



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

**MARMARA BÖLGESİ MAVİYEMİŞ PLANTASYONLARINDAKİ
VİRÜSLERİN DAS-ELISA ve RT-PCR YÖNTEMLERİYLE
SAPTANMASI ve KARAKTERİZASYONU**

VELİ TAŞ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
OCAK - 2024**



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MARMARA BÖLGESİ MAVİYEMİŞ PLANTASYONLARINDAKİ
VİRÜSLERİN DAS-ELISA ve RT-PCR YÖNTEMLERİYLE
SAPTANMASI ve KARAKTERİZASYONU

VELİ TAŞ
ORCID:0009-0000-7870-5412

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

Danışman
Prof.Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN
ORCID: 0000-0002-4381-4149

HATAY
OCAK - 2024

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MARMARA BÖLGESİ MAVİYEMİŞ PLANTASYONLARINDAKİ
VİRÜSLERİN DAS-ELISA ve RT-PCR YÖNTEMLERİYLE SAPTANMASI ve
KARAKTERİZASYONU**

Veli TAŞ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN danışmanlığında hazırlanan bu tez 25/01/2024 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN
Başkan

Doç. Dr. Eminur ELÇİ
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Hakan ÇARPAR
Üye

Kod No:

Doç. Dr. Cengiz KARACA
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 22.YL.015

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.

25/01/2024

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.

İmzası

Veli TAŞ

ÖZET

MARMARA BÖLGESİ MAVİYEMİŞ PLANTASYONLARINDAKİ VİRÜSLERİN DAS-ELISA ve RT-PCR YÖNTEMLERİYLE SAPTANMASI ve KARAKTERİZASYONU

Bu poje kapsamında, Marmara Bölgesi'nde Bursa'dan 86, İstanbul'dan 41 örnek olmak üzere toplamda 127 adet maviyemiş örneği arabis mosaic virus (ArMV), strawberry latent ringspot virus (SLRSV), tomato ringspot virus (ToRSV), tobacco ringspot virus (TRSV), blueberry red ringspot virus (BRRSV), blueberry leaf mottle virus (BLMoV), blueberry scorch virus (BlScV), blueberry shock virus (BlShV) ve blueberry shoestring virus (BSSV) için DAS-ELISA ve RT-PCR; blueberry mosaic associated virus (BlMaV) için üretilmiş ticari antiserum olmaması nedeniyle de sadece RT-PCR analizleri ile testlenmiştir. Testlemeler sonucunda, DAS-ELISA yöntemiyle tüm örneklerde hiçbir virüs tespit edilemezken RT-PCR analizleri ile İstanbul ilinden toplanan yüksek boylu maviyemiş örneklerinden 9 tanesinde BlMaV, 1 tanesinde ise BLMoV tespit edilmiştir. Bu sonuçlar sekans analizleriyle de doğrulanmıştır. BlMaV filogenetik analizleri sonucunda Marmara Bölgesi izolatlarının kendi içinde ve Karadeniz Bölgesi izolatlarıyla büyük benzerlik gösterdiği ancak diğer ülke izolatlarından oldukça farklı olduğu görülmüştür. Tek bir BLMoV izolati ile yapılan filogenetik analizlerde ise ülkemize ait izolatın en uzak homolojiyi %95,18 benzerlik oranı ile bir Amerika izolati (MT591564) ile gösterdiği saptanmıştır. Ülkemizde maviyemiş üretiminin son yıllarda hızla artışı da dikkate alındığında, bu çalışma ile virüsten arı üretim materyallerinin kullanılması ve yeni üretim alanlarının düzenli olarak maviyemiş virüsleri açısından testlenmesinin önemi bir kez daha ortaya konulmuştur.

2024, 51 sayfa

Anahtar Kelimeler: Bursa, DAS-ELISA, İstanbul, RT-PCR, *Vaccinium* spp.

ABSTRACT

DETECTION and CHARACTERIZATION of BLUEBERRY VIRUSES by DAS-ELISA and RT-PCR METHODS in MARMARA REGION of TÜRKİYE

Within the scope of this project, totally 127 blueberry samples (41 samples from Istanbul, 86 samples from Bursa) were tested for arabis mosaic virus (ArMV), strawberry latent ringspot virus (SLRSV), tomato ringspot virus (ToRSV), tobacco ringspot virus (TRSV), blueberry red ringspot virus (BRRSV), blueberry leaf mottle virus (BLMoV), blueberry scorch virus (BlScV), blueberry shock virus (BlShV) and blueberry shoestring virus (BSSV) by DAS-ELISA and RT-PCR. Since there is no commercial antiserum produced for blueberry mosaic associated virus (BlMaV), it has only been tested by RT-PCR analysis. While no virus could be detected in all samples by DAS-ELISA, BlMaV was detected in 9 of the highbush blueberries and BLMoV in 1 blueberry sample, collected from Istanbul by RT-PCR analysis. These results were also confirmed by sequence analysis. As a result of BlMaV phylogenetic analysis, it was revealed that the isolates of the Marmara Region showed great similarity within themselves and with the isolates of the Black Sea Region on Türkiye, but were quite different from the isolates from other countries. In the phylogenetic analyzes performed with a single BLMoV isolate, it was determined that this isolates showed the most distant homology with an American isolate (MT591564) with a similarity rate of 95.18%. Considering the rapid increase in blueberry production in our country in Türkiye recent years, this study emphasizes the importance of using virus-free production materials and regularly testing new production areas for blueberry viruses.

2024, 51 pages

Key Words: Bursa, DAS-ELISA, İstanbul, RT-PCR, *Vaccinium* spp.

TEŞEKKÜR

Öğrencilik hayatımda varlığı ile benim için önemli bir rol model oluşturan, gerek yüksek lisans tez konumunun belirlenmesinde gerek araştırılması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmalarına ışık tutan ve yardımını esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yine bu araştırmanın yapılmasında desteklerini esirgemeyen, 06.02.2023 tarihinde yaşadığımız deprem afetinde kaybettiğimiz Prof. Dr. Mona GAZEL hocam seni hiç unutmayacağız.

Tez çalışmalarım süresince, tüm laboratuvar çalışmalarında yapmış oldukları katkı ve yardımları nedeniyle Zir. Yük. Müh. Rengin AKKAN, Dr. Kıvılcım ÖRDEK'e ve Doktora Öğrencisi Büşra KARA'ya çok teşekkür ederim.

Arazi çalışmalarında desteklerini esirgemeyen kurum müdürüm Sn. İsa TANRIVERDİ'ye teşekkür ederim.

Beni bu günlere getiren emektar annem Gülnaz TAŞ, babam Abdulkadir TAŞ ve her zaman arkamda duran kardeşim Duygu TAŞ'a teşekkür ederim.

Ve bu yüksek lisans eğitimim boyunca hep yanında olan, her alanda desteğini hiç esirgemeyen, arazi çalışmalarım olsun laboratuvar çalışmalarım olsun her daim yanımda olan sevgili eşim Kübra TÜRKYILMAZ TAŞ'a ve varlığı ile bana şans getiren kızım Amine İkra TAŞ'a sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Blueberry Red Ring Spot Virus (BRRSV).....	3
1.2. Blueberry Mosaic Associated Virus (BlMaV)	3
1.3. Blueberry Scorch Virus (BlScV).....	3
1.4. Blueberry Shoestring Virus (BSSV)	3
1.5. Blueberry Shock Virus (BlShV).....	4
1.6. Blueberry Leaf Mottle Virus (BLMoV)	4
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	6
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	11
3.1. Materyal.....	11
3.1.1. Arazi Sürveyi ve Örneklem	11
3.2. Yöntem	13
3.2.1. DAS-ELISA Testlemeleri	13
3.2.2. Moleküler Çalışmalar	14
3.2.2.1. Maviyemiş Örneklerinden Nükleik Asit (NA) İzolasyonu.....	14
3.2.2.1.1. Morante-Carriel Protokolü Uygulanarak RNA Ekstraksiyonu (Morante-Carriel ve ark., 2014).....	14
3.2.2.1.2. Norgen RNA Ekstraksiyon Kiti ile Modifiye MacKenzie Yöntemiyle RNA İzolasyonu (MacKenzie ve ark., 1997)	16
3.2.2.2. Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Reverse Polymerase Chain Reaction; RT-PCR) Analizleri.....	17
3.2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu(Polymerase Chain Reaction;PCR)Aşaması	18
3.2.2.4. PCR Sonuçları ve Jel Elektrophorez Aşaması.....	22
3.2.2.5. DNA Dizileme ve BLAST Analizleri.....	23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	24
4.1. Arazi Çalışmaları.....	24
4.2. DAS-ELISA Testleri	29
4.3. Maviyemiş Bitkilerinde BlMaV, BLMoV, BlScV, BSSV, BlShV ve BRRSV tespiti amacıyla RT-PCR Analizleri	29
4.3.1. RNA İzolasyonu	29
4.3.2. RT-PCR Analizleri (Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu) 31	
4.3.3. Filogenetik Analizler ve Sonuçları.....	41
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	44
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	48
EKLER.....	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Blueberry örneklerinin testlendiği virüsler ve PCR analizlerinde kullanılan primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri ve baz büyüklükleri.....	18
Çizelge 3.2. BLMaV'nin RNA3 gen bölgesinin çoğaltılmasında uygulanan PCR koşulları.....	19
Çizelge 3.3. BSSV'nin çoğaltılmasında uygulanan PCR koşulları.....	20
Çizelge 3.4. BRRSV'nin çoğaltılmasında uygulanan PCR koşulları	20
Çizelge 3.5. BLMoV'nin çoğaltılmasında uygulanan PCR koşulları	21
Çizelge 3.6. BLSHv'nin çoğaltılmasında uygulanan PCR koşulları.....	21
Çizelge 3.7. BLSv'nin çoğaltılmasında uygulanan PCR koşulları.....	22
Çizelge 4.1. Sürvey kapsamında toplanan bazı maviyemiş örneklerinin farklı izolasyon yöntemiyle ekstrakte edilen RNA'larının nanodrop ölçüm değerleri	31
Çizelge 4.2. Marmara Bölgesinde farklı lokasyonlarda toplanan yabancı ve kültüre alınmış maviyemiş bitki örneklerinin BLMaV, BLMoV, BRRSV için farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları(MY: Maviyemiş)	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Türkiye’de yıllara göre Üretim Alanı (da)–Üretim Miktarı (ton) tablosu (Tüik, 2023).....	6
Şekil 3.1. Marmara Bölgesindeki sürvey yapılan alanlar (1:Bursa-Büyükorhan, 2:Bursa-Osmangazi-Uludağ,3:Bursa-İnegöl, 4:Bursa-Orhaneli,5:İstanbul-Pendik)..	11
Şekil 3.2. Sürvey kapsamında Bursa ilinden örnek alınan kültür (A) ve yabancı (B) maviyemiş plantasyonlarına örnek.....	12
Şekil 3.3. Sürvey yapılan maviyemiş plantasyonlarından örnekler (İstanbul ili Pendik ilçesi Göçbeyli Köyü).....	13
Şekil 4.1. Arazi çalışmalarında virüs benzeri simptom gösteren maviyemiş (A) ve yabancı ot örnekleri (B).....	24
Şekil 4.2. Sürvey kapsamında Bursa-Büyükorhanlı lokasyonundan maviyemiş kültür plantasyonlarından alınan mozaik simptomlu örnekler(A:524, B:525).	25
Şekil 4.3. Sürvey kapsamında Bursa-Büyükorhanlı lokasyonundan maviyemiş kültür plantasyonlarından alınan koyu kahverengi lekeli (a) ve mozaik simptomlu örnekler(A:526, B:527).	25
Şekil 4.4. Sürvey kapsamında Bursa-Büyükorhanlı lokasyonundan maviyemiş kültür plantasyonlarından alınan yaprak üzeri kabarcık simptomlu örneğin arazi ve laboratuvar fotoğrafı(A-B:529).	26
Şekil 4.5. Sürvey kapsamında Bursa ilinden maviyemiş’ten alınan, virüs benzeri simptom gösteren örneklerin laboratuvar fotoğrafı(A: 564,Kültür maviyemiş plantasyonu, Bursa-İnegöl B:587, yabancı maviyemiş plantasyonu, Bursa-Osmangazi).....	26
Şekil 4.6. Sürvey kapsamında İstanbul-Pendik lokasyonundan maviyemiş kültür plantasyonlarından alınan, yaprak damar arası sararma simptomlu örnekler(A:614, B:615).	27
Şekil 4.7. Sürvey kapsamında İstanbul-Pendik lokasyonundan maviyemiş kültür plantasyonlarından alınan, koyu kahverengi lekeli ve yaprak damar arası sararma simptomlu örnekler(A:627, B:636).	27
Şekil 4.8. Sürvey kapsamında İstanbul-Pendik lokasyonundan maviyemiş kültür plantasyonlarından alınan, koyu kahverengi leke simptomlu örnekler(A:637, B:638).....	28
Şekil 4.9. Sürvey kapsamında İstanbul-Pendik lokasyonundan, maviyemiş kültür plantasyonlarından alınan, koyu kahverengi leke ve mozaik leke simptomlu örnekler(A,B:640, C:642).	28
Şekil 4.10. Sürvey kapsamında İstanbul-Pendik lokasyonundan, maviyemiş kültür plantasyonlarından alınan, koyu kahverengi leke, mozaik leke ve yapraklarda sararma simptomlu örnekler(A,B:644, C:650).....	29
Şekil 4.11. Bursa-Büyükorhanlı lokasyonundan alınan 527 nolu maviyemiş örneğinin Morante-Cariel RNA ekstraksiyon yöntemi kullanılarak izole edilen RNA’sının spektrofotometrede 149,6 ng/µl ölçüm değerleri (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD)	30
Şekil 4.12. İstanbul-Pendik lokasyonundan alınan 637 nolu maviyemiş örneğinin Norgen RNA Ekstraksiyon Kiti kullanılarak modifiye MacKenzie Yöntemi’ ile maviyemişlerden izole edilen RNA kalitesini gösteren NanoDrop spektrofotometrede 151,8 ng/µl ölçüm değeri (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD)	30

- Şekil 4.13. İstanbul ve Bursa illerinden toplanan kültüre alınmış ve yabancı maviyemiş örneklerinden blueberry red ring spot virus(BRRSV)’unun CDS/ORF VI (Putative Translational Transactivator) gen bölgesi için spesifik 3F/4R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); 539,540,541,552,553,554,575,576,577: İnegöl/Bursa kültür maviyemiş, 583,584,585,601,602: Uludağ/Bursa yabancı maviyemiş ve 610,623,627,637: Pendik/İstanbul kültür maviyemiş örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su Kontrol37
- Şekil 4.14. İstanbul-Pendik’ten toplanan maviyemiş örneklerinde blueberry mosaic associated virus(BIMaV) tespiti için 3F/R (CP) primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi. M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD,627-675: İstanbul maviyemiş örnekleri -C: Su Kontrol; +C: Pozitif Kontrol38
- Şekil 4.15. İstanbul ve Bursa illerinden toplanan kültür ve yabancı maviyemiş örneklerinden blueberry mosaic associated virus’unun RNA3 (NP) gen bölgesine spesifik F/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); 524-539: İnegöl/Bursa kültür maviyemiş ve 614-650: Pendik/İstanbul kültür maviyemiş örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su Kontrol38
- Şekil 4.16. İstanbul-Pendik’ten toplanan Maviyemiş örneklerinde blueberry leaf mottle virüs (BLMoV) tespiti için RNA1- V1/V2 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi. M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, 631,636,637: İstanbul maviyemiş örnekleri ABD, -C: Su Kontrol; +C: Pozitif Kontrol ..39
- Şekil 4.17. İstanbul ve Bursa illerinden toplanan kültüre alınmış maviyemiş örneklerinden blueberry leaf mottle virus’unun 3’UTR gen bölgesine spesifik V1/V2 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); 631,636,637: Pendik/İstanbul maviyemiş örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su Kontrol .40
- Şekil 4.18. Bursa ilinden toplanan kültüre alınmış maviyemiş örneklerinden blueberry leaf mottle virus’unun 3’UTR gen bölgesine spesifik F/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); 524,538: Durdukaya/Bursa maviyemiş, 539,552,575: İnegöl/Bursa maviyemiş ve 583: Uludağ/Bursa maviyemiş örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su Kontrol40
- Şekil 4.19. Blueberry mosaic associated virus’un RNA3 (NP) gen bölgesi için BIMaV F/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda elde edilen ürünlerinin sekans analizine göre çizilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde, MEGA X yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendrogramda bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir41
- Şekil 4.20. Blueberry leaf mottle virus(BLMoV)’un 3’UTR gen bölgesi için V1/V2 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda elde edilen ürünlerinin sekans analizine göre çizilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde, MEGA X yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendrogramda bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir43

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

°C	: Derece Celsius
bp	: Baz Çifti
cm	: Santimetre
da	: Dekar
V	: Volt
g	: Gram
kb	: Kilo Baz
M	: Molar
mM	: Milimolar
Ha	: Hektar
µg	: Mikrogram
mg	: Miligram
g	: Gram
kg	: Kilogram
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
min	: Dakika
ppm	: Part Per Million (milyon birimde bir birim)
µg	: Mikrogram
ng	: Nanogram
pmol	: Piko Mol
rpm	: Rotation Per Minute (dakikadaki dönme sayısı)

KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
Ark	: Arkadaşları
cDNA	: Complementer Deoksiribonükleik Asit
d2O	: Çift Distile Su
Dk	: Dakika
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Acid
EtBr	: Ethidium Bromid
ETOH	: Ethanol
H ₂ O	: Su
LiCl	: Lithium Chloride

NaCl	: Sodium Chloride
NGS	: Yeni nesil dizileme
PCR	: Polymerase Chain Reaction
TAE	: Tris Asetat EDTA
TE	: Tris EDTA
TÜBİTAK	: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
UV	: Ultraviyole
DNA	: Deoksiribonükleik Asid
BSSV	: Blueberry Shoestring Virus
BRRSV	: Blueberry Red Ring Spot Virus
BlMaV	: Blueberry Mosaic Associated Virus
BlScV	: Blueberry Scorch Virus
BLMoV	: Blueberry Leaf Mottle Virus
ArMV	: Arabis Mosaic Virus
SLRSV	: Strawberry latent ringspot virus
TRSV	: Tobacco ringspot virus
ToRSV	: Tomato ringspot virus
MiLBVV	: Mirafiori lettuce big-vein virus
LRNV	: Lettuce ring necrosis virus
CPsV	: Citrus psorosis virus
RdRp	: RNA'ya bağlı RNA polimeraz
MP	: Hareketlilik proteini
MY	: Maviyemiş
NP	: Nukleokapsid Proteini

1. GİRİŞ

Maviyemiş (*Vaccinium spp.*) ilk olarak 1900'lü yılların başında Amerika Birleşik Devletleri'nde yetiştirilmeye başlanmıştır. Amerika kıtasının keşfinden sonra kıtaya gelen İngilizler, yerli halkın maviyemiş meyvelerini toplayıp tükettiklerini görmüş ve zaman içerisinde az miktarda da olsa ıslahını yapıp kültüre almasıyla üretimine başlamıştır. Maviyemiş dünyada uzun süredir doğrudan tüketilen veya çeşitli gıda sanayinde kullanılan bir üründür. Ülkemizde kültür maviyemiş üretimi son 10 yılda kayda geçmiş olup maviyemişin üretimi, gıda sanayide kullanımı ve tüketimi her geçen yıl artarak devam etmiştir. Maviyemiş *Plantae* alemi, *Magnoliopsida* sınıfı *Ericales* takımı *Ericaceae* familyası *Vaccinium* cinsine tabi olan bitkidir. Ülkemizde *Vaccinium* cinsine giren *Vaccinium vitis-idaea* L., *Vaccinium myrtillus* L., *Vaccinium arctostaphylos* L., ve *Vaccinium uliginosum* L. türleri yaygın olarak görülmektedir. Bu bitki ülkemizin farklı yörelerinde farklı isimlerle anılır. Ardahan'da mosi, Rize'de likapa, Trabzon'da ligarba, Karakavu'da çalıçileği, Rize ili Pazar ilçesinde kaskanaka, Ardeşen ilçesinde çera (çela), Artvin'de morsvi, mahabak, mesi; Giresun'da çalı çiçeği, Ordu'da cırtlık çileği, Yozgat'ta köpek üzümü, diğer bölgelerde ise ayı üzümü, çay üzümü veya çoban üzümü olarak isimlendirilen bu bitki literatüre "maviyemiş" olarak girmiştir (Çelik, 2012). Maviyemiş bitkisinin meyvesinin buğulu veya parlak mavi renginden dolayı "Mavi Altın" (Bluegold) olarak da isimlendirilir. Ülkemizin kuzey doğusunda özellikle Rize Artvin ve Trabzon'da yüksek boylu maviyemiş olan *Vaccinium corymbosum* L. türüne ait bazı çeşitler (Blecrop, Patriot, Duke) ile denemeler yapılmış ve başarılı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Ülkemizde doğal olarak yetişen maviyemiş türleri vardır. Bunlar genelde kısa boylu çalı formunda olan *Vaccinium angustifolium*, *Vaccinium myrtilloides* ve *Vaccinium ashei* türleridir.

Birleşmiş Milletler FAO güncel son verilerine göre 2021 yılında dünya üzerinde 163.741 ha maviyemiş alanından, 1.113.260,6 ton ürün elde edilmiştir. Dünyada 351.130 ton üretimle Amerika Birleşik Devletleri en üst sırada yer alırken onu sırasıyla 227.971 ton ile Peru, 146.551 ton ile Kanada, 122.794 ton ile Şili, 66.481 ton ile Meksika, İspanya, Polonya, Portekiz, Almanya, İtalya, Hollanda, Fransa takip etmektedir. Dünya maviyemiş üretiminde hektara verim olarak 142.117 ton ile Peru başı çekerken Peru'yu sırasıyla İspanya, Meksika, Hollanda, Avusturya, İtalya ve Amerika Birleşik Devletleri izlemektedir.

Ülkemizin kuzey bölgelerinin yüksek kesimlerinde maviyemişin yabani türleri doğal olarak yetişmesine karşın ilk kültür yetiştiriciliği 2000’li yılların başlarında başlamıştır. TÜİK kayıtlarına geçen ilk üretim ise 2013 yılında 485 dekar üretim alanından 170 ton üretim ile olmuştur. Ülkemizde 2013 yılından sonra yine TÜİK kayıtlarına göre üretim artarak devam etmiş ve 2021 yılında 4.187 da alandan 2.496 ton ürün elde edilirken 2022 yılında 6.613 da üretim alanından %72,5 artış ile 4.305 ton ürün elde edilmiştir.

Maviyemiş sağlık açısından oldukça faydalı olup içinde yüksek oranda fenolojik bileşikler ve antioksidan maddeler barındırmaktadır. Besin içeriği olarak 100 g’da 84,21 g su 0,74 g protein 0,33 g lipit 14,49 g karbonhidrat 2,4 g lif, 9,96 g şeker, 57 kcal enerji ve bol miktarda vitamin ve mineral bulunmaktadır (Forney, 2001). Maviyemiş meyveleri taze tüketiminin yanında meyve suyu sanayinde, süt ve yoğurt endüstrisinde, pastacılık ve dondurmacılık sektöründe, şarap yapımında, reçel ve marmelat sanayinde yaygın olarak kullanılırken yaprakları ilaç sanayi ve çay sanayinde kullanılmaktadır. Maviyemişin güneşte veya teknolojik olarak kurutulan meyveleri puding meyveli kek, ekmek ve çöreklerde kullanılmaktadır. Kurutulmuş olan meyveler toz haline getirildikten sonra şeker hastaları için tatlandırıcı olarak değerlendirilmektedir (Çelik, 2005). Maviyemiş gıda sanayi haricinde kozmetik sektöründe sabun ve krem yapımında da kullanılmaktadır.

Maviyemiş ılıman iklim isteği, asitli toprak isteği olan tam güneş alan veya hafif gölgeli, drenajı iyi yapılmış hava akımı iyi olan alanlarda yetiştirilmelidir. Çok düşük sıcaklıklara adaptasyonu sınırlı olduğundan -30 C derece sıcaklığın altına düşmeyen alanlarda nispeten korunaklı alanlarda yetiştirilebilmektedir (Çelik, 2005)

Tüm kültür bitkilerinde olduğu gibi maviyemişte de gelişimi, meyve kalitesini olumsuz etkileyen hastalıklar vardır. Bunların bir kısmı da virüs kökenli hastalıklardır. Maviyemişte görülen viral hastalıklar; blueberry shoestring virus (BSSV), blueberry shock virus (BlShV), blueberry red ring spot virus (BRRSV), blueberry leaf mottle virus (BLMOV), blueberry mosaic associated virus (BlMaV), blueberry scorch virus (BlScV)’dür. Bu viral hastalıkların haricinde maviyemiş ile birlikte farklı konukçu dizisine sahip olan virüsler vardır. Bunlar; tobacco ring spot virus (TRSV), arabis mosaic virus (ArMV), strawberry latent ring spot virus (SLRSV), tomato ring spot virus (ToRSV)’dir (Martin ve ark., 2012).

1.1. Blueberry Red Ring Spot Virus (BRRSV)

Maviyemişlerde hastalık yapan en önemli viral etmenlerden birisidir. İlk olarak 1956 yılında ABD’de kayıtlara girmiş olan hastalık daha sonra birçok ülkede tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalar neticesinde tek taşınma yolunun vejetatif üretim meteryali olduğu tespit edilmiştir. Bu hastalığın en belirgin semptomu genç olmayan yapraklarda dairesel kırmızıdan kahverengine çalan lekelerdir. Bu lekelenmeler yapraklarda olduğu gibi meyve ve gövdede görülebilir. Yoğun ve şiddetli enfeksiyonlarda meyve deformasyonu görülür (Ramsdel ve ark., 1987).

1.2. Blueberry Mosaic Associated Virus (BlMaV)

Maviyemiş mozaikle ilişkili virüs *Ophiovirus* cinsine ait virüslerdendir. Hastalık belirtisi yapraklarda mozaik şeklinde açık sarı, yeşil veya nadiren pembe lekelerdir (Caruso ve ark., 1995). Enfekteli bitkilerin meyvelerinde geç olgunlaşma ve kalite düşüklüğü gözlenmektedir (Martin ve ark., 2009). Hastalık ilk olarak 1950 yılında ABD’de tespit edilmiştir. Ülkemizde Karadeniz Bölgesi’nde tespit edilmiştir (Çağlayan ve ark. 2015). Yine bu bölgede en etkili vektörünün toprak kökenli funguslardan *Olpidium spp.* olduğu bildirilmiştir (Çağlayan ve ark. 2021; Akkan, 2019).

1.3. Blueberry Scorch Virus (BlScV)

Blueberry scorch virus *Carlavirus* cinsine giren bir RNA virüsüdür. İlk olarak 1970 yılında ABD’de kayıtlara geçmiştir. Hastalığın semptomu yaprak ve çiçeklerde görülen nekroz ve yapraklardaki meşe yaprağı şeklindeki görüntüdür. Ülkemizde bu hastalığa sebep olan virüse rastlanılmamıştır.

1.4. Blueberry Shoestring Virus (BSSV)

Blueberry shoestring virus *Sobemovirus* cinsine ait bir RNA virüsüdür. Virüs ilk kez ABD ve Kanada’da kayda girmiştir. Hastalık, bitkide yaşlı sürgünlerde uzun kırmızı lekeler ve yaprakta kızarma daralma ve meşe palamudu yaprağı şeklinde belirtilere sebep

olur. Hastalık verimde önemli kayıplara sebep olur. Hastalığın taşınması maviyemiş afidi olarakta adlandırılan *Illinoia pepperi* ile olur.

1.5. Blueberry Shock Virus (BShV)

Blueberry shock virus ilk olarak 1980 yılında ABD’de literatüre girmiştir. Bu virüsün sebep olduğu hastalık maviyemişin çiçeklenme döneminde yaprak ve çiçeklerde nekrozlaşmaya neden olur. Bununla birlikte yapraklarda solgunluk, yaprak sapında siyah çizgiler ve damarlarda kararma ile şok kurumalar ve dökülmeler görülür.

1.6. Blueberry Leaf Mottle Virus (BLMoV)

Blueberry leaf mottle virus *Nepovirus* cinsine tabi bir virüs olup ilk kez/olarak ABD ve Kanada’da tespit edilmiştir. Dünya üzerinde çeşitli ülkelerde tespit edilen virüs ülkemizde de tespit edilmiştir. Önde gelen belirtileri yapraklarda beneklenme ve lekelenmeler ile şiddetli deformasyon sonucu geriye doğru ölümdür. Virüs polenle, tohumla ve bitki özsuyu ile taşınabilmektedir.

Bilimdeki ilerleme ile birlikte kullanılan “Yeni Nesil Dizileme” (NGS) teknolojisinin virüsler üzerinde de yoğun kullanılmasıyla birlikte birçok viral hastalık etmeni virüs üzerindeki bilinmezlik de ortadan kalkmıştır.

Ülkemizde maviyemiş üretiminin artması ile maviyemiş viral hastalıkları üzerine yapılan çalışmalar da artmıştır. Bu konuda en kapsamlı çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenen 213O042 nolu Türkiye-Slovenya İkili İşbirliği projesi kapsamında yürütülen çalışmadır. Bu çalışma ile ülkemizin önemli maviyemiş üretiminin yapıldığı Karadeniz Bölgesi’nde sürvey çalışması yapılmıştır. Toplanan 157 örnek blueberry leaf mottle virüs (BLMoV), blueberry shock virus (BShV), blueberry shoestring virus (BSSV), blueberry scorch virus (BScV), blueberry mosaic associated virus (BIMaV), blueberry red ring spot virus (BRRSV) virüsleri için ELİSA ve PCR yöntemleri ile testlenmiştir. Testlenen 157 örnekten 23 tanesinde blueberry mosaic associated virus (BIMaV) tespit edilmiştir (Çağlayan ve ark., 2015). Tespit edilen virüslerin sekans analizleri yapılarak NCBI Gen Bankasında kayıtlı olan dünya izolatlarıyla kıyaslanmıştır. BIMaV filogenetik analizlerinde ülkemize ait BIMaV izolatlarının kendi içinde büyük benzerlik gösterdiği

ancak diğerk ÷lkelere ait izolatlardan oldukça farklı olduğu bildirilmiştir (Çağlayan ve ark., 2015; 2016a ve b; 2017a ve b; Gazel ve ark., 2015).

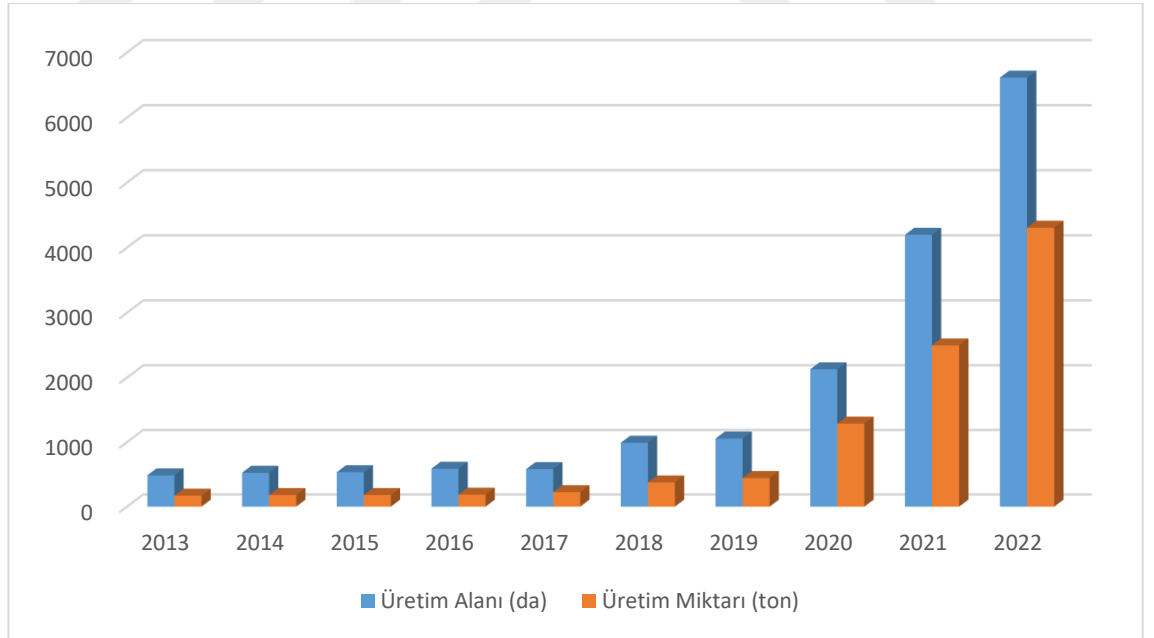
Bu çalışma ile önemli maviyemiş plantasyonlarının bulunduğu Marmara Bölgesi, Bursa ve İstanbul illerinde yabancı ve kültür maviyemiş plantasyonlarında sürvey yapılarak toplanan örnekler ArMV, SLRSV, TRSV, ToRSV, RBDV, BLMoV, BLShV, BLScV, BSSV ve BlMaV açısından DAS-ELISA ve/veya RT-PCR yöntemleriyle testlenmiştir. Böylece, daha önce maviyemiş virüsleri açısından detaylı çalışma yapılmamış olan Marmara Bölgesi'ndeki maviyemiş plantasyonlarında var olan maviyemiş viral hastalıklarının varlığı ve yaygınlık oranının belirlenmesi hedeflenmiştir.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Ağaoğlu ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada, ülkemizde üzüksü meyve üretiminin son yıllarda yaygınlaşmaya başladığını bildirmiştir. Maviyemiş de bu üzüksü meyvelerden birisidir. Üzüksü meyveler için ilk kültür yetiştiriciliği araştırmaları ülkemizde 1960'lı yılların sonlarında başlamıştır. Pazar sıkıntısından dolayı o yıllardan sonra ara verilen araştırmalar 1980'li yıllarda Bulgaristan'dan gelen soydaşlarımızın Bursa ve çevresinde üzüksü meyve yetiştiriciliği ile tekrar başlamıştır. 1995 yılında "Karadeniz Bölgesi Doğal Ahududu Seleksiyon Projesi" ve 1996 yılındaki "Frenk Üzümlü, Ahududu ve Böğürtlen Çeşitleri Islahı Projesi" ile araştırma boyutundaki çalışmalar yeniden devreye alınmıştır.

Maviyemiş üretimi TÜİK kayıtlarına ilk olarak 2013 yılında geçmiştir. Ülkemizde üretim her geçen gün artarak devam etmiş ve 2021 yılında üretim 2.496 tona 2022 yılında ise %72,5 artış ile 4.305 tona ulaşmıştır. Ülkemizde 2022 yılında 3.643 da üretim alanı ile Bursa ilk sırada yer alırken onu sırası ile 1.238 da ile Antalya, 358 da ile Rize, 298 da ile Kırklareli, 272 da ile Yalova takip etmektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Türkiye’de yıllara göre Üretim Alanı (da)–Üretim Miktarı (ton) tablosu (Tüik, 2023)

Dünyada ve ülkemizde üretimi artan maviyemiş için hastalık ve zararlı araştırmaları da önem kazanmıştır. Önemli hastalık etmenleri arasında virüsler bulunur. Maviyemişte hastalık yapan viral hastalıklar konukçusu spesifik olarak maviyemiş olanlar ve geniş konukçu dizinine sahip viral hastalıklar olmak üzere ayrılır. Geniş konukçu dizinine sahip olan virüsler; blueberry fruit drop associated virus (BFDAV), tomato ringspot virüs (ToRSV), blueberry peach rosette mosaic virus (BPRMV), tobacco ringspot virus (TRSV), arabis mosaik virus (ArMV), strawberry latent ringspot virus (SLRSV)'tür. Maviyemişte hastalık yapan spesifik virüsler; blueberry mosaic associated virus (BIMaV), blueberry leaf mottle virus (BLMoV), blueberry scorch virus (BIScV), blueberry necrotic ring blotch virus (BNRBV), blueberry shoestring virus (BSSV), blueberry red ringspot virus (BRRSV) ve blueberry shock virus (BlShV) 'tür

Varney, (1957) yaptığı çalışma ile blueberry mosaic associated virus (BIMaV) *Ophiovirus* cinsine tabi virüs literatüre ilk olarak 1950 yılında ABD'de kayıt altına alınmıştır. Sonrasında Yeni Zelanda, Avrupa, Arjantin ve Şili'de saptanmıştır. Bu hastalığın en önemli ve belirgin semptomları yapraklarda sararma, mozaik oluşumu ve nadiren pembemsi renklenmedir. Hastalığın toprak kökenli funguslar tarafından taşındığına dair ön bulguların son çalışmalar ile doğruluğu teyit edilmiştir.

Shands ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada; BIMaV ile enfekteli bahçeden alınan toprağa dikilen tuzak bitki marulun bir süre sonrasında köklerinde *Olphidium virulentus*'a ait dinlenme sporları gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar ile birlikte bu fungusun Maviyemiş mozaikle ilişkili virüsün (BIMaV) taşıyıcısı olabileceği bildirilmiştir.

Çağlayan ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada; BIMaV ülkemizde ilk olarak Karadeniz Bölgesi'nden toplanan farklı maviyemiş türlerinde saptanarak literatüre girmiştir. Yine aynı çalışma ile ülkemizde ilk ticari plantasyonunun da bulunduğu Rize ve çevresindeki yaylalarda yabani ve kültür plantasyonlarında örnekler toplanmış, testlemeleri yapılmıştır. Yapılan laboratuvar çalışmaları sonucunda BIMaV'ne rastlanmıştır.

Blueberry leaf mottle virus (BLMoV) *Nepovirus* cinsine tabii bir virüstür. BLMoV ilk olarak Amerika ve Kanada'da kayda geçmiş sonrasında Martin ve Tzanetakis (2017) yaptıkları çalışma ile Bulgaristan, Macaristan ve Portekiz'de tespit edilmiştir.

Çağlayan ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada ülkemizde BLMoV saptanmamıştır. Önde gelen semptomları yaprak lekeleri ve şiddetli deformasyonlar, beneklenme ve

geriye doğru ölümdür. Virüs vektörü nematod henüz tespit edilememiştir. Virüs polenle, tohumla ve bitki özsuyuyla taşınmaktadır.

Blueberry scorch virus (BIScV), *Carlavirus* cinsine tabii virüstür. İlk kez 1970 yılında ABD’de saptanarak literatüre girmiştir. Daha sonra ki yıllarda İtalya’da ve Avrupa’nın çeşitli ülkelerinde saptanmıştır. Hastalığın vektörü afitlerdir. Virüsün en belirgin belirtileri arasında ilkbaharda sürgünlerde geriye doğru ölüm ve çiçeklerde kuruma, yanıklık ve yapraklarda “meşe yaprağı” görünümü vardır. Bu virüs bakteriyel kanser hastalığı ile karıştırılabilir.

Brannen ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada; blueberry necrotic ring blotch virus (BNRBV), ilk olarak 2006 yılında ABD ‘de kayıt altına alınmıştır. Virüsün en önemli simptomların arasında yapraklarda yuvarlak nekrotik lekeler vardır. Hastalığın taşınmasına yönelik henüz net bir bilgi yoktur.

Ramsdell (1976) yaptığı çalışma ile blueberry shoestring virus (BSSV) *Sobemovirus* cinsine tabii bir RNA virüsü olarak ilk ABD ve Kanada ‘da tespit edilmiştir. Virüs hastalık yaptığı bitkide %25 varan verim kayıtlarına sebep olmaktadır. Vektörü maviyemiş afiti olarak da adlandırılan *Illinoia pepperi*’dir. En belirgin simptomları arasında gövdede ve çiçek pental yapraklarında uzun kırmızı lekelenmeler ve yapraklarda daralma ile kızarma belirtileridir.

Hutchinson ve ark. (1954) yaptıkları çalışma ile blueberry red ringspot virus (BRRSV) *Soymovirus* cinsine tabii olan maviyemişlerde yaygın görülen virüsü ilk olarak literatüre sokmuşlardır. Daha sonra Japonya, Çek Cumhuriyeti ve Avrupa’nın çeşitli ülkelerinde saptanmıştır. Bu hastalığın en belirgin simptomu yaprak, meyve ve gövde de görülen kırmızı halkalı lekelerdir. Hastalığın en etkin ve tek taşıma yolu vegetatif üretim meralyeleridir.

Blueberry Shock Virus (BlShV) ilk 1980 yılında ABD’de raporlanmıştır. Bu hastalığın önemli simptomu nekrozlaşmadır. Virüse bağlı nekrozlar çiçeklenme döneminde yaprak ve çiçeklerde görülür. Hastalığın ilerleyen zamanlarında yaprak ve çiçek dökülmelerine görülür. Taşınımı polen ile gerçekleşir.

Çağlayan ve ark. (2015; 2016; 2017), Gazel ve ark. (2015) ve Elçi ve ark. (2015) yaptıkları çalışmalar ülkemizde maviyemiş viral hastalıklarına karşı en kapsamlı çalışmalar olup, TÜBİTAK-213O042 nolu proje kapsamında yapılmıştır. Bu proje Türkiye–Slovenya ikili iş birliği ile yapılmıştır. Proje ile ülkemizde bulunan kültür ve

yabani maviyemiş plantasyonları da survey çalışmaları yapılarak örnekler toplanmıştır. Toplanan örnekler BLMaV, BRRSV, BLSV, BLMoV, BLSHv ve BSSV'lerine karşı DAS-ELISA ve/veya PCR yöntemleri ile testlenmiştir. PCR sonucu olarak 157 örnekten 23'ünde BLMaV'ne rastlanmıştır. Rastlanılan BLMaV'lerinin filogenetik analizleri sonucunda ülkemizdeki BLMaV'ler ile benzerlik taşıdığı fakat gen bankasındaki diğer BLMaV'ler ile farklı olduğu tespit edilmiştir.

Acioğlu (2018) hazırladığı, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi 525300 Tez nolu “*Rubus* ve *Vaccinium* Türlerinde Yeni Giriş Yapan Virüslerin Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması ve Karakterizasyonu” konulu tezde Karadeniz Bölgesi ve Bursa’ndan alınan 122 örnek BSSV, BFDaV, BBLV'lerine karşı testlenmiş fakat herhangi bir virüse saptanmamıştır.

Asil (2019) hazırladığı, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi 597691 Tez nolu “Ülkemizde Yetişen Kültür ve Yabani Maviyemiş Bitkilerindeki “Blueberry Mosaic Associated Virus” İzolatlarının Kısmi Sekans Analizleri” konulu tezde Rize, Trabzon, Samsun, Giresun ve Mersin illerinden 136 örnek toplanmış ve testlenen maviyemişlerin 39 tanesi BLMaV'nin RNA3 bölgesini çoğaltan primerle pozitif bulunurken aynı örnekler RNA2 gen bölgesini çoğaltan primerle testlendiğinde 7, RNA1 bölgesini çoğaltan primerlerle testlendiğinde ise 8 örnek pozitif bulunmuştur.

Güneşli (2019) hazırladığı, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi 539458 Tez nolu “Blueberry Red Ringspot Virus (BRRSV)’ünün Maviyemiş Türlerinde ve Olası Diğer Konukçularında Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması ve Karakterizasyonu” konulu tezde Karadeniz bölgesinden önemli maviyemiş plantasyonlarının bulunduğu illerden ve Bursa ve Mersin’den toplanan 179 örnek BRRSV'ne karşı testlenmiştir. BRRSV 3F/4R primeri kullanılarak önce PCR sonrasında DNA sekans analizi yapılmış fakat blueberry red ringspot virus (BRRSV)'ne rastlanılmamıştır.

Akkan (2019) hazırladığı, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi 703892 Tez nolu “Maviyemişlerde (*Vaccinium* spp.) Blueberry Mosaic Associated Virus (BLMaV)’un Olpidium Türleri İle Taşınabilme Durumunun ve Hastalığın Epidemiyolojisindeki Olası Rollerinin Araştırılması” konulu tezde; Rize’de farklı alanlarda yabani ve kültüre alınmış maviyemiş plantasyonlarından 35 örnek alınmıştır. BLMaV'nin RNA3 genini çoğaltan primerler ile yapılan RT-PCR teslemesiyle kültür maviyemişlerinde %83, yabani maviyemişlerde ise %55 BLMaV ile enfekteli bitki tespit edilmiştir. Bu çalışma

sonucunda ÷lkemizin en önemli maviyemiş üretime yapılan illerinden olan Rize’de 3 farklı lokasyonda B1MaV’nin potansiyel vektörü olarak bildirilen *O. virulentus* gerek morfolojik gerekse molek÷ler yöntemlerle tespit edilmiş ve B1MaV’nin bu fungus türü ile deneysel olarak marul ve maviyemiş fidelerine başarıyla taşındığı ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışma ÷lkemizde B1MaV’nin taşınmasına yönelik ilk çalışma olmasının yanı sıra B1MaV’nin deneysel konukçusu olarak marul dünyada ilk kez bu çalışma ile saptanmıştır.

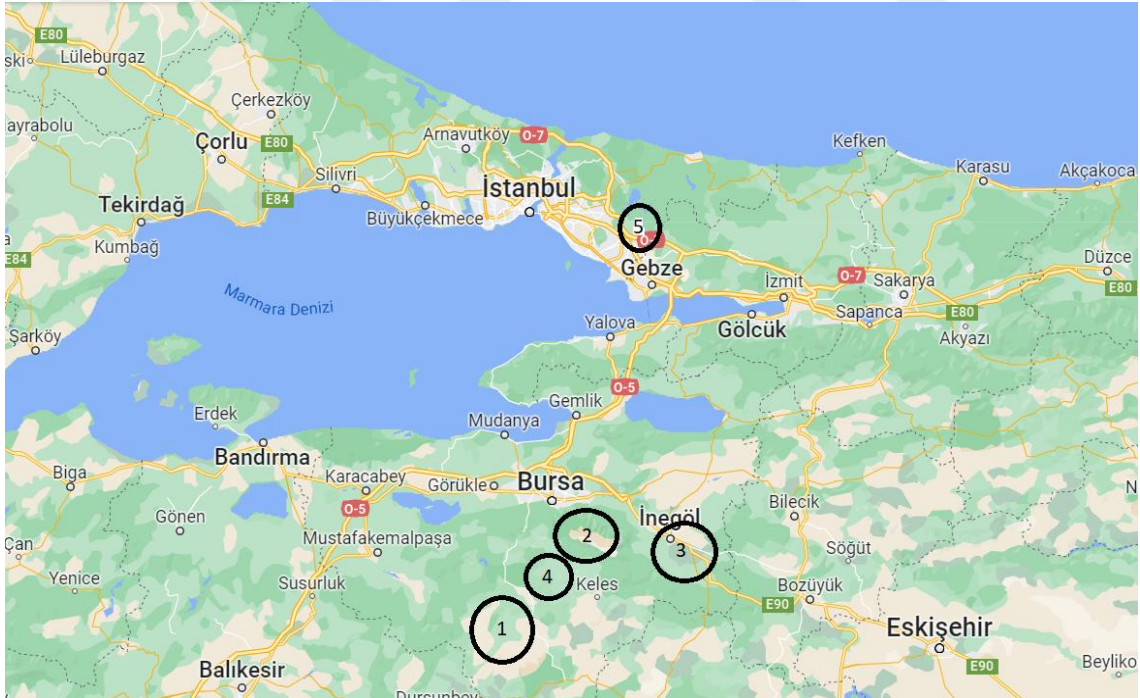


3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Arazi Sürveyi ve Örneklem

Marmara bölgesindeki önemli maviyemiş (*Vaccinium* spp.) plantasyonlarının bulunduğu Bursa ve İstanbul illerinde yabani ve kültür alanları gerek İl/İlçe Tarım ve Orman Müdürlüklerinden, gerek tarım ile ilgili kooperatiflerden bilgi alınarak ön hazırlık ve planlama yapılmıştır. 2022 yılının haziran ayında planlanan yerlerden ilk olarak Bursa iline gidilmiştir. Bursa'nın Osmangazi ilçesi Uludağ bölgesinde 27 örnek, Büyükşehir ilçesinde 15 örnek, İnegöl ilçesinde 37 örnek ve Orhaneli ilçesinde 7 örnek olmak üzere toplam 86 örnek alınmıştır. Osmangazi'de alınan 27 örnek yabani plantasyona, Büyükşehir'da virüs benzeri simptom gösteren 1 örnek yabancı ota ait iken diğer tüm örnekler kültür plantasyonlarına aittir. Yine aynı yılın ağustos ayında İstanbul'da ise Pendik ilçesinde bulunan ticari maviyemiş bahçesinden toplam 41 örnek alınmıştır.



Şekil 3.1. Marmara Bölgesindeki sürvey yapılan alanlar (1:Bursa-Büyükorhan, 2:Bursa-Osmangazi-Uludağ, 3:Bursa-İnegöl, 4:Bursa-Orhaneli, 5:İstanbul-Pendik).

Sürvey kapsamında örnekler toplanırken viral hastalık belirtileri gösteren örneklerle ilave olarak virüsün bitkide latent dönem geçirdiği varsayımı ile belirli bir belirti göstermeyen maviyemişlerden de örnekler alınmıştır. Örnekler bitkinin yaprak, meyve ve genç sürgünlerden alınmıştır.



Şekil 3.2. Sürvey kapsamında Bursa ilinden örnek alınan kültür (A) ve yabani (B) maviyemiş plantasyonlarına örnek



Şekil 3.3. Sürvey yapılan maviyemiş plantasyonlarından örnekler (İstanbul ili Pendik ilçesi Göçbeyli Köyü)

Alınan örnekler uygun koşullarda plastik poşetlere konularak etiketlenmiştir. Örneklerin kurumaması için nemlendirilerek, +4°C’de saklanarak laboratuvara gönderilmiştir. Laboratuvar ortamında tüm örnekler daha sonraki testlemelerde kullanılmak için isimlendirilmiş ve fotoğraflanarak kayıt altına alınmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. DAS-ELISA Testlemeleri

DAS-ELISA testlerinde ticari olarak antiserum üretilmiş olan ArMV, SLRSV, TRSV, ToRSV, RBDV, BLMoV, BLShV, BLScV ve BSSV virüsleri için Bioreba ve Agdia firmalarında temin edilen ELISA belirteçleri kullanılarak standart DAS-ELISA tekniği uygulanmıştır (Clark ve Adams, 1977). Her virüs için firmaların protokollerinde belirtilmiş olan sulandırma oranları dikkate alınmış ve tüm tampon çözeltiler firma

önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır. Daha önceki çalışmaların ışığı altında firma protokolüne ek olarak nikotinli ezme tamponu “(NT) (180 ml of 0.5 M Borik Asit, 3.8 gr NaBorate ($\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), 40.0 gr Polyvinylpyrrolidone, 4.0 gr yağsız süt tozu, 1.0 ml Tween-20 ve 10 ml nikotin, pH 8)” kullanılmıştır (Çağlayan, K. TÜBİTAK Projesi (213O042) Sonuç Raporu). Sonuçlar ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyundaki filtre kullanılarak değerlendirilmiştir. Buna göre negatif örneklerin optik densite (OD) ortalamalarının 2 katı ve daha üzerindeki değerleri veren örnekler pozitif olarak kabul edilmiştir.

3.2.2. Moleküler Çalışmalar

3.2.2.1. Maviyemiş Örneklerinden Nükleik Asit (NA) İzolasyonu

Araziden toplanılarak laboratuvara getirilen örnekler kayıt altına alındıktan sonra örneklerin hastalık belirtileri gösteren/göstermeyen alanlarından, yaprak, meyve ve sürgünden steril bisturi yardımıyla dokular alınmıştır. Alınan dokular steril seramik havanlarda sıvılaştırılmış azot ilave edilerek parçalanmıştır. Parçalanmış örnekler RNA ekstraksiyonu yapıncaya kadar ependorf tüplere alınarak -80°C 'de saklanmıştır. Morante-Carriel protokolü uygulanarak RNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1.1. Morante-Carriel Protokolü Uygulanarak RNA Ekstraksiyonu (Morante-Carriel ve ark., 2014)

Yıkama Aşaması;

- Parçalanmış örneğimizden hassas terazide ölçülerek 500 mg havana alınmıştır. İçerisine 1,5 ml washing buffer (yıkama solüsyonu) eklenerek havanda ezilmiştir.
- Ezilen karışımdan 2 ml hassas pipetler ile ependorf tüpe alınmış ve vortexlenmiştir.
- Ependorf tüpler $+4^\circ\text{C}$ de 5600 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek. Santrifüjden alınan ependorf tüpün üst kısmında kalan kısım atılmıştır.

İzolasyon Aşaması;

- Daha önceden hazırlayarak 65°C sıcaklığa ulaştırılan izolasyon bufferını örnek başına 1,5 ml olacak şekilde ilave edilmiş ve vortexlenmiştir.

- Ependorf tüpler 10 dakika boyunca 2 dakikada bir karıştırılarak 65°C’de inkübe edilmiştir.
- Mevcut örneğimizden 1 ml hassas pipetler yardımıyla alınarak ependorf tüpe aktarılmış ve ilave olarak Chloroform İsoamilalkol (24:1) ilave edilmiş ve beyaz renk alıncaya kadar karıştırılmıştır.
- Ependorf tüpler 6.700 rpm devirde 10 dakika +4°C’de santrifüjlenmiştir.
- Çökelen kısmın üstünde kalan kısım alınmış ve eşit hacimde chloroform isoamilalkol (24:1) ilave edilerek karışması sağlanmıştır.
- Ependorf tüpler 10.000 rpm devirde 10 dakika süreyle +4°C sıcaklıkta santrifüj yapılmıştır.
- Santrifüj sonrası ependorf tüpün üstte kalan kısmı farklı bir ependorf tüpe alınmış ve üzerine 0,1 hacim sodium asetat (NaoAc) (3M, pH:5,2) ve 0,6 hacim isopropanol eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır.
- Ependorf tüpler 30 dakika -80°C sıcaklıkta daha sonra 1 saat -20°C sıcaklıkta inkübasyon yapılmıştır.
- Tüpler 20 dakika 14.000 rpm devirde +4°C derecede santrifüj edilmiştir.

Saflaştırma Aşaması;

- Oluşan pellet 100 µl d2H2O ile birleştirilerek pellet çözündürülmüştür. Üzerine 0,3 hacim 10 M LiCl (Lityum klörür) ilave edilmiş ve buz kütesinin içerisinde 90 dakika inkübe edilmiş ve bu döngü 2 defa yapılmıştır.
- Döngü sonrasında tüpler 14.000 rpm devirde 30 dk süreyle +4 °C’de santrifüj yapılmıştır.
- Başka bir seçenek olarak bir defa LiCl (Lityum Klörür) eklendikten sonra bir gece +4 °C’de inkübe edilmiştir.
- Daha sonra tüpler 14.000 rpm devirde 30 dakika boyunca +4°C’de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında tüp içerisinde ayrılan kısımdan sıvı faz dökülerek uzaklaştırılmıştır.
- Pellet üzerine 100 µl miktarda d2H2O eklenerek pellet çözündürülmüştür.
- Üzerine 0,1 haciminde NaoAc (3M) ile 2 hacim soğuk ethanol (%96) ilave edilerek karıştırılmıştır.
- Tüpler 14.000 rpm devirde 20 dakika süreyle +4°C’de santrifüj edilmiştir.

- Oluşan pellet 200 µl hacminde %70 saflıkta soğuk alkolle yıkanmıştır.
- Az bir santrifüj yapıldıktan sonra alkol uzaklaştırılmıştır.
- Ependorf tüpler 20 dakika oda sıcaklığında kurutulmuştur.
- Daha sonra pellete 40 µl hacminde d2H₂O konularak çözündürülmüştür.
- RNA içerikli Nükleik asitler elde edilmiştir.
- Nükleik asitler moleküler analizlerde kullanılmak üzere -80°C’de saklanmıştır.

3.2.2.1.2. Norgen RNA Ekstraksiyon Kiti ile Modifiye MacKenzie Yöntemiyle RNA İzolasyonu (MacKenzie ve ark., 1997)

- 50 mg bitki dokusu steril araçlar ile alınıp hassas terazide tartılarak ezilmiştir ve ependorf tüplere aktarılmıştır.
- 600 µl miktarda Lyzis Buffer C eklenmiş ve vortexlenmiştir.
- 55°C sıcaklıkta 5 dakika inkübe edilmiştir. Tüpler bu esnada 2-3 defa alt-üst edilmiştir.
- Filter column (şeffaf o-ring) koleksiyon tüpüne aktarılmıştır. Mevcut lizatın tamamı hassas pipet yardımıyla ilgili kolona aktarılmıştır.
- 14.000 rpm devirde 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj sonrasında filtre edilen sıvı kısım farklı bir tüpe alınmıştır. Üzerine eşit hacimde % 96-100 oranında ethanol ileve edilerek vortexten geçirilmiştir.
- Spin column (grey-o-ring) koleksiyon tüpüne yerleştirilmiştir.
- Ethanol-lizatın birlikte bulunduğu solüsyondan 600 µl hacminde ilgili kolona aktarılmıştır.
- 600 rpm devirde 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Sıvı olan bölüm pipet ile alınarak atılmıştır. Spin kolon yeniden koleksiyon tüpüne yerleştirilmiştir.
- Not: Eğer spin kolonda santrifüj sonrasında sıvı bulunuyorsa 14.000 rpm devirde birkaç dakika ilave santrifüj yapılır.
- Lizat hacmine bağlı olarak bir önceki adım tekrar edilmiştir.
- Sonrasında tekrar aynı koleksiyon tüpüne eklenerek spin kolonun üzerine 400 µl hacminde wash solüsyon A(yıkama solüsyonu) eklenmiştir.
- 14.000 rpm devirde 1 dakika süreyle santrifüj edilmiştir.

- Santrifüj sonunda atık sıvı bölüm pipet ile alınarak atılmıştır ve bu işlem 3 defa tekrarlanmıştır.
- Son döngü de tamamlandıktan sonra atık sıvı bölüm tüpten alınarak atılmıştır. Spin kolon tekrardan koleksiyon tüpüne konulmuştur. Kolonu kurulamak için 14.000 rpm devirde 2 dakika süreyle santrifüj edilmiştir.
- Sonrasında Spin kolon filtre alınarak koleksiyon tüp atılmıştır.
- Spin kolon filtre 1,7 ml'lik Elution tüpün içine yerleştirilmiştir. Üzerine 50 µl hacminde Elution solüsyon A ilave edilmiştir.
- Sonrasında 2 dakika süreyle 2.000 rpm devirde santrifüj yapılmıştır. Bu işlemi takiben 14.000 rpm devirde 1 dakika daha santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonucunda sıvı geçmezse tekrar santrifüj yapılmıştır.
- Santrifüj sonucunda yakalanan RNA'lar Nanodrop cihazı ile ölçülmüştür ve -80°C'de dolapta saklanmıştır.

3.2.2.2. Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Reverse Polymerase Chain Reaction; RT-PCR) Analizleri

RNA virüsleri tek zincirli bir nükleik asit içerdiğinden ilk olarak RNA'nın cDNA'sı elde edilmiştir. Bu aşamada her bir örnek için tüplere;

- Random Hexamer Primer 1 µl
- d2H₂O 6,5 µl
- RNA 5 µl

eklenmiştir. Kullanılan tüm kimyasallar buz içeren kaplarda tutulmuş ve soğuk zincir korunmuştur. Hazırlanan RNA içerikli tüpler PCR cihazına konulmuş ve 94°C'de 5 dakika bekletilip daha sonrada 5 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra her bir tüpe:

- 4 µl 5xRT tamponu
- 2 µl d2H₂O
- 0,5 µl dNTP (10 mM)
- 1 µl RT enzimi eklenmiştir.

Daha sonraında tüpler PCR cihazına yerleştirilerek 42°C derecede 1 saat süreyle ikinci döngüde 72°C’de 10 dakika PCR cihazında bekletilmiştir ve cDNA oluşturulmuştur.

3.2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu(Polymerase Chain Reaction;PCR)Aşaması

PCR çalışmamızda kullanılan gen bölgeleri Çizelge 3.1.’de tablo halinde verilmiştir. PCR aşamasında virüse özgü primerler ve PCR döngüleri kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Blueberry örneklerinin testlendiği virüsler ve PCR analizlerinde kullanılan primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri ve baz büyüklükleri

Virüs Adı	Primer Dizini	Primer Uzunluğu (bp)	Kaynakça
BIMaV	RNA3 F-GCCCTTGTCAATTCAGTGTTAA RNA3 R-CAAGCGGAAACACAAGGAAA	350	(Isogai ve ark., 2016)
BSSV	F- ATGGGATTGTCGGTTGCC R- CACCAATCAGATCCAATGAG	387	(Tzanetakis ve ark.,) yayımlanmamış
BRRSV	3F-ATCAGTCCCAGAAGAAAAGAAGTA 4R-TCCGAAAAATAGATAGTGTCAGC	549	(Polashock ve Ehlenfeldt., 2009)
BLMoV	F- TTATTCTGGTGAAATTCCA R- TCATCCAAGAAGTGGGTGCCA	551	(Tang ve ark., 2014)
BLMoV	F- GTCGTAAATAGGACACCCTC R- TATACCGATTTCACGGAACC	436	Slovenya
BIShV	F- TATTCCGGCAGTTCGATAAC R- TCGGGGCATCTAATTCCTTC	993	(Tzanetakis and Martin, 2008)
BIScV	F- GAAAGAAGCACCGGCTCAATC R- GGAGATCTTGGCCATTTGCTC	403	(Ciuffo ve ark., 2005)

BlMaV için PCR aşamasında RNA3 (Nukleokapsid Proteini) bölgesinde çoğalan Çizelge 3.1.'de yer alan 350 bp büyüklüğünde ürün veren primer çifti kullanılmıştır. PCR aşamasında;

- 17,4 µl d2H₂O
- 2,5 µl 10XB(NH₄)SO₄
- 1 µl dNTP (10 mM)
- 1,5 µl MgCl₂ (25 mM)
- BlMaV'ye özgü 0,2 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl)
- 0,3 µl Taq-DNA polymerase
- Ve son olarak 2 µl daha önce hazırlanan cDNA ependorf tüp içerisine eklenerek PCR için gerekli karışım oluşturulmuştur.

Çizelge 3.2. BlMaV'nin RNA3 gen bölgesinin çoğaltılmasında uygulanan PCR koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	94°C	3 Dakika	1
Denatürasyon	94°C	20 Saniye	40
Bağlanma	55°C	20 Saniye	
Uzama	72°C	1 Dakika	
Son Uzama	72°C	7 Dakika	1

BSSV için için PCR aşamasında Çizelge 3.1.'de yer alan 387 bp büyüklüğünde ürün veren primer çifti kullanılmıştır. PCR aşamasında;

- 16.8 µl d2H₂O
- 2,5 µl 10XB
- 2µl dNTP (2,5 mM)
- 1,5 µl MgCl₂ (25 mM)
- BSSV'ye özgü 1 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl)
- 0,2 µl Taq-DNA polymerase
- 2 µl cDNA ependorf tüpe eklenerek PCR aşamasında kullanılan karışım oluşturulmuştur.

Çizelge 3.3. BSSV'nin çoğaltılmasında uygulanan PCR koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	94°C	2 Dakika	1
Denatürasyon	94°C	20 Saniye	35
Bağlanma	55°C	20 Saniye	
Uzama	72°C	30 Saniye	
Son Uzama	72°C	10 Dakika	1

BRRSV için PCR aşamasında Çizelge 3.1.'de yer alan 549 bp büyüklüğünde ürün veren primer çifti kullanılmıştır. PCR aşamasında;

- 8 µl d2H₂O
- 1,25 µl 10XB
- 1 µl dNTP (2,5 mM)
- 0,75 µl MgCl₂ (25 mM)
- BRRSV'ye özgü 0,25 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl)
- 0,1 µl Taq-DNA polymerase
- 1,2 µl cDNA ependorf tüpe eklenerek PCR aşamasında kullanılacak karışım oluşturulmuştur.

Çizelge 3.4. BRRSV'nin çoğaltılmasında uygulanan PCR koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	94°C	3 Dakika	1
Denatürasyon	94°C	30 Saniye	35
Bağlanma	51°C	45 Saniye	
Uzama	72°C	1 Dakika	
Son Uzama	72°C	10 Dakika	1

BLMoV için PCR aşamasında Çizelge 3.1.'de yer 551 bp ve 436 bp büyüklüğünde ürün veren primer çiftleri ayrı ayrı kullanılmıştır. PCR aşamasında;

- 16,4 µl d2H₂O
- 2,5 µl 10XB
- 0,5 µl dNTP (10 mM)
- 1,5 µl MgCl₂ (25 mM)

- BLMoV'ye özgü 1 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl)
- 0,1 µl Taq-DNA polymerase
- 2 µl cDNA ependorf tüpe eklenerek PCR aşamasında kullanılacak karışım oluşturulmuştur.

Çizelge 3.5. BLMoV'nin çoğaltılmasında uygulanan PCR koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	94°C	3 Dakika	1
Denatürasyon	94°C	30 Saniye	40
Bağlanma	55°C	1 Dakika	
Uzama	72°C	1 Dakika	
Son Uzama	72°C	7 Dakika	1

BlShV için PCR aşamasında Çizelge 3.1.'de yer alan 993 bp büyüklüğünde ürün veren primer çifti kullanılmıştır. PCR aşamasında;

- 16,4 µl d2H₂O
- 2,5 µl 10XB
- 0,5 µl dNTP (10 mM)
- 1,5 µl MgCl₂ (25 mM)
- BlShV'ye özgü 1 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl)
- 0,1 µl Taq-DNA polymerase
- 2 µl cDNA ependorf tüpe eklenerek PCR aşamasında kullanılacak karışım oluşturulmuştur.

Çizelge 3.6. BlShV'nin çoğaltılmasında uygulanan PCR koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	94°C	3 dakika	1
Denatürasyon	94°C	30 Saniye	35
Bağlanma	55°C	45 Saniye	
Uzama	72°C	45 Saniye	
Son Uzama	72°C	10 Dakika	1

BlScV için PCR aşamasında Çizelge 3.1.'de yer alan 403 bp büyüklüğünde ürün veren primer çifti kullanılmıştır. PCR aşamasında;

- 16,4 µl d2H2O
- 2,5 µl 10XB
- 0,5 µl dNTP (10 mM)
- 1,5 µl MgCl₂ (25 mM)
- B1ScV'ye özgü 1 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl)
- 0,1 µl Taq-DNA polymerase
- 2 µl cDNA ependorf tüpe eklenerek PCR aşamasında kullanılacak karışım oluşturulmuştur.

Çizelge 3.7. B1ScV'nin çoğaltılmasında uygulanan PCR koşulları

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	94°C	3 Dakika	1
Denatürasyon	94°C	30 Saniye	35
Bağlanma	56°C	45 Saniye	
Uzama	72°C	1 Dakika	
Son Uzama	72°C	10 Dakika	1

3.2.2.4. PCR Sonuçları ve Jel Elektroforez Aşaması

PCR aşamasında elde edilen sonuçları somutlaştırmak gözle görülebilir ve yorumlanabilir bir okuma için jel elektroforez uygulanmıştır.

- 1 gr Agaroz
- 100 ml 1xTAE (Tris-Asetat-EDTA) karıştırılarak %1 lik agaroz jel hazırlanmıştır.
- İçerisine 4 µl redsafe katılmış ve jelle florasan ışık altında ayırt edici özellik kazandırılmıştır.

Oda sıcaklığında jel formunda bulunan tampon çözelti mikrodalga fırında çözündürülerek jel tarakları yerleştirilmiş olan jel tabakasına düz bir zeminde ılık formda akışkan kıvamda dökülmüştür. Agaroz jelin polimerizasyonu için 40 dakika bekletilmiştir. Polimerizasyon işlemi ile jel kıvamına dönen agaroz tablasının içerisindeki taraklar dikkatlice ve yükleme yuvalarının bozulmamasına dikkat edilerek alınmış ardından elektroforez tankına konulmuştur. Elektroforez tankına 1xTAE tamponu agaroz jel tablasını tamamen kapatacak şekilde ilave edilmiştir. Agaroz jelde bulunan yükleme yuvalarına DNA marker ile beraber PCR ürünleri ve pozitif kontrol olarak kullanılan

örnekler jel çukurlarına dikkatlice yuva dışarısına taşırmamak suretiyle yüklenmiştir. Bir yuva boş bırakılarak negatif kontrol olarak su kullanılmıştır.

Yükleme aşaması tamamlandıktan sonra güç kaynağı elektroforezin ilgili alanlarına bağlanarak 150 Volt elektrik akımı 50 dakika verilmiştir. Jel UV ışık ile incelenmiş pozitif kontrolün karşılığı DNA marker’da tespit edilmiş ve örneklerimiz ile karşılaştırılarak değerlendirme yapılmıştır. Pozitif kontrol ile aynı boyutta bant oluşumu bulunanlar pozitif, diğerleri negatif kabul edilmiştir. Jel fotoğraflandırılarak kayıt altına alınmıştır.

3.2.2.5. DNA Dizileme ve BLAST Analizleri

PCR aşamasından sonra çoğalan her bir izolata ait PCR ürünleri olan DNA fragmentlerinin baz dizileri tespiti için PCR ürünleri özel bir firmaya (Medsantek, İstanbul) gönderilmiş ve sonuçlar internet ortamında online olarak temin edilmiştir. Elimize ulaşan baz dizileri izolatların kayıtlı olduğu NCBI veri tabanında bulunan izolat kayıtları ile karşılaştırılmış ve hizalama analizleri (BLAST) ile benzerlikleri karşılaştırılmıştır.

Çoklu baz dizisi kıyaslamaları MEGA X programı ile (Kumar ve ark., 2018) kıyaslanarak Neighbour-Joining metodu (Saitou ve Nei, 1987) kullanılarak yapılmıştır.

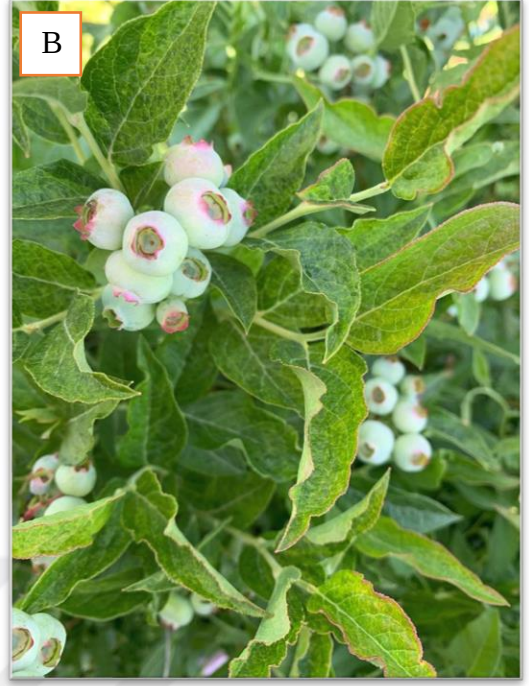
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Arazi Çalışmaları

Arazi çalışmaları, Marmara Bölgesi'nin önemli maviyemiş üretim alanı ve yabani plantasyonlarının bulunduğu Bursa ve İstanbul illerinde yapılmıştır. Bursa ilinin Osmangazi, Büyükorhan, İnegöl ve Orhaneli ilçesinden 86 örnek alınmış olup 27 örnek yabani plantasyona, 1 örnek ise yabancı ota aittir. İstanbul ilinde ise yoğun bir kültür plantasyonunun bulunduğu Pendik ilçesinden 41 örnek alınmıştır. Alınan örneklerde en yaygın simptomlar yapraklarda mozaikleşme, rozetleşme, renk açılması, kırmızımsı pembemsi renk değişikliği, bitkide akranlarına göre gelişme geriliği, gövde ve sürgünlerde ise boğum aralarında kısılma olarak gözlenmiştir (Şekil 4.1).



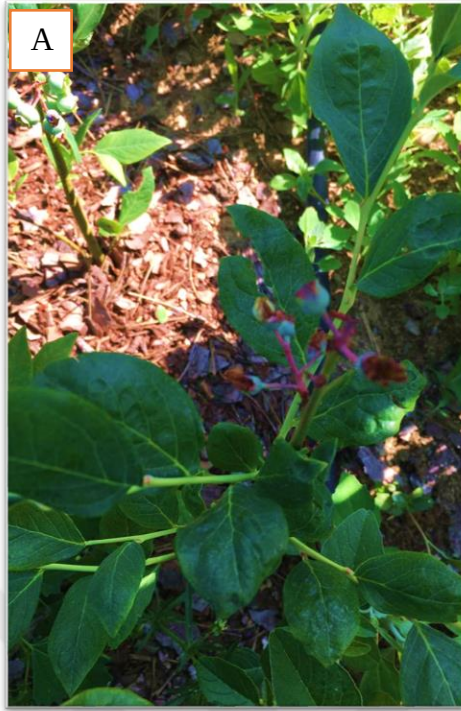
Şekil 4.1. Arazi çalışmalarında virüs benzeri simptom gösteren maviyemiş (A) ve yabancı ot örnekleri (B).



Şekil 4.2. Sürvey kapsamında Bursa-Büyükorhanlı lokasyonundan maviyemiş kültür plantasyonlarından alınan mozaik semptomlu örnekler(A:524, B:525).



Şekil 4.3. Sürvey kapsamında Bursa-Büyükorhanlı lokasyonundan maviyemiş kültür plantasyonlarından alınan koyu kahverengi lekeli (a) ve mozaik semptomlu örnekler(A:526, B:527).



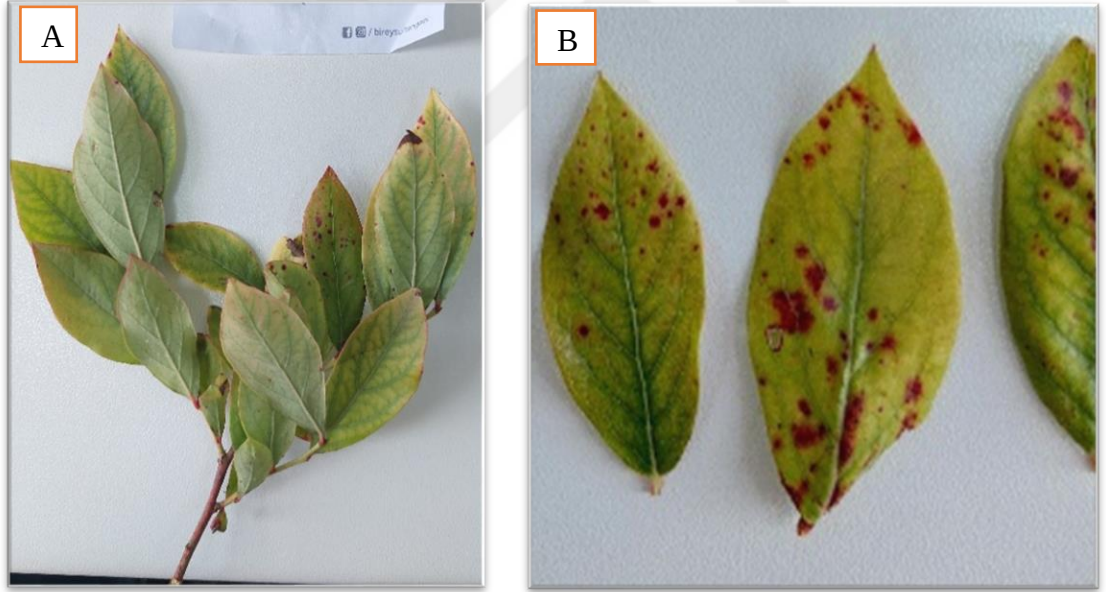
Şekil 4.4. Sürvey kapsamında Bursa-Büyükorhanlı lokasyonundan maviyemiş kültür plantasyonlarından alınan yaprak üzeri kabarcık simptomlu örneğin arazi ve laboratuvar fotoğrafı(A-B:529).



Şekil 4.5. Sürvey kapsamında Bursa ilinden maviyemişden alınan, virüs benzeri simptom gösteren örneklerin laboratuvar fotoğrafı(A: 564,Kültür maviyemiş plantasyonu, Bursa-İnegöl B:587, yabani maviyemiş plantasyonu, Bursa-Osmangazi).



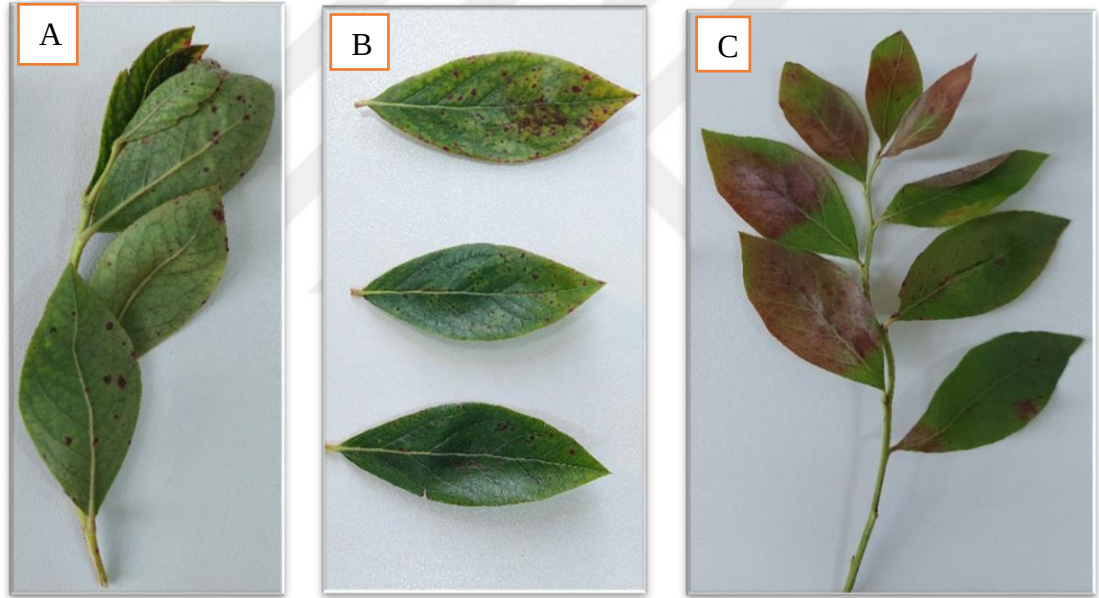
Şekil 4.6. Sürvey kapsamında İstanbul-Pendik lokasyonundan maviyemiş kültür plantasyonlarından alınan, yaprak damar arası sararma semptomlu örnekler(A:614, B:615).



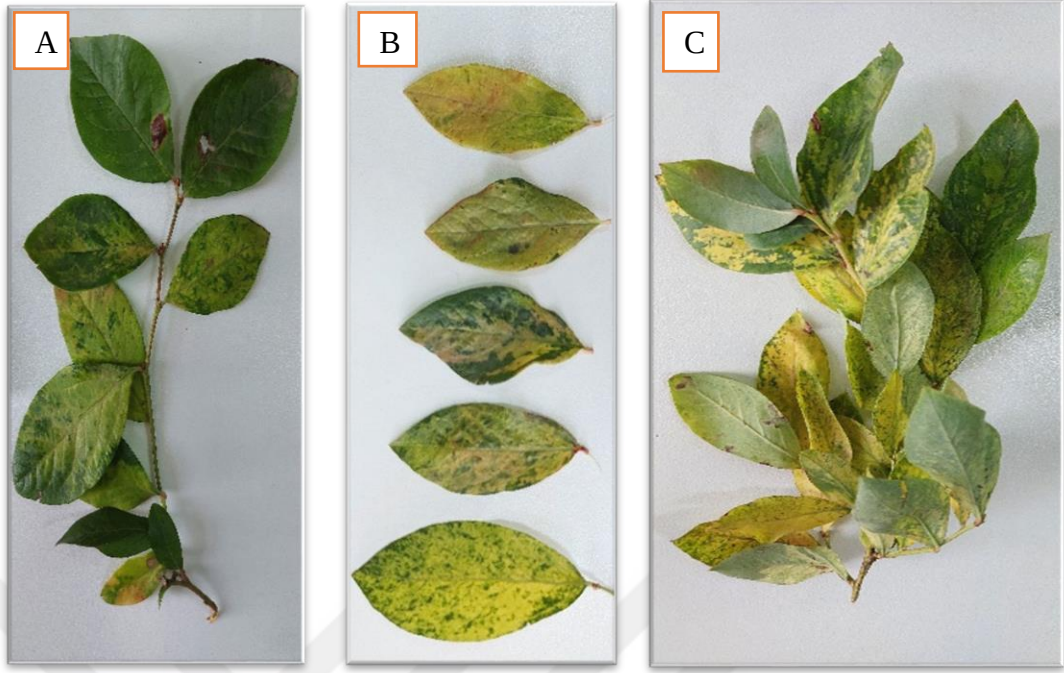
Şekil 4.7. Sürvey kapsamında İstanbul-Pendik lokasyonundan maviyemiş kültür plantasyonlarından alınan, koyu kahverengi lekeli ve yaprak damar arası sararma semptomlu örnekler(A:627, B:636).



Şekil 4.8. Sürvey kapsamında İstanbul-Pendik lokasyonundan maviyemiş kültür plantasyonlarından alınan, koyu kahverengi leke simptomlu örnekler(A:637, B:638).



Şekil 4.9. Sürvey kapsamında İstanbul-Pendik lokasyonundan, maviyemiş kültür plantasyonlarından alınan, koyu kahverengi leke ve mozaik leke simptomlu örnekler(A,B:640, C:642).



Şekil 4.10. Sürvey kapsamında İstanbul-Pendik lokasyonundan, maviyemiş kültür plantasyonlarından alınan, koyu kahverengi leke, mozaik leke ve yapraklarda sararma semptomlu örnekler(A,B:644, C:650).

4.2. DAS-ELISA Testleri

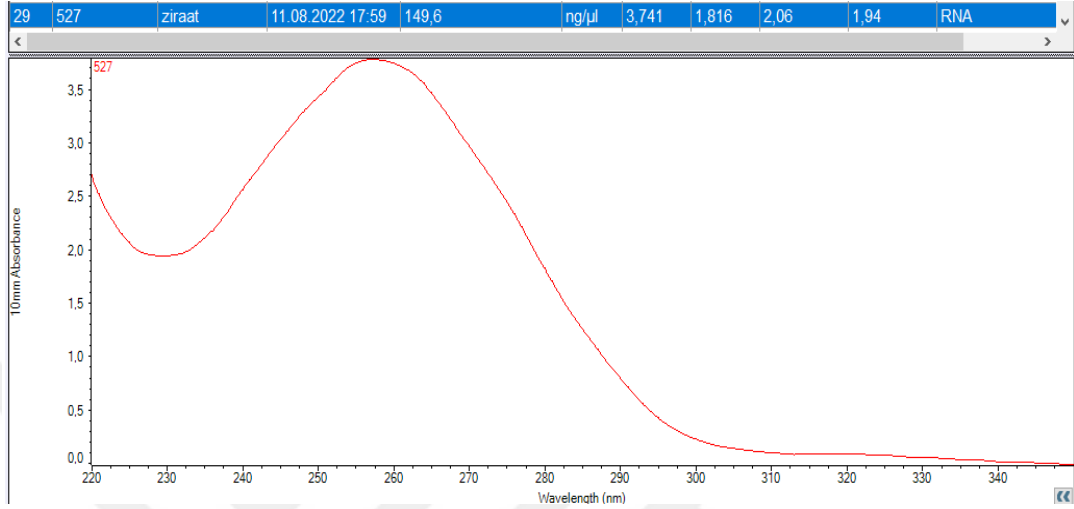
Marmara Bölgesi'nden toplanan 127 *Vaccinium* spp. örnekleri ArMV, SLRSV, TRSV, ToRSV, RBDV, BLMoV, BLShV, BLScV ve BSSV virüsleri için DAS-ELISA yöntemiyle testlendiğinde hiçbir örnek pozitif bulunmamıştır. Bu bulgular ülkemizde daha önce Karadeniz Bölgesi örneklerinin testlendiği çalışmalarla paralellik göstermektedir (Çağlayan ve ark. 2015).

4.3. Maviyemiş Bitkilerinde BLMaV, BLMoV, BLScV, BSSV, BLShV ve BRRSV tespiti amacıyla RT-PCR Analizleri

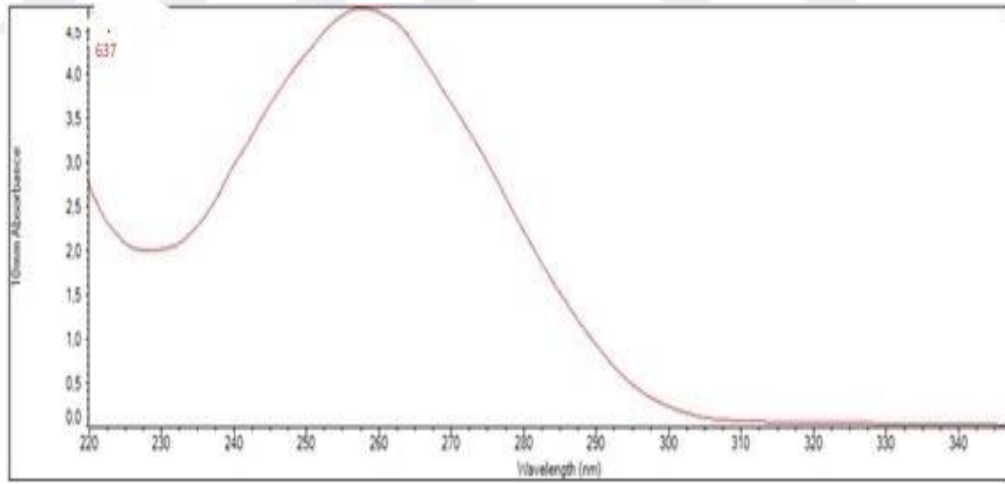
4.3.1. RNA İzolasyonu

Arazide yapılan sürveyler ve yapılan çalışmalar kapsamında toplanan maviyemiş örneklerinden RNA ekstrasyonu yapmak için Morante-Cariel RNA protokolü ve Norgen RNA Ekstraksiyon Kiti ile modifiye MacKenzie yöntemiyle RNA İzolasyonu yöntemi

kullanılmıştır. RNA ekstraksiyonu ile elde edilen RNA'ların konsantrasyonu ve kalitesi Nanodrop spektrofotometre ile ölçülmüş ve bazı örneklerin grafikleri Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Bursa-Büyükorhanlı lokasyonundan alınan 527 nolu maviyemiş örneğinin Morante-Carriel RNA ekstraksiyon yöntemi kullanılarak izole edilen RNA'sının spektrofotometrede 149,6 ng/μl ölçüm değerleri (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD)



Şekil 4.12. İstanbul-Pendik lokasyonundan alınan 637 nolu maviyemiş örneğinin Norgen RNA Ekstraksiyon Kiti kullanılarak modifiye MacKenzie Yöntemi' ile maviyemişlerden izole edilen RNA kalitesini gösteren NanoDrop spektrofotometrede 151,8 ng/μl ölçüm değeri (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD)

Şekillerde görüleceği gibi maviyemişlerde RNA izolasyonu için her iki yöntemin de başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür. Norgen RNA kit yöntemi maviyemiş türlerinden RNA izolasyonu amacıyla başarıyla kullanılan bir yöntem olarak bilinmekte olup,

Morante-Carriel ve ark. (2014) tarafından geliştirilen yöntem kaliteli RNA elde etmenin zor olduğu yenidoğruya, maviyemiş gibi bitkilerde başarı ile kullanılabileceğı bildirilmiştir.

Çizelge 4.1. Sürvey kapsamında toplanan bazı maviyemiş örneklerinin farklı izolasyon yöntemiyle ekstrakte edilen RNA'larının nanodrop ölçüm değerleri

Örnek Numarası	Ekstrasyon Yöntemi	Konsantrasyon Ng/ µl	260/ 280	260/ 230
525	Norgen RNA	246	1,93	0,99
528	Morante-Carriel	154,9	1,78	0,66
530	Morante-Carriel	183,3	1,87	0,82
617	Modifiye MacKenzie	109,8	1,91	0,85
631	Modifiye MacKenzie	208,4	1,93	0,95
636	Modifiye MacKenzie	154,8	1,87	0,78
643	Modifiye MacKenzie	165,1	1,71	0,55
648	Modifiye MacKenzie	316,1	2	1,1
650	Modifiye MacKenzie	145,6	1,83	0,71

4.3.2. RT-PCR Analizleri (Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Çalışmalarda çeşitli lokasyonlardan toplanan ve laboratuvar ortamında RNA ekstraksiyonu yapılan maviyemiş örnekleri maviyemişlerde görülen en yaygın virüsler açısından RT-PCR yöntemiyle testlenmiştir. Toplanan tüm örnekler blueberry scorch virus (BlScV), blueberry red ringspot virus (BRRSV), blueberry mosaic associated virus (BlMaV), blueberry shock virüs (BlShV), blueberry leaf mottle virus (BLMoV) ve blueberry shoestring virus (BSSV) açısından testlendiğinde sadece İstanbul-Pendik'ten toplanan 9 örnekte BlMaV, 1 örnekte ise BLMoV saptanmıştır (Çizelge 4.2; Şekil 4.13-4.18). Testlemelerde pozitif bulunan örnekler genellikle simptomlu bitkilerden alınan örneklerdir.

Çizelge 4.2. Marmara Bölgesinde farklı lokasyonlarda toplanan yabancı ve kültüre alınmış maviyemiş bitki örneklerinin B1MaV, BLMoV, BRRSV için farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları(MY: Maviyemiş)

Örnek No	Alınan Lokasyon	Örnek Adı	B1MaV RNA3 F/R	BLMoV 436 bp	BRRSV 3F/4R
524	Bursa- Büyükorhanlı	Kültür MY	-	-	-
525	Bursa- Büyükorhanlı	Kültür MY	-	-	-
526	Bursa- Büyükorhanlı	Kültür MY	-	-	-
527	Bursa- Büyükorhanlı	Yabancı Ot	-	-	-
528	Bursa- Büyükorhanlı	Kültür MY	-	-	-
529	Bursa- Büyükorhanlı	Kültür MY	-	-	-
530	Bursa- Büyükorhanlı	Kültür MY	-	-	-
531	Bursa- Büyükorhanlı	Kültür MY	-	-	-
532	Bursa- Büyükorhanlı	Kültür MY	-	-	-
533	Bursa- Büyükorhanlı	Kültür MY	-	-	-
534	Bursa- Büyükorhanlı	Kültür MY	-	-	-
535	Bursa- Büyükorhanlı	Kültür MY	-	-	-
536	Bursa- Büyükorhanlı	Kültür MY	-	-	-
537	Bursa- Büyükorhanlı	Kültür MY	-	-	-
538	Bursa- Büyükorhanlı	Kültür MY	-	-	-
539	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
540	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
541	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
542	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
543	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
544	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
545	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
546	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
547	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
548	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-

Çizelge 4.2. (Devam) Marmara Bölgesinde farklı lokasyonlarda toplanan yabancı ve kültüre alınmış maviyemiş bitki örneklerinin BİMaV, BLMoV, BRRSV için farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları(MY: Maviyemiş)

Örnek No	Alınan Lokasyon	Örnek Adı	BİMaV RNA3 F/R	BLMoV 436 bp	BRRSV 3F/4R
549	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
550	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
551	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
552	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
553	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
554	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
555	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
556	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
557	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
558	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
559	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
560	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
561	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
562	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
563	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
564	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
565	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
566	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
567	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
568	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
569	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
570	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
571	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
572	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-

Çizelge 4.2. (Devam) Marmara Bölgesinde farklı lokasyonlarda toplanan yabancı ve kültüre alınmış maviyemiş bitki örneklerinin B1MaV, B1MoV, BRRSV için farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları(MY: Maviyemiş)

Örnek No	Alınan Lokasyon	Örnek Adı	B1MaV RNA3 F/R	B1MoV 436 bp	BRRSV 3F/4R
573	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
574	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
575	Bursa-İnegöl	Kültür MY	-	-	-
576	Bursa-Orhaneli	Kültür MY	-	-	-
577	Bursa-Orhaneli	Kültür MY	-	-	-
578	Bursa-Orhaneli	Kültür MY	-	-	-
579	Bursa-Orhaneli	Kültür MY	-	-	-
580	Bursa-Orhaneli	Kültür MY	-	-	-
581	Bursa-Orhaneli	Kültür MY	-	-	-
582	Bursa-Orhaneli	Kültür MY	-	-	-
583	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
584	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
585	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
586	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
587	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
588	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
589	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
590	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
591	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
592	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
593	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
594	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
595	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
596	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-

Çizelge 4.2. (Devam) Marmara Bölgesinde farklı lokasyonlarda toplanan yabancı ve kültüre alınmış maviyemiş bitki örneklerinin B1MaV, B1MoV, BRRSV için farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları(MY: Maviyemiş)

Örnek No	Alınan Lokasyon	Örnek Adı	B1MaV RNA3 F/R	B1MoV 436 bp	BRRSV 3F/4R
597	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
598	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
599	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
600	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
601	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
602	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
603	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
604	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
605	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
606	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
607	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
608	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
609	Bursa-Osmangazi	Yabancı MY	-	-	-
610	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
611	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
612	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
613	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
614	İstanbul-Pendik	Kültür MY	+	-	-
615	İstanbul-Pendik	Kültür MY	+	-	-
616	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
617	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
618	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
619	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-

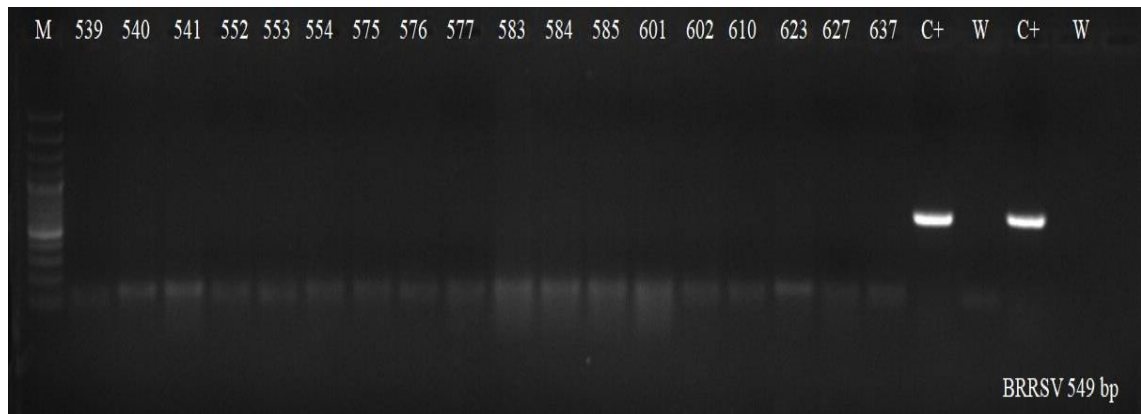
Çizelge 4.2. (Devam) Marmara Bölgesinde farklı lokasyonlarda toplanan yabancı ve kültüre alınmış maviyemiş bitki örneklerinin B1MaV, BLMoV, BRRSV için farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları(MY: Maviyemiş)

Örnek No	Alınan Lokasyon	Örnek Adı	B1MaV RNA3 F/R	BLMoV 436 bp	BRRSV 3F/4R
620	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
621	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
622	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
623	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
624	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
625	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
626	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
627	İstanbul-Pendik	Kültür MY	+	-	-
628	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
629	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
630	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
631	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
632	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
633	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
634	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
635	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
636	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
637	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	+	-
638	İstanbul-Pendik	Kültür MY	+	-	-
639	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
640	İstanbul-Pendik	Kültür MY	+	-	-
641	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
642	İstanbul-Pendik	Kültür MY	+	-	-

Çizelge 4.2. (Devam) Marmara Bölgesinde farklı lokasyonlarda toplanan yabancı ve kültüre alınmış maviyemiş bitki örneklerinin BLMaV, BLMoV, BRRSV için farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları(MY: Maviyemiş)

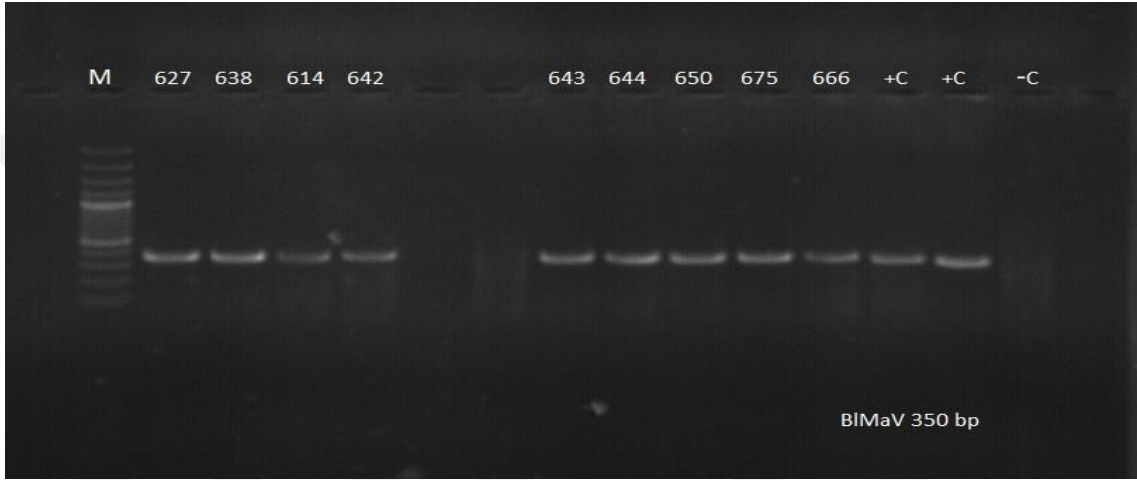
Örnek No	Alınan Lokasyon	Örnek Adı	BLMaV RNA3 F/R	BLMoV 436 bp	BRRSV 3F/4R
643	İstanbul-Pendik	Kültür MY	+	-	-
644	İstanbul-Pendik	Kültür MY	+	-	-
645	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
646	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
647	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
648	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
649	İstanbul-Pendik	Kültür MY	-	-	-
650	İstanbul-Pendik	Kültür MY	+	-	-

Blueberry red ring spot virus(BRRSV)'unun CDS/ORF VI (Putative Translational Transactivator) gen bölgesi virus tespiti için “BRRSV 3F/4R” primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizlerinde örneklerin hiçbirisinde beklenen düzeyde (549 bp) amplifikasyon elde edilememiştir (Şekil 4.13).

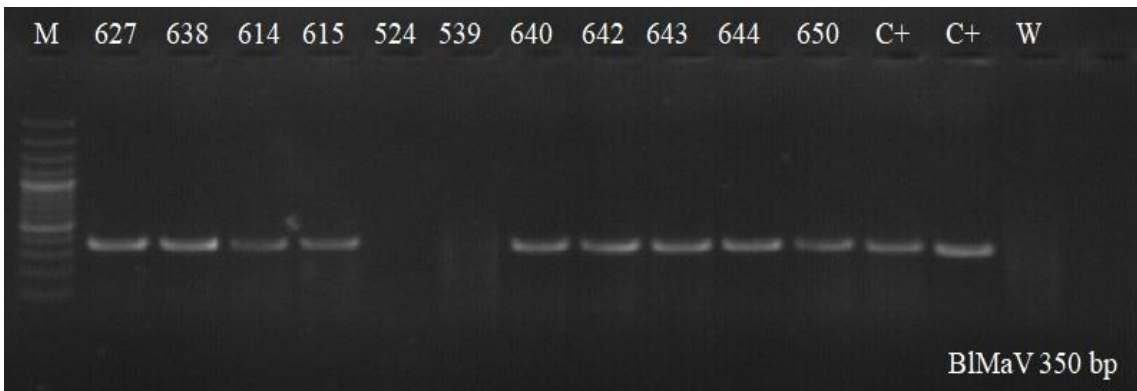


Şekil 4.13. İstanbul ve Bursa illerinden toplanan kültüre alınmış ve yabancı maviyemiş örneklerinden blueberry red ring spot virus(BRRSV)'unun CDS/ORF VI (Putative Translational Transactivator) gen bölgesi için spesifik 3F/4R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); 539,540,541,552,553,554,575,576,577: İnegöl/Bursa kültür maviyemiş, 583,584,585,601,602: Uludağ/Bursa yabancı maviyemiş ve 610,623,627,637: Pendik/İstanbul kültür maviyemiş örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su Kontrol

Blueberry mosaic associated virus'unun RNA3 (NP) gen bölgesi virus tespiti için "BlMaV F/R" primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizlerinde 41 İstanbul örneğinden 9 tanesinde beklenen düzeyde (350 bp) amplifikasyon elde edilmiştir. Ancak Bursa ilinden toplanan örneklerin hiçbirinde bu virüs saptanamamıştır (Şekil 4.14.-Şekil 4.15.). Beklenen düzeyde amplifikasyon elde edilen 9 örnekten en iyi çoğalma gösteren 5 tanesi (627,638,643,644 ve 650 no'lu örnekler) sekans analizine gönderilmiş ve gelen sekans sonuçlarının blueberry mosaic associated virüs(BlMaV)'un RNA3 gen bölgesine ait olduğu doğrulanmıştır.

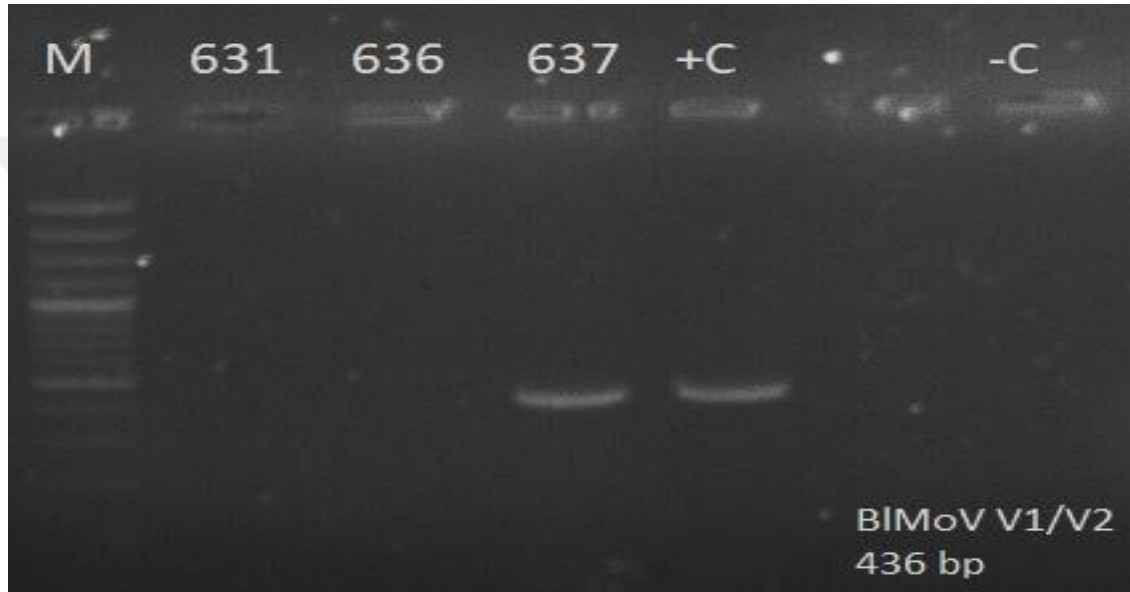


Şekil 4.14. İstanbul-Pendik'ten toplanan maviyemiş örneklerinde blueberry mosaic associated virus(BlMaV) tespiti için 3F/R (CP) primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi. M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD,627-675: İstanbul maviyemiş örnekleri -C: Su Kontrol; +C: Pozitif Kontrol

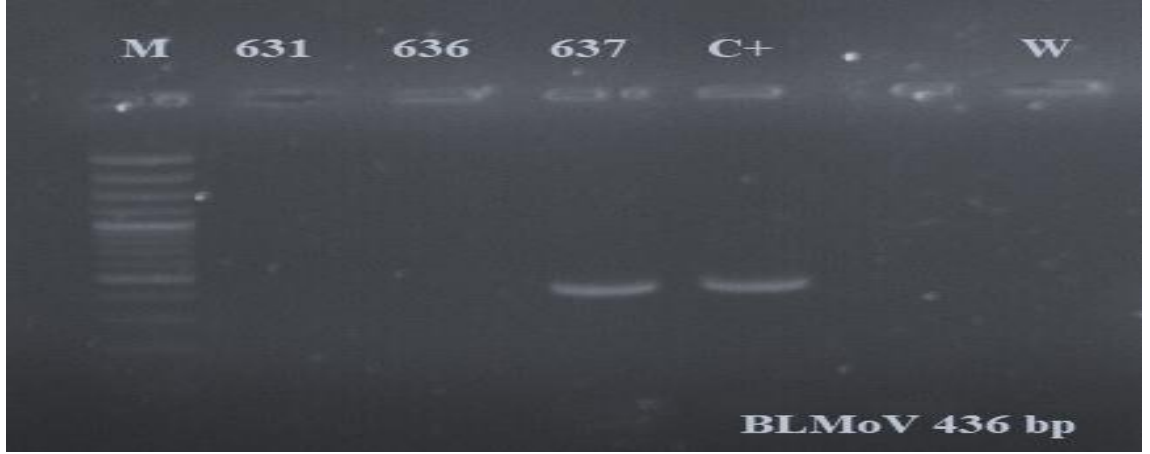


Şekil 4.15. İstanbul ve Bursa illerinden toplanan kültür ve yabani maviyemiş örneklerinden blueberry mosaic associated virus'unun RNA3 (NP) gen bölgesine spesifik F/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); 524-539: İnegöl/Bursa kültür maviyemiş ve 614-650: Pendik/İstanbul kültür maviyemiş örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su Kontrol

Blueberry Leaf Mottle Virus (BLMoV)'unun 3'UTR gen bölgesi virus tespiti için "BLMoV V1/V2" primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizlerinde 41 İstanbul örneğinden 1 tanesinde beklenen düzeyde (436 bp) amplifikasyon meydana gelmiştir fakat 86 Bursa örneğinden amplifikasyon elde edilememiştir (Şekil 4.16. - Şekil 4.17.). Beklenen düzeyde amplifikasyon elde edilen 1 örnek (637 no'lu örnek) sekans analizine gönderilmiş ve gelen sekans sonuçlarının blueberry leaf mottle virus'un 3'UTR gen bölgesine ait olduğu görülmüştür.

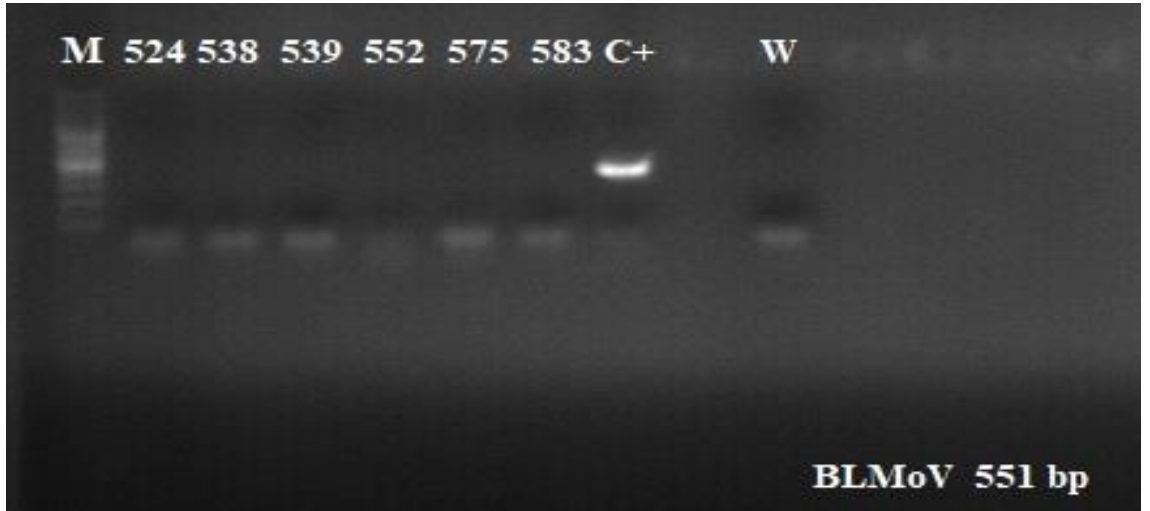


Şekil 4.16. İstanbul-Pendik'ten toplanan Maviyemiş örneklerinde blueberry leaf mottle virüs (BLMoV) tespiti için RNA1- V1/V2 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi. M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, 631,636,637: İstanbul maviyemiş örnekleri ABD, -C: Su Kontrol; +C: Pozitif Kontrol



Şekil 4.17. İstanbul ve Bursa illerinden toplanan kültüre alınmış maviyemiş örneklerinden blueberry leaf mottle virus'unun 3'UTR gen bölgesine spesifik V1/V2 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); 631,636,637: Pendik/İstanbul maviyemiş örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su Kontrol

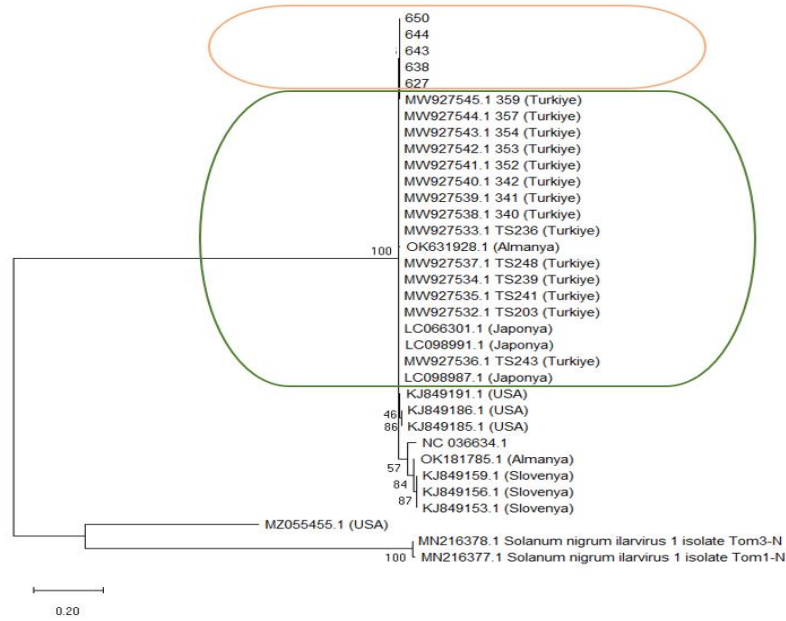
Blueberry leaf mottle virus'unun 3'UTR gen bölgesi virus tespiti için "BLMoV F/R" primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizlerinde İstanbul ve Bursa örneklerinin hiçbirisinde beklenen düzeyde (551 bp) amplifikasyon elde edilmemiştir (Şekil 4.18.).



Şekil 4.18. Bursa ilinden toplanan kültüre alınmış maviyemiş örneklerinden blueberry leaf mottle virus'unun 3'UTR gen bölgesine spesifik F/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); 524,538: Durdukaya/Bursa maviyemiş, 539,552,575: İnegöl/Bursa maviyemiş ve 583: Uludağ/Bursa maviyemiş örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su Kontrol

4.3.3. Filogenetik Analizler ve Sonuçları

Bu çalışma kapsamında BLMaV'nin RNA3 gen bölgesi için spesifik F/R primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizlerinde pozitif kontrollerle aynı seviyede bant veren (350 bp) 5 kültüre alınmış maviyemiş örneğinin (627,638,643,644,650 no'lu örnekler) sekans analizi yapılmıştır. Elde edilen BLMaV sekansları NCBI veri tabanında kayıtlı diğer ülkelere ait BLMaV sekanslarıyla Clustal W yöntemi kullanılarak hizalanmıştır. Hizalanan tüm nükleotid dizileri NJ (Neighbor Joining) yöntemi kullanılarak Mega X yazılımı ile analiz edilmiştir. BLMaV izolatlarına ait NJ dendrogramı incelendiğinde, BLMaV Türkiye izolatlarının birbirine çok benzediği ve daha önce Karadeniz Bölgesi'nden elde edilen BLMaV izolatlarıyla birlikte gruplandığı görülmüştür. Bu çalışma kapsamında analiz edilen 5 BLMaV izolatı en yakın homolojiyi %99,40 benzerlik oranıyla diğer Türkiye izolatları, %99,39 benzerlik oranı ile Japonya ve Almanya izolatları (LC098987 ve OK631928) ile göstermiş, en uzak benzerlik oranını ise %86,97 benzerlik oranı ile farklı bir grup içerisinde yer alan bir Amerika izolatı (MZ055455) ile gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.19.).



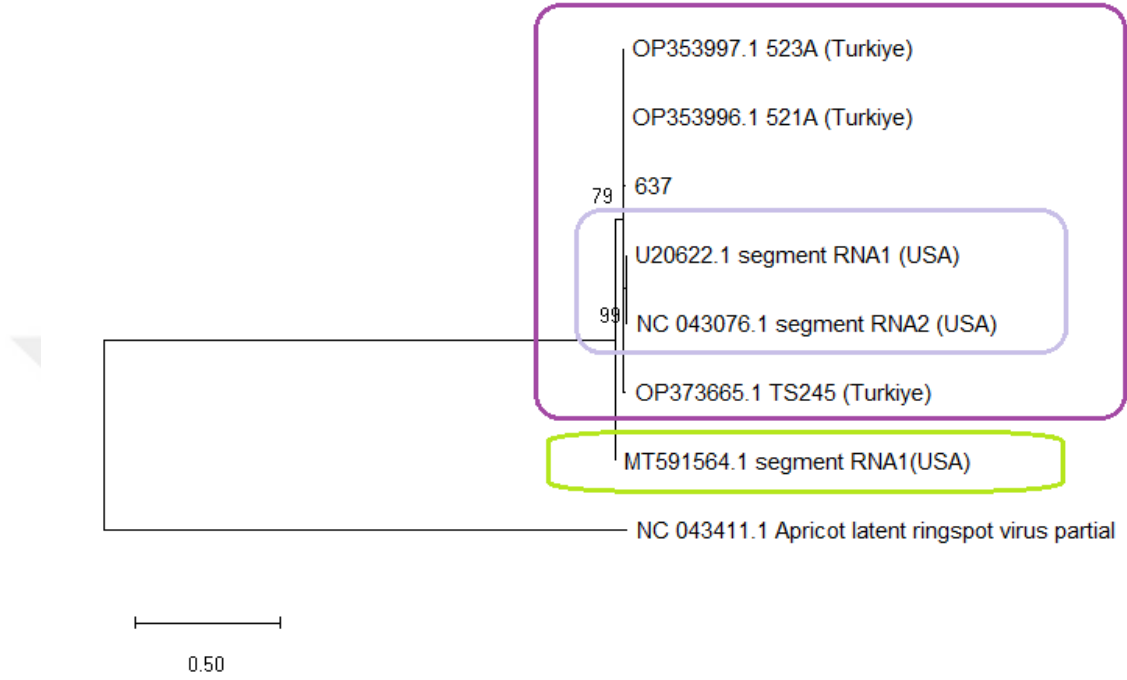
Şekil 4.19. Blueberry mosaic associated virus'un RNA3 (NP) gen bölgesi için BLMaV F/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda elde edilen ürünlerinin sekans analizine göre çizilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde, MEGA X yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendrogramda bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir

Bu dendogramlardan da anlaşılabileceği gibi aynı ülkeden elde edilen farklı izolatlar farklı genomik yapı gösterebilmektedir ancak bu durumun ülkemize ait BLMaV izolatları için geçerli olmadığı görülmüştür. Bunun nedeni söz konusu izolatların aynı coğrafik bölgeye ait (Pendik/İstanbul) ve aynı bahçeden toplanan örneklerden elde edilmesi olarak düşünülmekle birlikte bahçe tesis edilirken fidanların aynı kaynaktan temin edildiği düşünülmektedir. *Ophiovirus* cinsi içinde yer alan BLMaV'nin genetik çeşitliliği ile ilgili bir çalışmada, Amerika ve bazı Avrupa ülkelerinden elde edilen 61 izolat kullanılarak yapılan moleküler varyasyon analizleri sonucunda virüs izolatlarında genetik çeşitlilik durumu düşük düzeyde saptanmıştır (Thekke-Vetil ve ark. 2016). Bu durum *Ophiovirus* cinsine giren diğer virüsler için bildirilmiş olup popülasyon yapısının yüksek oranda korunduğunu göstermiştir (Alioto ve ark., 2003, Navarro ve ark., 2005, Martin ve ark., 2006).

BLMoV'nin 3'UTR gen bölgesi için spesifik V1/V2 primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizlerinde pozitif kontrollerle aynı seviyede bant veren (436 bp) 1 kültüre alınmış maviyemiş örneğinin (637 no'lu örnek) sekans analizi yapılmıştır. Örnek sekansları NCBI veri tabanında kayıtlı diğer sekanslarla Clustal W yöntemi kullanılarak hizalanmıştır. Hizalanan tüm nükleotid dizileri NJ (Neighbor Joining) yöntemi kullanılarak Mega X yazılımı ile analiz edilmiştir. BLMoV izolatlarına ait NJ dendrogramı incelendiğinde, BLMoV Türkiye izolatları ile birbirine çok benzediği, aynı grup içerisinde yer aldığı ve en yakın homolojiyi %98,7 benzerlik oranı ile Türkiye izolatları (OP353997 ve OP353996), en uzak homolojiyi ise %95,18 benzerlik oranı ile farklı bir grup içerisinde yer alan farklı bir USA izolatı (MT591564) ile gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.20).

BLMoV diğer maviyemiş virüslerine göre dünya genelinde daha az yaygın görülen bir virüs olup sadece ABD, Kanada ve Güney Kore'de saptandığına dair kayıt bulunmaktadır (EPPO, 2023). *Nepovirus* cinsine dahil edilen bir virüs olmasına karşın nematod ve afidlerle taşınmadığı sadece polen ve bal arıları yoluyla taşındığına dair bilgiler bulunmaktadır (Martin ve ark. 2012). Ülkemizde yapılan survey çalışmalarında Karadeniz Bölgesi'nden toplanan maviyemiş örneklerinde bu virüs tespit edilemezken (Çağlayan ve ark. 2015, 2016), Gebze ilinden toplanan yüksek boylu maviyemiş bitkilerinde bu virüs ilk kez tespit edilmiştir (Çağlayan ve ark., Yayınlanmamış Veri). Bu virüsün ülkemizde saptanmış olması sadece ülkemiz için değil, Avrupa açısından da ilk

kayıt niteliği taşımasından dolayı son derece önemli olup bu çalışma kapsamında da bir örnekte BLMoV saptanması bu virüsle ilgili analizlerin ülkemizde dikkatli bir şekilde takip edilmesi gerektiğini göstermektedir.



Şekil 4.20. Blueberry leaf mottle virus(BLMoV)’un 3’UTR gen bölgesi için V1/V2 primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda elde edilen ürünlerinin sekans analizine göre çizilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde, MEGA X yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendrogramda bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez kapsamında, Marmara Bölgesinde Bursa'dan 86, İstanbul'dan 41 örnek (27 örnek yabancı maviyemiş (Uludağ/Bursa), 1 örnek yabancı ot, 99 örnek ise yüksek boylu kültür maviyemişi) olmak üzere toplamda 127 adet maviyemiş örneği ArMV, SLRSV, TRSV, ToRSV, RBDV, BLMoV, BLShV, BLScV ve BSSV virüsleri için DAS-ELISA ve RT-PCR; BLMaV için üretilmiş ticari antiserum olmaması nedeniyle de bu virüs için ise sadece RT-PCR analizleri ile testlenmiştir. Yapılan bu çalışma kapsamında BRRSV açısından tüm örnekler negatif bulunurken, BLMaV açısından 9 örnekte (614,615,627,638,640,642,643,644 ve 650 no'lu örnekler) beklenen düzeyde amplifikasyon elde edilmiş ve sonuçlar sekans analizleri ile doğrulanmıştır. BLMoV açısından ise sadece 1 örnekte (637 no'lu örnek) beklenen düzeyde amplifikasyon elde edilmiş ve sekans analizi anlamlı gelmiştir.

Ülkemizde ilk yaygın maviyemiş plantasyonları Karadeniz Bölgesi'nde kurulmuş olup bu bölgede yetiştirilen çeşitlerden ülkemizin diğer bölgelerine doğru yayılmaya başlamıştır. Marmara Bölgesinde başta Bursa ülke üretiminde başı çekerken, İstanbul ilçelerinde de küçük çaplı üretimler başlamıştır. Bu çalışmada da daha önce ülkemizde yapılan çalışmaları doğrulayan sonuçlar elde edilmiş olup Karadeniz Bölgesi gibi Marmara Bölgesi'nde de en yaygın virüs blueberry mosaic associated virüs (BLMaV) olarak tespit edilmiştir. BLMaV önemli verim kayıplarına yol açan virüslerden birisi olması nedeniyle bu virüsle ilgili çalışmalara devam edilmesi ve bu çalışma kapsamında elde edilen ön verilerin göz önünde bulundurularak geliştirilmesi önerilmektedir. Ayrıca bu çalışma kapsamında testlenen 127 örneğin sadece bir tanesinde tespit edilen blueberry mottle virüs (BLMoV), enfeksiyon oranı bakımından düşük düzeyde bulunmuş olsa da gelecekte planlanacak çalışmalarda gözardı edilmemesi gereken önemli bir virüstür.

Ülkemizde başta Bursa ve Antalya ili olmak üzere maviyemiş üretimi hızla arttığı için virüsden arı üretim materyallerinin kullanılması ve yeni üretim alanlarının da düzenli olarak maviyemiş virüsleri açısından testlenmesi ve sonuçların gerek üreticiler gerekse Tarım ve Orman Bakanlığı il/ilçe müdürlükleri teknik personellerine iletilerek etkin kontrol programlarının geliştirilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Acioğlu, M., 2018. *Rubus* ve *Vaccinium* türlerinde yeni giriş yapan virüslerin moleküler yöntemlerle tanınması ve karakterizasyonu. Yüksek lisans tezi. **Hatay Mustafa Kemal Üniv. Fen bilimleri Enst.** S. 53.
- Ağaoğlu, S., Çelik, M., Atila, S., 2003. Bazı Ahududu Çeşitlerinin Ayaş (Ankara) Koşullarına Adaptasyonu Üzerine Ön Değerlendirmeler. **Ulusal Kivi ve Üzümsü Meyveler Sempozyumu**, Bildiri Kitabı, 315-326, Ordu.
- Akkan, R., 2019. Maviyemişlerde (*Vaccinium spp.*) Blueberry Mosaic Associated Virus (BlMaV)'un *Olpidium* Türleri ile Taşınabilme Durumunun ve Hastalığın Epidemiyolojisindeki Olası Rollerinin Araştırılması. Yüksek lisans tezi. **Hatay Mustafa Kemal Üniv. Fen bilimleri Enst.**
- Alioto D, Malfitano M, Troisi A, Peluso A, Martin S, Milne RG, Guerri J, Moreno P. 2003. Variability of the coat protein gene of Citrus psorosis virus in Campania, southern Italy. **Arch Virol.** 148(11):2155-66.
- Ateş, S., Çelik, H., 2012. Dünya ve Türkiye Maviyemiş Üretim Potansiyeli. IV. Ulusal Üzümsü Meyveler Semp. 3-5 Ekim, Akdeniz Üniv., Antalya. **Bildiriler Kitabı**
- Cho, I.S., Chung, B.N., Cho, J.D., Choi, G.S., 2012. First report of *Blueberry red ringspot virus* infecting highbush blueberry in Korea. **Plant Dis.** 96:1074
- Çağlayan, K., Gazel, M., Elçi, E., Çelik, H., Gündüz, K., Mavric, I., Grubar, B., Marn, M.V., 2015. Large scale survey on virus diseases of *Rubus* and *Vaccinium* species in Turkey. 23. International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops [ICVF]. 8-12 Haziran 2015, Morioka Japan, s 66.
- Çağlayan, K., Gazel, M., Gündüz, K., Elçi, E., Çelik, H., Marn, M.V., 2016a. Ülkemiz Maviyemiş Plantasyonlarında Bazı Virüslerin Tespit Edilmesi ve Moleküler Karakterizasyonu. Uluslararası katılımlı Türkiye VI. **Bitki Koruma Kongresi**, 5-8 Eylül 2016, Konya, p 640.
- Çağlayan, K., Çelik, H., Gazel, M., Elçi, E., Gündüz, K., Grubar, B., Marn, M.V., 2016b. Occurrence of *Vaccinium* viruses in Black Sea region of Turkey. **XI. International Vaccinium Symposium**, Orlando-Florida, U.S.A, 10-14 April, 2016, p,170.
- Çağlayan, K., Gazel, M., Elçi, E., Plesko, I. M., Virscek Marn, M., 2017a. Viruses Infecting Small Fruits in Turkey. International Conference on Agriculture, **Forest, Food Sciences and Technologies**, Cappadocia-Turkey, 15-17 May, 2017, p,1154.
- Çağlayan, K., Gazel, M., Elçi, E., Viršček Marn M., Mavric Pleško, I., 2017b. Prevalance of Blueberry mosaic associated virus in cultivated Blueberries in Turkey. 24. International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops [ICVF]. Thessaloniki, Greece, 5-9 June 2017, p, 130.
- Çelik, H., 2003. Bazı yüksekçallı maviyemiş çeşitlerinin Rize'deki performanslarının saptanması üzerine araştırmalar. **I. Ulusal kivi ve üzümsü meyveler sempozyumu**, Ordu bildiriler kitabı 454-460p.
- Çelik, D. D. (2005). *Yaban Mersini (Likapa) Yetiştiriciliği*. İstanbul: Hasad Yayıncılık.
- Çelik, H., 2012. **Yüksekboylu Maviyemiş Yetiştiriciliği**, O.M.Ü. Ziraat Fakültesi Ders Notları, İstanbul, 2012.
- Dunne, C.P., Glen, M., Tommerup, I.C., Shearer, B.L., Hardy, G.E.St., J., 2002. Sequence variation in the rDNA ITS of Australian *Armillaria* species and intra-specific variation in *A. luteobubalina*. **Australasian Plant Pathology** 31: 241–251.
- EPPO. 2023. Blueberry leaf mottle virus. EPPO datasheets on pests recommended for regulation. <https://gd.eppo.int> (accessed 2023-05-31) Accessed 5/30/2023.

- FAO, 2022. Statistical Database, <https://www.fao.org/faostat/en/#data> (Erişim tarihi: 18.12.2023).
- Forney CF. 2001. Horticultural and other factors affecting aroma volatile composition of small fruit., **Hort Technology**.; 11(4): 37-529.
- Gardes, M. and Bruns, T.D., 1993. ITS primers with specificity for basidiomycetes: Application to the identification of mycorrhizae and rust. **Molecular Ecology**, 2: 113-118.
- Gazel, M., Elçi, E., Çelik, H., Gündüz, K., Plesko, I.M., Marn, M.V., Çağlayan, K., 2015. The presence of Blueberry mosaic associated virus in Vaccinium spp. in Turkey. 23. International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops [ICVF]. 8-12 Haziran 2015, Morioka Japan, s 100.
- Herrera-Vásquez JÁ., del Carmen Cebrián M., Alfaro-Fernández A., del, Carmen Córdoba, M., Jordá, C., 2009. Multiplex PCR assay for simultaneous detection and differentiation of Olpidium bornovanus, O. brassicae and O. virulentus. **Mycol Res** 113:602–610.
- Hervé Lot, Piero, R., Sylvie, S., Riccardo, L., Robert G.M., 2002. “Occurrence of Mirafiori Lettuce Virus and Lettuce Big-vein Virus in Relation to Development of Big-vein Symptoms in Lettuce Crops” **European Journal of Plant Pathology, Phytopathology** 92: 288-293
- Hutchinson, M.T., Varney, E.H., 1954. Ringspot-A virus disease of cultivated blueberry. **Plant Disease Report** 38:260–262.
- Isogai, M., Matsushashi, Y., Suzuki, K., Satoru, Y., Watanable, M., Yoshikawa, N., 2016. Occurrence of blueberry mosaic associated virus in highbush blueberry trees with blueberry mosaic disease in Japan. **Journal of General Plant Pathology**. 82 (3): 177-179.
- Kalinowska, E., Paduch-Cichal, E., Chodorska, M., 2011. First report of Blueberry red ringspot virus in highbush blueberry in Poland. **J. Plant Pathology**.
- Kalinowska, E., Paduch, C. and Chodorska, M., 2012. Molecular characterization of Polish Blueberry red ringspot virus isolate. **Virus Genes** 44 (2), 309-311.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGAX: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Mol Biol Evol Oxford journals**, 35(6): 1547-1549. doi:10.1093/molbev/msy096.
- 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 Diseases**, 81: 222-226.
- Martin, R.R., 2004. Recommended procedures for detection of viruses of small fruit crops. **Acta Hort**. 656:199-207.
- Martin, S., Garcia, M.L., Troisi, A., Rubio, L., Legarreta, G., Grau, O., Alioto, D., Moreno, P., Guerri, J., 2006. Genetic variation of populations of citrus psorosis virus. **J. Gen. Virol.** 87, 3097–3102.
- Martin, R. R., Tzanetakis, I. E., 2018. High Risk Blueberry Viruses by Region in North America; Implications for Certification, Nurseries, and Fruit Production. **Viruses**, 10(7), 342; <https://doi.org/10.3390/v10070342>
- Martin, R. R., Polashock, J. J. And Tzanetakis, I. E., 2012. New and emerging viruses of blueberry and cranberry. **Viruses**, 4(11), 2831–2852.
- Martin, R. R., Tzanetakis, I. E., Caruso, F. L. And Polashock, J. J., (2009). Emerging and reemerging virus diseases of blueberry and cranberry. **Acta Hort** 810, 299–304.

- Morante-Carriel, J., Sellés-Marchart, S., Martínez-Márquez, A., Martínez-Estes, M.J., Luque, I., Bru-Martínez, R., 2014. RNA isolation from loquat and other recalcitrant woody plants with high quality and yield. **Anal Biochem.** 452:46–53.
- Navarro, J.A., Torok, V.A., Vetten, H.J., Pallas, V., 2005. Genetic variability in the coatprotein genes of lettuce big-vein associated virus and mirafiori lettuce big-vein virus. **Arch. Virol.** 150, 681–694.
- Plesko, M.I., Virscek, M.M., Koron, D., 2010. Detection of Blueberry red ringspot virus in highbush blueberry cv. ‘Coville’ in Slovenia. Biotic and abiotic stress prevention on integrated berry fruits production 9–11th March 2009 (Sofia-Bulgaria, 2010) **Applied Optics** Abs. 34.
- Pribylova, J., Špak, J., Kubelkova, D., Petrzik, K., 2010. First report of Blueberry red ringspot virus in highbush blueberry in the Czech Republic. **Plant Dis.** 94:1071.
- Ramsdell, D.C., Stretch, A.W., 1987. Blueberry Mosaic. In: Converse, R.H. (Ed.), **Virus Diseases of Small Fruits**. Agriculture Handbook No. 631, US Department of Agriculture, Washington, DC, USA, pp. 119–120.
- Raniere, L.C., 1960. Responses of cultivated high bush blueberry varieties to the known blueberry viruses. In: Proceedings of the Twenty-eighth Annual Blueberry Open House, **Virus Research**, 28, pp. 18–20.
- Roggero, P., Ciuffo, M., Vaira, A.M., Accotto, G.P., Masenga, V., Milne, R.G., 2003. An ophiovirus isolated from lettuce with big-vein symptoms. **Archives of Virology**. 145, 2629–42.
- Sasaya, T., and Koganezawa, H., 2006. Molecular analysis and virus transmission tests place *Olpidium virulentus*, a vector of Mirafiori lettuce bigvein virus and Tobacco stunt virus, as a distinct species rather than a strain of *Olpidium brassicae*. **J. Gen. Plant Pathol.** 72:20-25.
- Shands, A.C., Crandall, S.G., Miles, T.D., 2017. First report of the ability of *Olpidium virulentus* to vector Blueberry mosaic associated virus (BlMaV) on southern highbush blueberry. **Plant Dis.**, 101, 1683.
- Thekke-Veetil, T., Ho, T., Keller, K.E., Martin, R.R., Tzanetakis, I.E., 2014. A new ophiovirus is associated with blueberry mosaic disease. **Virus Research**, 189, 92–96.
- Thekke-Veetil, T., Polashock, J.J., Marn, M.V., Plesko, I.M., Schilder, A.C., Keller, K.E., Martin, R.R. and Tzanetakis, I.E., 2016. “Population structure of blueberry mosaic associated virus: Evidence of reassortment in geographically distinct isolates”. **Virus Res.**, 201, 79-84
- Tufanoğlu, G. Ç., Filiz Z., 2020. Maviyemiş Bahçe Tesisi Projesi Fizibilite Raporu ve Yatırımcı Rehberi
- Turkben, C., Barut, E., Incedayı, B., 2008. Investigations on Population of Blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) in Uludag (Mount Olympus) in Bursa, Turkey **Akdeniz Üniv. Ziraat Fak. Dergisi**, 21(1), 41-44.
- TÜİK, 2021. **Türkiye İstatistik Kurumu Web Sayfası**. Bitkisel Üretim İstatistikleri. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>. (Erişim tarihi: 16.12.2023)
- Varney, E.H. Mosaic and shoestring virus diseases of cultivated blueberry in New Jersey. **Phytopathology** 1957, 47, 306–309.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), **PCR Protocols: a guide to methods and amplifications**. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.

ÖZGEÇMİŞ

Yazar, ilk ve orta öğrenimini Kırşehir ilinde Muharrem Sayan İlköğretim Okulunda tamamlamış olup liseyi 2005-2009 yılları arasında yine Kırşehir’de Kırşehir Lisesi’nde tamamladı. 2009 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Bitki Koruma bölümünü okumaya hak kazandı ve 2013 yılında mezun oldu. 2021 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen Tarım ve Orman Bakanlığında çalışmaktadır.



EKLER

Morante-Carriel ve Ark.'nın RNA Ekstraksiyon Buffer Washing Buffer (Yıkama Buffer) (100 ml)

- Tris- HCl (pH:7.5) 0,1M : 1,2 g
- Sorbitol 0,35M : 6,3 g
- PEG %10 : 10 g
- Mercaptoethanol %2 : 2 µl

İzolasyon Buffer (100 ml)

- Tris- HCl (pH:7.5) 0,3 M : 3,6 g
- EDTA 25 mM : 0,7 ml
- M NaCl 2M : 11,6 g
- CTAB %2 : 2 g
- PVP %2 : 2 g
- Spermidine % 0,005 : 0,1 g

Saflaştırma Buffer (100ml)

- LiCl 10 M : 42,3 g
- Sodium Asetat 3 M : 40,8 ml
- % 70'lik ve %96'lık Soğuk Ethanol kullanılmıştır.

Agaros Jel Elektroforez (Maniatis ve Ark., 1982)

TAEX50 (100 ml)

- 0.5 M EDTA (pH:8) :10 ml
- 0.6 Glacial acetic acide : 5.71 ml
- Trizma base: 24.2 g
- Çözelti 100 ml d2H2O ' ya tamamlanıp otoklav edilmiş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

PCR Ürününün Yükleme Ortamı (15 ml 6X stok için)

- Bromophenol blue:15 ml
- Glycerol:18 g
- TAEX50 : 6 ml
- Karışım -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

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

- 0,5X TAE: 200 ml
- Ethidium bromide: 200 µl
- Işık geçirgenliği az olan koyu renkli kap içinde karanlık ortamda oda koşullarında muhafaza edilmiştir. 8-10 kullanımdan sonra çözelti yenilenmiştir.

%1 Agarose Jel Elektroforezi

- Agaroz: 1gr
- 0,5XTAE: 100 ml
- Hazırlanan karışım mikrodalgaya yerleştirilerek ısıtılmıştır. Yaklaşık 35-40°C sıcaklığa ulaştıktan sonra elektroforezin jel tepsisine dökülüp yuvaları açmaya yarayan taraklar yerleştirilmiştir. 10-15 dakikada katılaşmış olan 0.5XTAE ortamı içeren jel, elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

**DAS-ELISA İçin Kullanılan Tampon Çözeltiler ve İçerikleri (1000 ml)
Kaplama Tamponu (Coating Buffer) pH: 9.6**

- Na₂CO₃ : 1.59 g
- Na₂N₃ : 0.20 g
- NaHCO₃ : 2.93 g

Fosfat-Tuz Tamponu (PBS Buffer) pH: 7.4

- NaCl : 8 g
- Na₂HPO₄ X 12H₂O : 0.2 g
- Na₂N₃ : 0.2 g
- KCl : 0.2 g
- KH₂PO₄ : 2.9 g

Yıkama Tamponu (PBST Buffer) pH: 7.4

- PBS Buffer :999.50 ml
- Tween 20 : 0.50ml

Örnek Ezme Tamponu (Extraction Buffer) pH: 7.4

- PBST : 1000 ml
- Polyvinylpyrrolidone : 20 g
(MV= 40000 K=40)

Konjugat Tamponu (Conjugate Buffer) pH: 7.4

- PBST: 1000 ml
- Polyvinylpyrrolidone : 20 g (MV= 40000 K=40)
- Ovalbumin : 2 g
- NaN₃ : 0.2 g

Substrat Tamponu (Substrat buffer) pH: 9,8

- Diethanolamin : 97 ml
- NaN₃ : 0.2 g
- Karışım d₂H₂O ile 1 litreye tamamlanır.

