



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

**HATAY ve GAZİANTEP İLLERİNDEKİ BAĞ ALANLARINDA
GÖRÜLEN ÖNEMLİ VİRÜS HASTALIKLARININ SEROLOJİK ve
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANILANMASI**

Ece DEĞER

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
NİSAN-2015**



T.C.

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HATAY ve GAZİANTEP İLLERİNDEKİ BAĞ ALANLARINDA
GÖRÜLEN ÖNEMLİ VİRÜS HASTALIKLARININ SEROLOJİK ve
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANILANMASI**

Ece DEĞER

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
NİSAN-2015

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HATAY ve GAZİANTEP İLLERİNDEKİ BAĞ ALANLARINDA
GÖRÜLEN ÖNEMLİ VİRÜS HASTALIKLARININ SEROLOJİK ve
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANILANMASI**

**ECE DEĞER
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN danışmanlığında hazırlanan bu tez 16/04/2015 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN
BAŞKAN



Doç. Dr. Mona GAZEL
ÜYE



Doç. Dr. Önder KAMILOĞLU
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No: 8 2 4

Doç. Dr. Okan ŞENER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 11464

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.

16/04/2015

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.

ECE DEĞER

ÖZET

HATAY ve GAZİANTEP İLLERİ BAĞLARINDA GÖRÜLEN ÖNEMLİ VİRÜS HASTALIKLARININ SEROLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANILANMASI

Günümüzde bağları enfekte eden 60 kadar virüs saptanmıştır. Bu virüslerin hemen hemen yarısı *Nepovirus*, *Sadwavirus*, *Closterovirus*, *Ampelovirus*, *Vitivirus*, *Maculavirus* ve *Foveavirus* cinsine ait virüslerdir. Bu cinsler içinde yer alan virüslerin bazıları ülkemizin farklı bölgelerinde tespit edilmiş olup bu çalışmaların çoğu Trakya, Ege, İç Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde biyolojik ve serolojik yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Moleküler tanı yöntemlerinin bağ virüslerini tanılamak amacıyla kullanımı ise ülkemizde son yıllarda başlamış olup, Hatay ili bağlarında virüs hastalıklarının moleküler yöntemlerle teşhisine yönelik hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı Hatay ve Gaziantep illerindeki bağ alanlarında *Closteroviridae* familyasına ait virüslerden *Grapevine leafroll associated virus 1*, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 9 (GLRaV-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -9) ile özellikle odun dokusunda deformasyonlara neden olan *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB) ve *Grapevine virus D* (GVD)'nin DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleri ile; ülkemizde hiç çalışma bulunmayan ve son yıllarda tespit edilen "*Red blotch associated virus* (GRBaV) 'ün de PCR analizleri ile saptanmasıdır. Bu çalışma kapsamında Hatay ilinde 11, Gaziantep ilinde ise 2 bağ ziyaret edilmiş ve 153 bitki örneği toplanmıştır. Gözlenen en yaygın semptomlar yapraklarda kızarma ve damarların yeşil kalması, beneklenme, kıvrılmalar ve şekil bozuklukları, sürgünlerde ise boğum aralarında kısalmalar ile odun gövdesinde deformasyonlardır. ELISA testi sonuçlarına göre en yaygın virüsler GLRaV-1 (%55.56) , GLRaV 4-9 (%43.14), GLRaV-2 (%15.69), ve GLRaV-3 (%12.42) olarak saptanmış ve bu virüsleri GVA (%4.57) ve GLRaV-6 (%0.65) izlemiştir. Testlenen tüm örnekler GLRaV- 5, GLRaV-7 ve GVB açısından negatif bulunmuştur. Karışık enfeksiyonların hepsinde GLRaV-1'in yer aldığı, bunu sırasıyla GLRaV 4-9, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6 ve GVA'nın izlediği görülmüştür. RT-PCR analizleri sonucunda testlenen bağ örneklerinin ise % 23.94'ü GLRaV-1, %14.77'si GLRaV-3, % 15.38'i GLRaV-6, %13.64'ü GVA, %1.26'sı GVB ve %1.20'si GVD ile enfekteli bulunmuştur. Bu çalışma ile testlenen 153 örneğin hiç birisinde GRBaV tespit edilemezken GVB ve GVD virüsleri ülkemizde ilk kez RT-PCR yöntemi ile tespit edilmiştir.

2015, 45 sayfa

Anahtar kelimeler: *Vitis vinifera* L., *Closteroviridae*, *Vitivirus*, *Red blotch associated virus*, DAS-ELISA, PCR, Hatay, Gaziantep.

ABSTRACT

DETECTION of IMPORTANT VIRUS DISEASES in HATAY and GAZİANTEP VINEYARDS by SEROLOGICAL and MOLECULAR TECHNIQUES

To date, nearly 60 viruses have been reported to infect grapevines. Of these viruses, only about half, belonging primarily to the genera *Nepovirus*, *Sadwavirus*, *Closterovirus*, *Ampelovirus*, *Vitivirus*, *Maculavirus* and *Foveavirus*. Some of the viruses among these genera have already been detected in Trace, Agean, Central and Southeast regions of Turkey by using biological and serological methods. Molecular detection tools have been recently used in our country for grapevine viruses but there has been no report on molecular detection of any grapevine viruses in Hatay province, yet. The aim of this study is detection of *Grapevine leafroll associated virus 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9* (GLRaV-1, 2,3, 4,5, 6, 7, 9) which belong to *Closteroviridae*, *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB) and *Grapevine virus D* (GVD) which cause wood deformations on grapevines by DAS-ELISA and RT-PCR and as well as “*Red blotch associated virus* (GRBaV) on which there is no any report in Turkey by PCR. In frame of this study, 11 vineyards in Hatay and 2 vineyards in Gaziantep were visited and 153 samples were collected. The most common symptoms were reported as reddening of the leaves and green veins, mottling, leaf rolling, leaf and wood deformations and short internodes. According to ELISA results, most common viruses were GLRaV-1 (55.56%) , GLRaV 4-9 (43.14%), GLRaV-2 (15.69%), GLRaV-3 (12.42%) and followed by GVA (4.57%) and GLRaV-6 (%0.65). All tested samples, were found negative for GLRaV- 5, GLRaV-7 and GVB. GLRaV-1 placed in all mixedinfection combinations and followed by GLRaV 4-9, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6 and GVA. RT-PCR analysis showed that tested samples were infected by GLRaV-1, GLRaV-6, GLRaV-3, , GVA, GVB and GVD as 23.94%, 15.38%, 14.77%, 13.64%, %1.26, 1.20%, respectively. In this study GRBaV was not able to detected in any of the 153 tested samples and also GVB and GVD were first time detected by RT-PCR in Turkey.

2015, 45 pages

Key words: *Vitis vinifera* L., *Closteroviridae*, *Vitivirus*, *Red blotch associated virus*, DAS-ELISA, PCR, Hatay, Gaziantep.

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 Doç. Dr. Mona GAZEL'e de en içten teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Zir. Müh. Kıvılcım SARI'ya, Zir. Yük. Müh. Mustafa ALTINIŞIK'a, Arş. Gör. Gamze KILIÇ, Arş. Gör. Hakan ÇARPAR'a ve adlarını burada zikredemediğim, ancak yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tezimin her aşamasında ve hayatta beni her konuda destekleyen aileme sabır ve anlayışlarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.



İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	10
3.1. Arazi Çalışmaları ve Örneklemeye	10
3.2. SEROLOJİK ÇALIŞMALAR	10
3.2.1 DAS ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzim Linked Immunosorbent Assay) Yöntemi:.. ..	10
3.3. MOLEKÜLLER ÇALIŞMALAR.....	11
3.3.1. Bağ Örneklerinden Toplam Nükleik Asit İzolasyonu (TNA).....	11
3.3.1.1. LiCl Yöntemi ile RNA Ekstraksiyonu	12
3.3.1.2. Silica Capture Yöntemi ile RNA Ekstraksiyonu	13
3.3.1.3. Qiagen RNA Ekstraksiyon Kiti ile RNA İzolasyonu	13
3.3.1.4. Qiagen RNA Ekstraksiyon Kiti ile Modifiye RNA İzolasyonu	14
3.3.1.5. DNA İzolasyonu (Prince ve Ark., 1993).....	15
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) Analizleri	16
3.3.2.1 Reverse Transkripsiyon (RT; Reverse Transcription) PCR	16
3.3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyon.....	16
3.3.2.3. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Jel Elektroz.....	18
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	19
4.1. Arazi çalışmaları.....	19
4.2. DAS-ELISA Testi Sonuçları	23
4.3. RT-PCR ve PCR Analizleri	24
4.3.1. Bağlardan RNA Ekstraksiyonunun Optimizasyonu ve DNA İzolasyonu	24
4.3.2. Bağ Örneklerinin RT-PCR ile Testlenmesi	25
4.3.3. DNA virüsü olan Red blotch associated virüs (GRBaV) 'un PCR Analizleri	29
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	31
KAYNAKLAR	33
ÖZGEÇMİŞ	38
EKLER.....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1.	Hatay- Hassa'dan örnek alınan bir bağdan genel bir görünüm.	20
Şekil 4.2.	A, B: Omcalarda genel kızarma görünümleri, C: Yapraklarda içe doğru kıvrılma ve damarların yeşil kalması; D: Yapraklarda içe doğru kıvrılma, kızarma ve damarlarda kızarıklık, E, F: Yapraklarda kızarma ve kıvrılma olmaksızın damarların yeşil kalması.	21
Şekil 4.3.	A, B: Yapraklarda bölgesel kızarıklıklar ve beneklenme, C, D: Yaprak damar aralarında kızarma ve damarların yeşil kalması, E, F: Yapraklarda kızarma ve kıvrılma	22
Şekil 4.4.	Bağ sürgünlerinin LiCl yöntemi ile izole edilen RNA'ların spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçüm sonuçları.....	25
Şekil 4.5.	Bağ sürgünlerinin ticari kit (Qigen Sci-Almanya) kullanılarak izole edilen RNA'ların spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçüm sonuçları	25
Şekil 4.6.	GLRaV-1, -3, -5, -9, GVA ve GVB ile enfekteli bağ dokularının kullanıldığı RT-PCR sistemi kurma çalışmaları	26
Şekil 4.7.	GLRaV-5, -6, -9, GVB ve GVD ile enfekteli bağ dokularının kullanıldığı RT-PCR sistemi kurma çalışmaları. M: marker.....	27
Şekil 4.8.	GLRaV-1 açısından teslenen bazı bağ örneklerinin RT-PCR ile elde edilen jel görüntüleri. M: Marker	28
Şekil 4.9.	GLRaV-3 ve GVA açısından teslenen bazı bağ örneklerinin RT-PCR ile elde edilen jel görüntüleri. M: Marker +C: Pozitif kontrol W: Su	28
Şekil 4.10.	GLRaV-6 açısından teslenen bazı bağ örneklerinin RT-PCR ile elde edilen jel görüntüleri. M: Marker	29
Şekil 4.11.	GVD ve GVB açısından teslenen bazı bağ örneklerinin RT-PCR ile elde edilen jel görüntüleri. M: Marker +C: Pozitif kontrol W: Su	29
Şekil 4.12.	Bağ sürgünlerinden izole edilen DNA'ların spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçüm sonuçları	30
Şekil 4.13.	Grapevine red blotch associated virus'nün PCR analizleri için kullanılan bitki ekstraktlarının seyreltme oranları ve 1063 bp büyüklüğündeki ampliconların görünümü. (P) 1/40: 1/40 oranında seyreltilmiş plazmid; P: Seyreltilmemiş plazmid	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Türkiye'nin son beş yıldaki toplam bağ alanları ve yıllık üretimi	1
Çizelge 3.1.	Bağlarda enfeksiyon yapan virüslerin PCR analizlerinde kullanılan primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri.....	18
Çizelge 4.1.	GLRaV grubu virüslerle GVA ve GVB 'ye karşı testlenen bitki örneklerinin ELISA testi ile saptanan enfeksiyon oranları	23
Çizelge 4.2.	GLRaV grubu virüslerle GVA ve GVB 'ye karşı testlenen bitki örneklerinin ELISA testi ile saptanan karışık enfeksiyon oranları	23
Çizelge 4.3.	Hatay ve Gaziantep illerinden toplanan bitki örneklerinin GLRaV-1, -3, -5, -6, -9, GVA, GVB ve GVD'nin RT-PCR analizleri ile saptanan enfeksiyon oranları	27

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

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

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ArMV	: <i>Arabis mosaic virus</i>
BME	: β-mercaptoethanol
cDNA	: Komplementer DNA
CMV	: Cucumber mosaic virus
CTAB	: Cetyl Trimethylammonium Bromide
d ₂ H ₂ O	: Çift distile su
DAS-ELISA	: Double Antibody Sandwich – Enzym Linked Immunosorbent Assay
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asid
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	: Enzym Linked Immunosorbent Assay
EtBr	: Ethidium Bromid
ETOH	: Ethanol
GCMV	: <i>Grapevine chrome mosaic virus</i>
GFkV	: <i>Grapevine fleck virüs</i>
GFLV	: <i>Grapevine fan leaf virus</i>
GLRaV	: <i>Grapevine Leafroll associated Virus</i>
GRBaV	: <i>Grapevine Red Blotch associated Virus</i>
GRSPaV	: <i>Grapevine rupestris stem pitting associated virus</i>
GVA	: <i>Grapevine Virus A</i>
GVB	: <i>Grapevine Virus B</i>

GVD	: <i>Grapevine virüs D</i>
GVE	: <i>Grapevine virüs E</i>
IgG	: Immunogamma Globulinler
KOAc	: Potasyum Asetat
LiCl	: Lityum klorür
M.Ö	: Milattan Önce
NaCl	: Sodyum klorür
NaI	: Sodyum iyodür
OD	: Optik Densite
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RNA	: Ribonükleik Asit
RNase	: Ribonükleaz
rpm	: Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
RT	: Revers Transcription
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SLRSV	: <i>Strawberry latent ringspot virus</i>
TAE	: Tris asetat EDTA
TBRV	: <i>Tomato black ring virus</i>
TE	: Tris EDTA
ToRSV	: <i>Tomato ringspot virus</i>
TRSV	: <i>Tobacco ringspot virus</i>
UV	: Ultraviyole
V	: Volt

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. 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).

Kültür asmasının anavatanı olarak tanımlanan ülkemizde bağcılık önemli bir tarım kolu durumundadır. TÜİK istatistiklerine göre üzüm üretimi açısından ülkemizin son beş yıllık üretimi incelendiğinde 2014 yılında ülkemiz bağ alanlarında ve üretimde gerilemenin olduğu gözlenmektedir (Çizelge 1.1.) (Anonim, 2015). Bu çalışma kapsamında örnekleme yapılan Hatay ilinde 51.598 dekar ekili bağ alanı bulunmakta olup yıllık üretim 57.638 ton iken Gaziantep'te 165.001 dekar ekili bağ alanı bulunmaktadır ve 95.508 ton üretim ile bu iki il ülkemiz bağcılığına önemli katkı sağlamaktadır. (Anonim, 2014).

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

Yıllar	Alan (da)	Üretim (ton)
2010	4,777.856	4,255.000
2011	4,725.454	4,269.351
2012	4,622.959	4,275.659
2013	4,687.922	4,011.409
2014	4,670.929	4,175.356

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 60 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.

A) Enfektiyöz dejenerasyon ve ani ölümler

Bu gruba giren hastalıklara *Nepovirus* cinsine giren virüsler neden olmaktadır. Avrupa'da nepovirüslerin neden olduğu görünüm "yelpaze yaprak hastalığı" olarak adlandırılırken A.B.D'de "asma ani ölümü" olarak adlandırılmaktadır (Martelli ve Boudon-Padieu, 2006). Avrupa nepovirüsleri (*Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Tomato black ring virus* (TBRV), *Grapevine chrome mosaic virus* (GCMV)) genellikle şekil ve renk bozukluğu yapan ırklardır. Amerika nepovirüsleri ise (*Tomato ringspot virus* (ToRSV) ve *Tobacco ringspot virus* (TRSV)) gelişme geriliği, yaprak ve odun dokusunda şekil bozulmaları, verim azalması ve ani ölümlere neden olan ırklardır.

B) Yaprak kıvrıcılığı

Asmaların en yaygın virüs hastalığıdır (Martelli ve Boudon-Padieu, 2006). Kırmızı meyveli üzüm çeşitlerinde yapraklarda yaz ayı sonlarında başlayan kırmızı lekeler en tipik belirtilerdir. Bu lekeler zamanla tüm yaprağı kaplar ve yaprak damarları yeşil kalır. Yaprak ayası kırılmanlaşır ve aşağı doğru kıvrılır. Şiddetli enfeksiyonlarda tüm yaprak yüzeyi koyu bordo bir renk alır. Enfekteli omcalarda vejetasyon gecikir ve tane oluşumunda düzensizlikler gözlenerek 2-3 haftalık gecikmeler yaşanabilir. Tanelerde şeker içeriği %30 oranında düşebilir ve antosiyanin, fenolik içeriği değiştiğinden şaraplık üzüm kalitesinde de önemli ölçüde azalmalar meydana gelir.

Beyaz çeşitlerde yapraklarda kızarma yerine klorotik lekeler gözlenir. Bu hastalık grubunun etmenleri *Closteroviridae* familyasına bağlı closterovirüsler ile ampelovirüslerdir. Bu cinslere ait bugüne değin 11 virüs saptanmıştır (*Grapevine leafroll associated virus* 1-11), bunlardan dört tanesinin (GLRaV-1, -2, -3 ve -7) hastalık etmeni olduğu deneysel olarak da kanıtlanmıştır. Son yıllarda GLRaV-Pr ve –De olarak adlandırılan iki virüs de Gen bankasına GLRaV-10 ve -11 olarak kaydedilmiş ve bu familya içindeki toplam virüs sayısı 9’dan 11’e çıkmıştır (Maliogka ve ark., 2008, 2009). *Closteroviridae* familyasına giren bu virüslerden sadece GLRaV-2 *Closterovirus* cinsine dahil edilmiş olup diğerlerinin hepsi *Ampelovirus* cinsi içinde yer almaktadır. GLRaV-2’nin izolat sayısı çok geniştir ve farklı semptomlara neden olur (orta düzeyde yaprak kıvrılması, aşı noktasında uyumsuzluklar ve çoğunlukla da semptomsuz) (Martelli ve Boudon-Padieu, 2006). Hastalığın uzun mesafelere taşınması enfekteli üretim materyalleri ile olmakla birlikte kısa mesafeli taşınmalarda pseudococcid (*Helicoccus*, *Phenacoccus*, *Pseudococcus* ve *Planococcus*) ile coccid (*Pulvinaria*, *Nepulvinaria*, *Parthenolecanium*, *Coccus*, *Parassaissetia*, *Saissetia* ve *Ceroplastes*) unlu bitler semipersistent taşınmadan sorumlu olmaktadır (Martelli ve ark., 1997; Mahfoudhi ve Dhouibi , 2009).

C) Odun deformasyonları (Rugose wood)

Bu hastalıkta enfekteli omcalarda gelişme geriliği, ilkbaharda gözlerin uyanmasında gecikmeler, geriye doğru veya bazı durumlarda ani ölümler gözlenir. Aşılı omcalarda aşı noktasının üzerinde şişkinlikler ve mantarimsı kabuk dokusu ile birlikte odun tabakasında çıkıntı ve çukurlaşmalar gözlenir. Bu deformasyonlar sadece kalemede, sadece anaçta veya her ikisinde birlikte görülebilir. Bu hastalıktan kaynaklı verim azalmaları %15-55 arasında olduğu bildirilmiştir (Walter ve Martelli, 1997). Bu hastalık kompleksi dört ayrı isimle anılmaktadır: Rupestris gövde çukurlaşması, mantarimsı kabuk, LN33 gövde oluklaşması ve Kober gövde oluklaşması (Martelli, 1993; Martelli ve Boudon-Padieu, 2006). Rupestris gövde çukurlaşması en yaygın görüldür ve etmeni *Foveavirus* cinsine bağlı *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* (GRSPaV) olarak adlandırılmıştır (Martelli ve Jelkmann, 1998). Vektörü henüz bilinmemektedir. Kober gövde oluklaşması hastalığına *Grapevine virüs A* (GVA), mantarimsı kabuk hastalığına ise *Grapevine virüs B* (GVB) neden olmaktadır. Her iki virüs de *Vitivirus* cinsine aittir ve semipersistent olarak unlu bitlerle

taşınmaktadır. Aynı cinse dahil edilen ve unlu bitlerle taşınan yeni bir virüs Japonya'dan bildirilmiş ve *Grapevine virüs E* (GVE) olarak adlandırılmıştır (Nakaune ve ark., 2008). Bu grupta yer alan LN33 gövde oluklaşması hastalığı ile ilgili çok az bilgi mevcuttur ve sadece üretim materyalleri ile yayıldığı bilinmektedir.

D) Beneklenme

Grapevine fleck virus (GFkV) beneklenme hastalığının ana etmenidir ve mekanik olarak taşınmamaktadır. Birçok Avrupa üzüm çeşidinde ve Amerikan asma anaçlarında symptom oluşturmazken *Vitis rupestris*'lerde damar açılmaları ve damar aralarında beneklenme oluşturmaktadır. Şiddetli enfeksiyonlarda yapraklarda kıvrılma ve bükülmeler ile bodurlaşma görülmektedir (Walter ve Martelli, 1997). Latent bir hastalık olduğu için dünyada bağ yetiştiriciliği yapılan tüm önemli bölgelerde oldukça yaygındır (Martelli, 2010).

Bu hastalık gruplarından bir çoğu ülkemizin farklı bölgelerinde tespit edilmiştir (Tekinel ve ark., 1971; Azeri, 1983; Martelli, 1987; Özaslan ve Yılmaz, 1995; Çağlayan, 1997; Yılmaz ve ark., 1997; Akbaş ve Erdiller, 1998; Köklü ve ark., 1998; Çığsar ve ark. 2002; Akbaş ve ark. 2007). Ancak bu çalışmaların çoğunluğu Trakya, Ege, İç Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yapılmış olup virüs tanıları da biyolojik ve serolojik yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Bağlarda moleküler yöntemler kullanılarak yapılan tanı çalışmaları son yıllarda başlamış olup (Buzkan ve ark., 2010; Kaya ve ark., 2012) Hatay ve Gaziantep illeri bağlarında virüs tespit çalışmalarında bugüne kadar moleküler yöntemlerle virüs tanısı yapılmamıştır.

Bu çalışmanın temel amaçları:

- 1- Hatay ve Gaziantep illerindeki bağ alanlarında *Closteroviridae* familyasına ait virüslerden *Grapevine leafroll associated virus 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 9* (GLRaV-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9) ile özellikle odun dokusunda deformasyonlara neden olan *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB) ve *Grapevine virus D* (GVD)'nin DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemleriyle saptanması.
- 2- Ülkemizde hiç çalışma bulunmayan ve son yıllarda A.B.D'den bildirilen bir DNA virüsü olan "*Grapevine Red blotch associated virüs*" (GRBaV)'ün PCR analizleri ile saptanmasıdır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Üzümeri (1947), Türkiye’de ilk olarak 1947 yılında etmenleri açıklığa kavuşmamış virüslerin neden olduğu ve “sararma ve kısa boğum” olarak ifade edilen belirtileri “Asma Hastalıkları” isimli yayınında rapor etmiştir. Akdoğan (1956) Tekirdağ-Mürefte bölgesi bağlarında önceleri fizyolojik bozukluk olarak nitelenen bulaşık soysuzlaşma belirtilerine, daha sonra bir virüsün neden olduğunu bildirmiştir. Ardından 1960 yılında “Bulaşık soysuzlaşma (enfektiyöz dejenerasyon) etmeninden ari Amerikan asma anaçları kaynağının kurulması “isimli proje başlatılmış ve Manisa ile Çanakkale’nin bağ alanlarında endovasküler klonlar arasından klonal seleksiyonları yapılmıştır (Kespütlü ve Saydam, 1972). Bu istasyonlar 1967 yılında Amerikalı araştırmacı W.B. Hewitt tarafından ziyaret edilerek Kober 5BB klonları haricinde diğer materyallerin tamamının virüsle bulaşık olduğu saptanmış ve bu klonların tekrar testlenmesi önerisinde bulunulmuştur (Hewitt, 1968). Tekinel ve ark. (1971)’nin yaptıkları bir çalışmada, biyolojik indeksleme ile Burdur Siyahı, Dimriti, Azezi, Dımışkı ve İzmir çekirdeksizi çeşitlerinde enfektif dejenerasyon, Kilis bağlarında Alicante Bouschet çeşidinde yaprak kıvrıcıklığı ve damar bantlaşması, Mersin’de Royal Terhey’den çeşidinde enasyon, İzmir çekirdeksiz üzüm çeşidinde asma kısa boğum virüsü ve damar bantlaşması hastalıkları rapor edilmiştir.

Martelli (1987)’nin Türkiye’de yapmış olduğu simptomatolojik gözlemlerde kısa boğum, yaprak kıvrıcıklığı, mantarimsı odun, beneklenme virüs hastalıklarının olduğu bildirilmiştir. Gaziantep yöresinde bulunan bağlarda Çilek latent halkalı leke virüsü (*Strawberry latent ringspot virüs* (SLRSV)) Alicante Bouchet çeşidine mekanik olarak inokule edilerek saptanmış ve etmenin karakterizasyonu yapılmıştır (Savino ve ark., 1987).

Özaslan ve Yılmaz (1995)’in Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi bağlarında biyolojik ve serolojik yöntemleri kullanarak yaptıkları survey çalışmasında toplanan örneklerde *Grapevine fan leaf virus* (GFLV)’nin en yaygın virüs olduğunu (%24) ve bunu *Grapevine leaf roll associated virus-3* (GLRaV-3) (%17.5), GLRaV-1 (%12.5), *Grapevine fleck virus* (GFkV) (%7.5) ve *Arabis mosaic virus* (ArMV)’ün (%6.5) takip ettiğini ortaya koymuşlardır. Yılmaz ve ark. (1997)’nin Türkiye’nin çeşitli bölgelerinden topladıkları toplam 84 örnekte ELISA testiyle GLRaV-1, GLRaV-3 ve

GLRaV-7 nin varlığını ve yaygınlığını saptamışlardır. Hatay yöresi bağlarında DAS-ELISA yöntemi kullanılarak yapılan bir çalışmada ise bağlarda en yaygın virüs hastalığı etmeninin GVA olduğu ve genellikle etmenin yaprak kıvrıcıklığı ile beraber bulunduğu rapor edilmiştir (Çağlayan, 1997).

Köklü ve ark., (1998) Trakya Bölgesi Bağlarında şaraplık çeşitlerde GFLV'nin yaygınlığının belirlenmesi üzerine yaptıkları bir araştırmada DAS-ELISA testleri sonucunda daha önceden asma kısa boğum hastalığının karakteristik semptomlarını gösterdiği belirlenen örneklerde Tekirdağ Merkez ilçede %6.6 Şarköy'de %12.5 ve Uzunköprü ilçesinde %3.3 oranında yaygın olduğunu saptamışlardır.

Köklü (1998), enfekteli *Nicotiana benthamiana* yaprağı ve bağ floem dokularını kullanarak GLRaV-2 antiserumu üretilmesi üzerine çalışmış ve virüsün saptanmasında daha güvenilir sonuçları DAS-ELISA'ya kıyasla DAS-ELISA'dan elde etmiştir. Başka bir çalışmada ise DAS-ELISA yöntemi ile GVA, GVB, GFkV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6, GLRaV-7 ve GFLV ile bunlara ek olarak 2 örnekte ise *Cucumber mosaic virus* (CMV) belirlenmiştir (Köklü ve ark., 1999). Araştırmacılar 1997 yılının yaz sonu sonbahar başında yaptıkları survey çalışmasında virüslerin saptanması amacıyla mekanik inokulasyonlar ve serolojik testler gerçekleştirilmişlerdir. Test edilen 165 örnekten 153'ü (%92.7) en az bir virüs ile enfekteli bulunmuş, iki veya daha fazla virüs ile enfeksiyon yaygın durumda belirlenmiştir (%75). Clostero- ve vitivirüsler tüm test edilen alanlarda belirlenmiştir. En yaygın virüs GVA olarak saptanmış (%52.1) ve Şarköy'deki bağlarda bu virüs ile bulaşıklık oranı ise %68.1 olarak tespit edilmiştir. GVA'nın en yaygın bulunduğu çeşitler ise Cardinal (%100) ve Yapıncak (%88.2) olarak belirlenmiştir. Bölgede GFLV, GVA, GVB, GFkV, GLRaV-1 GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6, ve GLRaV-7'nin yaygınlık durumu ortaya konulmuştur.

Köklü ve Baloğlu (2000) Trakya bölgesinde bazı üzüm çeşitlerinde asma yaprak kıvrılma virüslerinin yaygınlığının belirlenmesi amacıyla 1997 ve 1998 yıllarında yaptıkları survey çalışmasında ELISA testlerinde toplam olarak 421 örneği GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3 ve GLRaV-7 açısından değerlendirmişler ve bunlardan 268'inin asma yaprak kıvrılması ile ilişkili virüslerle enfekteli olduğunu bulmuşlardır. Sonuç olarak en yaygın bulunan virüs GLRaV-1 (%37.05) olarak saptanmış ve bunu sırasıyla GLRaV-3 (%33.01), GLRaV-2 (%7.83) ve GLRaV-7 (%4.03)'nin izlediği belirlenmiştir. Daha sonra GLRaV-3'ü bitki dokusundan saflaştırarak antiserum üretme

alışmaları yapmışlar, aynı zamanda dsRNA analiz çalışmalarını yürütmüşlerdir (Köklü ve Baloğlu, 2001a ve 2001 b).

Bağ virüsleri için ülkemizde yapılan en geniş survey çalışmalarından birisinde tamamen eski ve yerli çeşitlerin yetiştirildiği, yabancı asma materyallerinin hiç girmediği yörelerdeki bağlarımızda dahi değişik virüs hastalıkları bulunmuştur. Digiario ve ark. (2000)'nın Güneydoğu Anadolu ve Orta Anadolu'nun başlıca bağ alanlarında yaptığı araştırmada, GVA'nın en yaygın virüs olduğunu ve bunu GLRaV-1, GFLV ve GFkV'nin takip ettiği ortaya koyulmuştur. Bunun yanısıra GLRaV-2, -3 ve -6' nın da diğerlerine kıyasla daha az yaygın olmakla birlikte mevcut olduğu tespit edilmiştir. Araştırmalar yaprak kıvrıcıklığı simptomlarının çoğunlukla şanlıurfa, Adıyaman, Elazığ bağlarında Amerikan asma anaçları üzerine aşılı kırmızı çeşitlerde (Antep Karası, Humusi, Khn, ve Siyah Kabarcık) ve Nevşehir'deki bağlarda yaygın olduğunu göstermektedir. Asma mantarımışı odun hastalığı (Corky bark) simptomları Adıyaman'daki aşılı bağlarda yaygın olarak gözlenirken Kapadokya'daki aşısız bağlarda bulunmamıştır (ığsar ve ark., 2002). Sarpkaya ve ark. (2004)'nın Gaziantep ili ve ilçelerinde yaptıkları survey çalışmalarında, bağlardan alınan örneklerin %30'u GLRaV-3 ile enfekteli olarak saptanırken, bunu GFLV (%24), ArMV (%15) ve GLRaV-1 (%10) enfeksiyonları izlemiştir.

Türkiye'de de rapor edilen bu virüsler içerisinde asma mantarımışı odun hastalığına neden olan GVA, GVB (*Vitivirus*) ve asmanın floeminde lokalize olan, ipliksi partiküllere sahip, yaprak kıvrıcıklığı simptomlarıyla ilişkili dokuz adet virüsten GLRaV-1 ve -3 tipleri Avrupa ve Akdeniz'e kıyısı bulunan birçok ülkede yaygın şekilde tespit edilmiştir (Martelli, 1986). Yaprak kıvrıcıklığına neden olan virüslerle, mantarımışı odun görünümüyle ilişkili olan virüslerin taşınmasında Hemiptera takımından *Pseudococcidae* ve *Coccidae* familyasında yer alan böcekler etkilidir. Unlubitler GVA ve GVB (Rosciglione ve Castellano, 1985; Engelbrecht ve Kasdorf, 1990; Garau ve ark., 1995) ile GLRaV-3 (Petersen ve Charles, 1997), GLRaV-5 (Golino ve ark., 2002) ve GLRaV-1'in (Scorza ve ark., 2003) bilinen en yaygın vektörleridir. Bu vektörler, virüsleri asmadan asmaya (Tanne ve ark., 1989; Belli ve ark., 1994), ve otsu konuklara (Rosciglione ve Castellano, 1985; Garau ve ark., 1995) başarıyla taşıyabilmiştir.

Çığsar ve ark. (2002)'nin Güneydoğu ve Orta Anadolu bağlarında yaptıkları detaylı bir survey çalışmasında ELISA yöntemini kullanmışlar ve GVA'nın en yaygın virüs olduğu (%42.4), ve bunu sırasıyla GLRaV-1 (%38.5), GFLV (%10.7) ve GFkV (%7.1)'nin izlediği bildirilmiştir. Sürpriz bir şekilde GLRaV-3'ün daha az yaygın olduğu (%2.4) ve diğer testlenen virüslerin de (GLRaV-2, GLRaV-6, GVB, ArMV) %1'den daha düşük oranda bulunduğunu saptamışlardır.

Akbaş ve ark., (2007) Orta Anadolu Bölgesi bağlarında ELISA yöntemini kullanarak yaptıkları survey çalışmasında 622 adet örneği GLRaV -1, -2, -3 ve -7 için testlemişler ve 95 örneğin en az bir virüs ile enfekteli olduğunu bulmuşlardır. En yaygın virüsün GLRaV-1 (%8.36) olduğunu ve bunu sırasıyla %5.78 ile GLRaV-3, %3.86 ile GLRaV-7 ve %2.41 ile GLRaV-2'nin izlediğini bildirmişlerdir.

GLRaV-3'ün bir unlu bit türü olan *Planococcus citri* ile deneysel olarak enfekteli bağlardan sağlıklı olanlara taşınabilme durumun araştırıldığı bir çalışmada, *P. citri* nimflerinin bu virüsü %35, erginlerin ise %13 oranında taşıdığı saptanmıştır (Sertkaya ve ark., 2008).

Ülkemizde son yıllarda survey çalışmalarında moleküler yöntemler kullanılmaya başlamış ve Buzkan ve ark. (2010), Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yaptıkları bir çalışmada GLRaV-5 virüsünü hem bağlarda hem de aday vektör unlu bitlerde RT-PCR analizleri ile tespit etmişlerdir.

Kaya ve Erilmez (2012)'in 2009-2011 yılları arasında İzmir ve Manisa illerinde yaptıkları bir survey çalışmasında ise 145 örnekten 5 tanesinde hem DAS-ELISA hem de RT-PCR yöntemi ile GLRV-4 virüsü tespit edilmiştir.

Önder ve Gümüş (2014)'ün Ege Bölgesi bağlarında yaptıkları bir başka çalışmada ise Manisa, Denizli, Uşak ve Aydın illerinden toplanan toplam 424 örnek Real time RT-PCR yöntemi ile testlenmiş ve 322 örnekte GLRaV-8, 71 örnekte GLRaV-Pr, 51 örnekte GLRaV-De 4 örnekte GLRaV-9 virüslerini saptamışlardır. Bu çalışma ile bu 4 virüsün ülkemizde varlığı ilk kez bildirilmiştir.

Bağ alanlarında son yıllarda bazı yeni virüs hastalıkları da tanımlanmıştır ve bunlardan bir tanesi de A.B.D.'de saptanmış olan *Grapevine red blotch-associated virus*'dur (GRBaV) (Al Rwahnih ve ark., 2013). Özellikle kırmızı üzüm çeşitlerinde “yaprak kıvrılma” hastalığına benzer şekilde belirti gösteren ancak yaprak kenarlarında kırmızı lekeler ve yaprak damarlarının pembe renk alması gibi belirtilerle farklılık

gösteren örneklerin “deep sequencing” yöntemi ile analizleri sonucu bir DNA virüsü olduğu tespit edilen GRBaV bağlarda yeni bir virüs olarak tanımlanmıştır.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Arazi Çalışmaları ve Örnekleme:

Arazi çalışmaları Hatay (Hassa ve Kırıkhan) ve Gaziantep (Nizip) illerinde yoğun olarak bağcılığın yapıldığı ilçelerde sofralık ve şaraplık çeşitlerde yapılmıştır. Örnekler toplanırken her ilin Tarım İl Müdürlükleri ile irtibata geçilerek TÜİK ve Çiftçi Kayıt Sistemi verilerinden yararlanılmıştır. Buna göre Hatay ilinden toplam 107 Gaziantep ilinden ise 46 örnek toplanmıştır. Simptomolojik gözlemler 2013 yılının Nisan-Aralık aylarında yapılmış ve çeşitlere göre belirtiler kaydedilmiştir. Örnekler kayıt altına alınarak simptomolojik açıdan karakteristik olanlar numaralandırılarak fotoğraflanmıştır. Sonbahar-kış döneminde belirti gösteren omcaların farklı yerlerinden 20-30 cm uzunluğunda sürgünler toplanarak uygun koşullarda laboratuvara getirilmiş ve testleninceye kadar +4 °C’de saklanmıştır.

3.2. Serolojik Çalışmalar

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

Bitki Özsularının Hazırlanması

Simptomlu örneklerden 1 gr olacak şekilde yaprak ve/veya sürgünlerin kambyal dokusundan hazırlanan örnekler ezme tamponu (Ek 1) ile özel torbalarda ezilerek 1,5 ml’lik tüplere alınmıştır.

ELISA Testinin Uygulanması ve Sonuçların Değerlendirilmesi

DAS-ELISA testlerinde GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV 4-9, GLRaV-6, GLRaV-7 ve GVA belirteçleri (IgG ve konjugat) Bioreba-İsviçre’den, GLRaV-5 belirteçleri Neogen-İngiltere’den, GVB belirteçleri ise Sediag-Fransa’dan temin edilmiştir. Her virüs için firmaların protokollerinde belirtilmiş olan sulandırma oranları dikkate alınmıştır. Bütün virüsler için ELISA testleri Clark ve Adams (1997)’a göre aşağıdaki şekilde yürütülmüştür:

- Kaplama tamponu kullanılarak optimum konsantrasyona göre sulandırılmış IgG'ler, ELISA plakalarının her bir çukuruna 100'er µl olacak şekilde eklenmiş ve plakaların üzeri kapatılarak nemli bir ortamda 37 °C de 4 saat inkübe edilmiştir.
- İnkübasyondan sonra yıkama tamponu ile tüm çukurlar en az üç kez yıkanmıştır. Yıkama tamponu üç dakika süreyle çukurlarda bekletildikten sonra ters çevrilerek plaka boşaltılmış ve kâğıt havlu üzerine vurmak suretiyle kurutulmuştur.
- Alt alta gelecek şekilde her iki çukura hazırlanan bitki öz suyundan 100'er µl önceden düzenlenen ELISA planına göre eklenmiş ve plakanın üzeri kapatılarak +4 °C de bir gece boyunca inkübe edilmiştir.
- İnkübasyondan sonra plakalar çukurlar arası karışma olmayacak şekilde 3 kez aynı şekilde yıkanıp kurutulmuştur.
- Enzimle işaretli IgG (konjugat) uygun şekilde hazırlanarak her bir çukura 100'er µl konulmuş ve plakalar +37 °C de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyondan sonra yıkama tamponu ile tüm çukurlar aynı şekilde üç kez yıkanmıştır.
- Substrat olarak 1 mg/ml p-nitrophenyl phosphate kullanılmış ve her bir çukura 100'er µl konularak 30-60 dk veya gerekli görüldüğünde daha uzun süre oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir.
- Sonuçlar hem görsel olarak hemde ELISA okuyucusunda 405 nm filtre kullanılarak değerlendirilmiştir. Buna göre negatif örneklerin optik densite (OD) ortalamalarının 2 katı ve daha üzerindeki değerleri veren örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir.

3.3. Moleküller Çalışmalar

3.3.1. Bağ Örneklerinden Toplam Nükleik Asit İzolasyonu (TNA)

Bağlardan toplanan örneklerden toplam nükleik asit (RNA) izolasyonu için Foissac ve ark. (2005)'nin protokolü, LiCl yöntemi (Spiegel ve ark., 1996), Qiagen

RNA ekstraksiyon kiti firma önerisine göre ve MacKenzie ve ark (1997)'nın önerdiği modifiye yönteme göre kullanılmıştır. GRBaV'nin bir DNA virüsü olması nedeniyle aynı örneklerden DNA izolasyonu ise Prince ve ark. (1993)'na göre yapılmıştır. Nükleik asit izolasyonları için vejetasyon döneminde yapraklar, kış döneminde ise sürgünlerin kambiyal dokusundan hazırlanan 0.1 gr bitki dokusu kullanılmıştır. İzole edilen nükleik asitler nanodrop spektrofotometre (Thermo Sci. A.B.D) ile ölçülerek kaliteli ve saf nükleik asitler RT-PCR ve PCR analizlerinde kullanılmaya kadar -80  C'de saklanmıştır.

3.3.1.1. LiCl Yöntemi ile RNA Ekstraksiyonu

- Simptomlu yapraklardan ve/veya kambiyal dokudan 1 gr örnek alınarak sıvı azot ile ezildikten sonra ezilen dokudan 0.1 gr örnek alınıp üzerine 2 ml RNA LiCl tamponu +  -mercaptoethanol(BME) karışımı eklenmiş ve iyice karıştırılarak tüplere alınmıştır.(1 ml LiCl tamponu için 2  l BME eklenir.)
- 65  C'de 15 dakika bekletilmiş ve üzerine eşit hacimde 500  l Potasyum asetat eklenmiştir.
- Karışım elle karıştırıldıktan sonra vortex karıştırıcı ile homojen hale gelmesi sağlanmıştır. 15 dakika buz üzerinde bekletilerek 10 dakika 15 000 rpm de santrifüj edilmiştir.
- 650  l üst faz yeni tüplere aktarılıp üzerine eşit hacimde izopropanol eklenip yavaşça karıştırılmıştır.
- -20  C de 1 saat bekletilmiş ve daha sonra 10 dakika 15 000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- Üst faz d k lerek çökelti 500  l %70'lik soğuk Ethanol   zeltisi ile yıkanmış ve oda sıcaklığında 5 veya 10 dakika bekletilerek kurutulmuştur.
-   kelti, 50  l steril saf su ile sulandırılmış ve RNA'lar -80  C'de saklanmıştır.

3.3.1.2. Silica Capture Yöntemi ile RNA Ekstraksiyonu

- Simptomlu yaprak ve/veya kambiyal dokusundan 0.3 gr alınıp sıvı azotla ezildikten sonra 3 ml “Silica capture ezme tamponu” ile ezilmiştir.
- Ezilen sıvıdan 500 µl ependorf tüpe alınıp üzerine 100 µl %10 N-lauryl sarcosyl ve 5 µl 2-mercaptoethanol eklenir yavaşça karıştırılmıştır. 70 °C’de ara ara karıştırılarak on dakika bekletilmiştir
- Karışım 13.000 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
- Yeni ependorf tüplere santrifüj edilen karışımın üst fazından 300 µl alınıp üzerine 150 µl %96 lık ETOH ve 300 µl 6M NaI ve 25 µl resüspense edilmiş silica eklenmiştir.
- 10 dakika oda sıcaklığında ara ara yavaşça karıştırılarak bekletilmiştir.
- 1 dakika 6.000 rpm de santrifüj edilip üst fazı dökülmüştür.
- Çökelti 500 µl yıkama tamponu ile çözündürülmüş ve 1 dakika 6.000 rpm de santrifüj edilerek üst faz dökülmüştür. İşlem bir kez daha tekrar edilmiştir.
- Çökelti birkaç dakika oda sıcaklığında bekletilerek kurutulmuştur.
- Çökelti üzerine 150 µl steril su eklenerek çözündürülmüş ve 70 °C de 5 dakika bekletilmiştir.
- 13.000 rpm de 3 dakika santrifüj edilmiş üst fazından 130 µl alınarak yeni tüplere aktarılıp -80 °C de saklanmıştır.

3.3.1.3. Qiagen RNA Ekstraksiyon Kiti ile RNA İzolasyonu

- Örnekler sıvı azot ile ezildikten sonra ezilen dokudan 0.1 gr alınıp 1.5 ml’lik ependorf tüplere aktarılmıştır.
- Tüplerin üzerine β-mercaptoethanol eklenmiş olan RLT tamponundan 450 µl eklenerek karıştırılmıştır. Karışım mor renkli kolonlara aktarılıp 15.000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- Bitki artıklarının toplandığı kolon atılmış ve alt kısımda toplama tüpünde biriken 400 µl sıvı faz alınarak yeni 1.5 ml’lik ependorf tüplere alınıp üzerine 200 µl %96’lık ethanol eklenmiştir.

- Karışım pembe kolonlara alınarak 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiş ve kolonun alt kısmında toplama tüpünde biriken sıvı dökülüp kolon tekrar aynı tüp içine yerleştirilmiştir.
- Kolona 700 µl RW1 tamponu eklenip 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
- Kolonun alt kısmındaki toplama tüpünde toplanan sıvı dökülüp kolon yine aynı tüpe yerleştirilmiştir.
- Kolona 500 µl RPE tamponu eklenip 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
- Önceki iki aşama tekrar edilmiştir.
- Kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirilip 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek bütün sıvı uzaklaştırılmıştır.
- Toplama tüpü atılıp kolon yeni 1.5 ml'lik ependorf tüplere yerleştirilmiştir.
- Kolona 50 µl RNase içermeyen su eklenip 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve 50 µl RNA solüsyonu -80 °C'de saklanmıştır.

3.3.1.4. Qiagen RNA Ekstraksiyon Kiti ile Modifiye RNA İzolasyonu

- 0.1 gr bitki örneği üzerine 1ml ezme tamponu eklenip iyice ezilmiştir.
- Özsu tüplere aktarılıp üzerine % 20'lik 100 µl Sarkosyl eklenmiştir.
- 70 °C'de 10 dk inkübe edilmiştir.
- Karışım mor renkli kolonlara aktarılıp 15.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- Bitki artıklarının toplandığı kolon atılıp alt kısımda toplama tüpünde biriken 400 µl sıvı faz alınarak yeni 1.5 ml'lik ependorf tüplere alınmış üzerine 200 µl %96'lık ethanol eklenmiştir.
- Karışım pembe kolonlara alınıp 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
- Kolonun alt kısmında toplama tüpünde biriken sıvı dökülüp, kolon tekrar aynı tüp içine yerleştirilmiştir.
- Kolona 700 µl RW1 tamponu eklenmiş ve ≥ 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilip sıvı kısım atılmıştır.

- Pembe kolona 500 µl RPE tamponu eklenmiş ve ≥ 10.000 rpm'de 15 sn santrifüj edilip sıvı kısım atılmıştır.
- Kolona 500 µl RPE tamponu eklenip ≥ 10.000 rpm'de 2dk santrifüj edilmiştir
- Toplama tüpü atılıp kolon yeni 1.5 ml'lik ependorf tüplere yerleştirilmiştir.
- Kolona 40 µl RNase içermeyen su eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dk bekletildikten sonra ≥ 10.000 rpm'de 1dk santrifüj edilmiştir.
- Kolon atılıp ependorf tüpler içinde biriken 40 µl RNA solüsyonu -80°C 'de saklanmıştır.

3.3.1.5. DNA İzolasyonu (Prince ve ark., 1993)

- 1 gr taze ya da kurutulmuş bitki dokusu havanlar içerisinde sıvı azotta ezilmiştir.
- 8 ml ezme tamponu eklenip dokular havanda ezildikten sonra falkon tüplere alınmıştır.
- 13.000 rpm'de 20 dk 4°C 'de santrifüj edilmiştir.
- Üst faz dikkatlice dökülüp, çökelti üzerine 4 ml ekstraksiyon tamponu ve 80 µl proteinaze K ilave edilmiştir.
- Hafifçe karıştırılıp üzerine 440 µl %10'luk Sarkosyl eklenmiştir.
- 1-2 saat 55°C 'de inkübe edilmiştir.
- 10 dk 8000 rpm'de 4°C 'de santrifüj edilip üst faz alınmıştır. Gerekli durumlarda 8000 rpm'de 15 dk tekrar santrifüj edilmiştir.
- 0,6 volume (~ 2.5 ml) isopropanol üst faza eklenip hafifçe karıştırılarak, tüpler -20°C 'de 30 dk bekletilmiş.
- 15 dk 8000 rpm'de 4°C 'de santrifüj edilip üst faz atılmıştır,
- Çökelti 3 ml TE tamponunda çözündürülüp üzerine 75 µl %20'lik SDS ve 60 µl proteinaz K ilave edilmiş ve 37°C 'de 1 saat inkübe edilmiştir.
- 525 µl 5M NaCl, 420 µl CTAB/NaCl solüsyonu ilave edilerek karıştırılmış ve 10 dk 65°C 'de inkübe edilmiştir.
- Eşit hacimde fenol chloroform/isoamyl alkol ilave edilip hafifçe karıştırılarak 8000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Gerekli durumlarda bu adım tekrarlanmıştır.

- Dikkatlice üstte oluşan sıvı faz yeni bir tüpe alınıp ve eşit hacimde chloroform/ isoamyl alkol eklenip 8000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- Sıvı faz yeni bir tüpe alınıp ve üzerine 2,5 ml isopropanol alkol eklenmiştir.
- +4 °C’de gece boyunca bekletilmiştir.
- 11000 rpm’de +4 °C’de 30 dk santrifüj edilip sıvı faz dikkatlice dökülmüş ve çökelti %70’lik soğuk ethanol ile yıkanmıştır.
- 11000 rpm’de 10 dk 4°C’de santrifüj edilmiştir.
- Çökelti kurutulup 50-100 µl TE buffer ile çözündürülmüş ve -80 °C’de saklanmıştır.

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

3.3.2.1 Reverse Transkripsiyon (RT; Reverse Transcription)

İlk aşamada, RNA’lardan cDNA elde edilmiştir. Her bir örnek için 1 µl Random hexamer primer, 6.5 µl d₂H₂O ve 5 µl RNA karışımı hazırlanmıştır. PCR cihazında 94 °C’de 5 dakika ve -20 °C’de 5 dakika bekletildikten sonra üzerine 5xRT Buffer’dan (Fermatas) 4 µl, DTT (0.1 mM)’den 2 µl dNTP(10 mM) 0.5 µl ve RT enziminden 1 µl eklenmiştir. PCR cihazında 42 °C’de 1 saat 72 °C’de 10 dakika olarak programlanmış ve cDNA aşaması tamamlanmıştır.

3.3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyon

GLRaV-1,-2,-3,-5,-6,-9 ile GVA, GVB, GVD ve GRBaV virüslerinin tespit edilmesinde kullanılan primer baz dizileri Çizelge 3.1’de verilmiştir. PCR karışımı; 16.8 µl d₂H₂O, 2.5 µl 10XB (Fermantas), 0.5 µl dNTP(10 mM), 2 µl MgCl₂(25 mM), virüse özgü 1 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl), 0.2 µl Taq-DNA polimerase (5 U/µl) ve 2 µl cDNA olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR cihazında 1 döngü 94 °C’de 5 dakika; 35 döngü 94 °C’de 30 saniye, 55 °C’de 30 saniye, 72 °C’de 1 dakika ve 1 döngü 72 °C’de 7 dakika olarak programlanmıştır.

DNA virüsü olan GRBaV’nin reaksiyonu için her bir örnekte 16.8 µl d₂H₂O, 2.5 µl 10XB(fermantas), 1.5 µl dNTP(2.5 mM), 2 µl MgCl₂ (25 mM), 0.5 µl virüse özgü

primer çifti (her biri 20 pmol/μl), 0.125 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.

Çizelge 3.1. Bağlarda enfeksiyon yapan virüslerin PCR analizlerinde kullanılan primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri

Virüs Adı	Primer Adı	Dizilim (5’-3’)	Büyük lük	Referans
<i>Grapevine leafroll associated virus 1</i> (GLRaV-1)	LQV1-H47	5’-GTT ACG GCC CTT TGT TTA TTA TGG-3’	397	Fiore ve ark., (2008)
	LEV1-C447	5’-CGA CCC CTT TAT TGT TTG AGT ATG-3’		
<i>Grapevine leafroll associated virus 2, Red Globe strain</i> (GLRaV-2RG)	RGHSP227V	5’-GCG ACT CCA GCA ACT TTA GTG A-3’	546	Rowhani ve ark., (2000)
	RGHSP777C	5’-GTC TAA CGA AAG ATC GGG TTC TAA G-3’		
<i>Grapevine leafroll associated virus 3</i> (GLRaV-3)	LC1	5’- CGC TAG GGC TGT GGA AGT ATT-3’	546	Osman ve Rowhani, (2006)
	LC2	5’- GTT GTC CCG GGT ACC AGA TAT-3’		
<i>Grapevine leafroll associated virus 5</i> (GLRaV-5)	LR5HSPV	5’- AAC ACT CTG CTT TTC TGC TGG CA-3’	272	Osman ve Rowhani, (2006)
	LR5HSPC	5’- TCT CCA GAA GAC GGA CCA ATG TAA-3’		
<i>Grapevine leafroll associated virus 6</i> (GLRaV-6) (Card)	JQ290111	5’-GGI TTI GAI TTY GGI ACI AC-3’	591	Fajardo ve ark., (2012)
	JQ290111	5’-RTC IAA IGT ICC ICC ICC RAA-3’		
<i>Grapevine leafroll associated virus 9</i> (GLRaV-9)	LR 9-F	5’- CGG CAT AAG AAA AGA TGG CAC-3’	393	Alkowni ve ark., (2004)
	LR 9-R	5’-TCA TTC ACC ACT GCT TGA AC-3’		
<i>Grapevine virus A</i> (GVA)	GVA V1	5’-GAC AAA TGG CAC ACT ACG -3’	429	Minafra ve ark., (1994)
	GVA C1	5’-AAG CCT GAC CTA GTC ATC TTG G-3’		
<i>Grapevine virus B</i> (GVB)	GVB V1	5’-GTG CTA AGA ACG TCT TCA CAG C-3’	459	Minafra ve ark., (1994)
	GVB C1	5’-ATC AGC AAA CAC GCT TGA ACC G-3’		
<i>Grapevine virus D</i> (GVD)(Dolc and Gard)	JQ31715	5’- GAC GCA GGG ATG TAC AGA-3’	852	Fajardo ve ark., (2012)
	JQ031716	5’- CCT CTA CTT ATG GAA ATT GCG CTC-3’		
<i>Grapevine red blotch-associated virus</i> (GRBaV)	Red 3F	5’-GTT ATT CCA AGC TGT CCA CT-3’	1063	Rwahnih ve ark., (2013)
	Red R352	5’-CAC TAG AAC TGC AGG AAT CG-3’		

3.3.2.3. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Jel Elektroforez

RT-PCR ürünlerinin görüntülenmesi için %1'lik Agaroz jel elektroforez işlemi yapılmıştır. 1 gr Agaroz, 100 ml 1x TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu içersinde mikrodalga fırında çözündürölüp tarak yerleştirilmiş jel tepsisine düz bir zemin üzerinde dökölerek agarozun polimerizasyonu için 20 dk süre ile bekletilmiştir. Jelin polimerizasyonundan sonra tarak dikkatli bir şekilde alınıp jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir. 1xTAE tamponu tankın içersine jeli kapatacak şekilde dökölüdükten sonra jel çukurlarına DNA marker ile beraber PCR ürünleri yükleme tamponu ile jel çukurlarına yüklenmiştir. Yükleme tamamlandıktan sonra elektroforez güç kaynağı ile eloktroforez tankına 150 V'luk elektrik akımı 40 dakika süreyle uygulanmiştır. Ethidium Bromid (EtBr) 0.5 µg/ml konsantrasyonda 100 ml suya karıştırılmış ve jel bu karışım içersinde 5-6 dakika tutularak boyanmiştır. Jel UV ışıkta görüntölünip oluşan bantlara göre değerlendirilmiştir. Örnekler kullanılan pozitiflerle karışılaştırılmış bant oluşturanlar pozitif, oluşturmayanlar negatif kabul edilerek jel görüntölleme cihazında fotoğraflanmiştır.

4.ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Arazi Çalışmaları

Hatay ilinin Kırıkhan ve Hassa ilçelerinden (Şekil 4.1.) 11 bağ, Gaziantep ilinden de 2 bağ ziyaret edilmiş ve toplam 153 bitki örneği toplanmıştır.

Yapılan çalışmalarda simptomolojik gözlemlere dayanarak ve tesadüfi olarak örnekler alınmıştır. Simptomolojik olarak genelde yapraklarda kızarmalar, beneklenmeler, kıvrılmalar ve şekil bozukluklarına, sürgünlerde ise boğum aralarında kısılmalar, odun gövdesinde deformasyonlara dikkat edilmiştir (Şekil 4.2. ve 4.3.). Hatay ve Gaziantep illerinde yürütülen önceki çalışmalarda da benzer simptomlar bildirilmiştir (Çağlayan, 1997; Sarpkaya ve ark., 2004).



Şekil 4.1. Hatay- Hassa'dan örnek alınan bir bağdan genel bir görünüm



Şekil 4.2. A, B: Omcalarda genel kızarma görünümleri, C: Yapraklarda içe doğru kıvrılma ve damarların yeşil kalması; D: Yapraklarda içe doğru kıvrılma, kızarma ve damarlarda kızarıklık, E, F: Yapraklarda kızarma ve kıvrılma olmaksızın damarların yeşil kalması



Şekil 4.3. A, B: Yapraklarda bölgesel kızarıklıklar ve beneklenme, C, D: Yaprak damar aralarında kızarma ve damarların yeşil kalması, E, F: Yapraklarda kızarma ve kıvrılma

4.2. DAS-ELISA Testi Sonuçları

Arazi çalışmaları sırasında toplanan 153 bitki örneği GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV 4-9, GLRaV- 5, GLRaV-6, GLRaV-7, GVA ve GVB virüslerine karşı teslenmiştir. Bu örneklerden 85 tanesi en az bir virüs ile enfekteli olduğu saptanmış olup testlenen örneklerde en yaygın virüs GLRaV-1 olarak bulunmuştur. DAS-ELISA ile testlenen örneklerin farklı virüslerle tekli ve karışık enfeksiyon oranları Çizelge 4.1. ve 4.2.'de verilmiştir. ELISA testinde tüm virüsler için beklenen şekilde pozitif kontrol olarak kullanılan örneklerin absorbans değeri oldukça yüksek bulunurken negatif kontrollerde düşük absorbans değerleri elde edilmiştir.

Çizelge 4.1. GLRaV grubu virüslerle GVA ve GVB 'ye karşı testlenen bitki örneklerinin ELISA testi ile saptanan enfeksiyon oranları

Virüsler	E.Ö.S / T.Ö.S*	Enfeksiyon oranı (%)
GLRaV-1	85/153	55.56
GLRaV-2	24/153	15.69
GLRaV-3	19/153	12.42
GLRaV-5	0/153	0.00
GLRaV- 4,9	66/153	43.14
GLRaV-6	1/153	0.65
GLRaV-7	0/153	0.00
GVA	7/153	4.58
GVB	0/153	0.00

*Enfekteli Örnek Sayısı/Toplam Örnek Sayısı

Çizelge 4.2. GLRaV grubu virüslerle GVA ve GVB 'ye karşı testlenen bitki örneklerinin ELISA testi ile saptanan karışık enfeksiyon oranları

Virüsler	E.Ö.S/T.Ö.S*	Enfeksiyon oranı (%)
GLRaV-1 + GLRaV 4-9	39/153	25.49
GLRaV-1 + GLRaV-2	5/153	3.27
GLRaV-1 + 2 + 4-9	12/153	7.84
GLRaV-1 + 3 + 4-9	5/153	3.27
GLRaV-1 + 2 + 3 + 4-9	6/153	3.92
GLRaV-1 + 2 + 4-9 + 6	1/153	0.65
GLRaV-1 + 2 + 4-9 + GVA	1/153	0.65

*Enfekteli Örnek Sayısı/Toplam Örnek Sayısı

Çizelgede de görüldüğü gibi, ELISA testi sonuçlarına göre en yaygın virüsler GLRaV-1 (%55.56), GLRaV 4-9 (%43.14), GLRaV-2 (%15.69), ve GLRaV-3 (%12.42) olarak saptanmış ve bu virüsleri GVA (%4.57) ve GLRaV-6 (%0.65)

izlemiştir. GLRaV-5, GLRaV-7 ve GVB açısından testlenen tüm örnekler negatif bulunmuştur. Özasan ve Yılmaz (1995)'ın Güneydoğu Anadolu ve Akdeniz bölgesi bağlarında biyolojik ve serolojik yöntemlerle yaptıkları çalışmada da en yaygın virüslerin GLRaV-3 (%17.5) ve GLRaV-1 (%12.5) olduğu bildirilmiştir. Sarpkaya ve ark. (2004)'nın Gaziantep ili bağlarında yaptıkları çalışmada ise bağ örneklerinin %30'nun GLRaV-3 ve %10'nun da GLRaV-1 ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Çağlayan (1997)'nin Hatay ili bağlarında yaptıkları çalışmada en yaygın virüsün GVA olduğu ve genellikle etmenin yaprak kıvrıcıklığı ile karışık enfeksiyonlar şeklinde görüldüğü bildirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen bulgular önceki çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Testlemeler sonucunda karışık enfeksiyonların hepsinde GLRaV-1'in yer aldığı, bunu sırasıyla GLRaV 4-9, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6 ve GVA'nın izlediği görülmüştür. Köklü ve ark. (1999)'nın Trakya bölgesinde yürüttükleri bir çalışmada biyolojik indeksleme ve ELISA testi ile en yaygın virüslerin GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6, GLRaV-7, GVA ve GVB olduğu ve testlenen 165 örnekten 153'ünün (%92.7) en az bir virüs ile enfekteli bulunduğunu bildirmişlerdir. İki veya daha fazla virüs ile karışık enfeksiyon oranının %75 olduğu ve bu karışımlarda en yaygın virüsün GVA olduğu bildirilmiştir.

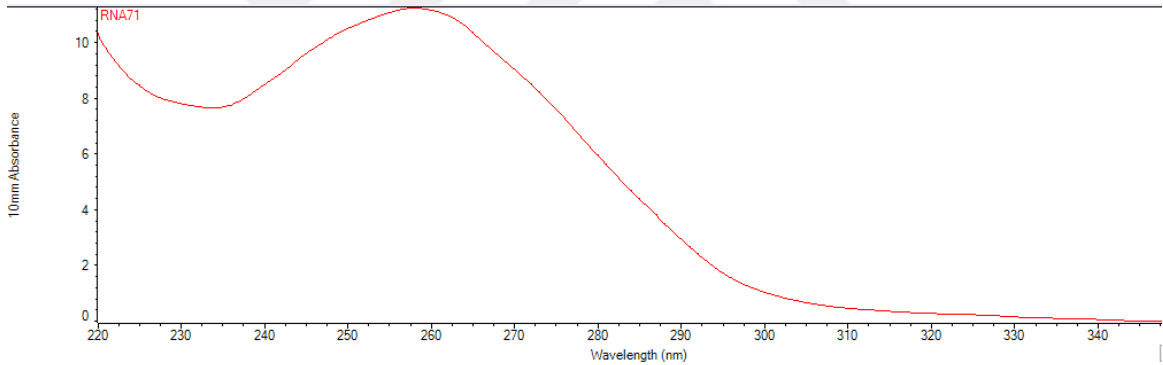
Bu çalışma kapsamında testlenen bağlarda GLRaV-5, -7 ve GVB saptanamamıştır ancak Akbaş ve ark., (2007) İç Anadolu Bölgesi bağlarında yürüttükleri bir çalışmada GLRaV-1, -2 ve -3'ün yanı sıra GLRaV-7'yi de saptamış ve enfeksiyon oranlarını sırasıyla %8.36, %2.41, %5.78 ve %3.86 olarak bildirmişlerdir. Buzkan ve ark. (2010) ise Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yaptıkları çalışmada GLRaV-5'i saptamışlardır. Bu çalışmada bu virüslerin tespit edilememiş olmasının nedeni sınırlı sayıda bağ örneklerin testlenmesi olarak düşünülmekte olup daha geniş alanlarda survey çalışması yapılması durumunda farklı virüslerin de saptanabilmesi mümkün olabilecektir.

4.3. RT-PCR ve PCR Analizleri

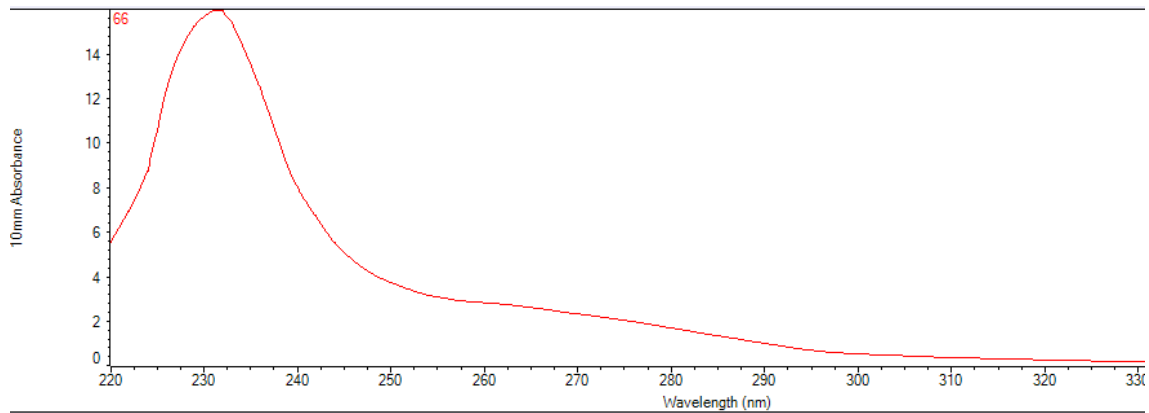
4.3.1. Başlardan RNA Ekstraksiyonunun Optimizasyonu ve DNA İzolasyonu

Başlardan toplam RNA ekstraksiyonu amacıyla dört farklı yöntem kullanılmıştır. “Silica capture” yöntemi ve Qiagen ekstraksiyon kiti ile yapılan ekstraksiyonlarda nanodrop spektrofotometre ile yapılan ölçümlerde ekstraktın içinde RNA miktarının çok az ve kalitesiz olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4. ve 4.5.). LiCl yöntemi ve Qiagen ekstraksiyon kitinin modifiye edilmiş yöntemi ile yapılan RNA ekstraksiyonlarında yapılan nanodrop ölçümlerinde ise RNA’ların çok iyi kalitede olmamasına rağmen PCR yapılabilecek düzeyde ve kalitede RNA miktarının olduğu saptanmıştır.

DNA ekstraksiyon çalışmalarında kullanılan yöntemde ise bitkinin gelişme dönemi, yaşı ve mevsimsel duruma göre PCR analizleri için uygun kalitede DNA izolasyonları mümkün olabilmıştır.



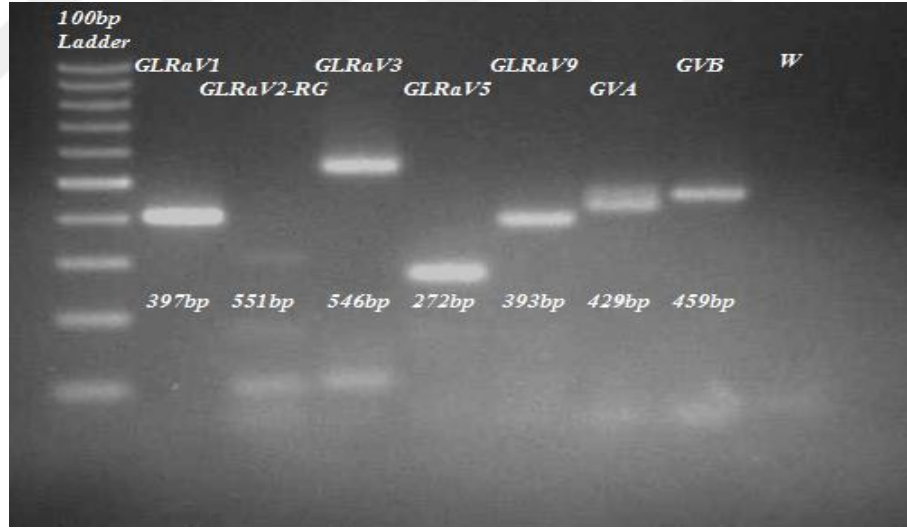
Şekil 4.4. Baş sürgünlerinin LiCl yöntemi ile izole edilen RNA’ların spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçüm sonuçları



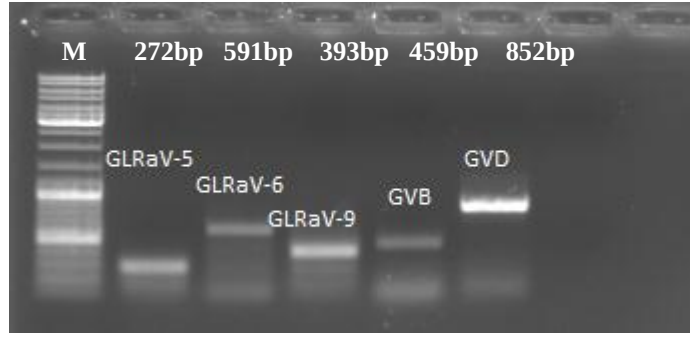
Şekil 4.5. Baş sürgünlerinin ticari kit (Qigen Sci-Almanya) kullanılarak izole edilen RNA’ların spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçüm sonuçları

4.3.2. Bağ Örneklerinin RT-PCR ile Testlenmesi

Hatay ve Gaziantep illerinden toplanan örnekler ile RT-PCR çalışmalarına başlamadan önce, pozitif olduğu bilinen bitki örnekleri kullanılarak laboratuvarı sistem kurma çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla Kaliforniya Üniversitesi-A.B.D’den getirtilen ve bu proje kapsamında testlenen virüslere ait pozitif bağ örneklerinden RNA izole edilmiştir. Pozitif örnekler ile yapılan RT aşamasından sonra cDNA’lar 100 ng/μl olacak şekilde sulandırılıp kullanılmış ve PCR analizleri sonucunda GLRaV-1 (397 bp), GLRaV-3 (546 bp), GLRaV-5 (272 bp), GLRaV-6 (591 bp), GLRaV-9 (393 bp), GVA (429 bp), GVB (459 bp) ve GVD (852 bp) için beklenen düzeyde DNA amplifikasyonları gözlenmiştir (Şekil 4.6. ve 4.7.). GLRaV-2’nin saptanması amacıyla kullanılan primerler özel bir bağ çeşidinde (Red Globe) saptanan virüse karşı sentezlendiği için optimizasyon denemelerinde kullanılan pozitif kontrol örneğinde herhangi bir amplifikasyon meydana gelmemiştir.



Şekil 4.6. GLRaV-1, -3, -5, -9, GVA ve GVB ile enfekteli bağ dokularının kullanıldığı RT-PCR sistemi kurma çalışmaları



Şekil 4.7. GLRaV-5, -6, -9, GVB ve GVD ile enfekteli bağ dokularının kullanıldığı RT-PCR sistemi kurma çalışmaları. M: marker

Optimizasyon çalışmaları sonucu amplifikasyon elde edilen örnekler pozitif kontrol olarak kullanılmış ve Hatay ile Gaziantep illerinden toplanan toplam 105 örnek RT-PCR ile testlenmiştir. Bu örneklerin GLRaV grubu virüslerle, GVA, GVB ve GVD ile enfekte olma oranlarının RT-PCR analizleri ile saptanma durumları Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

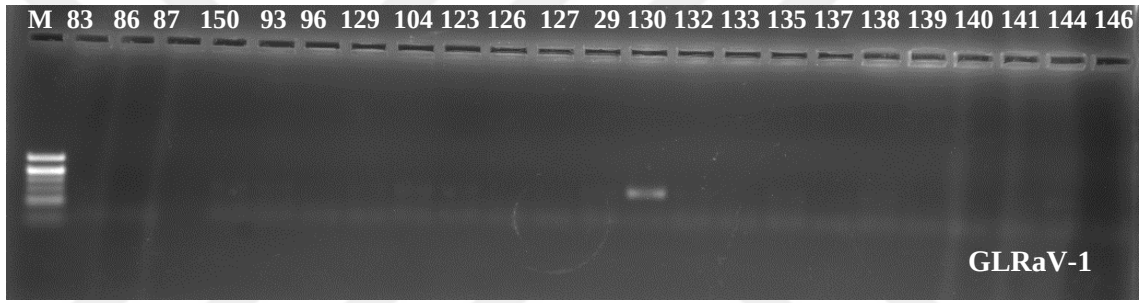
Çizelge 4.3. Hatay ve Gaziantep illerinden toplanan bitki örneklerinin GLRaV-1, -3, -5, -6, -9, GVA, GVB ve GVD'nin RT-PCR analizleri ile saptanan enfeksiyon oranları

Virüsler	E.Ö.S/T.Ö.S*	Enfeksiyon oranı (%)
GLRaV-1	17/71	23.94
GLRaV-3	13/88	14.77
GLRaV-5	0/96	0.00
GLRaV-6	4/26	15.38
GLRaV-9	0/96	0.00
GVA	6/44	13.64
GVB	1/79	1.26
GVD	1/83	1.20

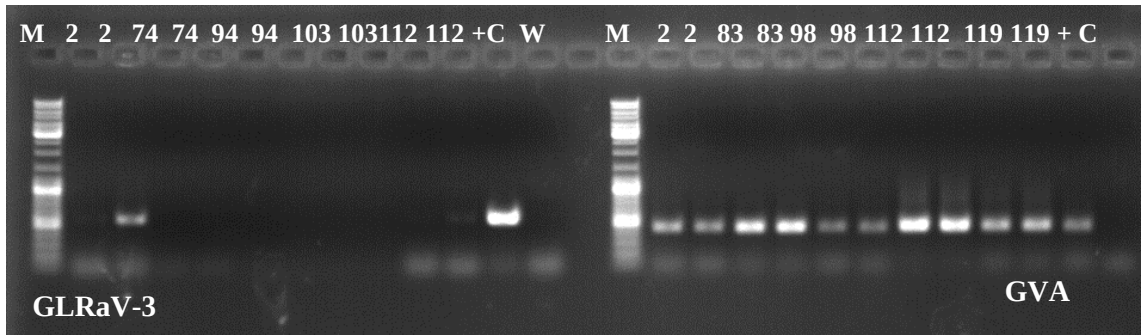
*Enfekteli Örnek Sayısı/Toplam Örnek Sayısı

Singh ve ark. (1995)'nin geliştirdiği PCR testi, virüslerin tanılanmasında son derece güvenilir bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Çizelge 4.3.'de görüldüğü gibi RT-PCR analizleri sonucunda testlenen bağ örneklerinin %23.94'ü GLRaV-1 ile, %14.77'si GLRaV-3 ile, %15.38'i GLRaV-6 ile, %13.64'ü GVA ile, %1.26'sı GVB ile

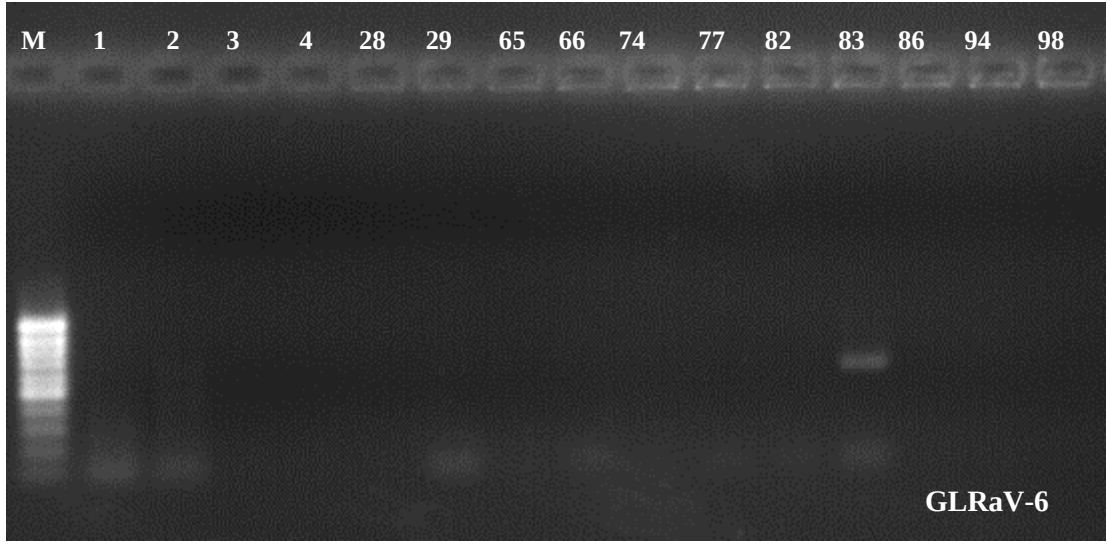
ve %1.20'si ise GVD ile enfekteli bulunmuştur (Şekil 4.8., 4.9., 4.10. ve 4.11.). Bu çalışma ile GVB ve GVD virüsleri ülkemizde ilk kez moleküler olarak tespit edilmiştir. Ülkemizde bağ virüslerinin moleküler yöntemlerle saptama çalışmaları son yıllarda başlamış olup Buzkan ve ark. (2010), Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde yürüttükleri çalışmada GLRaV-1, -3, -5 ve GVA'yı RT-PCR testi ile tespit etmiş ancak GVB için hiçbir örnekte pozitif sonuç bulamamışlardır. Ege bölgesi bağlarında yaprak kıvrıkcılığı hastalığı ile ilgili virüslerin Realtime RT-PCR analizleri ile belirlenmesi çalışmalarında ise daha önce serolojik yöntemlerle tanımlanmış olan GLRaV-1, -2, -3, -4, -5, -6 ve -7'nin yanı sıra *Ampelovirus* cinsine giren GLRaV-8, -9, -10 ve -11 virüsleri ilk kez saptanmıştır (Önder ve Gümüş, 2014).



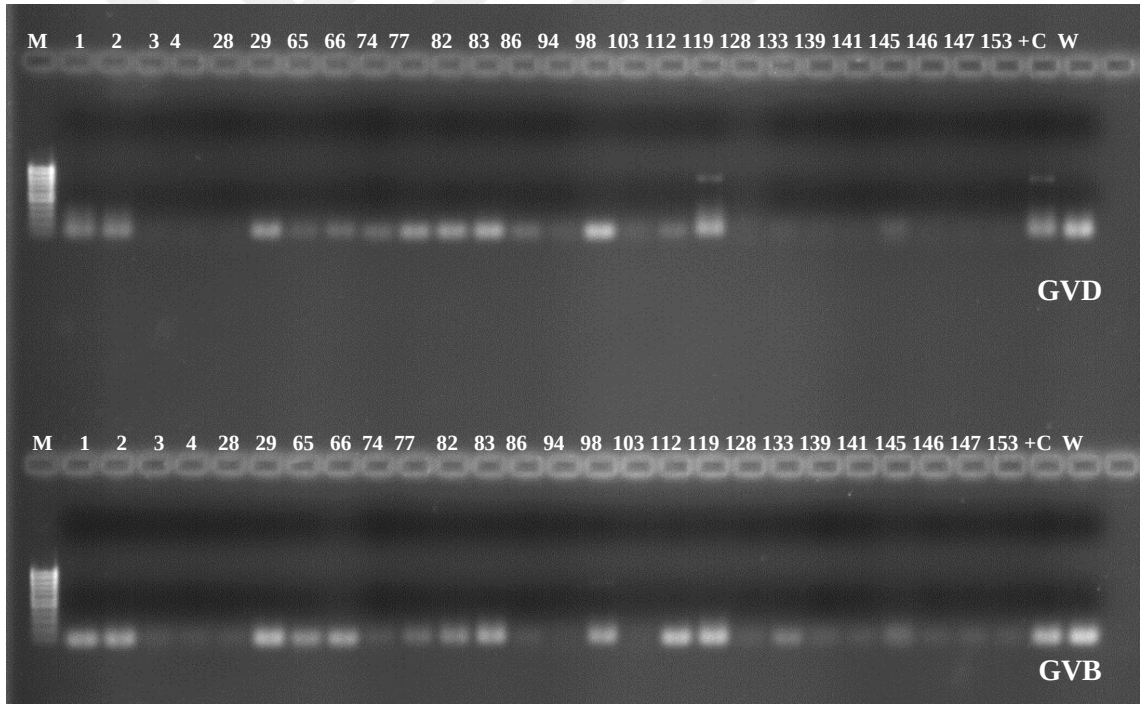
Şekil 4.8. GLRaV-1 açısından teslenen bazı bağ örneklerinin RT-PCR ile elde edilen jel görüntüleri.



Şekil 4.9. GLRaV-3 ve GVA açısından teslenen bazı bağ örneklerinin RT-PCR ile elde edilen jel görüntüleri. M: Marker +C: Pozitif kontrol W: Su



Şekil 4.10. GLRaV-6 açısından teslenen bazı bağ örneklerinin RT-PCR ile elde edilen jel görüntüleri. M: Marker

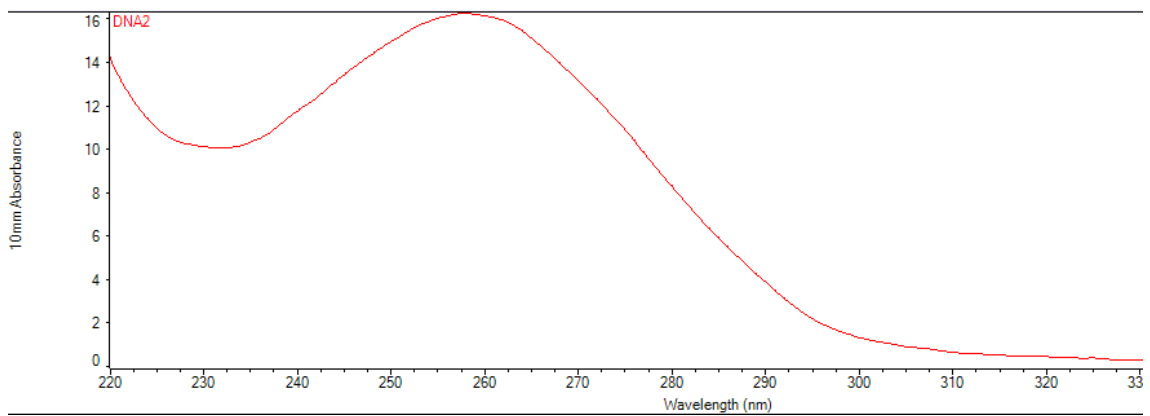


Şekil 4.11. GVD ve GVB açısından teslenen bazı bağ örneklerinin RT-PCR ile elde edilen jel görüntüleri. M: Marker +C: Pozitif kontrol W: Su

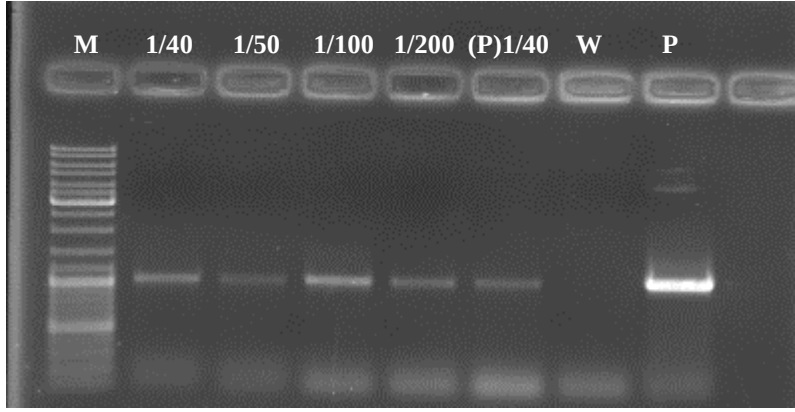
4.3.3. DNA virüsü olan *Red blotch associated virüs* (GRBaV) 'un PCR Analizleri

GRBaV'nin PCR analizi amacıyla DNA ekstraksiyonları Prince ve ark. (1993)'na göre yapılmış ve örneklerdeki DNA miktarı ve kalitesi nanodrop spektrofotometre ile ölçülmüştür (Şekil 4.9.). DNA kalitesi iyi olan bağ örneklerinin PCR analizine başlamadan önce Kaliforniya Üniversitesi-A.B.D'den getirtilen GRBaV pozitif bağ örneğinden DNA izolasyonu yapılmış ve hiç sulandırmadan PCR analizlerinde kullanılmıştır. Ancak herhangi bir amplifikasyon elde edilememesi üzerine pozitif kontrol olarak kullanılan bitki örneği 1/40, 1/50, 1/100 ve 1/200 oranında sulandırılmış ve PCR analizlerinde kullanılmıştır. Bu sulandırma serilerinin tamamında beklenen düzeyde amplifikasyon gözlenmiş ve en güzel bant oluşumu 1/100 sulandırma serisinde gözlenmiştir (Şekil 4.13.). Bağ öz suyunda fenolik bileşiklerin ve polisakkaritlerin yoğun olarak bulunması nedeniyle RNA ve DNA izolasyonlarında kalite problemi yoğun olarak yaşanmaktadır (Newbury ve Possingham, 1977; Rezaian ve Krake, 1987; Demke ve Adams, 1992). O nedenle bitki ekstraktlarının seyreltilmesiyle nükleik asitin (NA) serbest kalması sağlanmakta ve PCR analizleri için yeterli miktar ve kalitede NA elde edilebilmektedir.(Şekil 4.12.)

Toplanan örnekler *Grapevine Red Blotch associated virus* açısından testlenmiş ve örnekler reaksiyon vermeyip negatif olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte pozitif kontrol olarak kullanılan örnekte beklenen düzeyde (1063 bp) bant elde edilmiştir.



Şekil 4.12. Bağ sürgünlerinden izole edilen DNA'ların spektrofotometre (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, A.B.D) ile ölçüm sonuçları



Şekil 4.13. *Grapevine red blotch associated virus*'nün PCR analizleri için kullanılan bitki ekstraktlarının seyreltme oranları ve 1063 bp büyüklüğündeki ampliconların görünümü. (P) 1/40: 1/40 oranında seyreltilmiş plazmid; P: Seyreltilmemiş plazmid

Hatay ve Gaziantep illerinden toplanan 153 örneğin tamamı GRBaV için testlendiğinde tüm örnekler bu virüs açısından negatif bulunmuştur. *Geminiviridae* familyası içinde yer alan bu virüs, ilk kez A.B.D'de 2008 yılında tespit edilmiş olup özellikle kırmızı üzüm çeşitlerinde önemli zararlar yapmaktadır (Al Rwahnih ve ark., 2013). Bu hastalığın bağlardaki en önemli semptomları yaprak kenarları boyunca kırmızı lekeler ve yaprak alt yüzeyinde belirginleşen damar kızarmalarıdır. Hatay ve Gaziantep illerinde yapılan survey çalışmalarında bu semptomlara benzer semptomlar gözlenmesine karşın bu virüsün bu illerdeki varlığı belirlenememiştir. Çiftçi ve ark. (2014)'nın 2012 yılında yürüttükleri ve ülkemizin Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerini kapsayan bir survey çalışmasında da GRBaV'yi tespit edemedikleri bildirilmiştir.

Ülkemize yurt dışından kontrolsüz bağ fidanlarının yoğun bir şekilde girmesi ve Tarım Bakanlığı'na bağlı karantina merkezlerinde bağ virüsleri ile ilgili testlemelerin sadece bazı bilinen virüslere karşı ve ELISA yöntemi ile yapılması nedeniyle birçok yeni virüsün ülkemize giriş yapabilmesi mümkündür. Nitekim son yıllarda saptanmış ve *Grapevine pinot gris virus* olarak adlandırılan yeni bir bağ virüsü 2015 yılında İtalya ve bazı Avrupa ülkeleri ile yaklaşık eş zamanlı olarak ülkemizde de saptanmıştır (Gazel ve ark., 2015, yayınlanmamış veriler). Bu nedenlerden dolayı bağ alanlarına gerek bilinen gerekse ülkemize giriş yapması olası olan virüs hastalıkları açısından düzenli aralıklarla surveyler planlanması ve testlemelerde ELISA yönteminin yanı sıra mutlaka PCR analizlerinin de rutin olarak kullanılması gereklidir.

5.SONUÇ ve ÖNERİLER

Türkiye'nin dünya bağıcılığındaki yeri ve ekonomik önemi büyüktür ancak yüksek verimli ve kaliteli ürün elde etmek her zaman mümkün olamamaktadır. Bu durumun önemli sebeplerinden birisi de bağların pek çok virüs, bakteri, fungus, viroid ve fitoplazma gibi etmenlerin konukçusu olmasıdır. Bu etmenlerin neden olduğu hastalıklardan virüs ve virüs-benzeri hastalıklar bağlarda önemli tehditler oluşturmaktadır. Hastalıkların hızlı ve güvenilir yöntemlerle erken dönemde tespit edilmesi hastalık kontrolünde son derece önemli olup sanitasyon, sertifikasyon ve karantina çalışmaları için de son derece gereklidir. ELISA yöntemi ile yapılan testlemeler, güvenilir ve çok kısa sürede sonuç vermesine rağmen bitkilerin erken gelişme dönemlerinde özellikle odunsu bitkilerde virüs tespiti gözden kaçabilmektedir. Son yıllarda birçok bitki grubunda virüslerin hızlı ve güvenilir tespitlerinde moleküler tanı yöntemi olarak RT-PCR analizleri kullanılmaktadır. Bu yöntemin tercih edilmesindeki en önemli avantaj mevsimlere bağlı kalmadan virüs konsantrasyonunun çok düşük olduğu durumlarda bile virüslerin başarılı olarak tespit edilebilmesidir. Bu çalışmada ülkemizin önemli bağ yetiştiriciliğine sahip iki ili olan Hatay ve Gaziantep'deki bağ alanlarının GLRaV grubu virüsler ile GVA, GVB, GVD ve son yıllarda tespit edilmiş olan GRBaV'nin varlığının ELISA yöntemi yanında RT-PCR analizleri ile de tespit edilmesi hedeflenmiştir. Araştırma kapsamında toplanan 153 örneğin ELISA yöntemi ile testlenmesi sonucunda en yaygın virüsün GLRaV-1 olduğu (%55.56) ve bunu sırasıyla GLRaV-4-9, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA ve GLRAV-6 izlediği saptanmıştır. Karışık enfeksiyonlarda da GLRaV-1 tüm kombinasyonlarda yer alarak en yaygın virüs olarak belirlenmiştir. ELISA yöntemi ile testlenen örneklerin hiç birisinde GVB, GRBaV ve GLRaV-5 tespit edilememiştir. Bununla birlikte RT-PCR analizleri sonucu testlenen örneklerin %1.26'sında GVB, %1.20'sinde ise GVD tespit edilirken GLRaV-5 ELISA yanında RT-PCR analizleri ile de tespit edilememiştir. Bu çalışma ile GVB ve GVD virüsleri ülkemizde ilk kez tespit edilmiş olup bu virüsler "Rugose wood kompleks" olarak adlandırılan ve bağlarda odun deformasyonlarına yol açan hastalık grubuna ait virüslerdir ve ürünlerde %15-55 oranında verim kayıplarına yol açabilmektedir (Martelli, 2012).

Bu çalışma sonucunda elde edilen önemli sonuçlar ve öneriler özetlenecek olursa:

- 1- Gerek Hatay gerekse Gaziantep illerinde yaprak kıvrılma hastalığına yol açan GLRaV grubu virüslerden büyük çoğunluğu tekli veya karışık enfeksiyonlar şeklinde gerek ELISA gerek RT-PCR analizleri ile yaygın olarak saptanmıştır.
- 2- Bağlarda odun deformasyonlarına yol açan virüslerden en yaygın olarak GVA tespit edilmiş olup bunun yanı sıra GVB ve GVD virüslerinin de ilk kez bu çalışma ile ülkemizde bulunduğu bildirilmiştir.
- 3-Son yıllarda tespit edilmiş bir virüs olan *Grapevine red blotch associated virus* her iki ilin bağ alanlarında da tespit edilememiştir. Gerek bu virüs gerekse son yıllarda tespit edilen *Grapevine syrah virus-1* ve *Grapevine pinot gris virus* gibi diğer virüslerin de ülkemize giriş yapabilme olasılıklarına karşı düzenli olarak testlemelerin yapılması önerilmektedir.
- 4-Virüslerin etkin bir mücadele yöntemi bulunmadığı için kontrol önlemleri ön plana çıkmaktadır. Başarılı bir kontrol stratejisi geliştirilebilmesi de ancak doğru teşhis yöntemlerinin kullanılması ile mümkündür. Bu nedenle özellikle yurt dışında değişik amaçlarla ithal edilen bağ çeşitlerinin mutlaka ELISA ve RT-PCR yöntemleri kombine bir şekilde kullanılarak testlenmesi gerek ülkemizde mevcut gerekse yeni giriş yapma olasılığı olan virüs hastalıklarının doğru teşhis edilebilmesi açısından son derece önemlidir.
- 5- Ülkemizin genetik kaynaklarının muhafaza edildiği ve damızlık çeşitlerin bulunduğu bağ alanlarının düzenli olarak ELISA ve PCR yöntemleri ile testlenmesi ve enfekteli bulunanların ivedilikle eradike edilmesi de ülkemize temiz fidanlık dağıtımında önemli rol oynayacaktır.

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

KAYNAKLAR

- Akbaş, B., ve Erdiller, G., 1998. Konya ve Nevşehir ili bağlarında görülen virüs hastalıkları. **Türkiye VIII. Fitopatoloji kongresi Bild. Ankara.** p.149-53.
- 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
- Akdoğan, M., 1956. Short internode infectious degeneration (Kısa boğum, bulaşık soysuzlaşma). **Sakarya Ziraai Mücadele Enstitüsü, Halk Broşürleri.** p. 5-6.
- Alkowni, R., Rowhani, A., Daubert, S., Galino, D. 2004. Partial characterization of a new ampelovirus associated with Grapevine leafroll disease. **J. Plant Pathol.** 86: 123–133.
- Al Rwahnih, M., Dave, A., Anderson, MM., Rowhani, A., Uyemoto, JK., Sudarshana, MR., 2013. Association of a DNA virus with grapevines affected by red blotch disease in California. **Phytopathology.** 103:1069–1076.
- Anonim, 2014 <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>
- Anonim, 2015 http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001
- Azeri, T. 1983. Virus problems of Turkey's vineyards and virus-free planting material production programme. **Bornova Plant Protection Research Institute, İzmir.** 1: 61–69
- Belli, G., Fortusini A., Casati P., Belli L., Bianco P., Prati S. 1994. Transmission of grapevine leafroll associated closterovirus by the scale insect Pulvinaria vitis L. **Rivista di Patologia Vegetale.** 4: 105-108.
- Buzkan, N., Karadağ, S., Kaya, A., Baloğlu, S., Minafra, A., Ben-Dov, Y. 2010. First Report of the Occurrence of *Grapevine leafroll-associated virus-5* in Turkish Vineyards. **Journal of Phytopathology.** 158: 448–449
- Clark, M.F., Adams, A.N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **Journal of General Virology.** 34: 475–83.
- 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.
- Çiğsar, İ., Digiario, M., Martelli, G.P. 2002. Sanitary status of grapevine in south-eastern and central Anatolia (Turkey). **EPPO Bulletin.** 32: 471-475.
- Çiftçi, O., Serçe, Ç.U., Güler, B. 2014. Virus diseases of grapevine plants grown in the East and Southeast regions of Turkey. **Joint International Congress 14th Congress of Mediterranean Phytopathological Union International Society of Mycotoxicology (Mediterranean Branch) 25-29 August 2014, Istanbul, Turkey.** p. 140.
- Demke, T., Adams, R.P., 1992. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. **Biotechniques.** 12: 332–334.
- Digiario, M., Martelli, G.P., Savino, V. 2000. Phloem-limited viruses of the grapevine in the Mediterranean and Near East. **Proc. 13th Meeting of ICGV, Adelaide, (2000)** 7 pp: 5-76.
- Engelbrecht, D., Kasdorf, G. 1990. Transmission of grapevine leafroll disease and associated closteroviruses by the vine mealybug, *Planococcus ficus*. **Phytophylactica.** 22: 341-346.

- Fajardo, T.V.M., Eiras, M., Nickel, O., Dubiela, C.R., Souto, E.R. S., 2012. Detection and partial molecular characterization of *Grapevine fleck virus*, *Grapevine virus D*, *Grapevine leafroll-associated virus -5* and *-6* infecting grapevines in Brazil. **Ciência Rural, Santa Maria**. 42 (12): 2127-2130.
- Fiore, N., Prodan, S., Montealegre, J., Aballay, E., Pino, A.M., Zamorano, A. 2008. Survey of grapevine viruses in Chile. **Journal of Plant Pathology**. 90: 125-130.
- Foissac, X., Svanella-Dumas, L., Gentit, P., Dulucq, M.J., Marais, A. ve Candresse C. 2005. Polyvalent degenerate oligonucleotides reverse transcription-polymerase chain reaction: a polyvalent detection and characterization tool for Trichoviruses, Capilloviruses, and Foveaviruses. **Phytopathology**. 95 (6): 617-625.
- Garau, R., Prota, V.A., Boscia, D., Fiori, M., Prota, U. 1995. Pseudococcus affinis Mask., new vector of grapevine trichoviruses A and B. **Vitis**. 34: 67-68.
- Golino, D.A., Sim S.T., Gill R., Rowhani A. 2002. California mealybugs can spread grapevine leafroll disease. **California Agriculture**. 56: 196-201.
- Hewitt, W.B. 1968. **Zirai Araştırma ve İntroduksiyon Merkezi, Çeviri Yayınları**. No: 2, İzmir.
- Kaya, A., Erilmez, S., 2012. First Report of Grapevine Leafroll-associated Virus 4 in Vineyards of Turkey. **Plant disease**. 96 (8): 1230
- Kespütlü, I., Saydam, C. 1972. **T.C. Tarım Bakanlığı Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü Araştırma Eserleri Serisi**. Teknik Bülten No: 19, İzmir.
- Köklü, G., Digiario, M., Savino, V. 1998. A survey of grapevine viruses in Turkish Thrace. **Phytopathologia Mediterranea**. 37: 140-142.
- Köklü, G., Digiario, M., Sabanadzovic, S., Savino, V. 1999. Natural infections by Cucumber mosaic virus in Turkish grapevines. **Phytopathologia Mediterranea**. 38: 33-36.
- Köklü, G. 1998. Improvement of The Serological Diagnosis of Grapevine Leafroll Associated Virus 2 and Evaluation of Sanitary Status of Some Grapevine Varieties Grown In Trakya Region In Turkey, **(M.Sc. Tezi)**. CIHEAM/IAM-B.
- Köklü, G., Baloğlu, S. 2000. Determination of Incidence of Grapevine leafroll Associated Viruses in Some Grapevine Varieties Grown in Thrace Region. **The Journal of Turkish Phytopathology**. 29 (2-3): 85-94.
- Köklü, G. ve Baloğlu S. 2001a. Asma Yaprak Kıvrılması İle İlişkili Virüs 3 (GLRaV-3)'ün Saflaştırılması ve Antiserum Üretimi. **Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi**. 1 (1): 5-8.
- Köklü, G. ve Baloğlu, S. 2001b. Trakya Bölgesi Yetiştirilen Bağlarda dsRNA Analizleriyle Asma Yaprak Kıvrılması ile İlişkili Virüslerin Tespit Edilmesi. **Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi**. 1 (1): 1-4.
- 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.
- Mahfoudhi, N. ve Dhouibi, M.H. 2009. Survey of mealybugs (Hemiptera: pseudococcidae) and their natural enemies in Tunisian vineyards. **Afr. Entomol**. 17 (2): 154-160.

- Maliogka, V.I., Dovas, C.I. ve Katis, N.I. 2008. Evolutionary relationships of virus species belonging to a distinct lineage within the Ampelovirus genus. **Virus Research**. 135: 125-135.
- Maliogka, V.I., Dovas, C.I., Lotos, L., Efthimiou, K. ve Katis N.I. 2009. Complete genome analysis and immunodetection of a member of a novel virus species belonging to the genus Ampelovirus. **Arch. Virol.** 154: 209-218.
- Martelli, G.P. 1986. Virus and virus-like diseases of the grapevine in the Mediterranean area. **FAO Plant Protection Bulletin**. 34: 25-42.
- Martelli, G.P. 1987. A report to the government of Turkey. Published by FAO, Rome.
- Martelli, G. P. (Ed.) 1993. Graft-transmissible Diseases of Grapevines. **Handbook for Detection and Diagnosis**. ICGV, FAO, Rome.
- Martelli, G.P., Saldarelli, P. ve Minafra, A. 1997. A critical appraisal of the taxonomic position of grapevine virus A, B and D and their assignment to a new genus. **Proc. 12th Meeting of ICGV, Lisbon**. p.23.
- Martelli, G.P. ve Jelkmann, W. (1998). Foveavirus, a new plant virus genus. **Arch. Virol.** 143: 1245-1249.
- Martelli, G.P. ve Boudon-Padieu, E. 2006. Directory of infectious diseases of grapevines. **Options Méditerranéennes, Series B**. 55: 11-201.
- 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, G.P., Agranovsky, A.A., Al Rwahnih, M., Dolja, V.V., Dovas, C.I. ve Fuchs, M. 2012. Taxonomic revision of the family Closteroviridae with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus Ampelovirus and the putative species unassigned to the family. **J. Plant Pathol.** 94: 7-19
- Minafra, A., Saldarelli, P., Grieco, F., Martelli, G. P. 1994. Nucleotide sequence of the 3' terminal region of the RNA of two filamentous grapevine viruses. **Arch.Virol.** 137: 249-261.
- Nakaune, R., Toda, S., Mochizuki, M., Nakano, M. 2008. Identification and characterization of a new vitivirus from grapevine. **Arch. Virol.** 153: 1827-1832.
- Newbury, H.J., Possingham, J.V., 1977. Factors affecting the extraction of intact ribonucleic acid from plant tissue containing interfering phenolic compounds. **Plant Phys.** 60: 543-547.
- Oraman, M.N., 1965. Arkeolojik Buluntuların Işığında Türkiye Bağcılığının Tarihçesi Üzerinde Araştırmalar. Ankara Ün. Ziraat Fak. Yıllığı. 15(2): 96-108.
- Osman, F., Rowhani, A. 2006. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). **Journal of Virological Methods**. 133: 130-136.
- Önder, S., Gümüş, M. 2014. Ege bölgesi bağ alanlarında yaprak kıvrılması hastalığı ile ilişkili 4 yeni Ampelovirus. **Türkiye V. Bitki Koruma Kongresi, 3-5 Şubat 2014, Antalya**. 200.
- Özaslan, M., Yılmaz, M.A. 1995. Grapevine virus diseases in Adana, Tarsus, Sanliurfa and Adıyaman regions (Adana, Tarsus, Şanlıurfa ve Adıyaman bölgelerinde yetiştirilen bağlara zarar veren virüs hastalıkları). **Türkiye VII. Fitopatoloji Kongresi, Adana**. 306-312.

- Petersen, C., Charles J. 1997. Transmission of grapevine leafroll-associated closteroviruses by *Pseudococcus longispinus* and *P. calceolariae*. **Plant Pathology**. 46: 509-515.
- Prince, J.P., Davis, R.E., Wolf, T.K., Lee, I.M, Dally E.L., Bertaccini, A., Credi, R., Barba, M. 1993. Molecular detection of diverse mycoplasma-like organisms (MLOs) associated with grapevine yellows and their classification with Aster yellows, X-disease and elm yellows MLOs. **Phytopathology**. 83: 1130-1137.
- Rezaian, M.A., Krake, L.R., 1987. Nucleic acid extraction and virus detection in grapevine. **J. Virol. Methods**. 17: 277-285.
- Rosciglione, B., Castellano, M. 1985. Further evidence that mealybug can transmit grapevine virus A (GVA) to herbaceous hosts. **Phytopathologia Mediterranea**. 24: 186-188.
- Rowhani, A., Zhang, Y.P., Golino, D.A., Uyemeto, J.K., 2000. Isolation and partial characterization of two new viruses from grapevine. In: **Proceedings of the 13th International Council for the Study of Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine**. Adelaide, Australia. p.82.
- Rwahnih, M. A., Dave, A., Anderson, M., Rowhani, A., Uyemoto, J.K., Sudarshana, M.R. 2013. Association of a DNA Virus with Grapevines Affected by Red Blotch Disease in California. **Phytopathology**. 10: 1069-1076
- Sarpkaya, K., Can, C., Özaslan, M. 2004. Gaziantep ili ve ilçelerinde bağ virüs hastalıklarının serolojik yöntemlerle saptanması. **Türkiye I. Bitki Koruma Kongresi, Samsun**. 218.
- Sertkaya, G., Yiğit, A., Çağlayan, K. 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.
- Savino V., Martelli G.P., D'Onghia, A.M., Yılmaz, M.A. 1987. Strawberry latent ringspot virus in grapevine. **FAO Plant Protection Bulletin**. 35: 102-104.
- Scorza, R., Boudon-Padieu, E., Greif, C. 2003. New mealybug species vectoring Grapevine leafroll-associated virus-1 and -3 (GLRaV-1 and -3). **European Journal of Plant Pathology**. 109: 975-981.
- Singh, R.P., Kurz, J., Boiteau, G., Bernard, G. 1995. Detection of Potato leafroll virus in single aphids by the reverse transcription chain reaction and its potential epidemiological application. **Journal of Virological methods**. 55: 133-143.
- Spiegel, S., Scott, S.W., Bowman-Vance, V., Tam, Y., Galiakparov, N.N., Rosner, A. 1996. Improved detection of prunus necrotic ringspot virus by polymerase chain reaction. **Eur. j. Plant pathol.** 102: 681-685.
- Tanne, E., Ben-Dov, Y., Raccach, B. 1989. Transmission of closterolike particles associated with grapevine leafroll by mealybugs (*Pseudococcidae*) in Israel. **Phytoparasitica**. 17: 64.
- Tekinel, N., Dolar, M.S., Nas, Z., Bilgin, N., Salih, H., Salcan, Y. 1971. Akdeniz bölgesi bağlarında bulaşık soysuzlaşma (fanleaf)'nin araştırılması. **Bitki Koruma Bülteni**. 11: 225-247.
- Üzümeri, E. 1947. Grapevine Diseases (Bağ Hastalıkları). **Tarım Bakanlığı Neşriyat Genel Müdürlüğü**. no: 635.

- 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.
- Walter, B., Martelli, G.P. 1997. Clonal and sanitary selection of the grapevine. In: **Sanitary Selection of the Grapevine Protocols for Detection of Viruses and Virus-like Diseases.** (Ed.): B. Walter. 86: 43-95.



ÖZGEÇMİŞ

Yazar 1989 yılında Mardin ili Kızıltepe ilçesinde doğdu. İlk ve orta okul öğrenimini Kızıltepede, lise öğrenimini Mardinde tamamladı. 2008 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ziraat Mühendisliği bölümünü kazandı ve 2012 yılında mezun oldu. 2012 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı ve 2015 yılında mezun oldu.



EKLER

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

Kaplama Tamponu (Coating Buffer)

pH : 9.6

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

Fosfat-Tuz Tamponu (PBS Buffer)

pH : 7.4

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

Yıkama Tamponu (PBST Buffer)

pH :7.4

PBS Buffer	999.50 ml
Tween 20	0.50ml

Örnek Ezme Tamponu (Extraction Buffer)

pH : 7.4

PBST	1000.0 ml
Polyvinylpyrrolidone	20.00 gr
(MV = 40000 K =40)	

Konjugat Tamponu (Conjugate Buffer)

pH : 7.4

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

Substrat Tamponu (substrat buffer)

pH : 9,8

Diethanolamin	97.00 ml
NaN ₃	0.20 gr

Karışım d₂H₂O ile 1 litreye tamamlanır.

EK 2. Silica capture RNA ekstaksiyonunda kullanılan çözeltiler ve içerikleri

Ezme tamponu (Grinding Buffer) (100 ml)

Guanidine Thiocynate (4.0 M)	11.8 gr
0.5 M EDTA pH: 8.0 (25mM)	5 ml
5 M KOAc pH: 7.5 (1.oMM)	20 ml
3 M NaOAc pH: 5.2 (0.2M)	6.6 ml
PVP 40 (% 2.5)	0.25 gr

Yıkama Tamponu

10 mM Tris-HCl, pH: 7.5
0.5 mM EDTA
50 mM NaCl
% 50 Ethanol (EtOH)

0.5 M EDTA, pH 8.0

100 ml d₂H₂O' da 0.0145 gr EDTA eritilmiş ve pH'sı NaOH pelletleri ile 8.0'a ayarlanmıştır. Otoklav edilerek oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

5 M NaOAc, pH 5.2

60 ml d₂H₂O' da 29.445 gr NaOAc çözündürülür. Glacial asetik asid damlatılarak pH 6.0'a ayarlanmış ve suyla 100 ml'ye tamamlanmıştır.

NaI Solüsyonu

40 ml d₂H₂O' da 0.75 gr Na₂SO₃ çözündürülmüş ve 36 gr NaI eklenerek karıştırılmıştır. Solüsyon karanlık ortamda +4°C'de muhafaza edilmiştir.

10 mM Tris-HCl, pH:7.5

80 ml d_2H_2O ' da 0.121 gr trizma base çözündürülmüş ve HCl eklenerek pH dengelenmiştir. suyla 100 ml'ye tamamlanıp otoklav edilmiş ve odasıcaklığında muhafaza edilmiştir

50mM NaCl

0.29 gr NaCl 50 ml d_2H_2O 'ya tamamlanacak şekilde çözündürülmüştür.

Resüspanse silica

60 gr silica üzerine 500 ml d_2H_2O eklenmiş, karışımın çökmesi için 24 saat beklenmiştir. Üst fazın 470 ml'si dökülüp üzerine 500 ml d_2H_2O eklenmiş ve çökmesi için 5 saat beklenmiştir. Karışımın üst fazından 440 ml alınıp, 60 ml çamurlu kısım atılmış ve karışım HCl ile pH 2.0 ayarlanarak ve otoklav edilip +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

EK 3. LiCl YÖNTEMİNİN KİMYASALARININ HAZIRLANIŞI

RNA LiCl ezme tamponu(100 ml)

1 M Tris HCl pH: 8-8.5	20 ml
% 10 SDS	15 ml
4 M LiCl	7.5 ml
0.5 EDTA	2 ml
Sodium deoxychloride acid	1 gr
Nonidet P40	1 ml

% 10 SDS (100 ml)

10 gr SDS bir miktar d_2H_2O 'da çözündürülüp üzeri 100 ml d_2H_2O 'ya tamamlanmıştır

5 M KoAc (100 ml)

29.445 gr KoAc 60 ml d_2H_2O 'da çözündürülüp Glacial acetic acid damlatılarak pH'sı 6'ya ayarlanmış ve 100 ml'ye tamamlanmıştır.

EK 4. UZUN YÖNTEM FİTOPLAZMA

Grinding örnek ezme tamponu (200 ml)

K_2HPO_4	3.22 gr
KH_2PO_4	0.82 gr
Sucrose	20 gr
BSA (fraction)	0.3 gr
PVP-10	4 gr

Her 48 ml tampon çözelti kullanmak için 0.2544 gr Ascorbic acid eklenmiştir. Tampon çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilir.

Extraction tampon çözeltisi (100 ml)

1 M Tris	10 ml
0.5 M EDTA	20 ml
5 M NaCl	5 ml

Çözelti 100 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklav edilip oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

TE tampon çözelti (50 ml)

1 M Tris 500 µl

0.5 EDTA 100 µl

Çözelti d₂H₂O ile 50 ml'ye tamamlanıp otoklav edilmiş ve oda sıcaklığında tutulmuştur

EK 5. MACKENZİE EZME TAMPONU (100 ml)

Guanidine isothiacyonate 47.26 gr

Sodium acetat 2.72 gr

25 mM EDTA 0.7305 gr

PVP-40 2.5 gr

Karışım 100 ml d₂H₂O'ya tamamlanıp oda sıcaklığında saklanmıştır.

EK 6. AGAROS JEL ELEKTROFOREZ (MANIATIS ve ark., 1982)**TAEX50(100 ml)**

0.5 M EDTA pH:8 10 ml

0.6 Glacial acetic acide 5.71 ml

Trizma base 24.2 gr

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 gr

TAEX50 6 ml

Hazırlanan ortam -20 °C'de saklanmıştır.

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

0.5XTAE 200 ml

Ethidium bromide 200 µl

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

%1 Agarose Jel Elektroforezi

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