ark., 2012). İtalya’da sekans analizi yapılan GPGV izolatının ve bu virüsün *Trichovirus* cinsine giren *Grapevine berry inner necrosis virus* (GINV) ile çok yakın akraba olduğu bildirilmiştir (Giampetruzzi ve ark., 2012). Avrupa’da çoğunlukla şaraplık üzüm çeşitlerinde saptanan bu virus şu ana değin Avrupa dışında sadece Kore’de üzüm salkımlarında nekroz şeklinde semptom oluşturan sofralık “Tamnara” üzüm çeşidinde saptanmıştır (Cho ve ark., 2013). Kore’de GPGV enfekteli omcalarda sadece üzüm danelerinde GINV semptomlarına benzer şekilde nekrotik alanlara rastlanmıştır, yaprak ve sürgünlerde ise beneklenme, nekroz ve deformasyonlar gözlenmemiştir (Cho ve ark., 2013). Son iki yıl içinde ise Kore (Cho ve ark., 2013), Slovenya (Plesko ve ark., 2014), Slovakya ve Çek Cumhuriyeti’nde (Glasa ve ark., 2014) saptanmıştır. Avrupa ülkelerinde GPGV daha çok Pinot gris, Chardonnay, Traminer, Pinot noir, Black

Magic, Supernova, Glera, Sauvignonasse ve Muscat blanc üzüm çeşitlerinde bazen klorotik beneklenme ve bodurlaşma şeklinde görülürken bazen de latent enfeksiyonlar şeklinde bildirilmiştir (Malossini ve ark., 2012; Raiola ve ark., 2013; Morelli ve ark., 2014; Plesko ve ark., 2014). GPGV Slovakya izolatlarından kaydedilen genom sekans analizleri İtalya izolatı ile kıyaslandığında benzerlik gösterdiği ve yakın akraba oldukları tespit edilmiştir (Glasa ve ark., 2014). *Grapevine pinot gris virus* (GPGV), Avrupa ve Kore’de *Vitis vinifera* L.’da beneklenme ve deformasyon içeren bir *Thricovirus* (*Betaflexiviridae*) olarak bildirilmiştir (Martelli, 2014). Gazel ve ark. (2014) Tekirdağ ili bağ alanlarından toplanan 60 örneği *Grapevine pinot gris virus* (GPGV)’ye karşı RT-PCR ile testlediklerinde 22 örneği GPGV ile enfekteli bulmuşlar ve bu ön bulgular bu tezin planlanmasına vesile olmuştur. GPGV ile enfekteli bulunan semptomlu ve semptomsuz bağ örneklerinin hareket proteini ve kılıf proteini (MP/CP) ile replikaz geninin RNA’ya bağlı RNA polimeraz (RdRp) genomik bölgelerinin taranması sonucu virulent ve latent varyantları belirleyen iki farklı genetik grup saptanmıştır (Salderelli ve ark., 2015).

Bağlarda hastalığa neden olan DNA virüsleri içerisinde GRLDaV nin neden olduğu hastalık, 1980’li yılların başında Yunanistan’da gözlenmiş olup özellikle iki çeşitteki (*Roditis* ve *Savastiano*) yapraklarda belirgin renk kayıpları nedeniyle “*Roditis leaf discoloration* (RLD)” hastalığı olarak isimlendirilmiştir. RLD hastalığının özellikle sonbahar döneminde genç asma yapraklarında sararma ya da renk kırılması ve deformasyon şeklinde semptomlar verdiği ve özellikle de üzümlerde verim ve kaliteyi düşürdüğü bildirilmiştir (Rumbos ve Avgelis, 1989). Hastalık semptomları *Vitis vinifera* cv ‘Mission’ üstüne aşılama yoluyla çoğaltılmıştır. Enfekteli bağlarda bilinen virüslerin serolojisi saptanmış olsada RLD bulunamamıştır (Avgelis ve Rumbos, 1990; Avgelis ve ark., 2006; Rumbos ve Avgelis, 1993). GLRDaV bağlarda tanımlanan *Geminivirus* ile ilişkili red blotch ve vein clearing takip eden üçüncü DNA virüsüdür (Al Rwahnih ve ark., 2013). Son yıllarda NGS teknolojisinin kullanılmasıyla yeni viral ajanların varlığını açıklamak ve bilinmeyen bulaşıcı hastalıkların etiyolojisini belirlenmesi kolaylaşmıştır (Al Rwahnih ve ark., 2013; Giampetruzzi ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2011). 2015 yılına kadar etmeni ve etiyolojisi tam olarak bilinmeyen bu hastalığın yeni bir çalışma ile etmeni saptanmış ve *Grapevine roditis leaf discoloration-associated virus* olarak adlandırılmıştır. Yaklaşık 6988 nükleotid uzunluğunda olan yeni

bir DNA virüsü olduğu bildirilmiş olup viral genomun 4 farklı açık okuma erevesi (open reading frame:ORF) içerdiği ve bu virüsün de incir badnavirüs 1 (*Fig bandavirus 1*) ile yüksek oranda homoloji gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan arazi çalışmalarında bu virus sadece Roditis ve Savastiano eşitlerinde değil farklı çeşit ve simptomsuz örnekler olmak üzere %36 gibi yaygın bir oranda tespit edildiği bildirilmiştir GRLDaV'nin tespiti ile ilgili çalışmalarda gelişme geriliği, yapraklarda deformasyon ve anormal renklenmeler gözlenmiştir (Maliogka ve ark., 2015).



3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Arazi Çalışmaları ve Örnekleme

Arazi çalışmaları Hatay ve Tekirdağ illerinde yoğun olarak bağcılığın yapıldığı ilçelerde yürütülmüştür. Virüs benzeri belirti gösteren Antep karası, Chardonnay, Shiraz, Zinfandel, Palieri, Alicante bouchet, Dimyat, Kalecik karası, Pinot noir, Çavuş, Hamburğ misketi, Gamay, Alphonse, Boğazkere, Zevik, Razak, Narince, Merlot, Michel palieri, Lival, Karasakız 17, Cinsout, Paraz karası, Çınar üzümü 34-10, 8-11 Tiryaki, Ada karası gibi yerli ve yabancı sofralık ve şaraplık üzüm çeşitlerinden örnekler toplanmıştır. Survey çalışmaları 2014 ve 2015 yılı ilkbahar ve sonbahar dönemlerinde yürütülmüş, belirtiler kaydedilerek her bir omcanın dört farklı yerinden 10-15 cm uzunluğunda sürgün örnekleri alınarak uygun koşullarda laboratuvara getirilmiş ve testleninceye kadar +4 °C'de saklanmıştır. Bu çalışma kapsamında Hatay ilinden toplam 111 Tekirdağ ilinden ise 191 örnek toplanmıştır. Örnekler kayıt altına alınarak simptomolojik açıdan karakteristik olanlar numaralandırılarak fotoğraflanmıştır.

3.2. Moleküler Çalışmalar

3.2.1. Bağ Örneklerinden Nükleik Asit (NA) İzolasyonu

Bağlardan toplanan örneklerden RNA izolasyonu için Qiagen RNeasy plant mini kiti kullanılmıştır. RNA ekstraksiyon kiti firma önerisine göre ve MacKenzie ve ark (1997)'nin önerdiği modifiye yonteme göre kullanılmıştır. GRBaV'nin ve GRLDaV'nin DNA virüsü olması nedeniyle aynı örneklerden DNA izolasyonu Qiagen DNA plant mini kiti kullanılarak yapılmıştır. NA izolasyonlarında ilkbahar döneminde yapraklar, sonbahar ve kış döneminde ise sürgünlerden hazırlanan floem kazıntıları kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak GSyV1 ve GRLDaV için enfekteli bitki ve plasmid DNA'ları Dr. V. Maliogka'dan (Aristoteles Üniversitesi, Selanik-Yunanistan), GRBaV için Dr. M. Rwahnih'den (Kaliforniya Üniversitesi-ABD), GPGV için ise Dr. M. Glasa'dan (SAVBA-Viroloji Enstitüsü, Slovakya) temin edilmiştir. Her bir bitki

materyalinden 0,5 g örnek sıvı azot içinde ezildikten sonra izole edilen RNA ve DNA'lar PCR çalışmalarında kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.1.1. Qiagen RNA Ekstraksiyon Kiti ile modifiye Mackenzie yöntemiyle RNA İzolasyonu

- Örnekler sıvı azot ile ezildikten sonra ezilen dokudan 0,5 g alınıp Mackenzie ekstraksiyon tampon çözeltisi eklenmiş, ezilmiş ve örnekler 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarılmıştır.
- Bu örneklerin üzerine 150 µl %20'lik sarkozyl eklenmiş ve hafifçe karıştırılmıştır.
- 70°C'de 10 dk ara ara karıştırılarak inkübe edilmiştir.
- 14.000 rpm' de 5 dk santrifüj yapılmıştır.
- Sıvı kısım pellet hareket ettirilmeden 2 µl'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş Q/Ashredder spin kolon'a alınmıştır.
- 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılmıştır.
- Sıvı kısım ependorf tüplere alınarak ve üzerine 0,5 hacim %96'lık alkol eklenmiş ve pipetle karıştırılmıştır.
- Karışımdan 650 µl alınarak RNAasy mini spin kolona (pembe renkli) alınmıştır.
- 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılmıştır. Sıvı kısım atılarak, arta kalan karışım ile işlem tekrarlanmıştır.
- RNAasy mini spin kolonlar yeni ependorf tüplere yerleştirilerek üzerine 700 µl RW1 buffer eklenmiştir.
- 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılarak sıvı kısım atılmıştır.
- RNAasy mini spin kolonlar yeni tüplere yerleştirilerek üzerine 500 µl RPE buffer eklenerek ve 10.000 2 dk santrifüj yapılmıştır. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır.
- Kolona 40 µl RNase ari su eklenerek 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve RNA -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.1.2 Qiagen DNA Ekstraksiyon Kiti ve Nikotin tamponu ile Modifiye DNA İzolasyonu

Qiagen DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak yapılan DNA izolasyonunda daha iyi kalitede ve konsatrasyonda DNA elde etmek için ya doğrudan ticari kit protokolü ve Nikotin tampon çözeltisi (Martin, R., yayınlanmamış veriler) kullanılarak bitkiler ezilmiş ve devamında kit protokolünün aşamaları takip edilmiştir.

- Örnekler ≤ 100 mg yaş ağırlık veya ≤ 20 mg liyofilize doku ezilmiştir .
- Kit protokolü uygulamasında, sıvı azotta parçalanmış olan bitki örnekleri 400 μ l AP1 tamponu ile, Nikotin tamponu kullanıldığında ise 400 μ l Nikotin tamponu kullanılarak ezilmiş diğer aşamalar ise Qiagen DNA plant mini kit protokolüne göre uygulanmıştır.
- Ekstrakte edilen örnekler ependorf tüplere boşaltılmış ve üzerine 4 μ l RNase eklenerek vortekslenmiştir.

NOT: Gerek AP1 gerekse Nikotin tampon ile RNase, kullanılmadan önce karıştırılmamalıdır.

- 65° C' de 30-40 dakika inkübe edilmiş ve inkübasyon sırasında 2-3 kez tüpler ters düz edilmiştir.
- Her bir tüpe P3 tampon çözeltisinden 130 μ l eklenerek karıştırılmış ve buz üzerinde 10 dk inkübe edilmiştir.

NOT: Lysate 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmelidir.

- Lysate Q/Ashredder spin kolonuna pipet ile aktarılıp 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.
- Sıvı kısım pellet hareket ettirilmeden yeni bir tüpe aktarılıp 1,5 hacim AW1 tamponu eklenmiş ve pipetleme yapılarak karıştırılmıştır.
- 2 ml koleksiyon tüpüne yerleştirilen DNeasy mini spin kolonuna 650 μ l karışım aktarılıp 2 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve sıvı kısım atılmıştır. Bu adım arta kalan örnek ile devam edilmiştir.
- DNeasy mini spin kolonu 2 ml'lik koleksiyon tüpüne aktarılıp üzerine 500 μ l AW2 tamponu eklenerek 2 dakika 8.000 rpm'de santrifüjlenmiş ve sıvı kısım atılmıştır.
- Aynı kolonlara 500 μ l AW2 tamponu eklenerek 3 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

NOT: Kolonun sıvı kısımla temas etmemesi için spin kolonu koleksiyon tüpünden dikkatlice çıkarılmalıdır. Spin kolonu 1,5 veya 2 ml'lik ependorf tüplere taşınmıştır.

- Her bir kolona 25 µl AE tamponu eklenmiş, oda sıcaklığında 20-30 dakika bekletilmiştir. 8.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek aynı işlem iki kez tekrarlanmış ve elde edilen DNA'lar -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) Analizleri

3.2.2.1. Reverse Transkripsiyon (RT; Reverse Transcription)

RNA virüslerinin PCR ile testlenmesinde ilk aşamada, RNA'lardan cDNA elde edilmiştir. Her bir örnek için 1 µl Random hexamer primer, 6,5 µl d₂H₂O ve 5 µl RNA karışımı hazırlanarak PCR tüplerine konulmuştur. PCR cihazında 94 °C'de 5 dakika ve buz'da 5 dakika bekletildikten sonra her bir tüp içine 5xRT tamponundan (Fermatas) 4 µl, d₂H₂O 2 µl, dNTP (10 mM) 0,5 µl ve RT enziminden 1 µl eklenmiştir. Tüpler PCR cihazında 42 °C'de 1 saat 72 °C'de 10 dakika tutularak ve cDNA aşaması tamamlanmıştır.

3.2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyon

Grapevine pinot gris virus (GPGV), *Grapevine syrah virus-1* (GSyV-1), *Grapevine roditis leaf discoloration associated virus* (GRLDaV) ve *Grapevine red-blotch associated virus* (GRBaV)'lerinin tespit edilmesinde kullanılan primer baz dizileri. Çizelge 3.1. verilmiştir.

Çizelge 3.1. Bağlarda yeni tespit edilen virüslerin PCR analizlerinde kullanılan primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri ve baz büyüklükleri

Virüs Adı	Primer Adı	Dizilim (5'-3')	Büyük- lük(bp)	Referans
GSyV-1	DET-F	CAAGCCATCCGTGCATCTGG	297 bp	Al Rwahni ve ark., 2009
	DET-R	GCCGATTTGGAACCCGATGG		

Çizelge 3.1. (Devam) Bağlarda yeni tespit edilen virüslerin PCR analizlerinde kullanılan primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri ve baz büyüklükleri

Virüs Adı	Primer Adı	Dizilim (5'-3')	Büyük- lük(bp)	Referans
GVQ	CP-F	TCCCAGCTTCAGGGTGAATT	720 bp	Sabanadzovic ve ark., 2009
	CP-R	GCATTGCTGCGCATTGGAGG		
GSyV-CP	5922F	CCAATGGGTGCGCACTTGTTG	374 bp	Glasa ve ark., 2015
	6295R	ACTTCATGGTGGTGCCGGTC		
GRBaV	3F	GTTATTCCAAGCTGTCCACT	1063 bp	Al Rwahnih ve ark., 2013
	R352	CACTAGAAGTGCAGGAATCG		
	REP-for	CAAGTCGTTGTAGATTGAGGACG TATTGG	318 bp	
	REP-rev	AGCCACACCTACACGCCTTGCTC ATC		
	CP-for	AGCGGAAGCATGATTGAGACAT TGACG	257 bp	Krenz ve ark., 2014
	CP-rev	AACGTATGTCCACTTGCAGAAGC CGC		
GRLDaV	Badna-R-Up	GAAGGAATTGAATCTCCAGCAG CAGG	261 bp	Maliogka ve ark., 2015
	Badna-R-Do	CTCTGCTACACCAAGTGATAGAT TGTT		
GPGV	GPG-CP 6609F	ATTGCGGAGTTGCCTTCAAG	411 bp	
	GPG-CP 7020R	CTGAGAAGCATTGTCCCATC		
	GPG-MP 5637F	AATTGATCCCGTGTAGTGC	302 bp	Glasa ve ark., 2014
	GPG-MP 5939R	TCCGAGGACGATGAACCTC		
	GPG-REP F	AATTGATCCCGTGTAGTGC	618 bp	
	GPG-REP R	TCCGAGGACGATGAACCTC		

Grapevine pinot gris virus (GPGV)'ün PCR analizleri

GPGV'nin RT-PCR analizlerinde hareketlilik geni (movement protein=MP), kılıf protein geni (coat protein=CP) ve replikaz genine (replicase=REP) spesifik primerler kullanılmıştır. Bu primerler için PCR karışımı, 16,8 µl d₂H₂O, 2,5 µl 10XB, 2µl dNTP (2,5 mM), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), virüse özgü 1 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl), 0,2 µl Taq-DNA polymerase ve 2 µl cDNA olacak şekilde hazırlanmıştır. GPGV'nin CP ve MP gen bölgeleri için PCR döngüleri aynı olup PCR cihazı 1 döngü 94 °C'de 5 dakika; 35 döngü 94 °C'de 20 saniye, 55 °C'de 20 saniye, 72 °C'de 30 saniye ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika olarak programlanmıştır. GPGV-REP bölgesi için; PCR 1 döngü 94 °C'de 5 dakika; 40 döngü 94 °C'de 1 dakika, 58 °C'de 2 dakika, 72 °C'de 3 dakika ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika olarak programlanmıştır.

Grapevine syrah virus 1 (GSyV-1)'in PCR analizleri

PCR karışımı, 16,8 µl d₂H₂O, 2,5 µl 10XB, 2µl 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 ve 2 µl cDNA olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR cihazında 1 döngü 94 °C'de 5 dakika; 35 döngü 94 °C'de 30 saniye, 56 °C'de 20 saniye, 72 °C'de 30saniye ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika olarak programlanmıştır. Her üç primer içinde aynı karışım ve aynı döngüler kullanılmıştır.

Grapevine redblotch associated virus (GRBaV) 'un PCR Analizleri

DNA virüsü olan GRBaV'nin PCR analizinde, *Grapevine red-blotch associated virus* (GRBaV) genel tanı primeri ile birlikte virüsün kılıf proteini ve replikaz genini çoğaltan primerler (GRBaV-CPfor-CPprev ve GRBaV-REPfor-REPrev) kullanılmıştır. GRBaV saptama (3F-R352) primer çifti için yapılan optimizasyon çalışmalarında pozitif kontrol olarak kullanılan bitki materyalinden izole edilen DNA'lar sulandırılmadan ve 1/40 ve 1/100 oranında sulandırılarak kullanılmıştır. Kullanılan primerlerle yapılan PCR analizlerinde 15,8 µl d₂H₂O, 2,5 µl 10XB, 1,5 µl dNTP (2,5 mM), 2 µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl virüse özgü primer çifti (her biri 20 pmol/µl), 0,2 µl Taq-DNA polymerase (5 U/µl) ve 2 µl DNA karışımı hazırlanmıştır. Karışım PCR cihazında 1 döngü 94 °C'de 30 sn; 35 döngü 92°C'de 30 sn, 55 °C'de 30 sn, 72 °C'de

1dk, 1 döngü 72 °C’de 10 dk olarak programlanmıştır. GRBaV-CP ve GRBaV-REP gen bölgeleri için Her bir örnekte 15,8 µl d₂H₂O, 2 µl 10XB, 1,5 µl dNTP(2.5 mM), 1 µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl virüse özgü üç primer çifti (her biri 10 pmol/µl), 0,2 µl Taq-DNA polymerase (5 U/µl) ve 2 µl DNA karışımı kullanılarak PCR yapılmıştır. Karışım PCR cihazında 1 döngü 94 °C’de 30dk; 35 döngü 95°C’de 30 sn, 55 °C’de 30 sn, 72 °C’de 45sn, 1 döngü 72 °C’de 1 dk olarak programlanmıştır.

Grapevine roditis leaf discoloration associated virus (GRLDaV)’ün PCR Analizleri

Bu virüsün PCR ile testlenmesinde PCR karışımı; 17,8 µl d₂H₂O, 2,5 µl 10XB, 0,5 µl dNTP (10 mM), 1 µl MgCl₂ (25 mM), virüse özgü 0,5 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl), 0,2 µl Taq-DNA polymerase ve 2 µl DNA olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR cihazında 1 döngü 94 °C’de 5 dakika; 35 döngü 94 °C’de 30 saniye, 55 °C’de 45 saniye, 72 °C’de 1 dakika ve 1 döngü 72 °C’de 10 dakika olarak programlanmıştır.

3.2.3. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Jel Elektrophorez

RT-PCR ve PCR ürünlerinin görüntülenmesi için %1’lik Agaroz jel elektrophorez 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 elektrophorez tankına yerleştirilmiştir. 1xTAE tamponu tankın içersine jeli kapatacak şekilde döküldükten sonra jel çukurlarına DNA marker ile beraber PCR ürünleri jel çukurlarına yüklenmiştir. Yükleme tamamlandıktan sonra elektrophorez güç kaynağı ile elektrophorez tankına 150 V’luk elektrik akımı 50 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 ışıpta görüntülenip oluşan bantların büyüklüğüne göre sonuçlar değerlendirilmiştir. Testlenen virüslere karşı örnekler kullanılan pozitif kontrollerle karşılaştırılmış ve beklenen düzeyde bant oluşturanlar pozitif, oluşturmayanlar negatif kabul edilerek jel görüntüleme cihazında fotoğraflanmıştır.

3.2.4. GPGV için Moleküler Klonlama Çalışmaları

3.2.4.1. PCR ile Çoğaltılan CP, MP ve REP Gen Bölgelerinin pGEM–T Vektörlerine Klonlanması

PCR analizleri sonucu GPGV- CP, MP ve REP primerleri ile çoğaltılan PCR ürünleri pGEM-T Easy vektörüne kit kullanım kılavuzu takip edilerek klonlanlama çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla ilk olarak elde edilen PCR ürünleri DNA Clean / Extraction Kiti (MinElute PCR Purification Kit) kullanılarak temizleme işlemi yapılmıştır.

DNA'nın saflaştırılması aşamaları;

1. 1 µl PCR ürünü için 5 µl PB buffer kullanılmış ve ependorf tüpe aktarılmıştır.
2. PCR ürünü+PB buffer karışımı spin kolona aktararak 2 dk santrifüj yapılmıştır.
3. Alta çöken kısım dökülerek spin kolona 750 µl PE buffer eklenmiş ve 2 dk santrifüj yapılmıştır.
4. İkinci kez tekrar 2 dk santrifüj yapılarak alt çöken kısım dökülmüş ve filitre edildikten sonra ependorf tüpe aktarılmıştır.
5. Üzerine 15 µl distile su (RNase free su) ilave edilerek 1 dk bekletilmiş ve daha sonra 2 dk santrifüj yapılmıştır.

3.2.4.2. pGEM – T Easy vektöre klonlama işlemi

Klonlama işlemi için “pGEM–T Easy vektor” klonlama protokolü kullanılmıştır. Buna göre saflaştırılan PCR ürününden 3µl, 2× ligation buffer’ dan 5 µl, pGEM – T Easy vektörden (50 ng) 1 µl, T4 DNA ligase (3 Weiss units/µl) 1 µl olacak şekilde toplam 10 µl hacimde karışım hazırlanarak, +4 °C de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.4.3. Transformasyon

Transformasyon işlemi için hazırlanan ligasyon karışımından 2 µl alınarak 50 µl JM 109 Competent *E.coli* hücreleri üzerine eklenerek karıştırılmıştır. Buz üzerinde 20 dakika bekletilen karışım daha sonra ısı şoku için 42 °C 50 – 55 saniye bekletilerek tekrar buz üzerine alınmış ve 2 dakika da burada bekletilmiştir. Süre sonunda oda ısısına getirilerek SOC karışımından 950 µl eklenerek ve 37 °C’de 1,5 saat 150 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. Daha yüksek koloni oranını elde etmek için kitin önerdiği 1.000 g’de 10 dakika santrifüj işlemi yapılmış ve 200 µl SOC ile pelet pipetle çekilerek ampicilin+X-Gal+IPTG içeren agarlara yayılmıştır ve 37 °C bir gece inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.4.4. Plasmid İzolasyonu ve Klonların Analizi

Bir gece sonunda petrilerde tespit edilen beyaz renkli koloniler ampicilin içeren 2 ml sıvı LB besiyerine aktarılacak ve 37 °C’de bir gece 150 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün üreyen bakterilerden “Plasmid DNA saflaştırma kiti” (GenElute Plasmid Minikrep Kit Sigma PLN-70) yardımıyla ekstraksiyon yapılmıştır. 2 µl LB sıvı ortamında gelişen competent hücreler alınarak 12.000 g de 1 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj den sonra üstte kalan sıvı kısım dökülerek ve pelet üzerine 200 µl resuspension+RNase solüsyonundan eklenerek vortekslendikten sonra üzerine 200 µl Lysis solüsyonundan eklenerek ve ters düz edilerek karıştırılmıştır. Karışımın üzerine 350 µl nötralizasyon solüsyonundan eklenerek ve ters düz edilerek karıştırılmıştır. Karıştırıldıktan sonra 12.000 g de 10 dk santrifüj edilmiştir. Karışım kolon filtrelerine aktarılmadan önce filtreler 500 µl kolon hazırlık solüsyonuyla hazırlanmış ve karışım kolon filtrelerine aktarılacak 1 dk 12.000 g de santrifüj edilmiştir. Filtrenin altında kalan kısım dökülerek ve kontaminasyonların temizlenmesi amacıyla 50 µl yıkama solüsyonu eklenmiş ve 1 dk 12.000 g de santrifüj edildikten sonra alt faz dökülmüştür. Kolon filtrenin üzerine ikinci kez 500 µl yıkama solüsyonu eklenerek 1 dk 12.000 g de santrifüj edildikten sonra alt faz dökülmüştür. Spin kolon 1 dakika etanolün uzaklaştırılması için kurumaya bırakılmıştır. Spin kolon yeni bir tüpe aktarılacak ve 100 µl “Elution solüsyonu” ilave edilmiştir. 1 dk 12.000 g de santrifüj edildikten sonra filtre

atılmıştır. Kompetent hücrelere plazmitin transforme olup olmadığını belirlemek için PCR işlemi yapılmıştır. PCR karışımı; 16,8 µl d₂H₂O, 2,5 µl 10XB, 0,5 µl dNTP (10 mM), 2 µl MgCl₂ (25 mM), virüse özgü 0,5 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl), 0,4 µl Taq-DNA polymerase ve 2 µl DNA olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR cihazında 1 döngü 94 °C’de 5 dakika; 35 döngü 94 °C’de 30 saniye, 55 °C’de 45 saniye, 72 °C’de 1 dakika ve 1 döngü 72 °C’de 10 dakika olarak programlanmıştır.

3.2.5 DNA Dizileme ve BLAST Analizi

RT-PCR analizleri ile pozitif sonuç alınan GPGV izolatlarından bazıları seçilerek DNA sekans analizleri 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.

3.2.6. Filogenetik Analiz

Sekans analizi sonrasında Clustal W (Thompson ve ark., 1994) programı kullanılarak GPGV izolatlarına ait her iki yönde (forward ve reverse) elde edilen ham sekans verileri kullanılarak diziler elde edilmiştir. Bu diziler GenBankası (NCBI; National Center for Biotechnology Information) internet sitesinden (www.ncbi.nlm.nih.gov) indirilen diğer GPGV izolatlarına ait sekans verileri ile BLAST analizine tabi tutularak kıyaslanmıştır. Ayrıca, bu çalışmaya ait GPGV izolatlarının ve NCBI’ dan indirilen referans GPGV izolatının nükleotit dizilerinin Clustal W programı kullanılarak çoklu dizi hizalaması yapılmıştır. Daha sonra MEGA 6 (Tamura ve ark., 2013) yazılımı kullanılarak genetik uzaklıklar belirlenmiş ve neighbor-joining algoritmasına göre (Seitou ve Nei, 1987) filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Arazi Çalışmaları

Hatay ilinin Kırıkhan ve Hassa ilçelerindeki 11 bağ alanından Antep karası çeşidi olmak üzere 111 örnek, Tekirdağ ilinde bulunan bağ alanlarından Chardonnay, Şiraz, Zinfandel, Palieri, Alicante bouchet, Dimyat, Kalecik karası, Pinot noir, Çavuş, Hambug misketi, Gamay, Alphonse, Boğazkere, Zevik, Razak, Narince, Merlot, Michel palieri, Lival, Karasakız 17, Cinsout, Paraz karası, Çınar üzümü 34-10, 8-11 Tiryaki, Ada karası ve çeşit ismi bilinmeyen 191 bağ örneği toplanmış ve PCR analizi yapılmıştır.

Yapılan çalışmalarda simptomolojik gözlemlere dayanarak ve simptom gözlenmeyen bağlardan ise tesadüfi olarak örnekler alınmıştır. En yaygın gözlenen virüs benzeri belirtiler yapraklarda mozaikleşme, beneklenme, kıvrılma, yaprak damarlarında kızarmalar, yapraklarda kırmızı beneklenmeler ile omcanın taç bölgesinde genel kurumalar ve geriye doğru ölüm, aşı noktasında şişkinlik, boğum aralarında kısılmalar ve meyve olgunlaşmasının gecikmesi olarak gözlenmiştir. Bağ alanlarına yeni giriş yapan virüslerle hastalık belirtileri arasında kesin bir korelasyon henüz saptanamamıştır. İtalya’da 2003 yılından itibaren bağlarda gözlenen bodurlaşma, yapraklarda mozaikleşme ve klorotik lekeler, yapraklarda deformasyon ve verim azlığı gibi belirtiler önceleri trips zararı, bor noksanlığı veya bilinen bazı virüs belirtileri ile karıştırılmış ancak 2012 yılında birisi belirtilmeli, diğeri belirtilmez iki omcadan (cv. Pinot gris) yapılan “Yeni nesil sekans (NGS)” analizleri sonucunda her iki örnekte de yeni bir virüs saptanmış ve geçici olarak *Grapevine pinot gris virus* olarak adlandırılmıştır (Giampetruzzi ve ark., 2012). İlerleyen yıllarda bu virüsün iki farklı genetik grubu belirlenmiş ve birinci grubun belirtilmelere neden olduğu ikinci grubun ise belirtilmez bitkilerde saptandığı bildirilmiştir. Beltilmez bitkilerden izole edilen virüslerin hareketlilik proteinlerinde (MP) 6 adet ekstra aminoasit bulunduğuy belirlenmiş ancak bu farklılığın belirtilmelere ilişkisi konusunda kesin bir yargıya varılmamıştır (Habibi, 2015). Bu tez kapsamında testelenen bağ örneklerinde GPGV tespit edilen örneklerin bazılarında İtalya’dan bildirildiğiy gibi yapraklarda deformasyon, klorotik lekeler ve verim azalması gözlenmiş (Şekil 4.1) ancak bazı belirtilmez

örneklerde de GPGV tespit edilmiştir. Slovakya’da yapılan bir çalışmada da GPGV ile ilişkili özel bir semptom saptanmamıştır (Glasa ve ark., 2015). Bu çalışma kapsamında saptanan diğer bir virüs de GSyV-1’dir ve bu virüs tamamen semptomsuz örneklerde saptanmıştır. Kaliforniya bağlarında 2004 yılında tespit edilen ve “Syrah decline (SD)” hastalığı olarak tanımlanan aşı noktasında şişkinlik, odun dokusunda kırılabilirlik ve çukurlaşmalar, yapraklarda kızarma, kavrulma ve geriye doğru ölüm gibi belirtilerin etmenleri araştırıldığında ABD’de iki farklı araştırmacı grubundan birisi Shiraz (Syrah) üzüm çeşidinde *Grapevine syrah virus-1* (GSyV-1) diğer grup ise yabancı asmalarda *Grapevine virus Q* (GVQ) olarak adlandırılan iki farklı virüsün varlığını bildirmiştir (Rwahnih ve ark., 2009; Sabanadzovic ve ark., 2009). ABD’de geriye ölüm belirtileri gösteren şiraz üzüm çeşitlerinde semptomlardan sorumlu virüsleri tespit edebilmek amacıyla yürütülen NGS analizleri sonucunda 7 farklı RNA genomu tespit edilerek 4 tanesinin virüs, 3 tanesinin de viroid genomu olduğu bildirilmiştir (Al Rwahnih ve ark., 2009). Hastalık semptomları ile ilişkili bulunan virüslerden bir tanesinin yeni bir virüs olduğu bildirilmiş ve geçici olarak *Grapevine syrah virus-1* (GSyV-1) olarak adlandırılmıştır. Güney Afrika’ da SD belirtileri gösteren Şiraz üzüm çeşitlerinde ise *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3) ve *Grapevine virus A* (GVA) saptanmıştır (Prosser ve ark., 2007; Goszczynski, 2007; Maree ve ark., 2008). Bu çalışmalardan görüldüğü gibi GSyV-1 ile “Syrah decline” hastalığı arasında kesin bir ilişki bulunmayıp bu virüs bazı ülkelerde sadece yaprak kıvrılması gösteren omcalarda da saptanmıştır (Oosthuizen ve ark., 2016). Bu çalışma kapsamında yapılan surveyler sırasında kırmızı üzüm çeşitlerinde *Grapevine red blotch associated virus* belirtilerine benzeyen semptomlar gözlenmekle birlikte (Şekil 4.2) bu örneklerin hiç birisinde bu virüs saptanmamıştır. GRBaV yaygın olarak ABD’de saptanmış ve onun dışında sadece Kanada’da varlığı bildirilmiştir (Krenz ve ark., 2014). Bu iki ülke dışında hiç bir ülkeden GRBaV kaydı olmaması ve yapraklarda ve yaprak damarlarında kızarma belirtilerinin her zaman “red blotch” hastalığı ile ilişkili olmadığı Sudarshana ve ark. (2015) tarafından da bildirilmiştir. Bağlarda son yıllarda saptanan virüslerle ilgili çalışmalar 2009-2015 yılları arasında yürütülmüş olup henüz bu virüslerle gözlenen semptomlar arasında kesin bir ilişki doğrulanmamıştır. Bu çalışmada testlenen 4 yeni virüsten sadece iki tanesi (GPGV ve GSyV-1) PCR analizleri ile saptanmış ancak virüs-

hastalık semptomu konusunda diğerk ülkelerde yürütölen çalışmalar doğrulanarak kesin bir sonuca varılmamıştır.



şekil 4.1. Tekirdağ ili bağ alanlarında gözlenen virüs benzeri semptomlar A- Yapraklarda küçölme, boğum aralarında kısalma ve seyrek dane oluşumu B- Meyvede gelişme bozukluğu ve yapraklarda klorotik lekeler C- yapraklarda deformasyon ve klorotik lekeler D- Yelpeze yaprak oluşumu ve dane oluşumunda düzensizlik

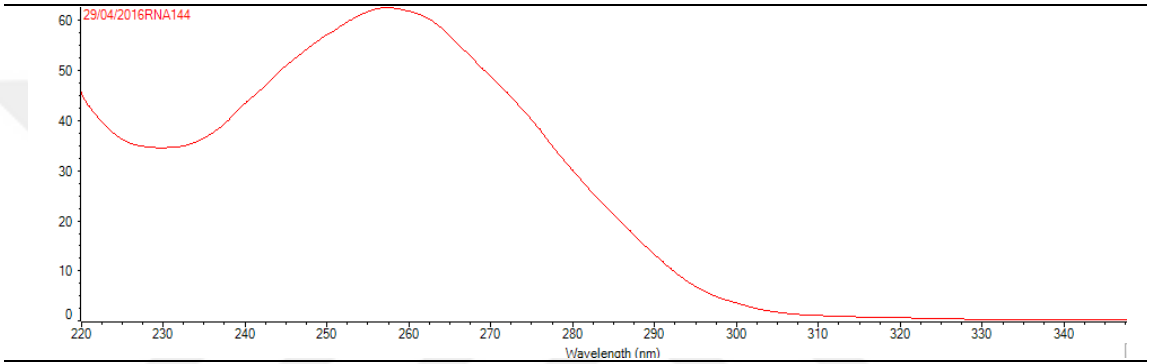


Şekil 4.2. Kırmızı üzüm çeşitlerinde yapraklarda kızarma ve gelişme geriliği A-B: Yapraklarda kızarma ve seyrek dane oluşumu C-D: Yaprak damarlarında kızarmalar E: Bitkide gelişme geriliği F: Yaprakta kırmızı beneklenmeler

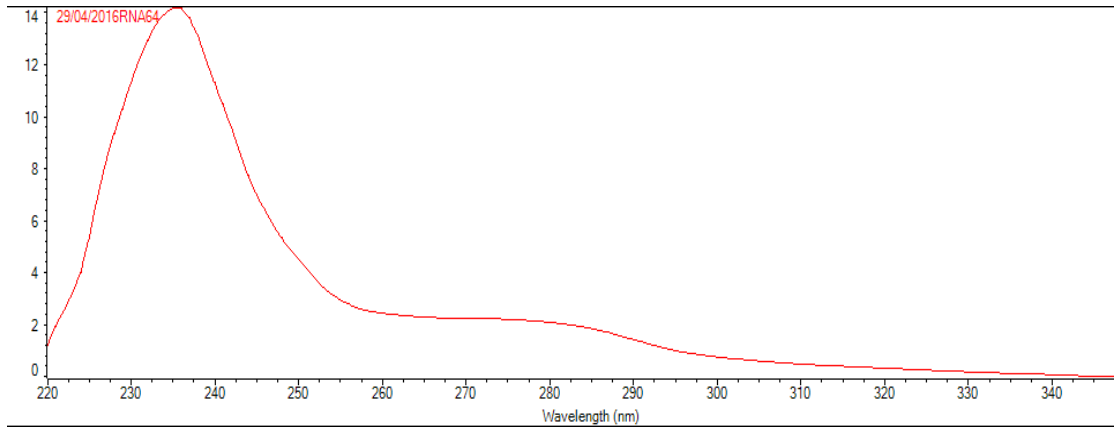
4.2. RT- PCR ve PCR Analizleri

4.2.1. Bağ örneklerinden RNA ve DNA İzolasyonu

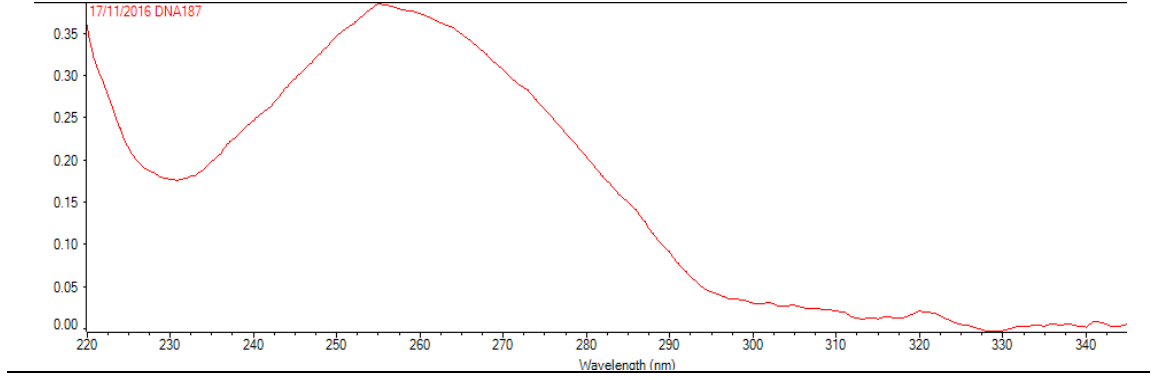
Bağ örneklerinden RNA izole etmek için Qiagen RNA kiti, DNA izole etmek için ise Qiagen DNA kiti ile normal kit tamponu yanında nikotin tamponu da kullanılmıştır. Qiagen kit yöntemleriyle yapılan izolasyonlarda RNA ve DNA kalitesini belirlemek amacıyla yapılan nanodrop spektrofotometre ölçümlerinde RNA ve DNA'ların iyi kalitede olmamasına rağmen PCR yapabilecek düzeyde olduğu saptanmıştır (Şekil 4.3, 4.4, 4.5).



Şekil 4.3. Kalecik karası çeşidinden RNeasy Qiagen ticari kit (Qiagen Sci-Almanya) kullanılarak izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD)



Şekil 4.4. Antep karası çeşidinden RNeasy Qiagen ticari kit (Qiagen Sci-Almanya) kullanılarak izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD)



Şekil 4.5 Tekirdağ ilinden toplanan ve çeşidi bilinmeyen bir bağ örneğinden DNeasy Qiagen ticari kit (Qiagen Sci-Almanya) kullanılarak izole edilen DNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD)



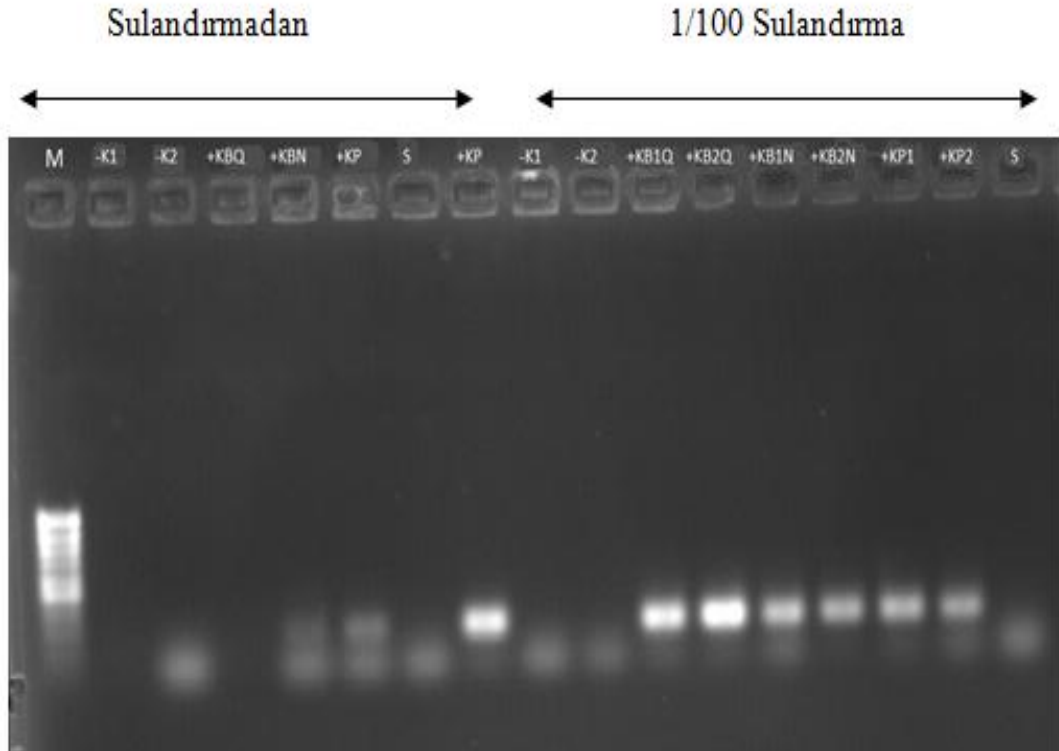
Şekil 4.6. *Grapevine roditis leaf discoloration associated virus* pozitif kontrollerinin nikotin tampon çözeltisiyle DNA izolasyonundan elde edilen DNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD)

Ticari kitler kullanılarak yapılan NA izolasyonlarında çok kaliteli DNA elde edilmemesi nedeniyle Dr. Robert Martin tarafından geliştirilen “Nikotin Tampon” kullanılmış ve bu yöntemle de saf ve kaliteli RNA elde etmek mümkün olmamıştır (Şekil 4.6). Bağlar gibi kompleks metabolitler açısından zengin olan bitkilerde temiz ve saf NA elde etmek oldukça zordur (Xiao ve ark., 2015). Bu araştırmacılar tarafından yürütülen bir çalışmada yaygın olarak kullanılan 5 ticari RNA izolasyon kiti şeftali ve bağlardan RNA izolasyonu etkinliği açısından denenmiştir (Trizol (Life Technologies), RNeasy Plant mini kit (Qiagen), Spectrum Plant Total RNA kit (Sigma), Accu-prep viral RNA kit (Bioneer) ve Plant/Fungi total RNA kit (Norgen Bio Tek) bağlarda kullanıldığında en başarılı sonuçlar Spectrum kiti'nden elde edilmiş ve bunu Norgen ve

Bioneer izlemiştir. Qiagen ve Trizol kitleri ile ise iyi kalitede RNA elde edilmemiştir. Bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızda kullandığımız Qiagen kiti ile kaliteli RNA elde edememe nedenine de açıklık getirmektedir.

4.2.2. RT-PCR ve PCR analizleri

Hatay ve Tekirdağ illerinden toplanan örnekler RNA virüsleri için RT-PCR, DNA virüsleri için ise PCR analizleri ile testlenmiştir. Örnekler testlenmeden önce her bir virüs için sentezlenen primerlerle sadece pozitif kontroller kullanılarak sistem kurma çalışmaları yapılmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. GRLDaV'nin PCR analizleri için optimizasyon çalışmaları M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya), -K1,2: Negatif kontrol; +KBQ:Qiagen yöntemi ile pozitif kontrol olarak kullanılan bitkiden izole edilen DNA; +KBN:Nikotin tamponu ile pozitif kontrol olarak kullanılan bitkiden izole edilen DNA; +KP:Pozitif kontrol olarak kullanılan plazmid DNA; S: Su kontrol

Çizelge 4.1. Tekirdağ ve Hatay ili bağ alanlarından toplanan örneklerinin çeşitleri ve testlendikleri virüs

Örnek No	No	Toplandığı yer	Çeşit adı	GPGV	GRBaV	SyrahV	GRLDaV
1	2	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-	testlenmedi
2	3	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-	testlenmedi
3	4	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-	testlenmedi
4	5	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-	testlenmedi
5	6	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-	testlenmedi
6	7	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-	testlenmedi
7	8	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-	testlenmedi
8	9	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-	testlenmedi
9	10	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-	testlenmedi
10	11	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-	testlenmedi
11	12	Tekirdağ	Chardonnay	+	-	-	testlenmedi
12	13	Tekirdağ	Chardonnay	+	-	-	testlenmedi
13	14	Tekirdağ	P.noir	-	-	-	testlenmedi
14	16	Tekirdağ	P.noir	-	-	-	testlenmedi
15	17	Tekirdağ	P.noir	+	-	-	testlenmedi
16	18	Tekirdağ	P.noir	-	-	-	testlenmedi
17	19	Tekirdağ	P.noir	+	-	-	testlenmedi
18	20	Tekirdağ	P.noir	+	-	-	testlenmedi
19	21	Tekirdağ	P.noir	-	-	-	testlenmedi
20	22	Tekirdağ	P.noir	-	-	-	testlenmedi
21	23	Tekirdağ	P.noir	+	-	-	testlenmedi
22	24	Tekirdağ	bilinmiyor	+	-	-	testlenmedi
23	25	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	testlenmedi	testlenmedi
24	26	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	testlenmedi	testlenmedi
25	27	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	testlenmedi	testlenmedi
26	28	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	-	testlenmedi
27	29	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	-	testlenmedi
28	30	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	-	testlenmedi
29	31	Tekirdağ	bilinmiyor	testlenmedi	-	-	testlenmedi
30	32	Tekirdağ	Zinfandel	+	-	testlenmedi	testlenmedi
31	33	Tekirdağ	Chardonnay	testlenmedi	-	-	testlenmedi
32	34	Tekirdağ	Chardonnay	testlenmedi	-	-	testlenmedi
33	35	Tekirdağ	Chardonnay	testlenmedi	-	-	testlenmedi
34	36	Tekirdağ	Chardonnay	+	-	-	testlenmedi
35	37	Tekirdağ	Chardonnay	+	-	-	testlenmedi

Çizelge 4.1. (Devam) Tekirdağ ve Hatay ili bağ alanlarından toplanan örneklerinin çeşitleri ve testlendikleri virüs

No	Örnek No	Toplandığı yer	Çeşit adı	GPGV	GRBaV	SyrahV	GRLDaV
36	38	Tekirdağ	Chardonnay	+	-	-	testlenmedi
37	39	Tekirdağ	Chardonnay	+	-	-	testlenmedi
38	40	Tekirdağ	Zinfandel	+	-	-	testlenmedi
39	41	Tekirdağ	bilinmiyor	testlenmedi	-	testlenmedi	testlenmedi
40	42	Tekirdağ	bilinmiyor	testlenmedi	-	testlenmedi	testlenmedi
41	43	Tekirdağ	bilinmiyor	testlenmedi	-	testlenmedi	testlenmedi
42	44	Tekirdağ	bilinmiyor	testlenmedi	-	-	testlenmedi
43	45	Tekirdağ	bilinmiyor	testlenmedi	-	testlenmedi	testlenmedi
44	46	Tekirdağ	bilinmiyor	+	-	-	testlenmedi
45	47	Tekirdağ	bilinmiyor	+	-	-	testlenmedi
46	48	Tekirdağ	bilinmiyor	+	-	testlenmedi	testlenmedi
47	49	Tekirdağ	bilinmiyor	+	testlenmedi	-	testlenmedi
48	50	Tekirdağ	bilinmiyor	testlenmedi	testlenmedi	-	testlenmedi
49	52	Tekirdağ	bilinmiyor	testlenmedi	testlenmedi	-	testlenmedi
50	53	Tekirdağ	bilinmiyor	testlenmedi	testlenmedi	-	testlenmedi
51	55	Tekirdağ	bilinmiyor	testlenmedi	-	testlenmedi	testlenmedi
52	56	Tekirdağ	bilinmiyor	testlenmedi	-	testlenmedi	testlenmedi
53	57	Tekirdağ	bilinmiyor	testlenmedi	-	testlenmedi	testlenmedi
54	58	Tekirdağ	bilinmiyor	testlenmedi	-	testlenmedi	testlenmedi
55	59	Tekirdağ	bilinmiyor	testlenmedi	-	testlenmedi	testlenmedi
56	60	Tekirdağ	bilinmiyor	testlenmedi	-	testlenmedi	testlenmedi
57	61	Tekirdağ	bilinmiyor	testlenmedi	-	testlenmedi	testlenmedi
58	62	Tekirdağ	bilinmiyor	testlenmedi	-	testlenmedi	testlenmedi
59	63	Tekirdağ	bilinmiyor	testlenmedi	-	-	testlenmedi
60	64	Tekirdağ	bilinmiyor	+	-	testlenmedi	testlenmedi
61	65	Tekirdağ	bilinmiyor	testlenmedi	-	testlenmedi	testlenmedi
62	66	Tekirdağ	bilinmiyor	testlenmedi	-	testlenmedi	testlenmedi
63	118	Tekirdağ	Şiraz	testlenmedi	-	-	testlenmedi
64	119	Tekirdağ	Şiraz	testlenmedi	-	testlenmedi	-
65	120	Tekirdağ	Şiraz	testlenmedi	-	-	testlenmedi
66	121	Tekirdağ	Şiraz	testlenmedi	-	+	-
67	122	Tekirdağ	Şiraz	testlenmedi	-	-	testlenmedi
68	123	Tekirdağ	Şiraz	testlenmedi	-	-	testlenmedi
69	124	Tekirdağ	Şiraz	testlenmedi	-	-	testlenmedi

Çizelge 4.1. (Devam) Tekirdağ ve Hatay ili bağ alanlarından toplanan örneklerinin çeşitleri ve testlendikleri virüs

No	Örnek No	Toplandığı yer	Çeşit adı	GPGV	GRBaV	SyrahV	GRLDaV
70	125	Tekirdağ	Şiraz	testlenmedi	-	-	testlenmedi
71	126	Tekirdağ	Şiraz	testlenmedi	-	-	testlenmedi
72	127	Tekirdağ	Şiraz	testlenmedi	-	+	-
73	128	Tekirdağ	Şiraz	testlenmedi	-	-	testlenmedi
74	129	Tekirdağ	Şiraz	testlenmedi	-	+	-
75	130	Tekirdağ	Şiraz	testlenmedi	-	+	-
76	131	Tekirdağ	Şiraz	testlenmedi	-	+	-
77	132	Tekirdağ	Şiraz	testlenmedi	-	+	-
78	133	Tekirdağ	Şiraz	testlenmedi	-	-	testlenmedi
79	134	Tekirdağ	Şiraz	testlenmedi	-	-	testlenmedi
80	135	Tekirdağ	Şiraz	testlenmedi	-	+	-
81	136	Tekirdağ	Şiraz	testlenmedi	-	+	-
82	137	Tekirdağ	Şiraz	-	-	+	-
83	138	Tekirdağ	Şiraz	-	-	-	testlenmedi
84	139	Tekirdağ	Kalecik karası	+	-	-	-
85	140	Tekirdağ	Kalecik karası	-	-	-	testlenmedi
86	141	Tekirdağ	Kalecik karası	+	-	+	-
87	142	Tekirdağ	Kalecik karası	-	-	testlenmedi	-
88	143	Tekirdağ	Kalecik karası	+	-	+	-
89	144	Tekirdağ	Kalecik karası	-	-	testlenmedi	-
90	145	Tekirdağ	Palieri	+	-	+	-
91	146	Tekirdağ	Palieri	-	-	+	-
92	147	Tekirdağ	Şiraz	-	-	-	-
93	148	Tekirdağ	Şiraz	-	-	-	testlenmedi
94	149	Tekirdağ	Şiraz	+	-	-	testlenmedi
95	150	Tekirdağ	Şiraz	-	-	-	testlenmedi
96	151	Tekirdağ	Şiraz	-	-	-	testlenmedi
97	152	Tekirdağ	Chardonnay	+	-	-	-
98	153	Tekirdağ	Chardonnay	+	-	-	-
99	154	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-	-
100	155	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-	testlenmedi
101	156	Tekirdağ	Chardonnay	+	-	-	-
102	157	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-	-
103	158	Tekirdağ	Chardonnay	+	-	-	-

Çizelge 4.1. (Devam) Tekirdağ ve Hatay ili bağ alanlarından toplanan örneklerinin çeşitleri ve testlendikleri virüs

Örnek No	Toplandığı yer	Çeşit adı	GPGV	GRBaV	SyrahV	GRLDaV	
104	159	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-	testlenmedi
105	160	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-	testlenmedi
106	161	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-	testlenmedi
107	162	Tekirdağ	Chardonnay	+	-	-	-
108	163	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-	testlenmedi
109	164	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-	-
110	165	Tekirdağ	Chardonnay	+	-	-	-
111	166	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-	testlenmedi
112	167	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-	testlenmedi
113	168	Tekirdağ	Chardonnay	+	-	-	-
114	169	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-	testlenmedi
115	170	Tekirdağ	Chardonnay	+	-	-	-
116	171	Tekirdağ	Chardonnay	+	-	-	testlenmedi
117	172	Tekirdağ	Alicante bouchet	+	-	-	-
118	173	Tekirdağ	Dimyat	-	-	-	testlenmedi
119	174	Tekirdağ	Alicante bouchet	-	-	-	testlenmedi
120	175	Tekirdağ	Kalecik karası	-	-	-	testlenmedi
121	176	Tekirdağ	Kalecik karası	-	-	-	-
122	177	Tekirdağ	Bilinmiyor	+	-	-	-
123	178	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	-	testlenmedi
124	179	Tekirdağ	Alicante bouchet	-	-	-	testlenmedi
125	180	Tekirdağ	Alicante bouchet	-	-	-	testlenmedi
126	181	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	-	testlenmedi
127	182	Tekirdağ	Kalecik karası	-	-	-	-
128	183	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	-	testlenmedi
129	184	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	-	testlenmedi
130	185	Tekirdağ	Cardinal	-	-	-	-
131	186	Tekirdağ	Alphonse	-	-	-	testlenmedi
132	187	Tekirdağ	Alphonse	-	-	-	testlenmedi
133	188	Tekirdağ	Alphonse	-	-	-	testlenmedi
134	189	Tekirdağ	Alphonse	-	-	-	testlenmedi
135	190	Tekirdağ	Çavuş	+	-	-	-
136	191	Tekirdağ	Çavuş	-	-	-	testlenmedi

Çizelge 4.1. (Devam) Tekirdağ ve Hatay ili bağ alanlarından toplanan örneklerinin çeşitleri ve testlendikleri virüs

No	Örnek NO	Toplandığı yer	Çeşit adı	GPGV	GRBaV	SyrahV	GRLDaV
137	192	Tekirdağ	Çavuş	-	-	-	testlenmedi
138	193	Tekirdağ	Palieri	+	-	-	-
139	194	Tekirdağ	Palieri	-	-	-	testlenmedi
140	195	Tekirdağ	Palieri	-	-	-	testlenmedi
141	196	Tekirdağ	Bilinmiyor	+	-	-	-
142	197	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	-	testlenmedi
143	198	Tekirdağ	Bilinmiyor	+	-	-	-
144	199	Tekirdağ	H. misketi	+	-	-	testlenmedi
145	200	Tekirdağ	H. misketi	-	-	-	testlenmedi
146	201	Tekirdağ	H.misketi	-	-	-	-
147	202	Tekirdağ	P.noir	-	-	-	testlenmedi
148	203	Tekirdağ	P.noir	-	-	-	testlenmedi
149	204	Tekirdağ	P.noir	-	-	-	testlenmedi
150	205	Tekirdağ	Gamay	+	-	-	-
151	206	Tekirdağ	Gamay	-	-	-	-
152	207	Tekirdağ	Gamay	-	-	-	testlenmedi
153	208	Tekirdağ	Alphonse	+	-	-	-
154	209	Tekirdağ	Alphonse	+	-	-	testlenmedi
155	210	Tekirdağ	Alphonse	-	-	-	-
156	211	Tekirdağ	Boğazkere	-	-	testlenmedi	testlenmedi
157	212	Tekirdağ	Palieri	-	-	testlenmedi	testlenmedi
158	213	Tekirdağ	Zevik	-	-	testlenmedi	testlenmedi
159	214	Tekirdağ	Razak	-	-	testlenmedi	testlenmedi
160	215	Tekirdağ	Narince	-	-	testlenmedi	testlenmedi
161	216	Tekirdağ	Bilinmiyor	+	-	+	-
162	217	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	-	-
163	218	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	-	-
164	219	Tekirdağ	Bilinmiyor	+	-	+	-
165	220	Tekirdağ	Bilinmiyor	+	-	+	-
166	221	Tekirdağ	Bilinmiyor	+	-	+	-
167	222	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	-	-
168	223	Tekirdağ	Bilinmiyor	+	-	+	-
169	224	Tekirdağ	Bilinmiyor	+	-	+	-
170	225	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	-	-
171	226	Tekirdağ	Bilinmiyor	+	-	+	-
172	227	Tekirdağ	Bilinmiyor	+	-	-	-
173	228	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	-	-
174	229	Tekirdağ	Michelpalieri	+	-	+	-

Çizelge 4.1. (Devam) Tekirdağ ve Hatay ili bağ alanlarından toplanan örneklerinin çeşitleri ve testlendikleri virüs

No	Örnek No	Toplandığı yer	Çeşit adı	GPGV	GRBaV	SyrahV	GRLDaV
175	230	Tekirdağ	Lival	-	-	-	-
176	231	Tekirdağ	Karacak 17	+	-	+	-
177	232	Tekirdağ	Cinsout	-	-	+	-
178	233	Tekirdağ	Parazkarası	+	-	+	-
179	234	Tekirdağ	Hamburg misketi	+	-	+	-
180	235	Tekirdağ	Çavuş	+	-	+	-
181	236	Tekirdağ	Çınar üzümü	+	-	+	-
182	237	Tekirdağ	34-10	+	-	+	-
183	238	Tekirdağ	Zevik	+	-	+	-
184	239	Tekirdağ	8-11 tiryaki	+	-	+	-
185	240	Tekirdağ	P.noir	+	-	+	-
186	241	Tekirdağ	A.Bouchet	+	-	+	-
187	242	Tekirdağ	Zinfandel	+	-	+	-
188	243	Tekirdağ	Chardonnay	+	-	+	-
189	244	Tekirdağ	Adakarası	-	-	+	-
190	245	Tekirdağ	Kalecik karası	+	-	+	-
191	246	Tekirdağ	Merlot	+	-	+	-
192	29	Hatay	Madam Stmathias	+	-	+	-
193	64	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
194	65	Hatay	Antep karası	-	-	-	-
195	66	Hatay	Antep karası	-	-	-	-
196	67	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
197	68	Hatay	Antep karası	-	-	-	-
198	69	Hatay	Antep karası	-	-	-	-
199	70	Hatay	Antep karası	-	-	-	-
200	72	Hatay	Antep karası	-	-	-	testlenmedi
201	73	Hatay	Antep karası	-	-	-	-
202	74	Hatay	Antep karası	-	-	-	-
203	75	Hatay	Antep karası	-	-	-	testlenmedi
204	77	Hatay	Antep karası	-	-	+	-
205	78	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
206	79	Hatay	Antep karası	-	-	-	-
207	82	Hatay	Antep karası	-	-	-	-
208	84	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi

Çizelge 4.1. (Devam) Tekirdağ ve Hatay ili bağ alanlarından toplanan örneklerinin çeşitleri ve testlendikleri virüs

No	Örnek No	Toplandığı yer	Çeşit adı	GPGV	GRBaV	SyrahV	GRLDaV
209	85	Hatay	Antep karası	-	-	+	-
210	87	Hatay	Antep karası	-	-	+	-
211	88	Hatay	Antep karası	-	-	-	testlenmedi
212	89	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
213	90	Hatay	Antep karası	-	-	-	-
214	91	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
215	92	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
216	93	Hatay	Antep karası	-	-	+	-
217	95	Hatay	Antep karası	-	Testlenmedi	-	testlenmedi
218	97	Hatay	Antep karası	-	Testlenmedi	-	testlenmedi
219	98	Hatay	Antep karası	-	-	-	-
220	99	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
221	100	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
222	101	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
223	102	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
224	103	Hatay	Antep karası	-	-	+	-
225	104	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
226	105	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
227	106	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
228	109	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
229	110	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
230	111	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
231	112	Hatay	Antep karası	-	-	+	-
232	114	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
233	115	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
234	116	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
235	118	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
236	119	Hatay	Antep karası	-	-	+	testlenmedi
237	120	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
238	121	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
239	122	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
240	123	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
241	124	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
242	125	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
243	126	Hatay	Antep karası	-	-	+	testlenmedi

Çizelge 4.1. (Devam) Tekirdağ ve Hatay ili bağ alanlarından toplanan örneklerinin çeşitleri ve testlendikleri virüs

No	Örnek No	Toplandığı yer	Çeşit adı	GPGV	GRBaV	SyrahV	GRLDaV
244	128	Hatay	Antep karası	-	-	-	-
245	129	Hatay	Antep karası	-	-	-	testlenmedi
246	130	Hatay	Antep karası	-	-	-	testlenmedi
247	131	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
248	133	Hatay	Antep karası	-	-	-	-
249	134	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
250	138	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
251	139	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
252	141	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
253	142	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
254	143	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
255	146	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
256	147	Hatay	Antep karası	-	-	-	testlenmedi
257	151	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
258	153	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
259	154	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
260	155	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
261	156	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
262	157	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
263	158	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
264	159	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
265	161	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
266	162	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
267	163	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
268	164	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
269	165	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
270	166	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
271	167	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
272	168	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
273	169	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	+	testlenmedi
274	170	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi

Çizelge 4.1. (Devam) Tekirdağ ve Hatay ili bağ alanlarından toplanan örneklerinin çeşitleri ve testlendikleri virüs

No	Örnek NO	Toplandığı yer	Çeşit adı	GPGV	GRBaV	SyrahV	GRLDaV
275	171	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
276	172	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
277	173	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
278	174	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
279	175	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
280	176	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
281	177	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
282	178	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
283	179	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
284	180	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
285	181	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
286	182	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
287	183	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
288	184	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
289	185	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
290	186	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
291	187	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
292	188	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
293	189	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
294	190	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
295	191	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
295	192	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
297	193	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
298	194	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
299	195	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
300	196	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
301	197	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	-	testlenmedi
302	198	Hatay	Antep karası	-	Testlenmedi	-	testlenmedi

İzole edilen RNA'lar *Grapevine pinot gris virus-coat protein* (GPGV-CP 411 bp), *Grapevine pinot gris virus-moment protein* (GPGV-MP 302 bp), *Grapevine pinot gris protein virus-replikaz* (GPGV-Rep 618 bp), *Grapevine syrah virus-1* (GSyV-1 297bp), *Grapevine syrah virus Q* (GVQ 720bp), *Grapevine syrah virus-kılıf protein* (374bp) primerleri kullanılarak GPGV ve GSyV1 için RT-PCR analizleri ile DNA'lar ise *Grapevine roditis leaf discoloration associated virus* (GRLDaV 261bp), *Grapevine red-blotch associated virus-kılıf protein* (GRBaV-CP 257bp), *Grapevine red-blotch associated virus-replikaz* (GRBaV-Rep 318bp), *Grapevine red-blotch associated virus-tanı primeri* (GRBaV 1063bp) primerleri kullanılarak GRLDaV ve GRBaV için PCR analizleri ile testlenmiştir (Çizelge 4.1)

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi Tekirdağ ilinden toplam 191 örnek Hatay ilinden ise 111 örnek farklı virüsler için testlenmiştir. Her iki ilde de DNA virüsleri olan GRBaV ve GRLDaV tespit edilmemiştir. Tekirdağ ilinde en yaygın virüsler GPGV (%43,62) ve GSyV-1 (%17,07) olarak bulunurken Hatay ilinde ise düşük yoğunlukta sadece GSyV-1 (%11) tespit edilmiştir. (4.2.)

Çizelge 4.2. Tekirdağ ve Hatay ili bağ alanlarından toplanan ve GSyV, GPGV, GRBaV, GRLDaV için RT-PCR ve/veya PCR analizleri ile testlenen örnek sayıları ve tespit edilen virüslerin bulunma oranları (%)

VİRÜSLER	Tekirdağ (enfekteli örnek /testlenen örnek sayısı)	Tekirdağ Enfeksiyon Oranı (%)	Hatay (enfekteli örnek /testlenen örnek sayısı)	Hatay Enfeksiyon Oranı (%)
GSyV	28/164	17.07	11/111	11
GPGV	65/149	43.62	0/100	0
GRBaV	0/187	0	0/28	0
GRLDaV	0/74	0	0/20	0
GPGV+	21/135	15.55	0/111	0
GSyV				

4.2.2.1. RNA virüsü olan GSyV-1 ve GPGV için RT-PCR analizleri

Grapevine syrah virus 1 (GSyV-1)

GSyV için pozitif kontrol olarak Dr. Maliogka'dan (Aristotelio Universitesi-Selanik/Yunanistan) temin edilen plasmid DNA'sı kullanılmıştır. Tekirdağ ve Hatay ili bağ örneklerinden RNeasy Qiagen kit kullanarak izole edilen RNA'lardan yapılan RT-PCR analizlerinde GSyV-1 virüsü için üç farklı primer çifti kullanılmıştır. Bu primerler virüsün kılıf protein genini çoğaltan GVQ-CP (720bp), metiltransferaz genini hedefleyen GSyV-1-Det primeri (297bp) ve virüsün kısmi kılıf protein genini çoğaltan SY5922F/SY6295R (374bp)'dir. Tekirdağ ve Hatay ili bağ örneklerinin RT-PCR analizleri sonucunda GVQ ve GSyV-1 saptama primerleri ile Tekirdağ ilinde 1 örnek (119 nolu Şiraz üzüm çeşidi) GVQ primeri ile, 1 örnek de (121 nolu Şiraz üzüm çeşidi) GSyV-1-DET primeri ile pozitif sonuç verirken Hatay ili bağ örneklerinden sadece 1 örnek (93 nolu Antep Karası üzüm çeşidi) GSyV-1-DET primeri ile pozitif sonuç vermiştir. Glasa ve ark. (2015) tarafından son yıllarda geliştirilen ve virüsün kısmi kılıf protein genini çoğaltan SY5965F/SY6559R primeri kullanıldığında ise Tekirdağ ili örneklerinde testlenen 42 adet örnekten 28, Hatay ili örneklerinde ise testlenen 111 sayıdaki örnekten 10 örnek pozitif bulunmuştur (Çizelge 4. 2). Bu primerlerden GVQ ve GSyV-1-Det primerleri 2009 yılında ABD'de birbirinden bağımsız iki farklı çalışma grubu tarafından sınırlı sayıdaki virüs izolatu genomuna uygun geliştirilen primerler olup farklı ülke izolatlarındaki varyasyonlara uygun olmadığı ve bu nedenle ülkemizdeki GSyV-1 izolatlarını tanılamakta yetersiz kaldığı düşünülmektedir. Nitekim Glasa ve ark. (2015) Slovakya ve Çek Cumhuriyeti bağ alanlarından toplanan örneklerin RT-PCR analizlerinde GSyV-1-Det primeri ile kendi geliştirdikleri SY5922F/SY6295R primeri kıyaslamalı olarak analiz ettiklerinde kendi geliştirdikleri primerle 2 kat daha fazla sayıda pozitif sonuç aldıklarını bildirmişlerdir. Primer performansları arasındaki farklılığın Al Rwahnih ve ark. (2009) ile Sabanodzovic ve ark. (2009) tarafından geliştirilen primerlerin hedeflediği gen bölgesinin zayıf derecede korumalı bir bölge olması nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Tekirdağ ve Hatay ili bağ örneklerinde GSyV-1 pozitif örneklerin büyük bir çoğunluğunun Glasa ve ark. (2015) tarafından geliştirilen primerlerle saptanması da bu görüşü doğrulamaktadır.

Bu çalışma Türkiye'de GSyV-1'in bağlarda tespit edilmesine yönelik ilk çalışmadır.

Çizelge 4.3. Tekirdağ ve Hatay ili bağ alanlarından toplanan örneklerin *Grapevine syrah virus 1* için GVQ, GSyV-1 ve GSyV-CP genine spesifik primerlerle testlenen örneklerin RT-PCR sonucu

Örnek No	Toplandığı yer	Çeşit adı	GVQ	GSyV-Det	SY5922F/SY6295
119	Tekirdağ	Şiraz	+	-	+
121	Tekirdağ	Şiraz	-	+	+
127	Tekirdağ	Şiraz	-	-	-
129	Tekirdağ	Şiraz	-	-	+
130	Tekirdağ	Şiraz	-	-	-
131	Tekirdağ	Şiraz	-	-	-
132	Tekirdağ	Şiraz	-	-	+
135	Tekirdağ	Şiraz	-	-	+
136	Tekirdağ	Şiraz	-	-	-
137	Tekirdağ	Şiraz	-	-	-
141	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	-
143	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	-
145	Tekirdağ	Palieri	-	-	+
146	Tekirdağ	Palieri	-	-	+
216	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	+
219	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	+
220	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	+
221	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	+
222	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	-
223	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	+
224	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	+
225	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	-
226	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	+
227	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	-
228	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	-
229	Tekirdağ	Lival	-	-	+
231	Tekirdağ	Karasakız 17	-	-	+
232	Tekirdağ	Cinsout	-	-	+
233	Tekirdağ	Parazkarası	-	-	+
234	Tekirdağ	Hamburg misketi	-	-	+
235	Tekirdağ	Çavuş	-	-	+
236	Tekirdağ	Çınar üzümü 34-10	-	-	+
237	Tekirdağ	Zevik	-	-	+

Çizelge 4.3. (Devam) Tekirdağ ve Hatay ili bağ alanlarından toplanan örneklerin *Grapevine syrah virus 1* için GVQ, GSyV-1 ve GSyV-CP genine spesifik primerlerle testlenen örneklerin RT-PCR sonucu

Örnek no	Toplandığı yer	Çeşit adı	GVQ	GSyV-Det	SY5922F/SY6295
238	Tekirdağ	8-11 tiryaki	-	-	-
239	Tekirdağ	P.noir	-	-	+
240	Tekirdağ	A.Bouchet	-	-	-
241	Tekirdağ	Zinfandel	-	-	+
242	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	+
243	Tekirdağ	Adakarası	-	-	-
244	Tekirdağ	Kalecik karası	-	-	+
245	Tekirdağ	Merlot	-	-	+
246	Tekirdağ	Madam Stmathias	-	-	+
29	Hatay	Antep karası	-	-	-
64	Hatay	Antep karası	-	-	-
65	Hatay	Antep karası	-	-	-
66	Hatay	Antep karası	-	-	+
67	Hatay	Antep karası	-	-	-
68	Hatay	Antep karası	-	-	-
69	Hatay	Antep karası	-	-	-
70	Hatay	Antep karası	-	-	-
72	Hatay	Antep karası	-	-	-
73	Hatay	Antep karası	-	-	-
74	Hatay	Antep karası	-	-	-
75	Hatay	Antep karası	-	-	+
77	Hatay	Antep karası	-	-	+
78	Hatay	Antep karası	-	-	-
79	Hatay	Antep karası	-	-	-
82	Hatay	Antep karası	-	-	-
84	Hatay	Antep karası	-	-	-
85	Hatay	Antep karası	-	-	+
87	Hatay	Antep karası	-	-	+
88	Hatay	Antep karası	-	-	-
89	Hatay	Antep karası	-	-	-
90	Hatay	Antep karası	-	-	-
91	Hatay	Antep karası	-	-	-
92	Hatay	Antep karası	-	-	-
93	Hatay	Antep karası	-	+	-
95	Hatay	Antep karası	-	-	-

Çizelge 4.3. (Devam) Tekirdağ ve Hatay ili bağ alanlarından toplanan örneklerin *Grapevine syrah virus 1* için GVQ, GSyV-1 ve GSyV-CP genine spesifik primerlerle testlenen örneklerin RT-PCR sonucu

Örnek no	Toplandığı yer	Çeşit adı	GVQ	GSyV-Det	SY5922F/SY6295
97	Hatay	Antep karası	-	-	-
98	Hatay	Antep karası	-	-	+
99	Hatay	Antep karası	-	-	-
100	Hatay	Antep karası	-	-	-
101	Hatay	Antep karası	-	-	-
102	Hatay	Antep karası	-	-	-
103	Hatay	Antep karası	-	-	-
104	Hatay	Antep karası	-	-	-
105	Hatay	Antep karası	-	-	-
106	Hatay	Antep karası	-	-	-
109	Hatay	Antep karası	-	-	-
110	Hatay	Antep karası	-	-	-
111	Hatay	Antep karası	-	-	-
112	Hatay	Antep karası	-	-	+
114	Hatay	Antep karası	-	-	-
115	Hatay	Antep karası	-	-	-
116	Hatay	Antep karası	-	-	-
118	Hatay	Antep karası	-	-	-
119	Hatay	Antep karası	-	-	+
120	Hatay	Antep karası	-	-	-
121	Hatay	Antep karası	-	-	-
122	Hatay	Antep karası	-	-	-
123	Hatay	Antep karası	-	-	-
124	Hatay	Antep karası	-	-	-
125	Hatay	Antep karası	-	-	-
126	Hatay	Antep karası	-	-	+
128	Hatay	Antep karası	-	-	-
129	Hatay	Antep karası	-	-	-
130	Hatay	Antep karası	-	-	+
131	Hatay	Antep karası	-	-	-
133	Hatay	Antep karası	-	-	-
134	Hatay	Antep karası	-	-	-
138	Hatay	Antep karası	-	-	-
139	Hatay	Antep karası	-	-	-

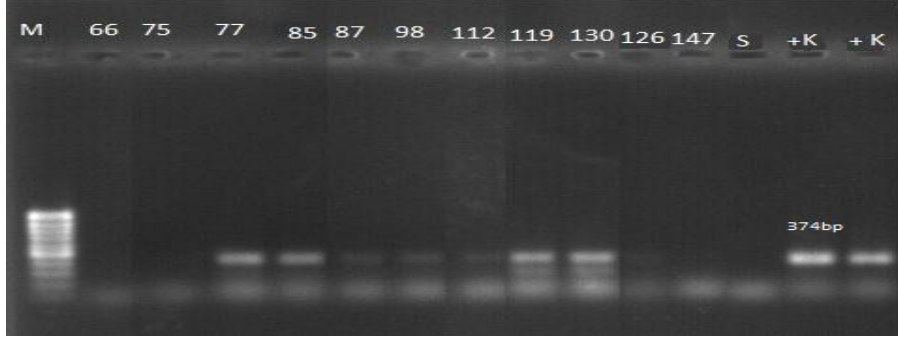
Çizelge 4.3. (Devam) Tekirdağ ve Hatay ili bağ alanlarından toplanan örneklerin *Grapevine syrah virus 1* için GVQ, GSyV-1 ve GSyV-CP genine spesifik primerlerle testlenen örneklerin RT-PCR sonucu

Örnek no	Toplandığı yer	Çeşit adı	GVQ	GSyV-Det	SY5922F/SY6295
141	Hatay	Antep karası	-	-	-
142	Hatay	Antep karası	-	-	-
143	Hatay	Antep karası	-	-	-
146	Hatay	Antep karası	-	-	-
147	Hatay	Antep karası	-	-	-
151	Hatay	Antep karası	-	-	-
153	Hatay	Antep karası	-	-	-
154	Hatay	Antep karası	-	-	-
155	Hatay	Antep karası	-	-	-
156	Hatay	Antep karası	-	-	-
157	Hatay	Antep karası	-	-	-
158	Hatay	Antep karası	-	-	-
159	Hatay	Antep karası	-	-	-
161	Hatay	Antep karası	-	-	-
162	Hatay	Antep karası	-	-	-
163	Hatay	Antep karası	-	-	-
164	Hatay	Antep karası	-	-	-
165	Hatay	Antep karası	-	-	-
166	Hatay	Antep karası	-	-	-
167	Hatay	Antep karası	-	-	-
168	Hatay	Antep karası	-	-	-
169	Hatay	Antep karası	-	-	-
170	Hatay	Antep karası	-	-	-
171	Hatay	Antep karası	-	-	-
172	Hatay	Antep karası	-	-	-
173	Hatay	Antep karası	-	-	-
174	Hatay	Antep karası	-	-	-
175	Hatay	Antep karası	-	-	-
176	Hatay	Antep karası	-	-	-
177	Hatay	Antep karası	-	-	-
178	Hatay	Antep karası	-	-	-
179	Hatay	Antep karası	-	-	-
180	Hatay	Antep karası	-	-	-

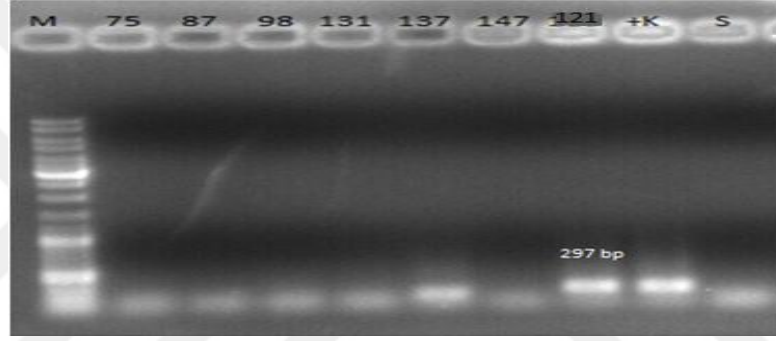
Çizelge 4.3. (Devam) Tekirdağ ve Hatay ili bağ alanlarından toplanan örneklerin *Grapevine syrah virus 1* için GVQ, GSyV-1 ve GSyV-CP genine spesifik primerlerle testlenen örneklerin RT-PCR sonu

Örnek no	Toplandığı yer	Çeşit adı	GVQ	GSyV-Det	SY5922F/SY6295
181	Hatay	Antep karası	-	-	-
182	Hatay	Antep karası	-	-	-
183	Hatay	Antep karası	-	-	-
184	Hatay	Antep karası	-	-	-
185	Hatay	Antep karası	-	-	-
186	Hatay	Antep karası	-	-	-
187	Hatay	Antep karası	-	-	-
188	Hatay	Antep karası	-	-	-
189	Hatay	Antep karası	-	-	-
190	Hatay	Antep karası	-	-	-
191	Hatay	Antep karası	-	-	-
192	Hatay	Antep karası	-	-	-
193	Hatay	Antep karası	-	-	-
194	Hatay	Antep karası	-	-	-
195	Hatay	Antep karası	-	-	-
196	Hatay	Antep karası	-	-	-
197	Hatay	Antep karası	-	-	-
198	Hatay	Antep karası	-	-	-

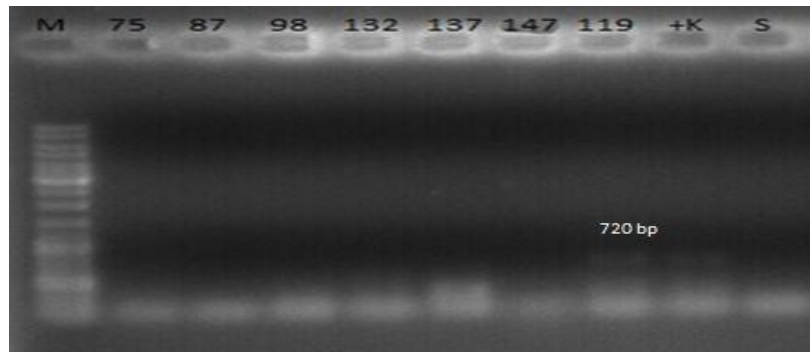
Hatay ili bağ örneklerinin SY5922F/SY6295R primeri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçlarında testlenen örneklerden 10 tanesinde beklenen düzeyde (374 bp) amplifikasyon gözlenmiştir (Şekil 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12).



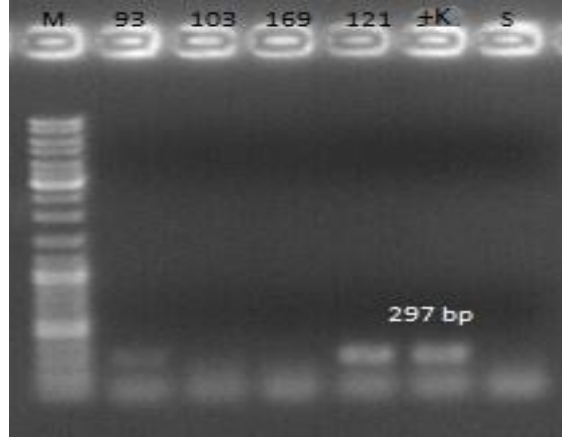
Şekil 4.8. Hatay ve Tekirdağ illerinde farklı üzüm çeşitlerinin *Grapevine syrah virus-1*'ün kılıf protein genini çoğaltan Sy5922-F/Sy6295R primeri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 66, 75, 77, 85, 87, 98, 112, 119, 130, 126, 147: testlenen bitki örnekleri; S: Su kontrol; +K: Pozitif kontrol



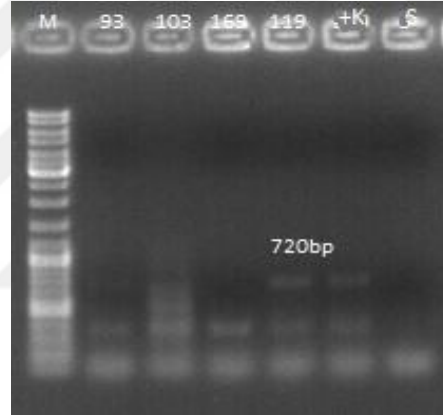
Şekil 4.9. Hatay ili Antep karası üzüm çeşidinde *Grapevine syrah virus-1*'ün metiltransferaz genini çoğaltan GSyV-1-DET primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 75, 87, 98, 131, 137, 147, 119: testlenen bitki örnekleri; S: Su kontrol; +K: Pozitif kontrol



Şekil 4.10. Hatay ili Antep karası üzüm çeşidinde *Grapevine syrah virus-1*'ün kılıf protein genini çoğaltan GVQ primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 75, 87, 98, , 132, 137, 147, 119: testlenen bitki örnekleri; S: Su kontrol; +K: Pozitif kontrol



Şekil 4.11. Hatay ili Antep karası üzüm çeşidinde *Grapevine syrah virus-1*'ün metiltransferaz genini çoğaltan GSyV-1-DET primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 93, 103, 169,121: testlenen bitki örnekleri; +K: Pozitif kontrol, S: Su kontrol



Şekil 4.12. Hatay ili Antep karası üzüm çeşidinde *Grapevine syrah virus-1*'ün kılıf protein genini çoğaltan GVQ primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 93, 103, 169, 119: testlenen bitki örnekleri; +K: Pozitif kontrol, S: Su kontrol.

Grapevine pinot gris virus (GPGV)

Tekirdağ ve Hatay ili bağ örneklerinden RNA izolasyonları RNeasy Qiagen kiti kullanılarak modifiye MacKenzie ve ark. (1997)'nin yöntemi ile yapılmıştır. *Grapevine pinot gris virus*'ün RT-PCR analizlerinde GPGV-CP (411 bp), GPGV-MP (302 bp), GPGV-REP (618 bp) primerleri kullanılmış ve sadece Tekirdağ ilinden toplanan örneklerde beklenen düzeyde bant görülmüştür (Şekil 4.13, 4.14, 4.15). Tekirdağ ilinden toplanan toplam 149 örnekten 65 tanesi GPGV'e spesifik 3 primer çiftinden en az bir tanesi ile RT-PCR analizi sonuçlarına göre pozitif bulunmuş ancak Hatay ili

örneklerinde GPVG-CP primeriyle 111 örnekte yapılan RT-PCR sonucunda pozitif örnek saptanamamıştır (Çizelge 4.2). GPGV-CP primeri tanı amacıyla yaygın olarak kullanılan bir primer olduğu için örnekler önce bu primerle testlenmiş pozitif bulunan örnekler ise GPGV-MP ve GPGV-REP primerleri ile de testlenmiştir. Ancak Hatay ili örneklerinde GPGV-CP primeri ile hiçbir örnek pozitif bulunmamasına karşın tesadüfi olarak seçilen 29 örnek GPGV-MP ve GPGV-REP primerleri ile de testlenmiş ve pozitif sonuç elde edilememiştir. Tekirdağ ilinden testlenen bağ örnekleri için GPGV ile ortalama enfeksiyon oranı %43,62 olarak tespit edilmiştir. Tekirdağ ili bağ örneklerinden testlenen 149 örnekten 63'i GPGV-CP primeri ile, 53'i GPGV-MP primeri ile pozitif sonuç verirken GPGV-REP primeri ile testlenen 115 örnekten 23'ü pozitif bulunmuştur. Bu sonuca göre testlenen örneklerin %42,28'i CP primeri ile, %35,57'i MP primeri ile ve %20'i ise REP primeri ile pozitif sonuç vermiştir. Testlenen örneklerden Chardonnay, Palieri, Kalecik karası, Şiraz, Zinfandel ve Çavuş çeşitlerinden toplam 21 örnek GPGV'nin üç farklı genini (CP, MP ve REP) çoğaltan primerle de pozitif sonuç vermiştir (Çizelge 4.3). GPGV ilk kez 2012 yılında İtalya'da Trentino Bölgesinde Pinot gris ve Traminer üzüm çeşitlerinde (Giampetruzzi ve ark., 2012) daha sonra ise aynı bölgede *Silene latifolia* ve *Chenopodium album* gibi otsu bitkilerde (Gualandri ve ark. 2016) saptanmıştır. İlerleyen yıllarda bu virüs sırasıyla Kore (Cho ve ark., 2013), Slovakya (Glasa ve ark., 2014), Slovenya (Mavric ve ark., 2014), Uruguay (Jo ve ark., 2015), Fransa (Beuve ve ark., 2015), Romanya, Ukrayna, Bosna ve Hersek, Karadağ, Sırbistan, Hırvatistan, Makedonya, Portekiz ve İspanya (Bertazzon ve ark., 2015), A. B. D. (Al Rwahnih ve ark., 2015), Kanada (Xiao ve ar., 2015), Çin (Fan ve ark., 2015) ve Gürcistan'da (Casati ve ark., 2015) saptanmıştır.

Çizelge 4.4. Tekirdağ ve Hatay illerinde toplanan bağ örneklerinin *Grapevine pinot gris virus* ile yapılan RT-PCR sonuçları

Örnek no	Toplandığı yer	Çeşit adı	GPGV-CP	GPGV-MP	GPGV REP
2	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	testlenmedi
3	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	testlenmedi
4	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	testlenmedi
5	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	testlenmedi
6	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	testlenmedi

Çizelge 4.4. (Devam) Tekirdağ ve Hatay illerinde toplanan bağ örneklerinin *Grapevine pinot gris virus* ile yapılan RT-PCR sonuçları

Örnek no	Toplandığı yer	Çeşit adı	GPGV-CP	GPGV-MP	GPGV REP
7	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	testlenmedi
8	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	testlenmedi
9	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	testlenmedi
10	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	testlenmedi
11	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	testlenmedi
12	Tekirdağ	Chardonnay	+	+	testlenmedi
13	Tekirdağ	Chardonnay	+	+	testlenmedi
14	Tekirdağ	P.noir	-	-	testlenmedi
16	Tekirdağ	P.noir-	-	-	testlenmedi
17	Tekirdağ	P.noir	+	+	testlenmedi
18	Tekirdağ	P.noir	-	-	testlenmedi
19	Tekirdağ	P.noir	+	+	testlenmedi
20	Tekirdağ	P.noir	+	+	testlenmedi
21	Tekirdağ	P.noir	-	-	testlenmedi
22	Tekirdağ	P.noir	-	-	testlenmedi
23	Tekirdağ	P.noir	-	+	+
24	Tekirdağ	bilinmiyor	+	+	+
25	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	testlenmedi
26	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	testlenmedi
27	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	testlenmedi
28	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	testlenmedi
29	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	testlenmedi
30	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	testlenmedi
32	Tekirdağ	Zinfandel	+	+	+
36	Tekirdağ	Chardonnay	+	+	+
37	Tekirdağ	Chardonnay	+	+	+
38	Tekirdağ	Chardonnay	+	+	+
39	Tekirdağ	Chardonnay	+	+	+
40	Tekirdağ	Zinfandel	+	+	testlenmedi
46	Tekirdağ	bilinmiyor	+	+	+
47	Tekirdağ	bilinmiyor	+	+	+
48	Tekirdağ	bilinmiyor	+	+	+
49	Tekirdağ	bilinmiyor	+	+	testlenmedi
64	Tekirdağ	bilinmiyor	+	+	testlenmedi
137	Tekirdağ	Şiraz	-	-	testlenmedi
138	Tekirdağ	Şiraz	-	-	testlenmedi
139	Tekirdağ	Şiraz	+	+	+

Çizelge 4.4. (Devam) Tekirdağ ve Hatay illerinde toplanan bağ örneklerinin *Grapevine pinot gris virus* ile yapılan RT-PCR sonuçları

Örnek no	Toplandığı yer	Çeşit adı	GPGV-CP	GPGV-MP	GPGV REP
140	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	-
141	Tekirdağ	bilinmiyor	+	+	+
142	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	-
143	Tekirdağ	bilinmiyor	+	+	+
144	Tekirdağ	bilinmiyor	-	testlenmedi	-
145	Tekirdağ	Palieri	+	+	+
146	Tekirdağ	Palieri	-	-	-
147	Tekirdağ	Şiraz	-	-	-
148	Tekirdağ	Şiraz	-	-	-
149	Tekirdağ	Şiraz	+	+	+
150	Tekirdağ	Şiraz	-	-	-
151	Tekirdağ	Şiraz	-	-	-
152	Tekirdağ	Chardonnay	+	+	+
153	Tekirdağ	Chardonnay	+	+	-
154	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-
155	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-
156	Tekirdağ	Chardonnay	-	+	-
157	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-
158	Tekirdağ	Chardonnay	+	+	+
159	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-
160	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-
161	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-
162	Tekirdağ	Chardonnay	+	+	+
163	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-
164	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-
165	Tekirdağ	Chardonnay	+	+	+
166	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-
167	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-
168	Tekirdağ	Chardonnay	+	+	-
169	Tekirdağ	Chardonnay	-	-	-
170	Tekirdağ	Chardonnay	+	+	-
171	Tekirdağ	Chardonnay	+	+	+
172	Tekirdağ	Alicante bouchet	+	+	-
173	Tekirdağ	Dimyat	-	-	-
174	Tekirdağ	Aalicante bouchet	-	-	-
175	Tekirdağ	Kalecik karası	-	-	-
176	Tekirdağ	Kalecik karası	-	-	-

Çizelge 4.4. (Devam) Tekirdağ ve Hatay illerinde toplanan bağ örneklerinin *Grapevine pinot gris virus* ile yapılan RT-PCR sonuçları

Örnek no	Toplandığı yer	Çeşit adı	GPGV-CP	GPGV-MP	GPGV REP
177	Tekirdağ	ilinmiyor	+	+	+
178	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	-
179	Tekirdağ	Alicante bouchet	-	-	-
180	Tekirdağ	Alicante bouchet	-	-	-
181	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	-
182	Tekirdağ	Kalecik karası	-	-	-
183	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	-
184	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	-
185	Tekirdağ	Cardinal	-	-	-
186	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	-
187	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	-
188	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	-
189	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	-
190	Tekirdağ	Çavuş	+	+	-
191	Tekirdağ	Çavuş	-	-	-
192	Tekirdağ	Çavuş	-	-	-
193	Tekirdağ	Palieri	+	+	testlenmedi
194	Tekirdağ	Palieri	-	-	-
195	Tekirdağ	Palieri	-	-	-
196	Tekirdağ	bilinmiyor	+	+	-
197	Tekirdağ	bilinmiyor	-	-	-
198	Tekirdağ	bilinmiyor	+	+	-
199	Tekirdağ	Hamburg misketi	+	+	-
200	Tekirdağ	Hamburg misketi	-	-	-
201	Tekirdağ	Hamburg misketi	-	-	-
202	Tekirdağ	P.noir	-	-	-
203	Tekirdağ	P.noir	-	-	-
204	Tekirdağ	P.noir	-	-	-
205	Tekirdağ	Gamay	+	+	-
206	Tekirdağ	Gamay	-	-	-
207	Tekirdağ	Gamay	-	-	-
208	Tekirdağ	Alphonse	+	+	-
209	Tekirdağ	Alphonse	+	+	-
210	Tekirdağ	Alphonse	-	-	-
211	Tekirdağ	Boğazkere	-	-	-

Çizelge 4.4. (Devam) Tekirdağ ve Hatay illerinde toplanan bağ örneklerinin *Grapevine pinot gris virus* ile yapılan RT-PCR sonuçları

Örnek no	Toplandığı yer	Çeşit adı	GPGV-CP	GPGV-MP	GPGV REP
212	Tekirdağ	Palieri	-	-	-
213	Tekirdağ	Zevik	-	-	-
214	Tekirdağ	Razak	-	-	-
215	Tekirdağ	Narince	-	-	-
216	Tekirdağ	Bilinmiyor	+	-	-
217	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	-
218	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	-
219	Tekirdağ	Bilinmiyor	+	-	-
220	Tekirdağ	Bilinmiyor	+	-	-
221	Tekirdağ	Bilinmiyor	+	-	-
222	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	-
223	Tekirdağ	Bilinmiyor	+	-	-
224	Tekirdağ	Bilinmiyor	+	-	-
225	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	-
226	Tekirdağ	Bilinmiyor	+	-	-
227	Tekirdağ	Bilinmiyor	+	-	-
228	Tekirdağ	Bilinmiyor	-	-	-
229	Tekirdağ	Michel Palieri	+	-	-
230	Tekirdağ	Lival	-	-	-
231	Tekirdağ	Karasakız 17	+	-	-
232	Tekirdağ	Cinsout	-	-	-
233	Tekirdağ	Parazkarası	+	-	-
234	Tekirdağ	Hamburg misketi	+	-	-
235	Tekirdağ	Çavuş	+	-	-
236	Tekirdağ	Çınar üzümü 34-10	+	-	-
237	Tekirdağ	Zevik	+	-	-
238	Tekirdağ	8-11 tiryaki	+	-	-
239	Tekirdağ	P.noir	+	+	-
240	Tekirdağ	A.Bouchet	+	+	-
241	Tekirdağ	Zinfandel	+	+	-
242	Tekirdağ	Chardonnay	+	+	-
243	Tekirdağ	Adakarası	-	+	testlenmedi
244	Tekirdağ	Kalecik karası	+	-	-
245	Tekirdağ	Merlot	+	+	-
246	Tekirdağ	Madam Stmathias	+	+	-
29	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi

Çizelge 4.4. (Devam) Tekirdağ ve Hatay illerinde toplanan bağ örneklerinin *Grapevine pinot gris virus* ile yapılan RT-PCR sonuçları

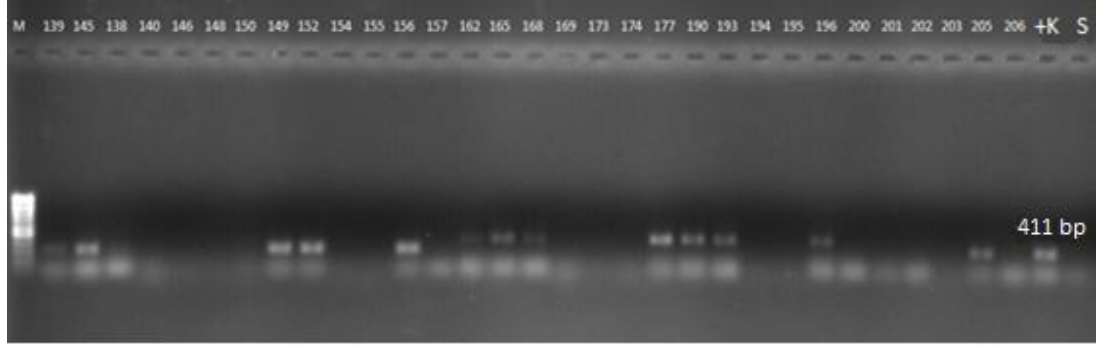
Örnek no	Toplandığı yer	Çeşit adı	GPGV-CP	GPGV-MP	GPGV REP
64	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
65	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
66	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
67	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
68	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
69	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
70	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
72	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
73	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
74	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
75	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
77	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
78	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
79	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
82	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
84	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
85	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
87	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
88	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
89	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
90	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
91	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
92	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
93	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
95	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
97	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
98	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
99	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
100	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
101	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
102	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
103	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
104	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
105	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
106	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
109	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
110	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
111	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
112	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi

Çizelge 4.4. (Devam) Tekirdağ ve Hatay illerinde toplanan bağ örneklerinin *Grapevine pinot gris virus* ile yapılan RT-PCR sonuçları

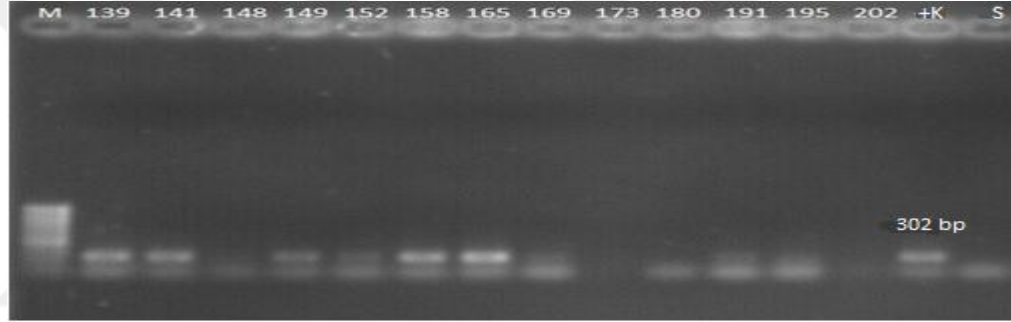
Örnek no	Toplandığı yer	Çeşit adı	GPGV-CP	GPGV-MP	GPGV REP
114	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
115	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
116	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
118	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
119	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
120	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
121	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
122	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
123	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
124	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
125	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
126	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
128	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
129	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
130	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
131	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
133	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
134	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
138	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
139	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
141	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
142	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
143	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
146	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
147	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
151	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
153	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
154	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
155	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
156	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
157	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
158	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
159	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
161	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
162	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
163	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi

Çizelge 4.4. (Devam) Tekirdağ ve Hatay illerinde toplanan bağ örneklerinin *Grapevine pinot gris virus* ile yapılan RT-PCR sonuçları

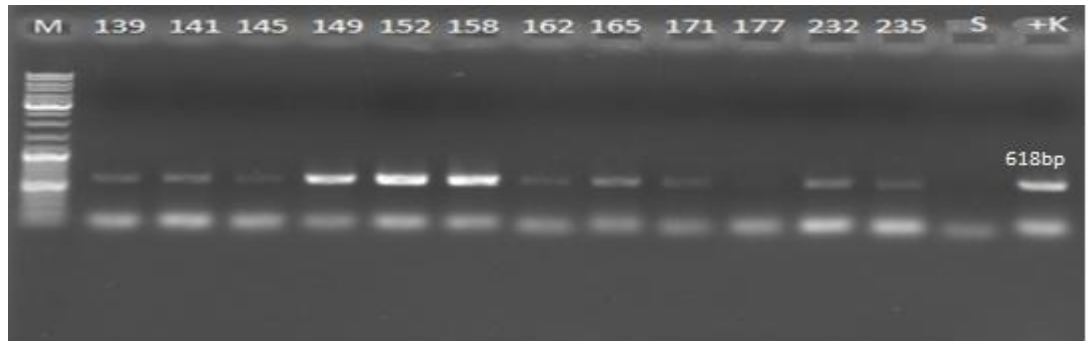
Örnek no	Toplandığı yer	Çeşit adı	GPGV-CP	GPGV-MP	GPGV REP
164	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
165	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
166	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
167	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
168	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
169	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
170	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
171	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
172	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
173	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
174	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
175	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
176	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
177	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
178	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
179	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
180	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
181	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
182	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
183	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
184	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
185	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
186	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
187	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
188	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
189	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
190	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
191	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
192	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
193	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
194	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
195	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
196	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
197	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi
198	Hatay	Antep karası	-	testlenmedi	testlenmedi



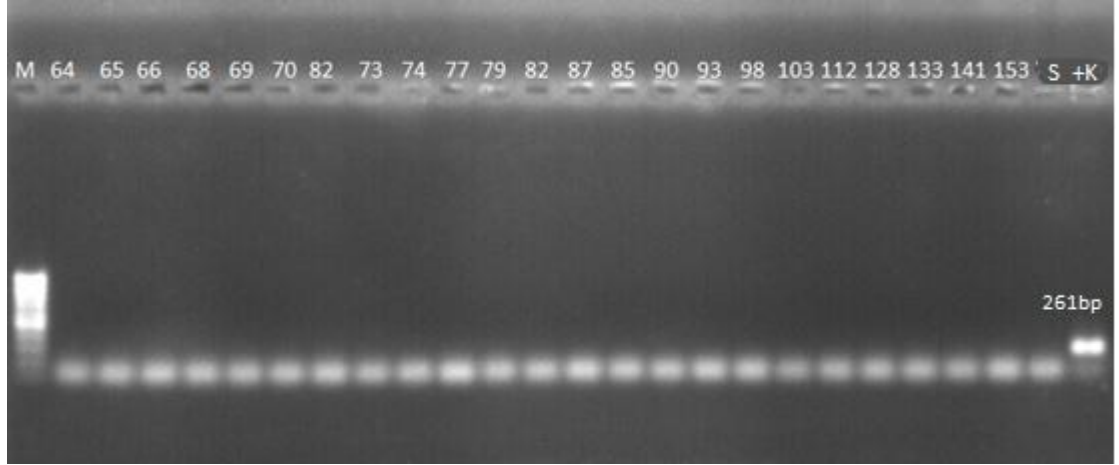
Şekil 4.13. Tekirdağ bağ örneklerinin *Grapevine pinot gris virus* kılıf protein (CP) genini çoğaltan primer çifti (GPG-6609F/GPG7020R) kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 139, 145, 138, 140, 146, 148, 150, 149, 152, 154, 155, 156, 157, 162, 165, 168, 169, 173, 174, 177, 190, 193, 194, 195, 196, 200, 201, 202, 203, 205, 206: testlenen bitki örnekleri; +K: Pozitif kontrol, S: Su kontrol



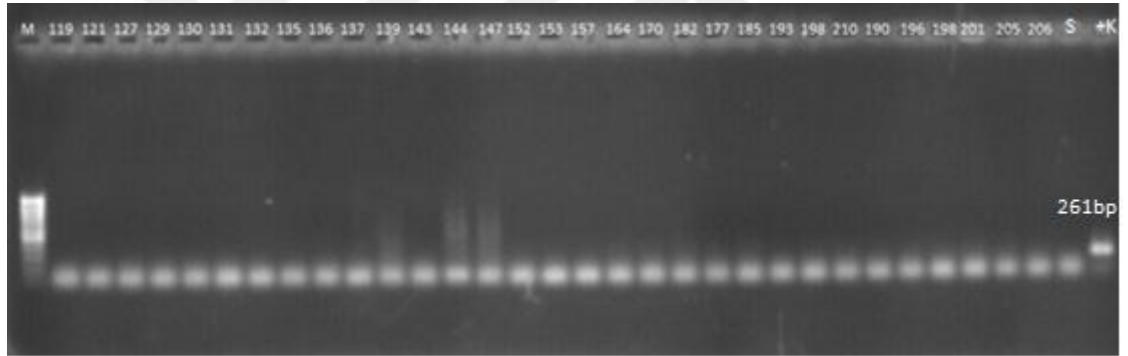
Şekil 4.14. Tekirdağ bağ örneklerinin *Grapevine pinot gris virus* hareketlilik protein (MP) genini çoğaltan primer çifti (GPG-5637F/GPG-5939R) kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu. M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 139, 141, 149, 152, 158, 165, 169, 173, 180, 191, 195, 202: testlenen bitki örnekleri; +K: Pozitif kontrol, S: Su kontrol



Şekil 4.15. Tekirdağ bağ örneklerinin *Grapevine pinot gris virus* replikaz (REP) genini çoğaltan primer çifti (GPG-14F/GPG-632R) kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu. M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 139, 141, 145, 149, 152, 158, 162, 165, 171, 177, 232, 235: testlenen bitki örnekleri; +K: Pozitif kontrol, S: Su kontrol



Şekil 4.17. Hatay ili bağ örneklerinin *Grapevine roditis leaf discoloration associated virus* 'ne karşı Badna-R-Up ve Badna-R-Do primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizlerinin elektroforez jel görüntüsü M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 64, 65, 66, 68, 69,70, 72, 73, 74, 77, 79, 82, 87, 85, 90, 93, 98, 103, 112, 128,133, 141, 153: testlenen bitki örnekleri; S: Su kontrol; +K: Pozitif kontrol.

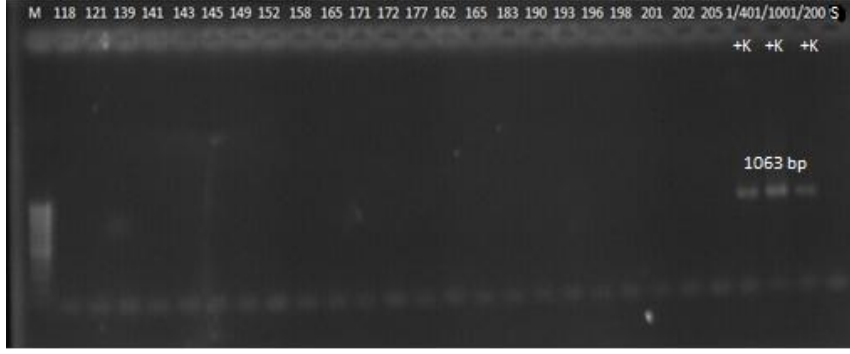


Şekil 4.18. Tekirdağ ili bağ örneklerinin *Grapevine roditis leaf discoloration associated virus* 'ne karşı Badna-R-Up ve Badna-R-Do primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizlerinin elektroforez jel görüntüsü M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 64, 65, 66, 68, 69,70, 72, 73, 74, 77, 79, 82, 87, 85, 90, 93, 98, 103, 112, 128,133, 141, 153: testlenen bitki örnekleri; S: Su kontrol; +K: Pozitif kontrol.

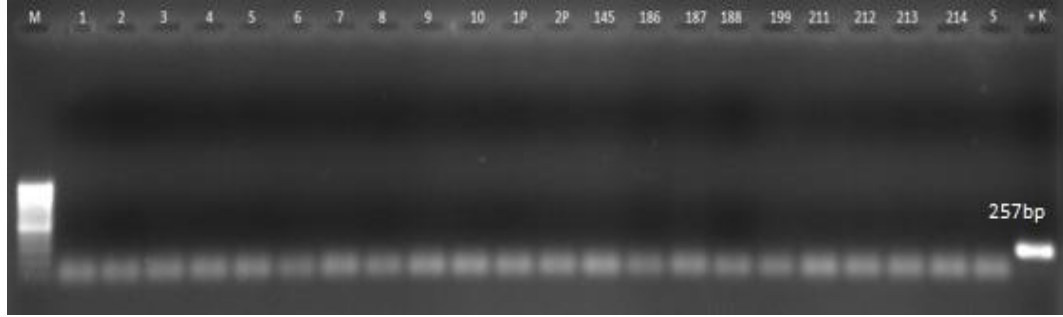
Grapevine red blotch associated virus (GRBaV) PCR Analizleri

Testlenenecek bitkiler ve pozitif kontrol bitki örneklerinden Qiagen RNeasy hazır kitin kullanıldığı modifiye MacKenzie yöntemi ile izole edilen NA'ler 1/40, 1/100 ve 1/200 oranında sulandırılarak Al Rwahnih ve ark. (2013) tarafından geliştirilen GRBaV primeriyle testlenmiştir. PCR analizleri sonucunda pozitif kontrol olarak kullanılan örnekte beklenen düzeyde amplifikasyon elde edilirken Tekirdağ ve Hatay ili

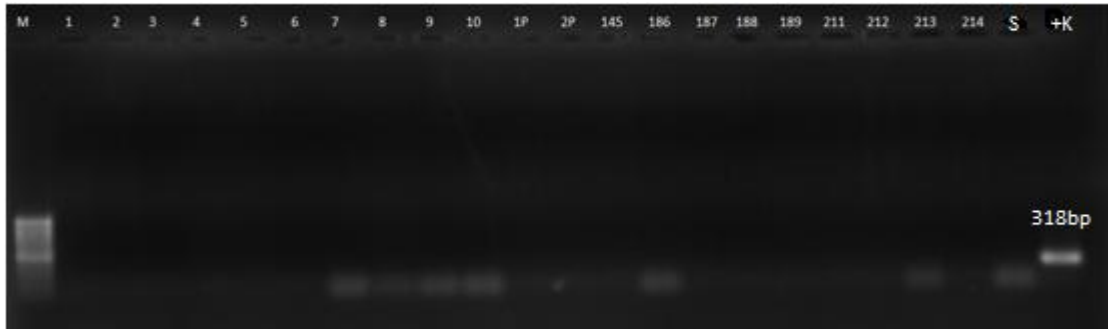
bağ örneklerinin hepsi GRBaV açısından negatif bulunmuştur (Şekil 4.19). Sonuçların doğrulanması amacıyla Krenz ve ark., (2014) tarafından geliştirilen ve virüsün kılıf protein geni (GRBaV-CP) ve replikaz genini amplifiye eden (GRBaV-REP) primerleriyle de bazı semptomlu örnekler seçilerek testlenmiştir. Örneklerden MacKenzie modifiye Qiagen kit ile RNA, Qiagen DNesay kit ile de DNA ile izole edilerek PCR yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda her iki yöntemle izole edilen DNA ve RNA'dan yapılan PCR ve RT-PCR işleminde pozitif kontroller çalışmış ve örnekler negatif bulunmuştur (Şekil 4.20, 4.21). Bağlar vegetatif yolla çoğaltılmaları nedeniyle birçok virüse konukçuluk yapmakta ve gerek RNA gerekse DNA virüsleri bir arada karışık enfeksiyona neden olmaktadır (Martelli, 2014). Bu nedenle bağlarda karışık virüs enfeksiyonlarını saptamak için ayrı ayrı RNA ve DNA izolasyonu yapmak yerine sadece RNA ekstraksiyonu ile hem RNA hem DNA virüslerinin PCR analizleri ile saptanabilme durumu da araştırılmıştır. Bu amaçla DNA virüsleri olan GRBaV ve GRLDaV'nin sadece pozitif kontrol bitki örnekleri kullanılarak modifiye Mackenzie RNA ekstraksiyon yöntemi ile RNA izolasyonu yapılmış ve RNA sulandırılmadan ve 1/100 oranında sulandırılarak RT-PCR yapılmıştır. Sonuçta her iki virüs için de sadece pozitif kontrollerde beklenen düzeyde amplifikasyon elde edilmiş ve sulandırma durumu açısından bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.22). Yapılan bazı çalışmalarda izole edilen total RNA'ların DNA virüslerini saptamada kullanılabilirliği araştırılmış ve RNA izolasyon prosedürlerinin GRBaV gibi küçük genomik DNA moleküllerini saptamada etkin olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (Xiao ve ark., 2015). GRBaV tanısı amacıyla yapılan tüm PCR ve RT-PCR analizlerinde gerek Tekirdağ gerekse Hatay ili bağ örneklerinde pozitif örnek saptanmamıştır. Bugüne kadar bu virüsün sadece ABD (Al Rwahnih ve ark., 2013; Krenz ve ark., 2014) ve Kanada'da (Poojari ve ark., 2013; 2016) varlığı tespit edilmiş olup diğer hiçbir ülkeden kayıt bulunmamaktadır. O nedenle ülkemizde tespit edilmemiş olması beklenen bir sonuçtur.



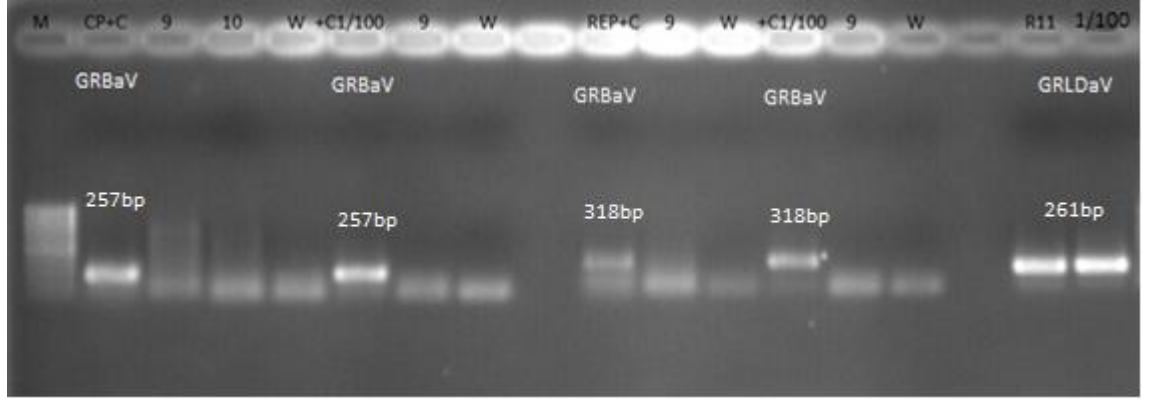
Şekil 4.19. Tekirdağ ili bağlarından toplanan örneklerin *Grapevine redblotch associated virus*'ne karşı GVGF1/GVGR1 primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizlerinin elektroforez jel görüntüsü M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 118, 121, 139, 141, 143, 145, 149, 152, 158, 165, 171, 172, 177, 162, 165, 183, 190, 193, 196, 198, 201, 202, 205: testlenen bitki örnekleri; 1/40, 1/100, 1/200: Farklı oranlarda sulandırılmış pozitif kontrol, S: Su kontrol.



Şekil 4.20. Tekirdağ ili bağlarından toplanan örneklerden izole edilen DNA'ların *Grapevine redblotch associated virus*-kılıf protein (GRBaV-CP) primeri kullanılarak yapılan PCR sonucunun elektroforez jel görüntüsü M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 1-10, 1P, 2P, 186, 187, 188, 199, 211, 212, 213, 214: testlenen bitki örnekleri; S: Su kontrol, +K: pozitif kontrol



Şekil 4.21. Tekirdağ ili bağlarından toplanan örneklerden izole edilen DNA'ların *Grapevine redblotch associated virus*-replikaz geni (GRBaV-REP) primeri kullanılarak yapılan PCR sonucunun elektroforez jel görüntüsü M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya) ; 1-10, 1P, 2P, 186, 187, 188, 199, 211, 212, 213, 214: testlenen bitki örnekleri; S: Su kontrol, +K: pozitif kontrol



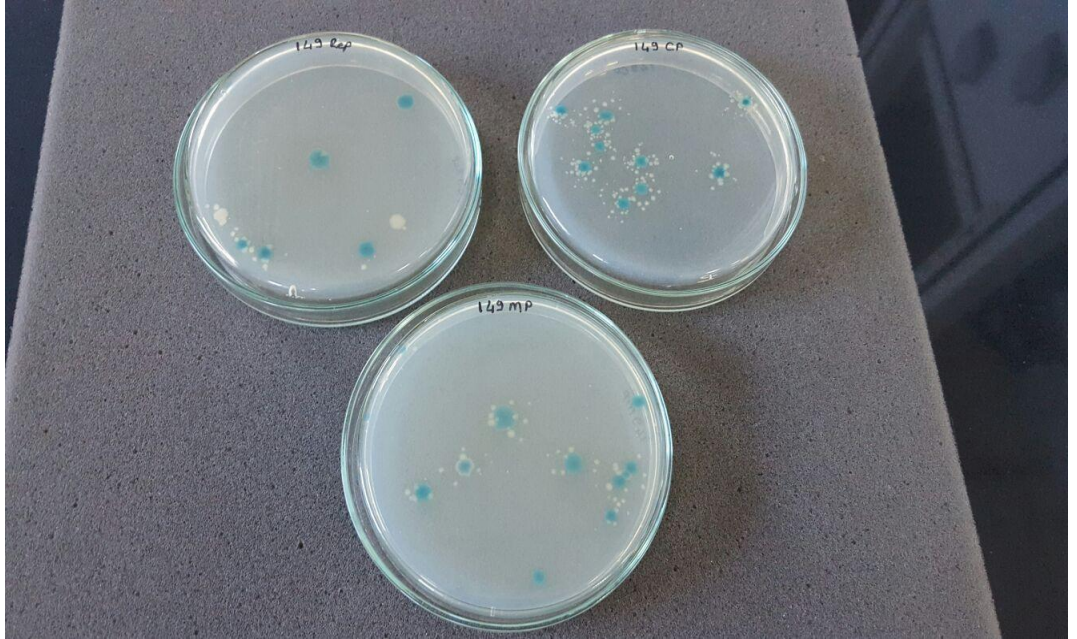
Şekil 4.22. GRBaV ve GRLDaV pozitif bitki kontrollerinden modifiye Mackenzie RNA ekstraksiyon yöntemiyle izole edilen total RNA'ların RT-PCR analizleri M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); (CP+C): *Grapevine red blotch asosciated virus-coat protein* pozitif, +C 1/100: *Grapevine red blotch asosciated virus-coat protein* 1/100 sulandırılmış pozitif, rep+C: *Grapevine red blotch asosciated virus-replikaz* proteini pozitif, +C1/100: *Grapevine red blotch asosciated virus-replikaz* proteini 1/100 sulandırılmış pozitif; 9-10: Tekirdağ bağ örnekleri; S: Su kontrol R11,R12:C*Grapevine roditis leaf discoloration virus* pozitif kontrol)

4.2.3. GPGV-CP, MP ve REP gen bölgelerinin klonlama çalışmaları

Tekirdağ ilinden toplanan ve GPGV'nin üç gen bölgesi için de RT-PCR analizlerinde beklenen düzeyde ampikon elde edilen 145 ve 149 nolu isolatlar kullanılarak yapılan klonlama işleminde transformasyon için ekim yapılan petriler 37 °C'de bekletilerek koloni gelişimi takip edilmiştir. 145 nolu izolatta sadece GPGV-CP ve GPGV-REP bölgelerinde mavi ve beyaz renkte koloniler elde edilirken 149 nolu izolatta üç bölge için de mavi ve beyaz koloniler elde edilmiştir (Şekil 4.23, 4.24). Beyaz kolonilerden hazırlanan örnekler GPGV-CP, GPGV-MP ve GPGV-REP primeri kullanılarak RT-PCR analizleri yapılmış ancak beklenen düzeyde ampikon elde edilememiştir. Elde edilen ampikonlar sekansa gönderildiğinde sadece vektöre ait dizilim elde edilmiş olup, bu da klonlamanın uygun ve başarılı bir şekilde gerçekleştirilemediğini göstermektedir.



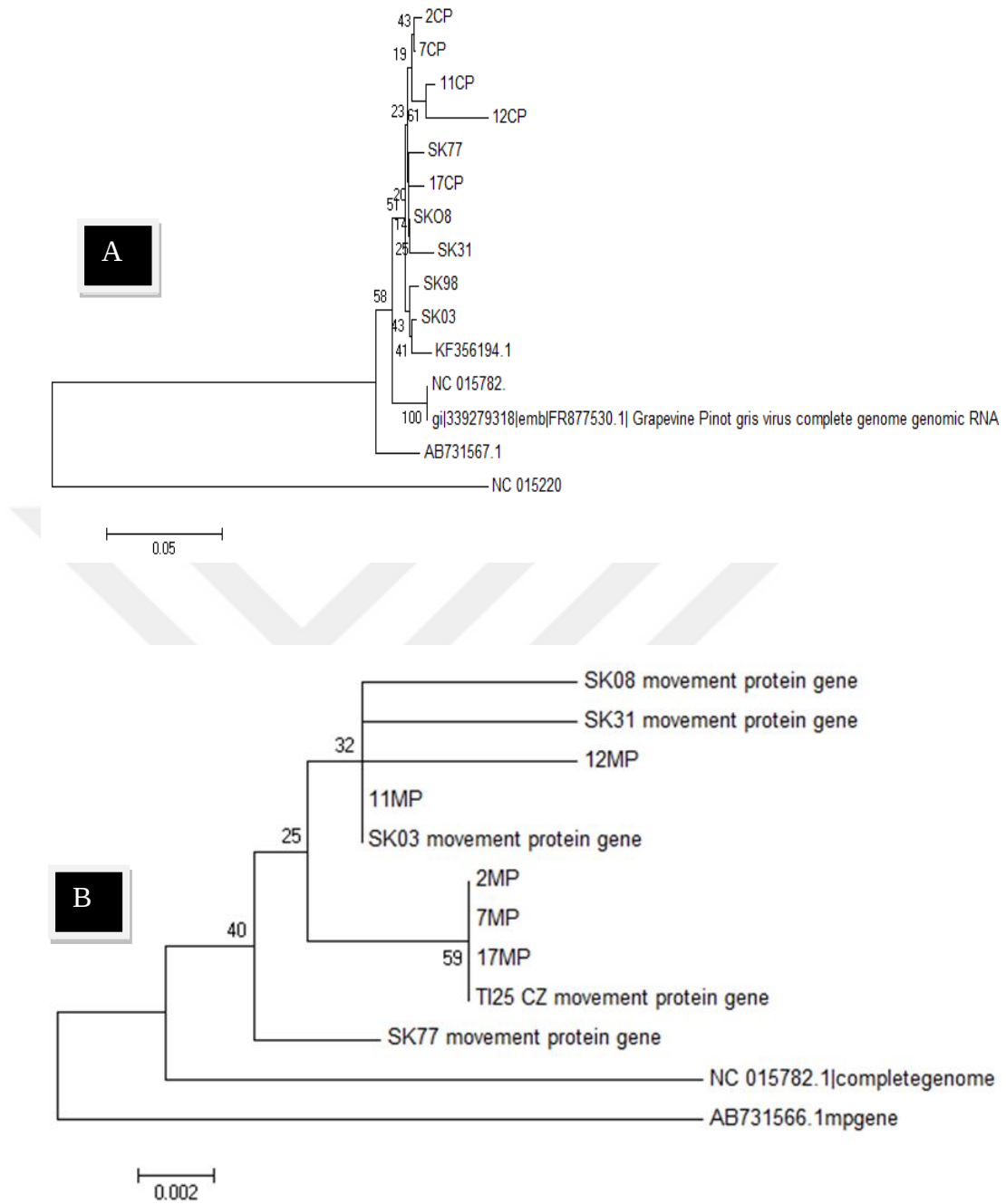
Şekil 4.23. *Grapevine pinot gris virus* (GPGV)'nin Tekirdağ örneklerinden RT-PCR sonrası pozitif bulunan 145 nolu palieri çeşidinden yapılan klonlama işleminde mavi ve beyaz koloni gelişimi göstermiştir. GPGV-CP, GPGV-MP, GPGV-REP bölgeleri için klonlanan örneklerdeki koloni oluşumu



Şekil 4.24. *Grapevine pinot gris virus* (GPGV)'nin Tekirdağ bağ örneklerinden GPGV-CP, -MP ve -REP primerleri ile pozitif bulunan 149 nolu GPGV-Shiraz izolatu kullanılarak yapılan klonlama çalışmaları sonucu gözlenen mavi ve beyaz koloni gelişimi

4.2.4. GPGV'nin Filogenetik Analizi

GPGV'nin kılıf protein (CP) ve hareketlilik protein (MP) gen bölgelerine ait nükleotid dizileri taksonomik analizler sırasında oldukça kullanışlı genomik bölgelerdir (Berger ve ark., 2000) bu nedenle bu çalışma kapsamında öncelikle bu iki gene ait nükleotid dizileri NCBI veri tabanındaki diğer GPGV izolatlarının dizileri ile Clustal W yöntemi kullanılarak hizalanmıştır. Hizalanan tüm nükleotid dizileri NJ (Neighbor Joining) yöntemi kullanılarak Mega 6 yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçta elde edilen dendrogramların birbiri ile oldukça uyumlu olduğu görülmüştür. GPGV-CP ve -MP izolatlarına ait NJ dendrogramı incelendiğinde, GPGV Türkiye izolatlarının aynı grup içerisinde yer aldığı ve en yakın homolojiyi Slovakya ve Çek Cumhuriyeti izolatları (SK77, SK08, SK31 ve TI25CZ, KF356194.1) ile gösterdiği saptanmıştır (Şekli 4.25).



Şekil 4.25. *Grapevine pinot gris virus* 'ün RT-PCR ürünlerinin sekans analizi sonucunda çizilen filogenetik ağaç. GPGV'nin kılıf protein geni (CP) (A) ve hareketlilik geni (movement protein gene-MP) (B) sekans dizilerinin Gen Bankası (NCBI) veri tabanında kayıtlı bazı GPGV izolatlarının CP ve MP bölgesine ait nükleotit dizileri esas alınarak oluşturulan filogenetik ağaç. Filogenetik analizde, MEGA 6 yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendrogramda bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiş ve % 50'nin altındaki değerler ağaçta yer almamıştır.

5.SONUÇ ve ÖNERİLER

Ülkemiz, asmanın gen merkezi olmasının yanı sıra eski ve köklü bir bağcılık kültürüne de sahiptir. Ülkemiz, bağcılıkta dünya çapında önemli bir üretim payına sahiptir ve üzüm, sofralık ve kurutmalık olarak uluslararası boyutta önemli rol alırken şarapçılık da son yıllarda önemli gelişmeler göstermeye başlamıştır. Bağ yetiştiriciliğini tehdit eden birçok zararlı ve hastalıklar mevcuttur. Bu etmenler bitkilerin yaşam kalitesini azaltarak meyve verim ve kalitesinde de azalmalara neden olmaktadır. Günümüzde bağları enfekte eden yaklaşık 60 kadar virüs saptanmıştır (Martelli, 2014). Bu virüslerin hemen hemen yarısı *Nepovirus*, *Sadwavirus*, *Closterovirus*, *Ampelovirus*, *Vitivirus*, *Maculavirus* ve *Foveavirus* cinsine ait virüslerdir. Yeni nesil dizileme teknolojisindeki gelişmeler doğrultusunda çok sayıda yeni viral etmen tanımlanmış olup *Grapevine Syria virus-1* bu örneklerin ilkidir ve bunu *Grapevine pinot gris virus* (GPGV) izlemiştir. Bağlarda yaygın olarak tespit edilen RNA virüsleri haricinde günümüzde sadece birkaç DNA virüsü tanımlanmış olup bunlar: tek iplikli DNA'ya sahip *Geminiviridae* üyesi *Grapevine Cabernet franc-associated virus* (GCFaV) ve *Grapevine red blotch associated virus* (GRBaV) ile çift iplikli DNA'ya sahip *Caulimoviridae* familyası *Badnavirus* cinsine dahil olan *Grapevine vein clearing virus* (GVCV) ve *Grapevine roditis leaf discoloration-associated virus* (GRLDaV)'dür (Martelli 2014). Bu çalışma kapsamında Hatay ve Tekirdağ illeri bağ alanlarında yapılan arazi surveyleri ile Tekirdağ ilinden ithal ve yerli çeşitler olmak üzere toplam 191, Hatay ilinden ise en yaygın yetiştiriciliği yapılan Antep Karası çeşidinden 111 örnek bağ alanlarına son yıllarda yeni giriş yapan GPGV, GSyV-1, GRBaV ve GRLDaV'ye karşı PCR ile testlenmiş ve sonuçlar sekans analizi yöntemiyle doğrulanmıştır.

Testlenen örneklerden Tekirdağ ilinden toplanan bağ örneklerinde % 43,62 oranında GPGV, % 17,07 oranında ise GSyV1 saptanmıştır. Hatay ilinden toplanan örneklerde ise sadece % 11 oranında GSyV1 saptanmış ve testlenen örnekler diğer virüsler açısından temiz bulunmuştur. Tekirdağ ili bağ alanlarında yeni virüslerden GPGV ve GSyV-1'nin yüksek oranda saptanmasının bu ilde yabancı orijinli sofralık ve şaraplık üzüm çeşitlerinin yaygın olarak yetiştirilmesi nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Hatay ilinde testlenen örneklerin tamamının yerli çeşit olması ve dış

kaynaklı yeni çeşitlerin bu bölgede yaygın olmaması nedeniyle GPGV'nin saptanamadığı ve GSyV-1 enfeksiyon oranının da çok düşük olduğu görülmektedir.

GSyV-1 konusunda dünyada yapılan çalışma sayısı son derece sınırlı olup gen bankasında az sayıda kayıtlı izolat bulunması nedeniyle virüsün tespiti amacıyla ilk yıllarda ABD'li araştırmacılar tarafından geliştirilen GVQ ve GSyV-1_Det primerleri ülkemizdeki GSyV-1 izolatlarını tanımada başarısız olmuştur. Tüm virüslere karşı testlenen 301 örnekten seçilen 42 Tekirdağ, 53 Hatay örneği GSyV-1 için geliştirilen 3 primer çifti ile denenmiş ve Tekirdağ örneklerinden 1 tanesi GVQ, 1 tanesi ise GSyV-1-Det primeri ile pozitif sonuç verirken, Hatay ili örneklerinden sadece 1 tanesi GSyV-1-Det primeri ile saptanabilmiştir. Bunu yanında 2015 yılında Glasa ve ark. tarafından gen bankasındaki çok sayıda izolat genomu dikkate alınarak geliştirilen SY5922F/SY6295R primeri ile yapılan testlerde Tekirdağ örneklerinden 28, Hatay ili örneklerinden ise 10 tanesi pozitif bulunmuştur. Bu çalışma kapsamında elde edilen PCR ürünleri çoğaltılarak sekansa gönderilmiş ancak sekans sonuçları hala elimize ulaşmadığı için bu çalışma kapsamında yorumlanamamıştır.

Bu tez kapsamında yapılan PCR analiz sonuçlarına göre GPGV, Tekirdağ iline ait çok sayıda farklı üzüm çeşidinde saptanmıştır. PCR analizlerinde virüsün 3 farklı gen bölgesini çoğaltan primerler kullanılmış ve seçilen sınırlı sayıdaki izolat sekans analizine gönderilerek elde edilen sekanslar farklı ülkelerden gen bankasına kaydedilen GPGV-bağ izolatları ile kıyaslanmıştır. Bu çalışmanın devamında GPGV pozitif bulunan çeşitlerden yapılacak seçimlerle daha fazla izolatin sekans analizi yapılarak gen bankasına yeni veriler sağlanması önerilmektedir. Böylece sınırlı sayıda ve sadece bazı Avrupa ülkeleri, ABD ile Kore'ye ait bulunan GPGV sekans dizilerine ilaveten ülkemizde bağlardan ve olası vektörlerden elde edilecek izolatlara ait yeni sekans dizileri kayıt edilerek GPGV'nin evrimsel gelişme ve ortaya çıkış sürecinin açıklanmasına katkı sağlanmış olacaktır. GPGV'nin yabancı orijinli çeşitler yanında yerli üzüm çeşitlerimizde de saptanması hastalığın vektörlerle taşınma ve diğer olası konukçu varlığı konusunda önemli bir veridir. Bu nedenle önemli sofralık ve şaraplık üzüm çeşitlerinde daha geniş alanlarda surveyler yapılarak GPGV'nin epidemiyolojisinde rol oynayan *Eriophyidae* familyasına bağlı olası vektör akar türlerinin ve GPGV'nin taşınmasındaki etkin rollerinin ortaya çıkarılması gerekmektedir. Ayrıca bağ alanlarında yoğun olarak bulunan yabancı otların da GPGV

açısından testlenmesi gerekmektedir. Yapılacak olan tespit ve taşıma denemeleri sonucunda eriofidlerin virüsü taşımadaki rolleri ve bağ dışında olası konukçular belirlenerek, eriofidlerle ve yabancı otlarla etkin mücadele olanaklarının geliştirilmesi ve bununla ilişkili olarak hastalık kontrolünde gerekli önlemlerin ivedilikle alınmasına destek sağlanmış olacaktır. Türkiye’de ekonomik anlamda önemli bağ çeşitlerinde GPGV’nin verim ve kaliteye olan etkilerinin araştırılması da önerilmektedir. Bu kapsamda enfekteli ve sağlıklı omcalarda salkım sayısı/omca, 100 dane ağırlığı, üzüm suyunun şeker içeriği, total asitlik, pH değeri v.b. gibi bazı özellikler incelenerek virüsün gerçek anlamda ekonomik kayıplara yol açıp açmadığı belirlenmelidir.

Bu çalışma ile GSyV-1 ülkemizde ilk kez saptanmış olup bu virüsle symptom ilişkileri araştırılmamıştır. Ayrıca bu virüsün saptanmasında denenen 3 farklı primerin yanında ülkemiz izolatlarını daha iyi tanılamaya yönelik yeni primerlerin geliştirilmesi de önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Anonim, 2015http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.dp?alt_id=1001.
- Anonim, 2015<http://www.ipmcenters.org/index.cfm/center-products/ipm-eacademy/upcoming-events/red-blotchspeakings>
- Anonim, 2015http://www.eppo.int/QUARANTINE/Alert_list/viruses/GRBAV0.htm
- Anonim, 2015<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-15-0596-PDN>
- Akbaş, B., and Erdiller, G., 1993. Researches on Grapevine Virus Diseases and Determination of Their Incidences in Ankara, Türkiye. **Journal of Turkish Phytopath**, 22(2,3): 47-54
- Akbaş, B., Kunter, B., İlhan, D., 2007. Occurrence and Distribution of *Grapevine Leafroll-associated Viruses* 1, 2, 3 and 7 in Turkey. **Journal of Phytopathology**, 155. 122–124
- Al Rwahnih M., Daubert S., Golino D.A., Rowhani A., 2009. Deep sequencing analysis of rnas from a grapevine showing Syrah Decline symptoms reveals a multiple virus infection that included a novel virus. **Virology**, 387, 395-401
- Al Rwahnih, M., Dave, A., Anderson, M., Uyemoto, J. K., and Sudarshana, M. R., 2012a. Association of a circular DNA virus in grapevines affected by red blotch disease in California. **In Proceedings of the 17th Congress of ICVG, Davis, CA, USA** pp. 7-14.
- Al Rwahnih, M., Sudarshana, M. R., Uyemoto, J. K., and Rowhani, A., 2012b. Complete genome sequence of a novel vitivirus isolated from grapevine. **Journal of Virology**, 86(17), 9545-9545.
- Al Rwahnih, M. A., Dave, A., Anderson, M. M., Rowhani, A., Uyemoto, J. K., and Sudarshana, M. R., 2013. Association of a DNA virus with grapevine affected by red blotch disease in California. **Phytopathology**, 103(10), 1069-1076.
- Al Rwahnih, M., Golino, D. A. Rowhani, A. 2015. First report of *Grapevine pinot gris virus* infecting grapevine in the United States. **Plant Disease.**, Doi: 10.1094/PDIS-10-15-1235-PDN.
- Avgelis, A.D., Rumbos, I.C., 1990. Carnation mottle virus isolated from vines affected with *Roditis leaf discoloration*. **10th Meet ICVG Volos**, 70 Greece
- Avgelis, A.D., Salderelli, P., Boscia, D., 2006. Grapevine viruses associated with *roditis leaf discoloration*. **15th Meet ICVG Stellenbosch**, 161-162, South Africa
- Azeri, T., ve Çiçek, Y. 1995. İntrodüksiyon ve Klon Seleksiyonuyla Elde Edilmiş Bazı Bağ Çeşitleri ve Anaçlarındaki Virüs ve Virüs Benzeri hastalıkların Saptanmasına Yönelik Araştırmalar. VII. **Türkiye Fitopatoloji Kongresi**, Adana. 26-29 Eylül 1995, s. 374-377.
- Battany, M., Rowhani, A., and Golino, D. 2004. Syrah in California, decline or disorder. **Practical Winery and Vineyard**, 26(1), 20-35.
- Berger, P., Barnett, O.W., Brunt, A.A., Colinet, D., Edwardson, I.R., Hammond, I., Hill, I.H., Jordan, R.L., Kashwazaki, S., Makkouk, K., Morales, F.I.,

- Rybicki, E., Spence, N., Ohki, S.T., Uyeda, I., van Zaayen, A., Vetten, R.I. 2000. Family Potyviridae. In: *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Springer-Verlag, NY. 703-724
- Bertazzon, N., Filippin, L., Forte, V., Angelini, E. 2015. *Grapevine pinot gris virus* seems to have recently been introduced to vineyards in Veneto, Italy. **Archives of Virology**, 161, 711-714.
- Beuve, M., Candresse, T., Tannieres, M., Lemaire, O., 2015. First report of *Grapevine pinot gris virus* (GPGV) in France. **Plant Disease**, 99,
- Buzkan, N., Karadağ, S., Kaya, A., Baloglu, 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
- Casati, P., Maghradze, D., Quaglino, F., Ravasio, A., Failla, O., & Bianco, P. A. (2015). First report of *Grapevine Pinot gris virus* in Georgia. **Journal of Plant Pathology**, doi:10.4454/JPP.V98I1.003293.
- Cho, I. S., Jung, S.M., Cho, J. D., Choi, G.S., Lim, H.S., 2013. First report of *Grapevine Pinot gris virus* infecting grapevine in Korea. **New Diseases Reports** 27,10, Kore.
- 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.
- Çığsar, İ., Digiaro, M., Martelli, G.P., 2002. Sanitary status of grapevine in south-eastern and central Anatolia (Turkey). **EPPO Bulletin**. 32, 471-475.
- EPPO. 2015. *Grapevine red blotch-associated virus*. **European and Mediterranean Plant Protection**
- Fan, X. D., Dong, Y. F., Zhang, Z. P., Ren, F., Hu, G. J., Li, Z. N., et al. 2015. First report of *Grapevine Pinot gris virus* in grapevines in China. **Plant Disease**. doi:10.1094/PDIS-08-15-0913-PDN.
- Gazel, M., Çağlayan, K., Elçi, E., Öztürk, L., 2014 First Report of Grapevine Pinot Gris Virus in Grapevine Turkey . **Journal of Plant Pathology**, 100,3, 657
- Giampetruzzi, A., Roumi, V., Roberto, R., Malossini, V., Yashikawa, N., LaNotte, P., Terlizzi, F., Credi, R., Salderelli, P., 2012. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus-and viroid-derived small RNAs in cv Pinot gris. **Virus Research**, 163, 262-268.
- Glasa, M., Predajna, L., Kominek, P., Hagyo, A., Candresse, T., Olmos, A., 2014 Molecular characterization of divergent *Grapevine pinot gris virus* and their detection in Slovak and Czech grapevine. **Archives of Virology**, 159, 2103- 2107.
- Glasa M., Predajna L., Soltys K., Sabanadzovic S., Olmos A., 2015. Detection and molecular characterisation of *Grapevine Syrah virus-1* isolates from Central Europe. **Virus Genes**, 51: 112-121.
- Goszczynski, D.E., 2007. Single-strand conformation polymorphism (SSCP), cloning and sequencing of *Grapevine virus A* (GVA) real a close association between related molecular variants of the virus and Shiraz diseases in South Africa. **Plant Pathology**, 56, 755-762.

- Goszczynski, D.E., and Jooste, A.E.C., 2003. Identification of divergent variants of *Grapevine Virus A*. *Eur. Journal Plant Pathology*, 109, 397-403.
- Goussard, H., and Bakker, H., 2006. Characterisation of grapevines visually infected with shiraz diseases associated viruses .
- Gualandri, V., Asquini, E., Pierluigi, B., Laura, C., Matteo, B., Umberto, M., Paola, B., Pasquale, S., Azeddine, S., 2016. Identification of herbaceous hosts of the *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV). *European Journal of Plant Pathology*, 147(1),21-25.
- Gürsoy, Y.Z., 1988. Vein Necrosis. A New Virus Like Diseases in Turkish Vineyards. *Journal of Turkish Phyt., Soc. V. 17* (1): 43-46.
- Gramaje D, Muñoz RM, Lerma ML, García-Jiménez J, Armengol J., 2009 Fungal grapevine trunk pathogens associated with Syrah decline in Spain. *Phytopathologia Meditteranea*, 48:396–402.
- Habili, N., Farrokhi, N., Lima, M.F., Nicholas, P., and Randles, J.W., 2006. Distribution of Rupestris stem pitting associated virus variants in two Australian vineyards showing different symptoms. *Annals of Applied Biology*, 148(1), 91-96.
- Habili, N. 2015. *Grapevine Pinot Gris virus* -a tricky virus around the corner? *Wine and Viticulture Journal*, 54-55.
- Jo, Y., Choi, H., Kyong Cho, J., Yoon, J. Y., Choi, S. K., Kyong Cho, W., 2015. In silico approach to reveal viral populations in grapevine cultivar Tannat using transcriptome data. *Scientific Reports*, 5, 15841.
- Kaya, A., Erilmez, S., 2012. First Report of *Grapevine Leafroll-associated Virus 4* in Vineyards of Turkey. *Plant Diseases*, 96 (8): 1230
- Köklü, G., Digiario, M., Savino, V. 1998. A survey of grapevine viruses in Turkish Thrace. *Phytopathologia Meditteranea*, 37: 140-142.
- Krenz, B., Thompson, J. R., Fuchs, M., and Perry, K. L., 2012. Complete geno sequence of a new circular DNA virus from grapevine. *Journal of Virology*, 86(14), 7715-7715.
- Krenz, B., J. R. Thompson, H. L. McLane, M. Fuchs, and Perry, K. L., 2014. *Grapevine red blotch-associated virus* is widespread in the United States. *Phytopathology*, 104:1232-1240.
- Kreuze, J. F., Perez, A., Untiveros, M., Quispe, D., Fuentes, S., Barker, I., and Simon, R., 2009. Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: a generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology*, 388(1), 1-7.
- 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.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J., 1992. Molecular Cloning, A laboratory Manuel. *CSH Laboratory*, 554.
- Maliogka, V.I., Olmos, A., Pappi, P.G., Lotos, L., Efthimiou, K., Grammatikaki, G., Candresse, T., Katis, N.I., Avgelis, A.D. 2015. A novel grapevine badnavirus is associated with the *Roditis leaf discoloration disease*. *Virus Research*, 203: 47-55.

- Malossini, U., Moscan, R., Ferrazza, M., Bianchedi, P., Varner, M., and Credi, R., 2012. Caratteristiche vegeto-produttive di viti Pinot grigio Tramine aromatica affette da una nuova virosi segnalata in Trentina. **IV Convegno Nazionale di Viticoltura CONAVI**, TO Asti, 10-11-12 pp 37.
- Martelli, G.P. 1987. A report to the government of Turkey. **Published by FAO**, Rome.
- Martelli, G.P. 2010. Virus diseases of grapevine. **Encyclopedia of Life Sciences**, 2nd Ed., John Wiley ve Sons. Hoboken, NJ, USA. p. 1-11.
- Martelli, D.P., 2014. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. **Journal Plant Pathology**, 96(1S), 110-111.
- Maree, H. J., Freeborough M.-J., Burger J. T. 2008. Complete nucleotide sequence of a South African isolate of *Grapevine leafroll-associated virus 3* reveals a 5'UTR of 737 nucleotides. **Arch. Virol.**, 153: 755–757
- Morelli, M., de Moraes Catarino, A., Susca, L., Salderelli, P., Gualandri, V., and Martelli, G.P., 2014. First report of *Grapevine Pinot gris virus* from table grapes in southern Italy. **Journal Plant Pathology**, 96,439.
- Oraman, M.N., 1965. Arkeolojik Buluntuların Işığında Türkiye Bağcılığının Tarihçesi Üzerinde Araştırmalar. **Ankara Ün. Ziraat Fak. Yıllığı**, 15(2): 96-108.
- Oosthuizen, K. , Coetzee, B. , Maree, H. J. , Burger, J. T. 2016. First Report of *Grapevine Syrah virus 1* in South African Grapevines. **Plant Diseases**, 100 (6): 1252
- Özaslan, M., Baloğlu. S. ve Yılmaz, M.A. 1993. Virus Diseases of Grapevine in South-eastern Anatolian Region in Türkiye. **11.Th Proc. Of. Icvg.**, Montreux, Switzerland. No:62 Ep. P. 122.
- Özaslan, M., 1998. The Effect of Virus Diseases on The Yield of Grapevine in Gaziantep and Kilis Provinces In Türkiye. **J. Türk. Phytopath. Vol.**, 27 (1) : 47-57.
- Poojari, S., Alabi, O. J., Fofanov V. Y., ve Naidu R. A., 2013. A leafhopper transmissible DNA virus with novel evolutionary lineage in the family Geminiviridae implicated in grapevine redleaf disease by next-generation sequencing. **PLoS One.**, 8:e64194. doi:10.1371/journal.pone.0064194.
- Poojari, S., Lowery, T., Schmidt, A-M., Rott, M., McFadden-Smith, W., Stobbs, L., Urbez-Torres, J.R. 2016. Red blotch and the virus in Canada. In: **Webinar on Red Blotch Disease**, February 26,
- Plesko MI, Marn VK, Seljak G, Zezlina I 2014 First report of *Grapevine Pinot gris virus* in grapevine in Slovenia. **Plant Dis.** 98(7):1014
- Prosser, S. Goszczynski, D. , Meng, B. 2007. Molecular analysis of double-stranded RNAs reveals complex infection of grapevines with multiple viruses. **Virus Res.**, 124: 151–159
- Raiola, A., Scopel, C., Ferrigo, D., Tagietti, F., Duso, C., and Causin, R., 2013. First report of *Grapevine Pinot gris virus* infecting cv. Glera in the Conegliano- Valdobbiadene area. Abstr. IXX cong. Italy. Phytopathol. Soc. Padua. **Journal Plant Pathology**, 95,(4,Suppl.),S4,58.
- Renault-Spilmont, A.S., Grenan, S., and Boursiquot, J.M., 2003. 'Syrah Decline in French vineyards.' **14th ICVG Conference**, Proceedings, 144, Bari

- Rumbos, I.C., Avgelis, A.D., 1993. Further investigations on *Roditis leaf discoloration Diseases*. **11th Meet ICVG**, 76, Montreux, Switzerland.
- Rumbos, I. C., and Avgelis, A. D., 1989. *Roditis Leaf Discoloration A New Virus Disease of Grapevine: Symptomatology and Transmission to Indicator Plants*. **Phytopathologische Zeitschrift**, 152, 274-278.
- Sabanadzovic, S., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Gorbalenya, A.E., 2009. Permutation of the active site of putative RNA-degpendent RNA polymerase in a newly identified species of plant alpha-like virüs. **Virology** 394, 1–7.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: A new method for econstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, 4: 406-425.
- Salderelli, P., Giampetruzzi, A., Morelli, M., Malossini, U., Pirolo, C., Bianchedi, P., Gualandri, V., 2015. Genetik variability of *Grapevine Pinot gris virus* and its association with Grapevine Leaf Mottling and Deformation. **Phytopathology**, 105, 555-563.
- Sertkaya, G., A. Yiğit ve K. Çağlayan, 2008. Experimental Transmission of *Grapevine Leafroll Virus 1-3* (GLRaV1-3) by *Citrus mealybug*, *Planococcus citri* (Risso) (Hemiptera, Pseudococcidae) and Grape leafhopper, *Arboridia adanae* Dlab (Hemiptera, Cicadellidae). **J. Turk. Phytopath.** 37 (1-3): 39-54.
- Sudarshana, MR., Perry, KL., Fuchs, MF., 2015. *Grapevine red blotch-associated virus*, an emerging threat to the grapevine industry. **Phytopathology**. 105:1026–1032.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: **Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0**. **Mol. Biol.** 30:2725–2729.
- Thompson, J.D, Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, 22: 4673-80.
- 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.
- Zhang, Y., Singh, K., Kaur, R., Qiu, W., 2011. Association of a novel DNA virus with the Grapevine vein-clearing and vine decline syndrome. **Phytopathology**, 101, 1081-1090.
- Xiao, H., Kim, W., Meng, B., 2015. A highly effective and versatile technology fort he isolation of RNAs from grapevines and other woody perennials for use in virus diagnostics. **Virology Journal**, 12 (171), 2-15.

ÖZGEÇMİŞ

Yazar 1991 yılında Mersin ili Aydıncık ilçesinde doğdu. İlk ve orta okul Mersin ve lise öğrenimini Isparta’da tamamladı. 2009 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma bölümünü kazandı ve 2010 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma bölümüne yatay geçiş programıyla kabul edildi ve 2013 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi’den mezun oldu. 2014 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.



EKLER

MACKENZİE EZME TAMPONU (100 ml)

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

Karışım 100 ml d₂H₂O' ya tamamlanıp oda sıcaklığında saklanmıştır.

NİKOTİN BUFFER TAMPONU (1/000ml)

0.5 M Boric asid	180 ml
NaBorate	
(<i>NaB₄O₇·10H₂</i>)	38g
PVP(40) polyvinylpyrrolidone	40g
Nonfat milk powder	4g
Tween-20	1ml
Nicotine	10ml

Karışım 100 ml d₂H₂O' ya tamamlanıp oda sıcaklığında saklanmıştır.

AGAROS JEL ELEKTROFOREZ (MANIATIS ve ark., 1992)

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)

0.5X TAE 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 dökülüp taraklar yerleştirildikten sonra agarozun donması beklenmiştir (15-20 dakika). 0.5XTAE ortamı içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

SOC (100ml)

2.0g Bacto®-tryptone

0.5g Bacto®-yeast extract

1ml 1M NaCl

0.25ml 1M KCl

1ml 2M Mg_2^+ stock, filter-sterilized

1ml 2M glucose, filter-sterilized

Çözelti 100 ml d_2H_2O 'ya tamamlanarak ph 7 ayarlanmıştır.

2M Mg_2^+ stok

20.33g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

24.65g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

Çözelti 100 ml d_2H_2O tamamlanarak ve filtrelenmiştir.

IPTG stok solüsyon (0.1M)

1.2g IPTG

d_2H_2O 'e 50 ml tamamlanmış ve 4°C saklanmıştır

X-Gal (2ml)

100mg 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-d-galactoside

LB medium (1litre)

10g Bacto®-tryptone

5g Bacto®-yeast extract

5g NaCl

NaOH ekleyerek pH to 7.0 'e tamamlanmıştır

2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase

60mM Tris-HCl (pH 7.8)

20mM $MgCl_2$

20mM DTT

2mM ATP 10% polyethylene glycol (MW8000, ACS Grade)

Tek kullanımlık tüplerde 20 ° C'de saklanmıştır.

TYP broth (1 litre)

16g Bacto®-tryptone

16g Bacto®-yeast extract

5g NaCl

2.5g K_2HPO_4