



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

**AHUDUDU VE BÖĞÜRTLENLERDE RASPBERRY BUSHY DWARF  
VİRUS (RBDV) TÜRKİYE İZOLATLARININ GENETİK  
ÇEŞİTLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**MİHRİBAN DEGER**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATAY  
EKİM-2019**



T.C.  
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AHUDUDU VE BÖĞÜRTLENLERDE RASPBERRY BUSHY DWARF  
VİRUS (RBDV) TÜRKİYE İZOLATLARININ GENETİK  
ÇEŞİTLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

MİHRİBAN DEGER

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY  
EKİM-2019

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

**AHUDUDU VE BÖĞÜRTLENLERDE RASPBERRY BUSHY DWARF VİRUS  
(RBDV) TÜRKİYE İZOLATLARININ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Mihriban DEGER**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN** danışmanlığında hazırlanan bu tez **18/10/2019** tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN**  
Başkan

**Prof. Dr. Mona GAZEL**  
Üye

**Dr.Öğr.Üyesi Eminur ELÇİ**  
Üye

**Kod No:**

**Prof. Dr. Erdal SERTKAYA**  
Enstitü Müdürü

Bu çalışma HMKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir

Proje No: (18.YL.091

**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.**

18.10.2019

## 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.

**MİHRİBAN DEĞER**

## ÖZET

### AHUDUDU VE BÖĞÜRTLENLERDE RASPBERRY BUSHY DWARF VİRUS (RBDV) TÜRKİYE İZOLATLARININ GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu çalışmada ülkemizin iki farklı bölgesinde (Marmara ve Doğu Akdeniz) farklı *Rubus* türlerinden elde edilen raspberry bushy dwarf virüs (RBDV) izolatlarının genetik çeşitliliğinin araştırılması ve DNA dizilerinin Gen Bankasına kayıtlı dünya izolatlarıyla kıyaslanması hedeflenmiştir. Önemli *Rubus* spp. yetiştiriciliği yapılan illerden Bursa'dan 230, Hatay'dan 153, Mersin'den 45, Adana'dan 37 ve Kahramanmaraş'tan 17 olmak üzere toplam 482 böğürtlen ve ahududu örneği toplanmıştır. Bu örnekler öncelikle RBDV'nin kılıf proteinini çoğaltan tanı primeri (RBDV F/ R, ) ile testlenerek illere göre enfeksiyon oranı belirlenmiştir. Mersin, Kahramanmaraş ve Adana ilinde bu virüse rastlanmazken RBDV ile enfeksiyon oranı Hatay ilinde % 13, 72, Bursa'da ise % 9,13 olarak saptanmıştır. RBDV'nin RNA3 tarafından kodlanan ve kılıf proteinini çoğaltan RBDV CPUP/ RNA1.2LO primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR analizlerinde Hatay'da tespit edilen 21 RBDV pozitif *Rubus* örneğinin hiç birisinde amplifikasyon gözlenmezken Bursa *Rubus* örneklerinin 15 tanesinde beklenen düzeyde (1072 bp) bant elde edilmiştir. Virüsün RNA 2 tarafından kodlanan hareketlilik proteinini saptamak için MPUP/ MPLO primer çifti ile yapılan RT-PCR analizlerinde yine Hatay örneklerinin hiçbirisinde amplifikasyon gözlenmezken, 21 Bursa örneğinin 9 tanesinde beklenen düzeyde (1328 bp) bant gözlenmiştir. RBDV'nin her iki gen bölgesinin sekans analizi sonuçlarına göre Türkiye izolatlarının birbirine çok benzediği, aynı grup içerisinde yer aldığı ve en yakın homolojiyi Slovenya izolatları ile (% 93-97) gösterdiği saptanmıştır. Bu çalışma sonuçları temel alınarak özellikle Hatay ili RBDV izolatlarının bilinen RBDV izolatlarından farklı olduğu belirlenmiş ve "Yeni Nesil Dizileme" yöntemi kullanılarak tüm genom analizlerinin yapılması önerilmektedir.

2019, 49 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** *Rubus* spp., raspberry bushy dwarf virus, genetik çeşitlilik, Türkiye

## ABSTRACT

### STUDIES ON GENETIC DIVERSITY OF TURKISH RASPBERRY BUSHY DWARF VIRUS (RBDV) ISOLATES IN RASPBERRY AND BLACKBERRIES

In this study, genetic diversity of raspberry bushy dwarf virus (RBDV) collected from different geographical regions of Turkey (Eastern Mediterranean and Marmara regions) was studied and their sequences were compared with the world RBDV isolates deposited in GeneBank. Totally 482 blackberry and raspberry samples were collected from the important *Rubus* spp growing provinces such as 230 samples from Bursa, 153 samples from Hatay, 45 samples from Mersin, 37 samples from Adana and 17 samples from Kahramanmaraş. All samples were firstly tested with the detection primers of RBDV (RBDV F/ R ) and the infection rate was detected for each province. Although the infection rate of RBDV was detected as 13.72% in Hatay and 9.13% in Bursa, it was not detected at all in Mersin, Kahramanmaraş and Adana provinces. When CPUP/ RNA1.2LO primer pairs which amplify coat protein (CP) of RBDV expressed by RNA3 was used in RT-PCR analysis, expected amplification (1072 bp) was observed in 15 Bursa samples out of 21 RBDV positives while no amplification was observed in Hatay samples. MPUP/ MPLO primer pairs were used to amplify movement protein (MP) of RBDV isolates and 9 Bursa samples out of 21 were amplified as expected size (1328 bp) whereas no amplification was observed in Hatay *Rubus* samples. According to the sequencing results of both genes, Turkish RBDV isolates are identical, grouped together in the same clade and showed a high level of identity to Slovenian RBDV isolates (%93-97). Based on this study, it has been highly suggested that full genome analyses of Hatay-RBDV isolates should be studied by using “Next Generation Sequencing” technology.

2019, 49 pages

**Key words:** *Rubus* spp., raspberry bushy dwarf virus, genetic diversity, Turkey

## TEŐEKKÖR

Yüksek lisans tez konusunun belirlenmesinde, araştırılması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmayı yönlendiren ve her türlü yardımı esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez konusunun belirlenmesi ve çalışmaların takip edilmesinde her türlü yardımı esirgemeyen çalışmamda konusunda yardımcı olan Ziraat Yüksek Mühendisi Kıvılcım SARI'ya Ziraat Yüksek Mühendisi Mehtap ACIOĞLU'ya Ziraat Yüksek Mühendisi Hamide Deniz KOCABAĞ'ına ve isimlerini burada zikredemediğim ama yardımlarını esirgememiş tüm arkadaşlarıma ve çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen, her zaman arkamda olan aileme sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	I
ABSTRACT .....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	V
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	7
3.1. Materyal .....	7
3.2. Yöntem.....	7
3.2.1. Arazi Çalışmaları ve Örnekleme.....	7
3.2.2. Moleküler Çalışmalar.....	7
3.2.2.1. Rubus spp. Örneklerinden Nükleik Asit (NA) İzolasyonu .....	7
3.2.2.1.1. Morante-Carriell Yöntemiyle RNA Ekstraksiyonu (Morante-Carriell ve ark., 2014) .....	8
3.2.2.1.2. Qiagen RNA Ekstraksiyon Kiti ile modifiye MacKenzie yöntemiyle RNA İzolasyonu (MacKenzie ve ark. 1997).....	9
3.2.2.1.3. Silica Yöntemiyle RNA Ekstraksiyonu (Poudel ve ark., 2013) .....	10
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) Analizleri .....	11
3.2.2.1. Reverse Transkripsiyon (RT; Reverse Transcription) .....	11
3.2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	11
3.2.2.3. RBDV'nin PCR analizi .....	12
3.2.2.4. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Jel Elektroferez .....	12
3.2.2.5. DNA Dizileme, Blast ve Filogenetik Analizler .....	13
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	14
4.1. Arazi Çalışmaları .....	14
4.2. PCR Analizleri (Polymerase Chain Reaction; PCR) .....	16
4.2.1. Toplam RNA İzolasyonu .....	16
4.2.2. RT-PCR analizleri.....	18
4.2.3. RBDV'nin Genetik Çeşitlilik Çalışması .....	36
4.2.4. Filogenetik Analizler.....	38
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	41
KAYNAKÇA .....	43
ÖZGEÇMİŞ .....	46
EKLER.....	47



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Raspberry bushy dwarf virus'un genom organizasyonu.....	5
Şekil 4.1. Rubus alanında gözlenen virüs benzeri belirtiler A- Yapraklarda deformasyon, B- Yapraklarda damarlar boyunca kızarma, C- Yapraklarda mozaik lekeler, D- Yaprakta sarı mozaik leke .....	14
Şekil 4.2. Rubus alanında gözlenen virüs benzeri belirtiler A- Yaprak uçlarında ve damarlar boyunca sararma, B- Virüs belirtisi göstermeyen fakat testleme programına alınan bir örnek.....	15
Şekil 4.3. Rubus alanında gözlenen virüs benzeri belirtiler A- Yapraklarda deformasyon, kırışıklık ve kabarma B- yapraklarda deformasyon, sararma ve kırışıklık .....	15
Şekil 4.4. Morante-Cariel RNA Ekstraksiyon yöntemi kullanılarak rubuslardan izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci ABD ), 276 nolu Ahududu örneği.....	16
Şekil 4.5. Qiagen Kiti RNA Ekstraksiyon yöntemi kullanılarak rubuslardan izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü(NanoDrop 2000c, Thermo Sci ABD ), 365 Böğürtlen örneği.....	16
Şekil 4.6. Silika RNA Ekstraksiyonu yöntemi kullanılarak rubuslardan izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü(NanoDrop 2000c, Thermo Sci ABD ), 423 Böğürtlen örneği.....	17
Şekil 4.7. Bursa'dan toplanan Rubus örneklerinde raspberry bushy dwarf virus tespiti için RBDVF/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi. Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 27, 29, 31, 51, 79, 85, 105, 122: Bursa örnekleri W: Su kontrol; (1/4 cDNA, 1/10 cDNA sulandırma serileri) .....	34
Şekil 4.8. Bursa'dan toplanan Rubus örneklerinde Raspberry bushy dwarf virus tespiti için RBDVF/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi. Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD ); 27, 29, 31, 51, 79, 85, 105, 122: Bursa örnekleri ; W: Su kontrol; (1/20 cDNA, 1/40 cDNA, 1/80 cDNA, sulandırma serileri).....	34
Şekil 4.9. Bursa'dan toplanan Rubus örneklerinde Raspberry bushy dwarf virus tespiti için RBDVF/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi. Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 27, 29, 31, 51, 79, 85, 105, 122, B32: Bursa örnekleri ; W: Su kontrol; ( 1/10 cDNA, 1/20 cDNA, 1/40 cDNA, 1/80 cDNA, 1/160 cDNA, 1/320 cDNA, sulandırma serileri).....	35
Şekil 4.10. Bursa'dan toplanan Rubus spp. örneklerinde raspberry bushy dwarf virüs tespiti için RBDV F/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi. M: Marker ( SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); B156-B200: Bursa Böğürtlen örnekleri; W: Su Kontrol; +C: Pozitif Kontrol ( doğrudan cDNA kullanıldı.).....	36
Şekil 4.11. Bursa'dan toplanan Rubus örneklerinde Raspberry bushy dwarf virus tespiti için RBDV CPUP/RNA1,2LO primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi. Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); B156,	

B157, B158, B162, B163, B164, B165, B167, B32, B85 : Bursa örnekleri ; TS1, TS2, TS3, TS4, TS5 : Hatay örnekleri ; W: Su kontrol; +C: Pozitif Kontrol ( 1/1 doğrudan cDNA kullanılarak) Hatay rubus örnekleri; TS1, TS2, TS3, TS4, TS5: 1/1 ve 1/10 sulandırma serileri kullanılmıştır. ....	37
Şekil 4.12. Bursa'dan toplanan Rubus örneklerinde CPUP/RNA1,2LO primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi sonucunda RBDV pozitif çıkan örneklerin sekans analizi sonrasında blast sonucu .....	37
Şekil 4.13. Bursa'dan toplanan Rubus örneklerinde raspberry bushy dwarf virus tespiti için RBDV MPUP/ MPLO primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi. Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); B157, B158, B160, B162, B163, B164, B165: Bursa örnekleri ; TS1, TS2, TS3, TS4, TS5, TS6, TS7 : Hatay örnekleri ; W: Su kontrol; +C: Pozitif Kontrol ( 1/1 doğrudan cDNA kullanılarak) .....	38
Şekil 4.14. Bursa'dan toplanan Rubus örneklerinde RBDV MPUP/ MPLO primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi sonucunda elde edilen PCR ürünlerinin sekans analizi sonrasında blast sonucu.....	38
Şekil 4.15. Raspberry bushy dwarf virus 'un RNA3 (CP) gen bölgesini çoğaltan CPUP/RNA1,2LO 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.....	39
Şekil 4.16. Raspberry bushy dwarf virus 'un RNA2 (MP) gen bölgesi için RBDV MPUP/ MPLO 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.....	40

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Raspberry busy dwarf virus'un farklı gen bölgelerini çoğaltan primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri ve baz büyüklükleri. ....	12
Çizelge 4.1. Ahududu(276), Böğürtlen(365), Böğürtlen(423) örneklerinden ekstrakte edilen bazı RNA'ların nanodrop ölçüm değerleri. ....	17
Çizelge 4.2. Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları ....	18
Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları ....	19
Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları.....	20
Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları.....	21
Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları.....	22
Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları ....	23
Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları ....	24
Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları ....	25
Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları ....	26
Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları ....	27
Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları ....	28
Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları ....	29

Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları ....	30
Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları ....	31
Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları ....	32
Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları ....	33
Çizelge 4.3. Rubus spp plantasyonlarında RBDV tespit edilen iller, testlenen örnek sayısı ve enfeksiyon oranları (%) .....	35

## 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
g	gram

### KISALTMALAR

A.B.D	Amerika Birleşik Devletleri
bp	baz çifti
d <sub>2</sub> O	Çift distile su
Dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	Ethidium Bromid
ETOH	Ethanol
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
TAE	Tris asetat EDTA
TE	Tris EDTA
UV	Ultraviyole
V	Volt

RBDV	Raspberry Bushy Dwarf Virus
RVCV	Raspberry Vein Chlorosis Virus
RpRSV	Raspberry Ringspot Virus
RLMV	Raspberry Leaf Mottle Virus
RLBV	Raspberry Leaf Blotch Virus
RYNV	Rubus Yellow Net Virus
BRRV	Blueberry Red Ringspot Virus
BRNV	Black Raspberry Necrosis Virus
CRLV	Cherry Rasp Leaf Virus
TSV	Tobacco Streak Virus
TRSV	Tobacco Ringspot Virus
ToRSV	Tomato Ringspot Virus
SLRSV	Strawberry Latent Ringspot Virus
ArMV	Arabis Mosaic Virus
NaCl	Sodium Chloride
LiCl	Lithium Chloride
MP	Hareketlilik proteini
CP	Kılıf proteini
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
NGS	Yeni Nesil Dizileme
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
NJ	Neighbor Joining

## 1. GİRİŞ

Ahududu ve Böğürtlen; Roseles takımı Rosaceae familyası (Gülgiller), *Rubus* cinsine aittirler. *Rubus* cinsi bitkiler aleminde birbirinden farklı en çok türü içeren cinstir. Bazı araştırmacılara göre 740 adet *Rubus* türü olduğu belirtilmektedir (Jennings ve Jones, 1986). Ahududu 1960'lı yılların sonlarında adaptasyon amacıyla ülkemize getirilmiştir. Türkiye'de ilk defa 1930'lu yılların sonlarında Bursa'nın köylerinde yetiştiriciliği yapılmaya başlanmış ve üretim miktarı günümüzde 25000 tona ulaşmış bulunmaktadır. 1993 yılında ABD'den getirilen ve kültür çeşitlerine ait olan fidanlar Fındık Araştırma Enstitüsü bünyesinde adaptasyona alınmış ve olumlu neticeler sonucu Giresun'da da yetiştiriciliği başlamıştır. Ülkemizin her yöresinde böğürtlene rastlanmaktadır. Özellikle Orta Anadolu ve Karadeniz Bölgesinde böğürtlen yetiştiriciliği daha fazladır. Ülkemizde 2018 yılı itibarıyla istatistiklerine göre 6.769 da alanda 5.875 ton ahududu, 2.807 da alanda 2.540 ton böğürtlen üretimi gerçekleşmiştir (TÜİK 2019).

Türkiye'de çilek dışındaki üzüksü meyve yetiştiriciliğinin geçmişi çok eskilere gitmemektedir. Ülkemiz florasında doğal olarak yetişen birçok üzüksü meyve türünün kültür formlarının ilk adaptasyon çalışmalarına 1960'lı yılların sonunda başlamıştır. Ancak, üretilen yaş üzüksü meyvelerin pazarlanmalarındaki sorunlar nedeniyle üretimlerine ve araştırmalara uzun bir ara verilmiştir. 1980'li yılların sonuna doğru Bursa ve çevresinde ahududu üretimi, Bulgaristan'dan gelen soydaşlarımız tarafından başlatılmıştır. 1995 yılında Karadeniz Bölgesi Doğal Ahududu Seleksiyonu Projesi, 1996'da da ülkesel çapta uygulanan "Frenk üzümü, Ahududu ve Böğürtlen Çeşitlerinin Islahı" projesi ile araştırma boyutundaki çalışmalar yeniden devreye sokulmuştur (Ağaoğlu, 2003).

Son yıllarda dünya çapında 40'dan fazla virüsün üzüksü meyvelerde enfeksiyon yaptığı bildirilmektedir. Ahududu ve böğürtlenlerde gözlenen en yaygın virüsler raspberry bushy dwarf virus (RBDV), tobacco streak virus (TSV), arabis mosaic virus (ArMV), strawberry latent ringspot virus (SLRSV), raspberry ringspot virus (RpRSV), tomato ringspot virus (ToRSV), tobacco ringspot virus (TRSV), cherry rasp leaf virus (CRLV), black raspberry necrosis virus (BRNV), rubus yellow net virus (RYNV),

raspberry vein chlorosis virüs (RVCV)'dür. Bu virüslerden en yaygın olanlar Nepovirüs cinsine giren birçok virüs ile polenle taşınan raspberry bushy dwarf virus (RBDV)'dir.

RBDV polen yoluyla taşınan ve *Rubus* türlerinde ekonomik zarara neden olan en önemli virüslerden birisidir. Böğürtlen yanında kırmızı ve siyah ahududuları ve bazı hibrit üzümü meyveleri de enfekte edebilmekte, bitkilerde bodurlaşma, yapraklarda sararma, meyvelerde dağılma gibi belirtilerin yanı sıra bazı koşullarda hiçbir belirti vermeden de enfeksiyon yapabilmektedir. Özellikle bu hastalığın meyve belirtisi diğer nepovirüs belirtileri ve genetik anormalliklerle de karıştırılabilmektedir. Kırmızı ahududularda çeşide bağlı olarak kloroz, meyve anormallikleri görülebilir ve meyve sayısı etkilenmediği halde verim %40 oranında düşebilir. RBDV çok hızlı yayılan bir virüstür ve yapılan bir çalışmada "Meeker" çeşidi ile kurulan bir ahududu bahçesinin 5-6 yıl içinde %100 enfekteli olduğu saptanmıştır (Martin, 1998). RBDV'nin tanımlanmış 3 ırkı vardır ve bunlardan en yaygın olanı genellikle kırmızı ahududu bitkilerinde saptanan D ırkıdır. Diğer iki ırk (B ve RB ) ise serolojik olarak D ırkından farklı olup siyah ahududu çeşitlerinde görülmektedir (Barbara ve ark., 1984).

RBDV'nin taksonomik olarak bağlı olduğu bir familya henüz yokken *Idaeovirus* cinsinin tek üyesidir (Jones ve ark., 1996). RBDV polen ve tohumla taşınmakta olup oluşturduğu belirtiler besin eksikliği ve yetersiz tozlanma gibi bir takım nedenlerle karıştırılabilmekte bu nedenle de virüs tespiti için güvenilir tekniklere gereksinim duyulmaktadır.

Ülkemizde *Rubus* türlerinde virüs hastalıkları ile ilgili çalışmalar son yıllarda başlamıştır. Ülkemizde bu konuda yapılan bir çalışmada Doğu Akdeniz bölgesinde sınırlı sayıda böğürtlenlerin yabancı ve kültür formları ile kırmızı ahududular biyolojik ve serolojik yöntemlerle testlenmiş ve *Rubus* türlerinde sadece ToRSV'nin varlığı bildirilmiştir (Dolunay ve Sertkaya, 2011; Sertkaya ve ark., 2011). Bu konuda yapılan en kapsamlı çalışma ise TÜBİTAK tarafından desteklenen 213O042 nolu Türkiye-Slovenya İkili İşbirliği projesi ile yapılmış ve ülkemizde gerek yabancı populasyon gerekse ticari yetiştiricilik açısından böğürtlen ve ahududu yetişen önemli illerde survey çalışmaları yürütülmüştür. Bu çalışmalar sonucunda toplanan örnekler RBDV, ArMV, SLRSV, ToRSV, TRSV, RLMV, RYNV, RLBV ve BRRV için ELISA ve/veya PCR yöntemleri ile testlenmiş ve *Rubus* plantasyonlarında en yaygın virüsün RBDV olduğu saptanmıştır (Çağlayan ve ark., 2015). Önceki çalışmalarda tespit edilen



ToRSV'nin *Rubus* plantasyonlarındaki varlığı ise bu çalışma kapsamında DAS ELISA yöntemi ile bulunurken moleküler analizlerle kanıtlanamamıştır (Çağlayan, Kişisel Görüşme).

Bu çalışmanın amacı, ülkemizde en yaygın *Rubus* virüsü olarak saptanmış olan RBDV'nin farklı coğrafik bölgeler ve farklı *Rubus* türlerinden elde edilen izolatlarının genetik çeşitliliğinin araştırılması ve Gen Bankasına kayıtlı dünya izolatlarıyla kıyaslanmasıdır.



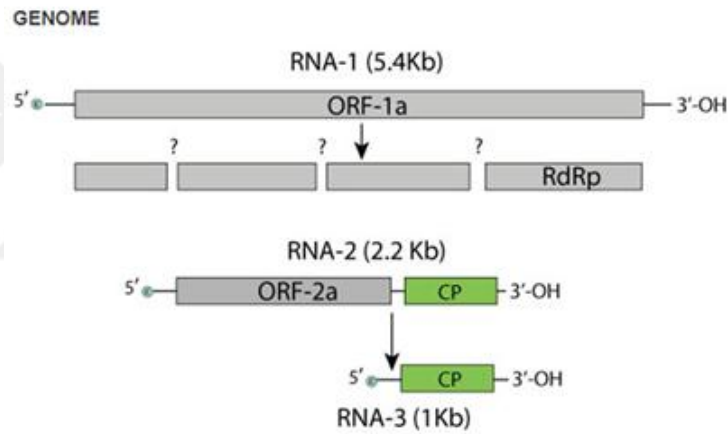
## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Son yıllarda dünya çapında 40'dan fazla virüsün üzüksü meyvelerde enfeksiyon yaptığı bildirilmektedir (Martin, 2004). Bu virüslerden en yaygın olanlar *Nepovirus* cinsine giren virüsler ile polenle taşınan raspberry bushy dwarf virus (RBDV)'dir (Valasevich ve Kolbanova., 2011). Bu virüslerin ahududu plantasyonlarında tespit edildiği bazı ülkeler; Çek Cumhuriyeti (Spak, 1995), İngiltere (Barbara ve ark., 2001), Amerika (Ellis ve ark., 2005), Slovenya (Viršček Marn ve Mavrič., 2006)'dır. RBDV'nin doğal enfeksiyonu farklı *Rubus* türlerinde ve melezlerinde bulunmuştur: kırmızı ve siyah ahududu (*R. occidentalis*), böğürtlen (*R. fruticosus*), loganberi (*R. ursinus X R. idaeus*), boysenberi (*R. ursinus X R. idaeus*), (*R. baileyanus X R. argutus*) ve arktik ahududu (*R. arcticus*) (Jones ve ark., 1982, Kokko ve ark., 1996, Strik ve ark., 2003). RBDV, *Rubus* türlerinin yanı sıra ilk kez Slovenya'da yeni bir konukçu olan bağlarda (*Vitis vinifera*) da tespit edilmiştir (Mavric Plesko ve ark., 2009).

*Rubus* cinsine ait bitkileri enfekte eden virüsler başlıca üç yolla taşınmaktadır: polen, nematod ve afidler. Polen yoluyla taşınan en önemli virüsler RBDV olup, böğürtlen yanında kırmızı ve siyah ahududuları ve bazı hibrit üzüksü meyveleri de enfekte edebilmekte, bitkilerde bodurlaşma, yapraklarda sararma, meyvelerde dağılma (crumbly fruit) gibi semptomların yanı sıra bazı koşullarda hiçbir belirti vermeden de enfeksiyon yapabilmektedir (latent semptom) (Jones ve ark., 1982). Özellikle bu hastalığın meyve semptomu diğer nepovirüs belirtileri ve genetik anormalliklerle de karıştırılabilmektedir. RBDV'nin afidle taşınan bir virüs olan BRNV ile birlikte bulunması durumunda çalimsı cücelik görünümüne neden olduğu bildirilmiştir (Martin, 2002). Bu hastalık nedeniyle verimde %40'lara varan azalmalar olabilmektedir (Strik ve Martin, 2002).

RBDV özellikle ahududularda önemli zarar yapmakta olup verim ve kaliteyi azaltmakta meyvelerde anormallikler ve ufalanmaya yol açmaktadır (Martin, 1998). Bu tür meyveler reçel ve pasta sanayisinde kullanılabilmeyle birlikte taze tüketim için uygun olmamaktadır. A.B.D'de RBDV nedeniyle verim kayıpları dönüm başına 1000-3000 dolar olarak hesaplanmıştır. Buna ilaveten RBDV nedeniyle bahçelerin sökülerek yenilenmesi hem 1,5 yıl zaman kaybına neden olmakta hem de dönüm başına 3500 dolar kadar ekstra bir maliyet gerektirmektedir (Chamberlain, 2003).

RBDV'nin genomu iki parçalı olup RNA-1 bir ana ORF içerir ve 188kDa büyüklüğünde helikaz ve replikaz proteinlerini kodlar. RNA-2 iki ORF içerir: 5'-ucunun yarısı yaklaşık 39 kDa büyüklüğünde "hareketlilik genini" kodlarken 3'-ucunun yarısı ise 30 kDa büyüklüğünde kılıf proteinini kodlar (Şekil 2.1.). RNA-2'nin olasılıkla RNA-3'ün çoğalmasında şablon rolü oynadığı düşünülmekte ve kılıf proteininin bir subgenomik RNA olan RNA3 tarafından kodlandığı bildirilmektedir (Natsuaki ve ark., 1991). RBDV'nin enfektiyöz klonları oluşturulduğunda RNA1 ve RNA2'nin birlikte düşük oranda enfektif olduğu fakat RNA3'ün eklenmesiyle virüs replikasyonunun büyük ölçüde aktive edildiği saptanmıştır. Bu durum bir çok *Idaeovirus* cinsine dahil olan virüslerde de görülen "genom aktivasyonu" mekanizmasını anımsatmaktadır (MacFarlane ve Mc Gavin, 2009).



Şekil 2.1. Raspberry busy dwarf virus'un genom organizasyonu

RBDV'nin ahududularda hastalık oluşturduğu uzun yıllardır bilinmesine rağmen böğürtlenlerde ilk kez 1997 yılında saptanmış ancak RBDV'nin ahududularda yayılmasının böğürtlenlerden daha hızlı olduğu bildirilmiştir (Martin ve Strik, 2002). RBDV aşılama yoluyla böğürtlenden ahududuya taşınabildiği gibi aksi yönde de taşınma mümkündür. Böğürtlenlerden elde edilen RBDV izolatlarının ahududu izolatlarıyla benzerlik durumlarının araştırıldığı bir çalışmada her iki bitki türünden de izole edilen RBDV kılıf protein geninin yüksek oranda benzer olduğu saptanmıştır (Chamberlain, 2003). Bu durum RBDV'nin böğürtlen izolatının, ahududu RBDV kılıf protein ya da hareketlilik proteinini kodlayan genlerde olası bir mutasyon sonucu

meydana gelmediğini ancak polen yoluyla virüsün ahududulardan böğürtlene geçtiğini göstermiştir (Okinaka ve ark. 2001; Chamberlain, 2003 )

Ülkemizde son yıllarda *Rubus* türlerinde virüs hastalıkları ile ilgili çalışmalar başlamış ve Doğu Akdeniz bölgesinde yapılan bir çalışmada sınırlı sayıda böğürtlenlerin yabani ve kültür formları ile kırmızı ahududular biyolojik ve serolojik yöntemlerle testlenmiş. *Rubus* türlerinde sadece ToRSV'nin varlığı bildirilmiştir (Dolunay ve Sertkaya, 2011; Sertkaya ve ark., 2011). *Rubus* türlerinde yapılan en kapsamlı çalışma ise TÜBİTAK tarafından desteklenen 213O042 nolu Türkiye-Slovenya İkili İşbirliği projesi ile yapılmış ve ülkemizde gerek yabani populasyon gerekse ticari yetiştiricilik açısından böğürtlen ve ahududu yetişen önemli illerde survey çalışmaları yürütülmüştür. Yapılan bu survey çalışmaları sonucunda toplanan örnekler RBDV, ArMV, SLRSV, ToRSV, TRSV, RLMV, RYNV, RLBV ve BRRV için ELISA ve/ veya PCR yöntemleri ile testlenmiş. Bu çalışma kapsamında *Rubus* plantasyonlarında en yaygın virüsün RBDV olduğu saptanmıştır (Çağlayan ve ark., 2015). Önceki çalışmalarda tespit edilen ToRSV'nin *Rubus* plantasyonlarındaki varlığı ise bu çalışma kapsamında da DAS ELISA yöntemi ile bulunurken moleküler analizlerle kanıtlanamamıştır (Çağlayan, Kişisel Görüşme).

Bu çalışmanın amacı, ülkemizde en yaygın *Rubus* virüsü olarak saptanmış olan RBDV'nin farklı coğrafik bölgeler ve farklı *Rubus* türlerinden elde edilen izolatlarının genetik çeşitliliğinin araştırılması ve Gen Bankasına kayıtlı dünya izolatlarıyla kıyaslanmasıdır.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Materyal**

Bu çalışmanın materyalini Adana, Bursa, Hatay, Kahramanmaraş ve Mersin, illerinden toplanan böğürtlen ve ahududu yaprak ve sürgün örnekleri oluşturmuştur.

#### **3.2. Yöntem**

##### **3.2.1. Arazi Çalışmaları ve Örnekleme**

Bu çalışma kapsamında ülkemizde Adana, Bursa, Hatay, Kahramanmaraş ve Mersin, illerinde böğürtlen ve ahududu yetişen alanlarda ilkbahar mevsiminde virus hastalıkları surveyi yapılmıştır. Survey çalışmalarında her ildeki damızlık parseller, fidanlıklar, ticari bahçeler ve doğal bitki populasyonları ziyaret edilerek tipik virus semptomu gösteren bitkilerin yanı sıra latent enfeksiyonlar için semptomsuz bitkilerden de örnek alınmıştır. Semptomlar kaydedilerek bitki örnekleri uygun koşullarda laboratuvara getirilmiş ve testleninceye kadar +4 °C'de saklanmıştır. Örnekler kayıt altına alınarak semptomolojik açıdan karakteristik olanlar numaralandırılarak fotoğraflanmıştır.

##### **3.2.2. Moleküler Çalışmalar**

###### **3.2.2.1. *Rubus* spp. Örneklerinden Nükleik Asit (NA) İzolasyonu**

*Rubus* bahçelerinden toplanan örneklerden RNA izolasyonu için Morante-Carriel RNA protokolü, Qiagen RNA Ekstraksiyon Kiti ile modifiye MacKenzie RNA protokolü ve Silica RNA protokolü kullanılmıştır (MacKenzie ve ark., 1997; Poudel ve ark., 2013; Morante-Carriel ve ark., 2014). Nükleik asit (NA) izolasyonlarında ilkbahar döneminde alınan yapraklar kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak, TÜBİTAK tarafından desteklenen 213O042 Slovenya Projesi kapsamında testlenen örnekler içerisinde RBDV ile enfekteli olduğu tespit edilen örneklerden elde edilen cDNA

(komplementer deoksiribonükleik asit)'lar kullanılmıştır. Her bir bitki materyalinden 0.05 gr örnek sıvı azot içinde ezildikten sonra izole edilen RNA'lar PCR çalışmalarında kullanılmaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

### **3.2.2.1.1. Morante-Carriell Yöntemiyle RNA Ekstraksiyonu (Morante-Carriell ve ark., 2014)**

#### **Ezme ve Yıkama Aşaması**

- 50 mg bitki dokusu alınmıştır.
- Üzerine 1,5 ml washing buffer (Yıkama Buffer) ilave edilerek havanda iyice ezilmiştir. 2 ml'lik ependorf tüpe alındıktan sonra vortekslenmiştir.
- Tüpler 5600 rpm'de 15 dakika +4 °C'de santrifüj yapılarak üst kısım atılmıştır.

#### **İzolasyon Aşaması**

- Önceden 65°C'de ısıtılmış izolasyon tampon buffer (her bir örnek için 1,5ml) eklendikten sonra tüpler vortekslenmiştir.
- 65°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Her 2 dakikada bir ters düz edilmiştir.
- Örnekten 1 ml çekilerek yeni tüpe aktarılmıştır. Üzerine eşit hacimde Chloroform-İsoamilalkol(C:I:A, 24:1) eklenmiştir. Daha sonra karıştırılmıştır (süt beyaz olana kadar).
- Tüpler 6700 rpm'de 10 dakika +4°C santrifüj edilmiştir.
- Üst kısım dikkatlice yeni tüplere alınmıştır. Yine eşit hacimde C:I:A eklenmiştir. İyice karıştırılmıştır.
- Tüpler 10.000 rpm'de 10 dakika +4°C santrifüj edilmiştir.
- Üst kısım yeni bir tüpe alınır; ve üzerine Sodium Asetat (NaOAc) (0,1 vol, 3 M , pH:5,2) İsoopropanol (0,6 vol) eklenerek daha sonra karıştırılmıştır.
- Tüpler -80 °C'de 30 dakika veya -20'de 1 saat inkübe edilmiştir.
- Daha sonra örnekler 14.000 rpm'de 20 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir.

#### **Saflaştırma Aşaması**

- Daha sonra tüplerdeki sıvı dökülür daha sonra pellet üzerine 100 µl d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O ilave edilerek pellet çözündürülmüştür. Üzerine 0,3 vol 10M LiCl ilave edilerek buzun üstünde 90 dakika inkübe edilmiştir ( 2 defa tekrarlanmıştır).
- Daha sonra 14.000 rpm'de 30 dakika +4 °C'de santrifüj edilmiştir.

- Alternatif olarak; tek sefer LiCl eklendikten sonra 1 gece +4 °C'de inkübe edilmiştir.
- Daha sonra 14.000 rpm'de 30 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir.
- LiCl santrifüjden sonra dökülmüştür.
- Pellet üzerine 100 µl d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O ilave edilmiştir. Daha sonra pellet çözündürülmüştür.
- Çözündükten sonra 0,1 vol NaoAc (3 M) eklendi ve 2 vol cold-ethanol (%96) ilave edilmiştir. Daha sonra karıştırılmıştır.
- Tüpler 14.000 rpm'de 20 dakika +4°C'de santrifüj edilmiştir.
- Pellet 200 µl %70'lik soğuk alkolle yıkanmıştır.
- Kısa bir santrifüj yapılarak alkol dökülmüştür.
- Tüpler 20 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.
- Pellet 40 µl d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O'da çözündürülmüştür.

#### **3.2.1.1.2. Qiagen RNA Ekstraksiyon Kiti ile modifiye MacKenzie yöntemiyle RNA İzolasyonu (MacKenzie ve ark., 1997)**

- Örnekler sıvı azot ile ezildikten sonra ezilen dokudan 0,05 g alınıp Mackenzie ekstraksiyon tampon çözeltisi eklenerip ezilmiştir ve örnekler 1,5 ml'lik endorf tüplere aktarılmıştır.
- Bu örneklerin üzerine 150 µl %20'lik sarkozyl ilave edilmiş ve hafifçe karıştırılmıştır.
- 70°C'de 10 dk ara ara karıştırılarak inkübe edilmiştir.
- 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Sıvı kısım pelleti hareket ettirmeden 2 µl'lik toplama tüpüne yerleştirilip Q/Ashredder mor renkli spin kolona alınmıştır.
- Tüpler 14.000 rpm'de 2 dk santrifüjlenmiştir.
- Sıvı kısım endorf tüplere alınarak üzerine 0,5 hacim %96'luk alkol ilave edildi ve pipetle karıştırılmıştır.
- Karışımdan 650 µl alınarak RNeasy mini spin kolona (pembe renkli) alınmıştır.

- 10.000 rpm'de 2 dk santrifüjlenmiştir. Sıvı kısım atılarak, arta kalan karışımla işlem tekrarlanmıştır.
- RNeasy mini spin kolonlar yeni ependorf tüplere yerleştirilerek üzerine 700 µl RW1 buffer eklenmiştir.
- Tüpler 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilerek sıvı kısım atılmıştır.
- RNeasy mini spin kolonlar yeni tüplere yerleştirilerek üzerine 500 µl RPE buffer eklenmiş ve tüpler 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır.
- Kolona 40 µl RNase ari su eklenerek 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve RNA -80 °C'de saklanmıştır.

### 3.2.1.1.3 Silica Yöntemiyle RNA Ekstraksiyonu (Poudel ve ark., 2013)

- 50 mg bitki dokusu üzerine 1000 µl silica ekstraksiyon buffer içerisine 1 µl B-Mercaptoethanol eklenip, iyice karıştırılıp, ependorf tüpe alınmıştır.
- Santrifüj yapılmadan 600 µl sıvı fazdan çekilerek yeni ependorf tüpe aktarılmıştır. Ama tüpün içine 600 µl 5.8 molarlık potasyum asetat eklenmiştir. Tüpler ters- düz edilmiş ve 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
- Üstteki sıvı fazdan 750 µl alınıp yeni bir tüpe konulmuştur ve üzerine 750 µl % 100 isopropanol ilave edilmiştir. -20 °C'de en az yarım saat bekletilmiş daha sonra 13.000 rpm'de 30 dakika santrifüj yapılmıştır.
- Sıvı faz atılır, pellet üzerine 500 µl yıkama solüsyonu eklenmiştir. Vortexlenmiştir ve pellet çözündürülmüştür. Daha sonra üzerine 20 µl silica ilave edilerek 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.
- Sıvı faz atılmıştır. Pellet 500 µl wash buffer ile yıkandırılıp ve çözündürülmüştür.
- 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek, sıvı faz atılmış ve pellet oda sıcaklığında kurutulmaya bırakılmıştır (Alkol kokusu kalmayana kadar).
- Pelletin üzerine 150 µl TE buffer eklenir ve pellet çözündürülür. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir.
- 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. 100 µl sıvı faz alınıp alınan sıvı fazın üzerine 8 µl sodium asetat ve 200 µl % 100 ethanol eklenmiştir.



- 20 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Santrifüj 10 dakika +4 °C’de 12.000 rpm’ de santrifüj yapılmıştır. Sonra sıvı faz atılmıştır.
- Pellet üzerine 200 µl % 70’lik ethanol eklenip – 20 °C’de 30 dakika inkübe edilmiştir.
- Tüpler vortexlenmiş ve + 4 °C’de 3 dakika 12. 000 rpm’de santrifüj yapılmıştır ve sıvı faz atılmıştır (bu aşama 2 defa tekrarlanır).
- Pellete dokunmadan sıvı faz atılıp pellet 20 dk oda sıcaklığında kurutulmuştur (alkol kokusu kalmayana kadar).
- Pellet 80 µl TE buffer ile çözündürülmüştür.
- Elde edilen RNA’ların konsantrasyonları ölçülerek moleküler analizlerde kullanmak için –80 °C’de saklanmıştır.

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

#### **3.2.2.1. Reverse Transkripsiyon (RT; Reverse Transcription)**

RNA virüslerinin PCR ile testlenmesinde ilk aşamada, RNA’lardan cDNA elde edilmiştir. cDNA için 2 farklı yöntem kullanılmıştır. Birinci yöntem olarak her bir örnek için 1 µl Random hexamer primer, 6,5 µl d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O ve 5 µl RNA karışımı hazırlanarak PCR tüplerine konulmuştur. PCR cihazında 94 °C’de 5dakika ve buz üzerinde 5 dakika bekletildikten sonra her bir tüp içine 5XRT tamponundan 4 µl, d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O 2 µl, dNTP (10 mM) 0,5 µl ve RT enziminden 1µl eklenmiştir. Tüpler PCR cihazında 42 °C’de 1 saat 72 °C’de 10 dakika tutularak cDNA aşaması tamamlanmıştır.

2. yöntem olarak her bir örnek için 25ul 1x Maxima RT buffer, 2U Maxima reverse transcriptase, 0. 25 U RiboLock inhibitör, 2.5 µl total nükleik asit, 6 ng random primer ve 400 µM dNTP eklenmiştir. Tüpler PCR cihazında 25 °C’de 10 dakika, 50 °C’de 60 dakika, 85°C’de 5 dakika tutularak cDNA aşaması tamamlanmıştır.

#### **3.2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

Bu çalışma kapsamında *Rubus spp.* örneklerinin testlendiği raspberry bushy dwarf virüs (RBDV) için kullanılan primer baz dizileri Çizelge 3.1’de verilmiştir. RBDV’nin PCR koşulları farklı olduğu için ayrı ayrı PCR analizine tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.1. Raspberry bushy dwarf virus’un farklı gen bölgelerini çoğaltan primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri ve baz büyüklükleri

VİRÜS	PRİMER ADI	PRİMER DİZİLİMİ	BAZ UZUNLUĞU (bp)	KAYNAKÇA
RBDV	F	AGATCCATGACGGATGT	280	Kokko ve ark. 1996
	R	AGATATGCCCACTAGCA		
RBDV	MPUP	CTGGACATCTCGAGTTTGC	1328	Mavric ve ark.2009
RBDV	MPLO	CGATTGGTGG AACAGCT	1072	Mavric ve ark.2009
	CPUP	CGGTACTGGTGAGGTGTATTT		
	RNA1.2	GGGGTTTGCTCAGCAAAC		

### 3.2.2.3. RBDV’nin PCR analizi

RBDV’de PCR analizlerinde virüse özgü primerler kullanılarak PCR karışımı, 16,8 µl d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O, 2,5 µl 10XB, 0,5 µl dNTP (10 mM), 2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), virüse özgü 0,5 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl), 0,2 µl Taq-DNA polymerase ve 2 µl cDNA olacak şekilde hazırlanmıştır. RBDV primerlerin hedef DNA’ya bağlanma (annealing) ve uzama (extension) süre ve sıcaklıkları ise döngüleri ortak olup PCR cihazı 1 döngü 94 °C’de 5 dakika; 35 döngü 94 °C’de 30 saniye, 55°C’de 45 saniye, 72 °C’de 1 dakika ve 1 döngü 72 °C’de 10 dakika olarak programlanmıştır.

RBDV MPUP/MPLO ve CPUP/RNA1.2LO primeri kullanılarak PCR karışımı 5 µl d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O, Phusion Flash 12,5 µl, Primer F 1,25 µl, Primer R 1,25 µl cDNA olacak şekilde hazırlanmıştır. RBDV primerin hedef DNA’ya bağlanma (annealing) ve uzama(extension) süre ve sıcaklıkları ise döngüleri ortak olup PCR cihazı 1 döngü 95 °C’de 5 dakika; 40 döngü 94 °C’de 1 dakika, 55°C’de 1,30 dakika, 72 °C’de 1,30 dakika ve 1 döngü 72 °C’de 7 dakika olarak programlanmıştır.

### 3.2.2.4. Agaroz Jel Elektrofrezisi

RT-PCR ürünlerinin görüntülenmesi için %1'lik Agaroz jel elektroforez işlemi yapılmıştır. 1 gr Agaroz, 100 ml 1x TAE tamponu içerisinde mikrodalga fırında çözündürülüp tarak yerleştirilmiş ve jel tepsisine düz bir zemin üzerinde dökülerek agarozun polimerizasyonu için 20 dk süre ile bekletilmiştir. Jelin polimerizasyonundan sonra tarak dikkatli bir şekilde alınıp jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir. 1xTAE tamponu tankın içersine jeli kapatacak şekilde döküldükten sonra jel çukurlarına DNA marker ile beraber PCR ürünleri jel çukurlarına yüklenmiştir. Yükleme tamamlandıktan sonra elektroforez güç kaynağı ile elektroforez tankına 150V'luk elektrik akımı yaklaşık 50 dakika süreyle uygulanmıştır. Ethidium Bromid (EtBr) 0,5 µg/ml konsantrasyonda 100 ml suya karıştırılmış ve jel bu karışım içerisinde 5-6 dakika tutularak boyanmıştır. Jel UV ışıkta görüntülenip oluşan bantların büyüklüğüne göre sonuçlar değerlendirilmiştir. Testlenen virüslere karşı örnekler kullanılan pozitif kontrollerle karşılaştırılmış ve beklenen düzeyde bant oluşturanlar pozitif, oluşturmayanlar negatif kabul edilerek jel görüntüleme cihazında fotoğraflanmıştır.

#### **3.2.2.5. DNA Dizileme, Blast ve Filogenetik Analizler**

PCR ile çoğaltılan her bir izolata ait PCR ürünü DNA fragmentlerinin baz dizileri tayin edilmek üzere baz dizisi tayin eden firmaya (Medsantek, İstanbul) gönderilmiş ve sonuçlar online olarak alınmıştır. Çoklu baz dizisi karşılaştırmaları Bioedit bilgisayar yazılımının (Hall, 1999) Clustal W 2.0.11 seçeneğiyle yapılmıştır. Daha sonra MEGA X (Tamura ve ark. 2018) yazılımı kullanılarak genetik uzaklıklar belirlenmiş ve neighbor-joining algoritmasına göre filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur.

## 4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1 Arazi Çalışmaları

Bu çalışma kapsamında Hatay ilinden 153, Bursa'dan 230, Mersin'den 45, Adana'dan 37 Kahramanmaraş'tan 17 olmak üzere toplam 482 *Rubus* spp. örneği toplanmıştır.

Bu çalışmada *Rubus* türlerinde gözlenen en yaygın belirtiler yapraklarda deformasyon, sararma, yapraklarda kıvrılma, yaprak kırışıklıkları, damar aralarında sararma ve kızarma, yapraklarda damar açılmaları, yapraklarda küçülme şeklinde olmuştur (Şekil 4.1, 4.2, 4.3). Örnekleme yapılırken gerek virüs benzeri belirtiler gösteren gerekse belirtilsüz *Rubus* bitkilerinden tesadüfi olarak örnekler alınmıştır.



Şekil 4.1. *Rubus* üretim alanında gözlenen virüs benzeri belirtiler A- Yapraklarda deformasyon, B- Yapraklarda damarlar boyunca kızarma, C- Yapraklarda mozaik lekeler, D- Yaprakta sarı mozaik leke



Şekil 4.2. *Rubus* üretim alanında gözlenen virüs benzeri belirtiler A- Yaprak uçlarında ve damarlar boyunca sararma, B- Virüs belirtisi göstermeyen fakat testleme programına alınan bir örnek

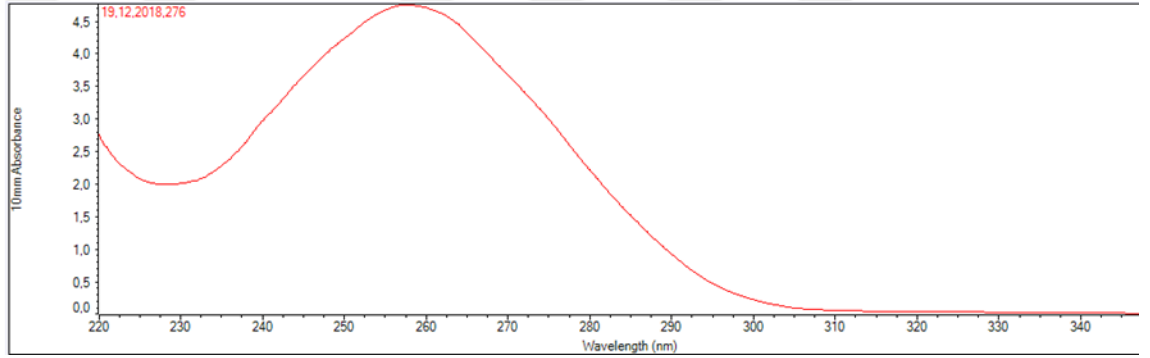


Şekil 4.3. *Rubus* üretim alanında gözlenen virüs benzeri belirtiler A- Yapraklarda deformasyon, kıvrıklık ve kabarma B- yapraklarda deformasyon, sararma ve kıvrıklık

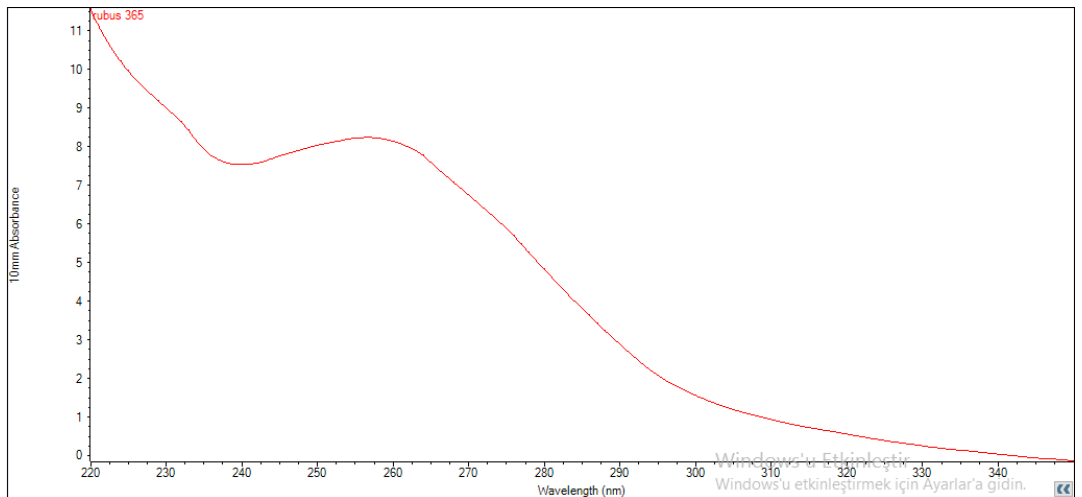
## 4.2. PCR Analizleri (Polymerase Chain Reaction; PCR)

### 4.2.1. Toplam RNA İzolasyonu

Rubus örneklerinden RNA izole etmek için Qiagen RNA kiti, Silica ve Morante-Carriell RNA ekstraksiyon yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemlerle yapılan izolasyonlarda RNA kalitesini belirlemek amacıyla yapılan nanodrop spektrofotometre ölçümlerinde elde edilen RNA'ların yeterli miktarda ve kalitede olduğu saptanmıştır (Şekil 4.4, 4.5, 4.6, ). Testlemelerde kullanılan bu örneklerin bazılarının nanodrop değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

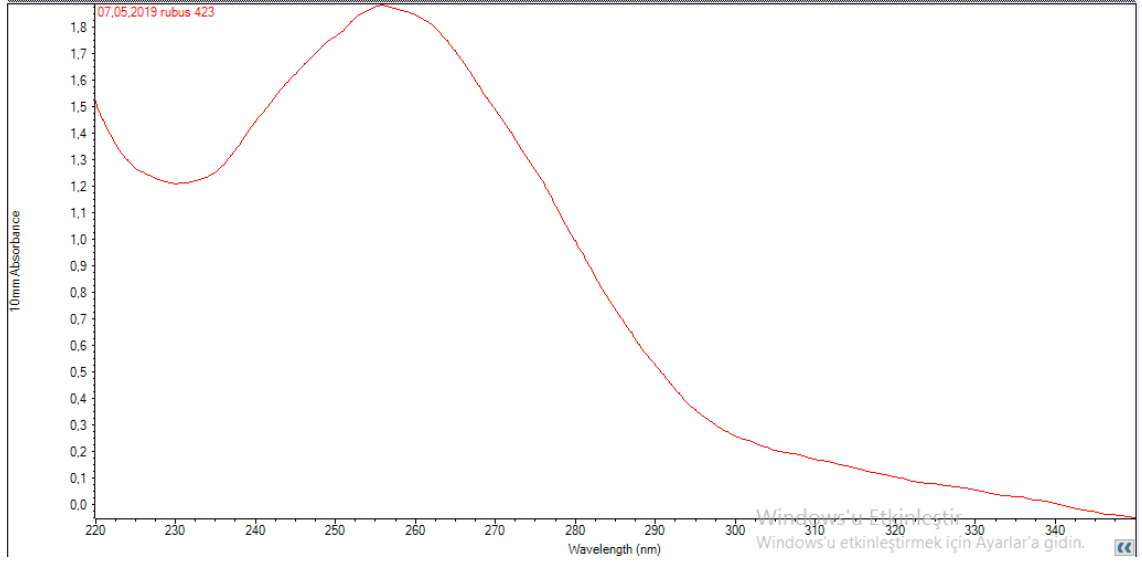


Şekil 4.4 Morante-Carriell RNA Ekstraksiyon yöntemi kullanılarak Rubuslardan izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci ABD ), 276 nolu Ahududu örneği



Şekil 4.5 Qiagen Kiti RNA Ekstraksiyon yöntemi kullanılarak Rubuslardan izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci ABD), 365 nolu Böğürtlen örneği





Şekil 4.6 Silika RNA Ekstraksiyonu yöntemi kullanılarak Rubuslardan izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci ABD ), 423 nolu Böğürtlen örneği

Çizelge 4.1 Ahududu (örnek no: 276), Böğürtlen (örnek no: 365), Böğürtlen (örnek no: 423) örneklerinden ekstrakte edilen bazı RNA'ların nanodrop ölçüm değerleri

ÖRNEK NUMARASI	EXTRAKSIYON YÖNTEMİ	KONSANTRASYON ng / µl	260/280 Optical Density	260/ 230 Optical Density
276	MORANTE CARRIEL	188.1	2.13	2.36
365	QIAGEN	325.1	1.69	0.90
423	SİLİCA	73.8	1.86	1.53

Çizelge ve grafiklerden görüleceği gibi Rubus'lardan RNA izolasyonu için en başarılı yöntemler Silica ve Morante-Cariel olarak tespit edilmiş, Qiagen RNA ticari kiti kullanılarak yapılan izolasyonlarda ise toplam RNA konsantrasyonu yüksek bulunurken RNA kalitesinin düşük olduğu ve polisakkarit kirliliğinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Silica yöntemi Rubus türlerinden RNA izolasyonu amacıyla başarıyla kullanılan bir yöntem olarak bilinmekte olup (Poudel ve ark., 2013), Morante-Cariel ve ark. (2014) tarafından geliştirilen yöntem başta yenedünya olmak üzere kaliteli RNA elde etmenin zor olduğu birçok bitki türünde denenmiş ve bu çalışma ile bu yöntemin Rubus türlerinde de başarıyla kullanılabileceği ortaya konulmuştur.

#### 4.2.2. RT-PCR analizleri

Bu çalışma kapsamında toplanan *Rubus* spp. örneklerinden izole edilen RNA'lar, RBDV tanısı için geliştirilen primer çiftleri ve uygun PCR koşulları kullanılarak RT-PCR yöntemi ile test edilmiştir. Toplanan örneklerin tamamı RBDV'nin kısmi kılıf proteinini çoğaltan Det F/ R (CP), RNA2'nin kodladığı hareketlilik genini çoğaltan MPUP/MPLO (MP) ve RNA3 tarafından kodlanan kılıf proteininin daha büyük bir bölgesini çoğaltan CPUP/RNA1.2 (CP) primerleri kullanılarak testlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. *Rubus* spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları

Bitki Adı	Toplandığı Yer	Örnek Numara	Örnek İsmi	Rbdv Det. F/ R (MPCP) Primer	Rbdv RNA2 Gen Bölgesi MPUP/MPLO Primer	Rbdv RNA3 Gen Bölgesi CPUP/RNA1.2 Primer
Ahududu	Hatay	1	TS 1	+	-	-
Böğürtlen	Hatay	2	TS2	+	-	-
Ahududu	Hatay	3	TS3	+	-	-
Ahududu	Hatay	4	TS4	-	-	-
Ahududu	Hatay	5	TS5	-	-	-
Ahududu	Hatay	6	TS6	-	-	-
Ahududu	Hatay	7	TS7	-	-	-
Ahududu	Hatay	8	TS8	-	-	-
Ahududu	Hatay	9	TS9	-	-	-
Ahududu	Hatay	10	TS10	-	-	-
Ahududu	Hatay	11	TS11	-	-	-
Ahududu	Hatay	12	TS12	-	-	-
Ahududu	Hatay	13	TS13	+	-	-
Ahududu	Hatay	14	TS14	-	-	-
Ahududu	Hatay	15	TS15	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	16	TS16	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	17	TS17	-	-	-
Ahududu	Hatay	18	TS18	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	19	TS19	-	-	-
Ahududu	Hatay	20	TS20	-	-	-
Ahududu	Hatay	21	TS21	-	-	-



Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları

Bitki Adı	Toplandığı Yer	Örnek Numara	Örnek İsmi	Rbdv Det. F/ R (MPCP) Primer	Rbdv RNA2 Gen Bölgesi MPUP/ MPLO Primer	Rbdv RNA3 Gen Bölgesi CPUP/ RNA1.2 Primer
Böğürtlen	Hatay	22	TS22	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	23	TS23	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	24	TS24	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	25	TS25	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	26	TS26	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	27	TS27	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	28	TS28	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	29	TS29	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	30	TS30	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	31	TS31	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	32	TS32	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	33	TS33	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	34	TS34	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	35	TS35	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	36	TS36	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	37	TS37	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	38	TS38	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	39	TS39	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	40	TS40	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	41	TS41	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	42	TS42	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	43	TS43	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	44	TS44	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	45	TS45	+	-	-
Böğürtlen	Hatay	46	TS46	+	-	-
Böğürtlen	Hatay	47	TS47	+	-	-
Böğürtlen	Hatay	48	TS48	+	-	-
Böğürtlen	Hatay	49	TS49	+	-	-
Böğürtlen	Hatay	50	TS50	+	-	-
Böğürtlen	Hatay	51	TS51	+	-	-
Böğürtlen	Hatay	52	TS52	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	53	TS54	+	-	-
Böğürtlen	Hatay	54	TS55	+	-	-
Böğürtlen	Hatay	55	TS57	+	-	-

Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları

Bitki Adı	Toplandığı Yer	Örnek Numara	Örnek İsmi	Rbdv Det. F/ R (MPCP) Primer	Rbdv RNA2 Gen Bölgesi MPUP/ MPLO Primer	Rbdv RNA3 Gen Bölgesi CPUP/ RNA1.2 Primer
Böğürtlen	Hatay	56	TS60	+	-	-
Böğürtlen	Hatay	57	TS61	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	58	TS62	+	-	-
Böğürtlen	Hatay	59	TS63	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	60	TS64	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	61	TS65	+	-	-
Böğürtlen	Hatay	62	TS66	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	63	TS67	+	-	-
Böğürtlen	Hatay	64	TS69	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	65	TS70	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	66	TS72	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	67	TS73	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	68	TS74	+	-	-
Böğürtlen	Hatay	69	TS76	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	70	TS77	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	71	TS79	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	72	TS81	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	73	TS82	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	74	TS83	+	-	-
Böğürtlen	Hatay	75	TS85	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	76	TS87	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	77	TS88	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	78	TS89	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	79	TS90	-	-	-
Ahududu	Hatay	80	TS91	-	-	-
Ahududu	Hatay	81	TS92	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	82	TS93	-	-	-
Ahududu	Hatay	83	TS94	-	-	-
Ahududu	Hatay	84	TS98	+	-	-
Ahududu	Hatay	85	TS99	-	-	-
Ahududu	Hatay	86	TS100	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	87	TS101	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	88	TS102	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	89	TS103	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	90	TS104	-	-	-

Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları

Bitki Adı	Toplandığı Yer	Örnek Numara	Örnek İsmi	Rbdv Det. F/ R (MPCP) Primer	Rbdv RNA2 Gen Bölgesi MPUP/ MPLO Primer	Rbdv RNA3 Gen Bölgesi CPUP/ RNA1.2 Primer
Böğürtlen	Hatay	91	TS105	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	92	TS106	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	93	TS107	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	94	TS108	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	95	TS109	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	96	TS110	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	97	TS111	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	98	TS112	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	99	TS114	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	100	TS115	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	101	TS130	-	-	-
Ahududu	Hatay	102	272	-	-	-
Ahududu	Hatay	103	273	-	-	-
Ahududu	Hatay	104	274	-	-	-
Ahududu	Hatay	105	275	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	106	276	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	107	277	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	108	278	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	109	279	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	110	280	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	111	281	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	112	282	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	113	283	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	114	323	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	115	325	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	116	326	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	117	327	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	118	328	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	119	329	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	120	330	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	121	331	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	122	332	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	123	333	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	124	334	-	-	-

Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları

Bitki Adı	Toplandığı Yer	Örnek Numara	Örnek İsmi	Rbdv Det. F/ R (MPCP) Primer	Rbdv RNA2 Gen Bölgesi MPUP/ MPLO Primer	Rbdv RNA3 Gen Bölgesi CPUP/ RNA1.2 Primer
Böğürtlen	Hatay	125	335	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	126	336	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	127	337	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	128	338	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	129	339	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	130	362	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	131	363	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	132	364	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	133	365	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	134	366	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	135	367	-	-	-
Böğürtlen	Hatay	136	368	-	-	-
Ahududu	Hatay	137	369	-	-	-
Böğürtlen	Hatay Samandağ	138	421	-	-	-
Böğürtlen	Hatay Samandağ	139	422	-	-	-
Böğürtlen	Hatay Samandağ	140	423	-	-	-
Böğürtlen	Hatay Samandağ	141	424	-	-	-
Böğürtlen	Hatay Samandağ	142	425	-	-	-
Böğürtlen	Hatay Samandağ	143	426	-	-	-
Böğürtlen	Hatay Samandağ	144	427	-	-	-
Böğürtlen	Hatay samandağ	145	428	-	-	-
Böğürtlen	Hatay samandağ	146	429	-	-	-
Böğürtlen	Hatay samandağ	147	430	-	-	-
Böğürtlen	Hatay samandağ	148	431	-	-	-
Böğürtlen	Hatay samandağ	149	432	-	-	-
Böğürtlen	Hatay samandağ	150	433	-	-	-
Böğürtlen	Hatay samandağ	151	434	-	-	-
Böğürtlen	Hatay samandağ	152	435	-	-	-
Böğürtlen	Hatay samandağ	153	436	-	-	-
Böğürtlen	Kahraman Maraş	154	211	-	-	-
Böğürtlen	Kahraman Maraş	155	212	-	-	-
Böğürtlen	Kahraman Maraş	156	213	-	-	-
Böğürtlen	Kahraman Maraş	157	214	-	-	-
Böğürtlen	Kahraman Maraş	158	215	-	-	-

Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları

Bitki Adı	Toplandığı Yer	Örnek Numara	Örnek İsmi	Rbdv Det. F/ R (MPCP) Primer	Rbdv RNA2 Gen Bölgesi MPUP/ MPLO Primer	Rbdv RNA3 Gen Bölgesi CPUP/ RNA1.2 Primer
Böğürtlen	Kahraman Maraş	159	216	-	-	-
Böğürtlen	Kahraman Maraş	160	217	-	-	-
Böğürtlen	Kahraman Maraş	161	218	-	-	-
Böğürtlen	Kahraman Maraş	162	219	-	-	-
Böğürtlen	Kahraman Maraş	163	220	-	-	-
Böğürtlen	Kahraman Maraş	164	221	-	-	-
Böğürtlen	Kahraman Maraş	165	222	-	-	-
Böğürtlen	Kahraman Maraş	166	223	-	-	-
Böğürtlen	Kahraman Maraş	167	224	-	-	-
Böğürtlen	Kahraman Maraş	168	225	-	-	-
Böğürtlen	Kahraman Maraş	169	226	-	-	-
Böğürtlen	Kahraman Maraş	170	227	-	-	-
Böğürtlen	Adana	171	374	-	-	-
Böğürtlen	Adana	172	375	-	-	-
Böğürtlen	Adana	173	376	-	-	-
Böğürtlen	Adana	174	377	-	-	-
Böğürtlen	Adana	175	378	-	-	-
Böğürtlen	Adana	176	379	-	-	-
Böğürtlen	Adana	177	380	-	-	-
Böğürtlen	Adana	178	381	-	-	-
Böğürtlen	Adana	179	382	-	-	-
Böğürtlen	Adana	180	383	-	-	-
Böğürtlen	Adana	181	384	-	-	-
Böğürtlen	Adana	182	385	-	-	-
Böğürtlen	Adana	183	386	-	-	-
Böğürtlen	Adana	184	387	-	-	-
Böğürtlen	Adana	185	388	-	-	-
Böğürtlen	Adana	186	389	-	-	-
Böğürtlen	Adana	187	400	-	-	-
Böğürtlen	Adana	188	401	-	-	-
Böğürtlen	Adana	189	402	-	-	-

Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları

Bitki Adı	Toplandığı Yer	Örnek Numara	Örnek İsmi	Rbdv Det. F/ R (MPCP) Primer	Rbdv RNA2 Gen Bölgesi MPUP/ MPLO Primer	Rbdv RNA3 Gen Bölgesi CPUP/ RNA1.2 Primer
Böğürtlen	Adana	190	403	-	-	-
Böğürtlen	Adana	191	404	-	-	-
Böğürtlen	Adana	192	405	-	-	-
Böğürtlen	Adana	193	406	-	-	-
Böğürtlen	Adana	194	407	-	-	-
Böğürtlen	Adana	195	408	-	-	-
Böğürtlen	Adana	196	409	-	-	-
Böğürtlen	Adana	197	410	-	-	-
Böğürtlen	Adana	198	411	-	-	-
Böğürtlen	Adana	199	412	-	-	-
Böğürtlen	Adana	200	413	-	-	-
Böğürtlen	Adana	201	414	-	-	-
Böğürtlen	Adana	202	415	-	-	-
Böğürtlen	Adana	203	416	-	-	-
Böğürtlen	Adana	204	417	-	-	-
Böğürtlen	Adana	205	418	-	-	-
Böğürtlen	Adana	206	419	-	-	-
Böğürtlen	Adana	207	420	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	208	183	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	209	184	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	210	185	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	211	186	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	212	187	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	213	188	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	214	189	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	215	190	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	216	191	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	217	192	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	218	193	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	219	194	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	220	195	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	221	196	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	222	197	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	223	198	-	-	-

Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları

Bitki Adı	Toplandığı Yer	Örnek Numara	Örnek İsmi	Rbdv Det. F/ R (MPCP) Primer	Rbdv RNA2 Gen Bölgesi MPUP/ MPLO Primer	Rbdv RNA3 Gen Bölgesi CPUP/ RNA1.2 Primer
Böğürtlen	Mersin	224	199	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	225	200	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	226	201	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	227	202	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	228	203	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	229	204	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	230	205	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	231	206	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	232	207	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	233	208	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	234	209	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	235	210	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	236	211	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	237	212	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	238	213	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	239	214	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	240	215	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	241	216	-	-	-
Böğürtlen	Mersin	242	284	-	-	-
Böğürtlen	Mersin silifke	243	285	-	-	-
Böğürtlen	Mersin silifke	244	286	-	-	-
Böğürtlen	Mersin silifke	245	287	-	-	-
Böğürtlen	Mersin silifke	246	288	-	-	-
Böğürtlen	Mersin silifke	247	289	-	-	-
Ahududu	Mersin silifke	248	290	-	-	-
Ahududu	Mersin silifke	249	291	-	-	-

Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları

Bitki Adı	Toplandığı Yer	Örnek Numara	Örnek İsmi	Rbdv Det. F/ R (MPCP) Primer	Rbdv RNA2 Gen Bölgesi MPUP/ MPLO Primer	Rbdv RNA3 Gen Bölgesi CPUP/ RNA1.2 Primer
Böğürtlen	Mersin silifke	250	292	-	-	-
Böğürtlen	Mersin silifke	251	293	-	-	-
Böğürtlen	Mersin silifke	252	294	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	253	B1	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	254	B2	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	255	B3	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	256	B4	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	257	B5	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	258	B6	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	259	B7	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	260	B8	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	261	B9	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	262	B10	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	263	B11	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	264	B12	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	265	B13	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	266	B14	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	267	B15	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	268	B16	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	269	B17	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	270	B18	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	271	B19	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	272	B20	-	-	-
Ahududu	Bursa	273	B22	-	-	-
Ahududu	Bursa	274	B24	-	-	-
Ahududu	Bursa	275	B26	+	-	-
Ahududu	Bursa	276	B27	-	-	-
Ahududu	Bursa	277	B28	+	-	-



Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları

Bitki Adı	Toplandığı Yer	Örnek Numara	Örnek İsmi	Rbdv Det. F/ R (MPCP) Primer	Rbdv RNA2 Gen Bölgesi MPUP/ MPLO Primer	Rbdv RNA3 Gen Bölgesi CPUP/ RNA1.2 Primer
Ahududu	Bursa	278	B29	-	-	-
Ahududu	Bursa	279	B31	+	-	+
Ahududu	Bursa	280	B32	+	-	+
Yabani böğürtlen	Bursa	281	B33	+	-	-
Ahududu	Bursa	282	B34	-	-	-
Ahududu	Bursa	283	B35	-	-	-
Ahududu	Bursa	284	B36	+	-	-
Ahududu	Bursa	285	B37	-	-	-
Ahududu	Bursa	286	B38	-	-	-
Ahududu	Bursa	287	B40	-	-	-
Ahududu	Bursa	288	B41	-	-	-
Ahududu	Bursa	289	B42	-	-	-
Ahududu	Bursa	290	B43	-	-	-
Ahududu	Bursa	291	B44	-	-	-
Ahududu	Bursa	292	B46	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	293	B47	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	294	B48	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	295	B49	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	296	B50	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	297	B51	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	298	B52	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	299	B53	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	300	B54	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	301	B55	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	302	B56	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	303	B57	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	304	B58	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	305	B59	-	-	-
Ahududu	Bursa	306	B60	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	307	B61	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	308	B62	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	309	B63	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	310	B64	-	-	-

Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları

Bitki Adı	Toplandığı Yer	Örnek Numara	Örnek İsmi	Rbdv Det. F/ R (MPCP) Primer	Rbdv RNA2 Gen Bölgesi MPUP/ MPLO Primer	Rbdv RNA3 Gen Bölgesi CPUP/ RNA1.2 Primer
Böğürtlen	Bursa	311	B65	-	-	-
Ahududu	Bursa	312	B66	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	313	B67	-	-	-
Ahududu	Bursa	314	B68	-	-	-
Ahududu	Bursa	315	B69	-	-	-
Ahududu	Bursa	316	B70	-	-	-
Ahududu	Bursa	317	B71	-	-	-
Ahududu	Bursa	318	B72	-	-	-
Ahududu	Bursa	319	B73	-	-	-
Ahududu	Bursa	320	B74	-	-	-
Ahududu	Bursa	321	B75	-	-	-
Ahududu	Bursa	322	B76	+	-	-
Ahududu	Bursa	323	B77	-	-	-
Ahududu	Bursa	324	B78	-	-	-
Ahududu	Bursa	325	B79	-	-	-
Ahududu	Bursa	326	B80	-	-	-
Ahududu	Bursa	327	B81	-	-	-
Ahududu	Bursa	328	B82	-	-	-
Ahududu	Bursa	329	B83	-	-	-
Ahududu	Bursa	330	B84	+	-	+
Ahududu	Bursa	331	B85	+	+	+
Ahududu	Bursa	332	B86	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	333	B87	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	334	B88	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	335	B89	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	336	B90	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	337	B91	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	338	B92	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	339	B93	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	340	B94	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	341	B95	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	342	B96	-	-	-

Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları

Bitki Adı	Toplandığı Yer	Örnek Numara	Örnek İsmi	Rbdv Det. F/ R (MPCP) Primer	Rbdv RNA2 Gen Bölgesi MPUP/ MPLO Primer	Rbdv RNA3 Gen Bölgesi CPUP/ RNA1.2 Primer
Yabani böğürtlen	Bursa	343	B97	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	344	B98	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	345	B99	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	346	B100	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	347	B101	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	348	B102	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	349	B103	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	350	B104	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	351	B105	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	352	B106	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	353	B107	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	354	B108	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	355	B109	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	356	B111	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	357	B112	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	358	B113	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	359	B114	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	360	B115	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	361	B116	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	362	B117	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	363	B118	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	364	B119	-	-	-

Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları

Bitki Adı	Toplandığı Yer	Örnek Numara	Örnek İsmi	Rbdv Det. F/ R (MPCP) Primer	Rbdv RNA2 Gen Bölgesi MPUP/ MPLO Primer	Rbdv RNA3 Gen Bölgesi CPUP/ RNA1.2 Primer
Yabani böğürtlen	Bursa	365	B120	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	366	B121	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	367	B122	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	368	B123	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	369	B124	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	370	B125	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	371	B126	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	372	B127	-	-	-
Ahududu	Bursa	373	B128	-	-	-
Ahududu	Bursa	374	B129	-	-	-
Ahududu	Bursa	375	B130	-	-	-
Ahududu	Bursa	376	B131	-	-	-
Ahududu	Bursa	377	B132	-	-	-
Ahududu	Bursa	378	B133	-	-	-
Ahududu	Bursa	379	B134	-	-	-
Ahududu	Bursa	380	B135	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	381	B136	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	382	B137	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	383	B138	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	384	B139	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	385	B140	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	386	B141	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	387	B142	-	-	-
Ahududu	Bursa	388	B143	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	389	B144	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	390	B145	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	391	B146	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	392	B147	-	-	-

Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları

Bitki Adı	Toplandığı Yer	Örnek Numara	Örnek İsmi	Rbdv Det. F/ R (MPCP) Primer	Rbdv RNA2 Gen Bölgesi MPUP/ MPLO Primer	Rbdv RNA3 Gen Bölgesi CPUP/ RNA1.2 Primer
Böğürtlen	Bursa	393	B148	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	394	B149	-	-	-
Yabani	Bursa	395	B150	-	-	-
böğürtlen						
Yabani	Bursa	396	B151	-	-	-
böğürtlen						
Yabani	Bursa	397	B152	-	-	-
böğürtlen						
Yabani	Bursa	398	B153	-	-	-
böğürtlen						
Böğürtlen	Bursa	399	B154	-	-	-
Yabani	Bursa	400	B155	-	-	-
böğürtlen						
Yabani	Bursa	401	B156	-	-	-
böğürtlen						
Ahududu	Bursa	402	B157	+	+	+
Ahududu	Bursa	403	B158	+	+	+
Yabani	Bursa	404	B159	-	-	-
böğürtlen						
Ahududu	Bursa	405	B160	+	+	-
Yabani	Bursa	406	B161	-	-	-
böğürtlen						
Ahududu	Bursa	407	B162	+	+	+
Ahududu	Bursa	408	B163	+	+	+
Ahududu	Bursa	409	B164	+	+	+
Ahududu	Bursa	410	B165	+	+	+
Ahududu	Bursa	411	B166	-	-	-
Ahududu	Bursa	412	B167	+	+	+
Böğürtlen	Bursa	413	B168	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	414	B169	-	-	-
Yabani	Bursa	415	B170	-	-	-
böğürtlen						
Yabani	Bursa	416	B171	-	-	-
böğürtlen						
Yabani	Bursa	417	B172	-	-	-
böğürtlen						

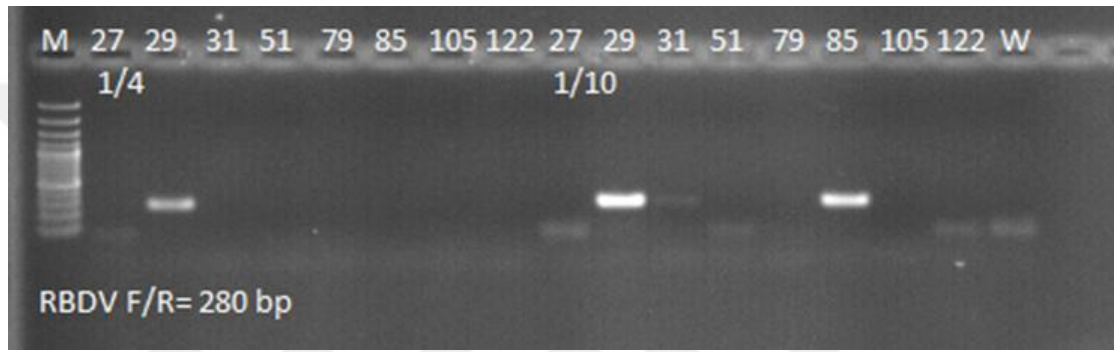
Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları

Bitki Adı	Toplandığı Yer	Örnek Numara	Örnek İsmi	Rbdv Det. F/ R (MPCP) Primer	Rbdv RNA2 Gen Bölgesi MPUP/ MPLO Primer	Rbdv RNA3 Gen Bölgesi CPUP/ RNA1.2 Primer
Böğürtlen	Bursa	418	B173	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	419	B174	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	420	B175	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	421	B176	+	-	-
Böğürtlen	Bursa	422	B177	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	423	B178	-	-	-
Yabani böğürtlen	Bursa	424	B179	+	-	-
Böğürtlen	Bursa	425	B180	+	-	-
Böğürtlen	Bursa	426	B181	+	-	-
Ahududu	Bursa	427	B182	-	-	-
Ahududu	Bursa	428	B183	-	-	-
Ahududu	Bursa	429	B184	-	-	-
Ahududu	Bursa	430	B185	-	-	-
Ahududu	Bursa	431	B186	-	-	-
Ahududu	Bursa	432	B187	-	-	-
Ahududu	Bursa	433	B188	-	-	-
Ahududu	Bursa	434	B189	-	-	-
Ahududu	Bursa	435	B190	-	-	-
Ahududu	Bursa	436	B191	-	-	-
Ahududu	Bursa	437	B192	-	-	-
Ahududu	Bursa	438	B193	-	-	-
Ahududu	Bursa	439	B194	-	-	-
Ahududu	Bursa	440	B195	-	-	-
Ahududu	Bursa	441	B196	-	-	-
Ahududu	Bursa	442	B197	-	-	-
Ahududu	Bursa	443	B198	-	-	-
Ahududu	Bursa	444	B199	-	-	-
Ahududu	Bursa	445	B200	-	-	-
Ahududu	Bursa	446	B201	-	-	-
Ahududu	Bursa	447	B202	-	-	-
Ahududu	Bursa	448	B203	-	-	-
Ahududu	Bursa	449	B204	-	-	-

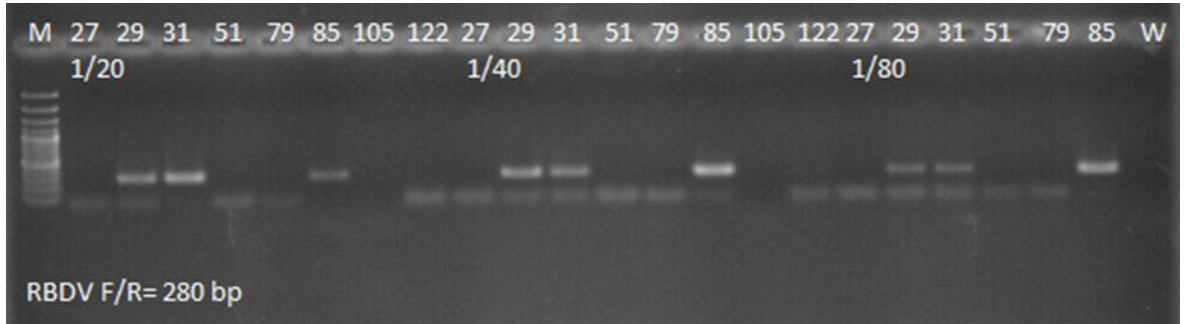
Çizelge 4.2. (devam) Rubus spp. yetiştirilen farklı illerden toplanan bitki örneklerinin raspberry busy dwarf virus'un 2 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları

Bitki Adı	Toplandığı Yer	Örnek Numara	Örnek İsmi	Rbdv Det. F/ R (MPCP) Primer	Rbdv RNA2 Gen Bölgesi MPUP/ MPLO Primer	Rbdv RNA3 Gen Bölgesi CPUP/ RNA1.2 Primer
Ahududu	Bursa	450	B205	-	-	-
Ahududu	Bursa	451	B206	-	-	-
Ahududu	Bursa	452	B207	-	-	-
Ahududu	Bursa	453	B208	-	-	-
Ahududu	Bursa	454	B209	-	-	-
Ahududu	Bursa	455	B210	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	456	B233	-	-	-
Ahududu	Bursa	457	B234	-	-	-
Ahududu	Bursa	458	B235	-	-	-
Ahududu	Bursa	459	B236	-	-	-
Ahududu	Bursa	460	B237	-	-	-
Ahududu	Bursa	461	B238	-	-	-
Ahududu	Bursa	462	B243	-	-	-
Ahududu	Bursa	463	B246	-	-	-
Ahududu	Bursa	464	B249	-	-	-
Ahududu	Bursa	465	B250	-	-	-
Ahududu	Bursa	466	B252	-	-	-
Ahududu	Bursa	467	B259	-	-	-
Ahududu	Bursa	468	B260	-	-	-
Ahududu	Bursa	469	B261	-	-	-
Ahududu	Bursa	470	B262	-	-	-
Ahududu	Bursa	471	B263	-	-	-
Ahududu	Bursa	472	B269	-	-	-
Ahududu	Bursa	473	B270	-	-	-
Ahududu	Bursa	474	B271	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	475	B272	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	476	B273	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	477	B274	-	-	-
Ahududu	Bursa	478	B318	-	-	-
Ahududu	Bursa	479	B319	-	-	-
Ahududu	Bursa	480	B320	-	-	-
Ahududu	Bursa	481	B321	-	-	-
Böğürtlen	Bursa	482	B322	-	-	-

Çizelge 4.2.'de görüldüğü gibi bu çalışma kapsamında Hatay ilinden 153, Bursa'dan 230, Mersin'den 45, Adana'dan 37 Kahramanmaraş'tan 17 olmak üzere toplam 482 *Rubus* örneği öncelikle raspberry bushy dwarf virus'un kılıf proteinini çoğaltan tanı primeri (RBDV F/R ) ile testlenmiştir. Örnekler testlenmeden önce bu primer çifti ile sadece pozitif kontroller kullanılarak sistem kurma çalışmaları yapılmıştır. Sistem kurma çalışmaları esnasında pozitif kontrol olarak kullanılan örneklerden izole edilen cDNA'lar doğrudan ve 1/4, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 oranlarında sulandırılarak kullanılmıştır (Şekil 4.7, 4.8, 4.9).

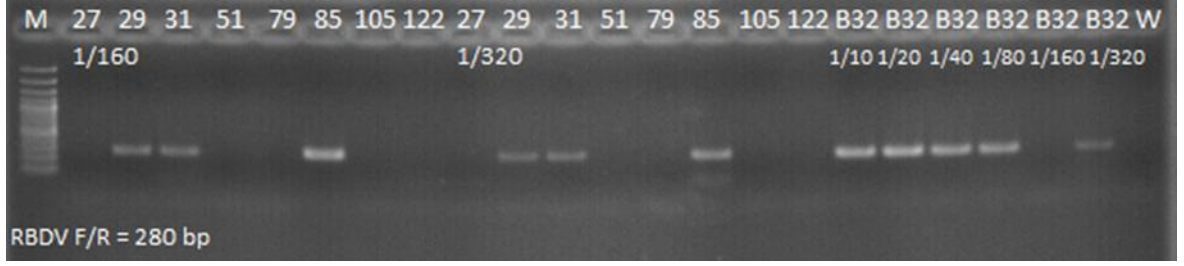


Şekil 4.7 Bursa'dan toplanan *Rubus* örneklerinde raspberry bushy dwarf virus tespiti için RBDVF/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi. Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 27, 29, 31, 51, 79, 85, 105, 122: Bursa örnekleri W: Su kontrol; (1/4 cDNA, 1/10 cDNA sulandırma serileri)



Şekil 4.8 Bursa'dan toplanan *Rubus* örneklerinde Raspberry bushy dwarf virus tespiti için RBDVF/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi. Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD ); 27, 29, 31, 51, 79, 85, 105, 122: Bursa örnekleri ; W: Su kontrol; (1/20 cDNA, 1/40 cDNA, 1/80 cDNA, sulandırma serileri)





Şekil 4.9 Bursa'dan toplanan *Rubus* örneklerinde Raspberry bushy dwarf virus tespiti için RBDVF/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi. Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 27, 29, 31, 51, 79, 85, 105, 122, B32: Bursa örnekleri ; W: Su kontrol; ( 1/10 cDNA, 1/20 cDNA, 1/40 cDNA, 1/80 cDNA, 1/160 cDNA, 1/320 cDNA, sulandırma serileri)

Pozitif kontroller kullanılarak sistem kurma çalışmalarında RBDVF/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizlerinde 1/4, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 ve 1/320 oranlarında sulandırılan cDNA'lar kullanıldığında tüm seyreltme serilerinde beklenen düzeyde (280 bp) bant elde edilmiştir. En iyi bant 1/10 ve 1/20 oranlarında sulandırılan cDNA'larda elde edilmiştir.

Mersin, Kahramanmaraş, Adana ilinde bu virüse rastlanmazken Hatay'da testlenen örneklerde RBDV ile enfeksiyon oranı % 13.72, Bursa'da ise % 9.13 yoğunlukta bulunmuştur. (Çizelge 4. 3 )

Çizelge 4.3. *Rubus spp* plantasyonlarında RBDV tespit edilen iller, testlenen örnek sayısı ve enfeksiyon oranları (%)

ÖRNEK TOPLANAN İLLER	(ENFEKTELİ ÖRNEK SAYISI x 100 )/TESTLENEN ÖRNEK SAYISI	ENFEKSİYON ORANI (%)
HATAY	21/153	13,72
KAHRAMAN MARAŞ	0/17	0
ADANA	0/37	0
MERSİN	0/45	0
BURSA	21/230	9,13

RBDV'nin saptanması amacıyla virüsün kılıf proteininin küçük bir bölgesini çoğaltan ve tanı primeri olarak kullanılan RBDV F/R primerleri ile yapılan RT-PCR analizlerinde Bursa'dan toplanılan 230 *Rubus* örneğinden 21 tanesi RBDV ile enfekteli olarak bulunurken Hatay'dan toplanan 153 örneğin 21 tanesinde beklenen düzeyde bant elde edilmiştir (Şekil 4.10). RBDV ile enfekteli bulunan Bursa örneklerinden 16 tanesi ahududu, 3 tanesi böğürtlen, 2 tanesi ise yabancı böğürtlendirdir. Bununla birlikte Hatay ilinden toplanan ve RBDV ile enfekteli bulunan *Rubus* örneklerinin 4 tanesi ahududu,

17 tanesi böğürtlen olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). RBDV'nin ahududularda böğürtlenlere göre daha yaygın olduğu ve virüsün yayılmasının da ahududularda böğürtlenlerden daha hızlı olduğu önceki çalışmalarda da bildirilmiştir (Martin ve Strik, 2002).



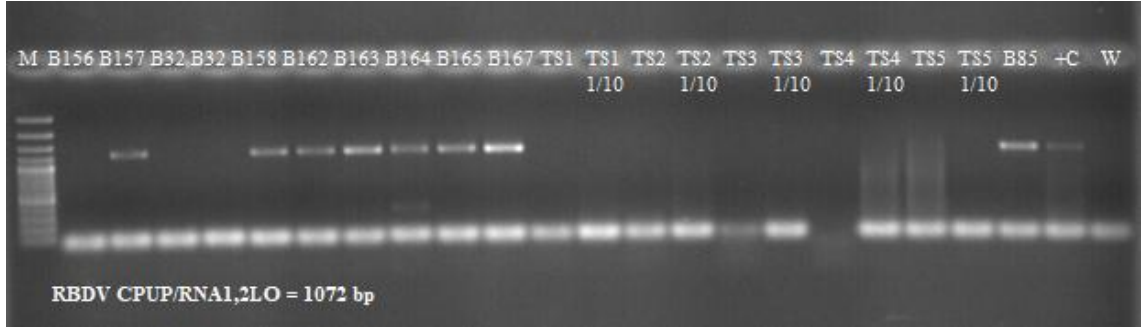
Şekil 4.10 Bursa'dan toplanan *Rubus* spp. örneklerinde raspberry bushy dwarf virus tespiti için RBDV F/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi. M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); B156-B200: Bursa Böğürtlen örnekleri; W: Su Kontrol; +C: Pozitif Kontrol (doğrudan cDNA kullanıldı)

#### 4.2.3. RBDV'nin Genetik Çeşitlilik Çalışması

Bu çalışma kapsamında RBDV'nin genel tanı primeri kullanılarak pozitif bulunan 42 *Rubus* örneği virüsün 2 farklı gen bölgesini (Hareketlilik ve kılıf proteini) çoğaltan primerlerle testlenmiştir.

RBDV'nin RNA3 tarafından kodlanan ve kılıf proteinini çoğaltan RBDV CPUP/ RNA1.2LO primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR analizlerinde Hatay'da tespit edilen 21 RBDV pozitif *Rubus* örneğinin hiç birisinde amplifikasyon gözlenmezken Bursa *Rubus* örneklerinin 15 tanesinde beklenen düzeyde amplifikasyon meydana gelmiş ancak bunlardan 9 tanesi sekans analizi için çoğaltılabilmektedir (B31, B85, B157, B158, B162, B163, B164, B165, B167) (Şekil 4.11). Bu primer çifti ile

RBDV'nin tespiti için beklenen baz büyüklüğü 1072 bp'dir. Sekans analizine gönderilen PCR ürünlerinin blast analiz sonuçları RBDV RNA 3 gen bölgesinin başarıyla çoğaltıldığını göstermiştir(Şekil 4.12).



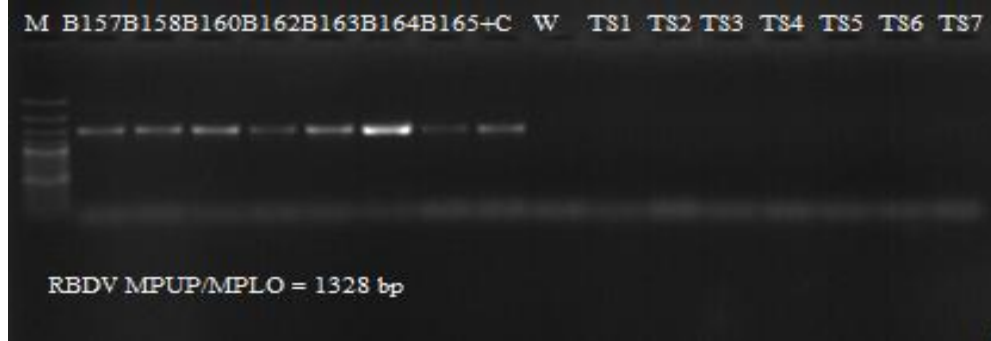
Şekil 4.11 Bursa'dan toplanan *Rubus* örneklerinde Raspberry bushy dwarf virus tespiti için RBDV CPUP/RNA1,2LO primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi. Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); B156, B157, B158, B162, B163, B164, B165, B167, B32, B85 : Bursa örnekleri ; TS1, TS2, TS3, TS4, TS5 : Hatay örnekleri ; W: Su kontrol; +C: Pozitif Kontrol (doğrudan cDNA kullanılarak) Hatay *rubus* örnekleri; TS1, TS2, TS3, TS4, TS5: doğrudan cDNA ve 1/10 sulandırılmış cDNA PCR aşamasında kullanılmıştır.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<a href="#">Raspberry bushy dwarf virus isolate RR5 movement protein and coat protein genes, complete cds</a>	1717	1717	95%	0.0	97.75%	<a href="#">KY417870.1</a>
<a href="#">Raspberry bushy dwarf virus isolate RR7 coat protein gene, complete cds</a>	1703	1703	94%	0.0	98.02%	<a href="#">KY417879.1</a>
<a href="#">Raspberry bushy dwarf virus isolate RR6 coat protein gene, complete cds</a>	1703	1703	94%	0.0	98.02%	<a href="#">KY417878.1</a>
<a href="#">Raspberry bushy dwarf virus isolate RR2 movement protein and coat protein genes, complete cds</a>	1697	1697	95%	0.0	97.36%	<a href="#">KY417868.1</a>
<a href="#">Raspberry bushy dwarf virus isolate RR8 movement protein and coat protein genes, complete cds</a>	1694	1694	95%	0.0	97.27%	<a href="#">KY417871.1</a>
<a href="#">Raspberry bushy dwarf virus segment 2 movement protein and capsid protein genes, complete cds</a>	1692	1692	95%	0.0	97.17%	<a href="#">KJ007640.1</a>
<a href="#">Raspberry bushy dwarf virus isolate RR-1 segment RNA2, complete sequence</a>	1692	1692	95%	0.0	97.27%	<a href="#">EU796088.1</a>
<a href="#">Raspberry bushy dwarf virus isolate RR3 movement protein and coat protein genes, complete cds</a>	1688	1688	95%	0.0	97.17%	<a href="#">KY417869.1</a>
<a href="#">Raspberry bushy dwarf virus isolate CmRR-1 segment RNA2, complete sequence</a>	1683	1683	95%	0.0	97.07%	<a href="#">EU796089.1</a>
<a href="#">Raspberry bushy dwarf virus isolate RR4 coat protein gene, complete cds</a>	1668	1668	94%	0.0	97.33%	<a href="#">KY417877.1</a>
<a href="#">Raspberry bushy dwarf virus genomic RNA, segment:RNA2, complete sequence, isolate: J1</a>	1620	1620	95%	0.0	95.70%	<a href="#">AB948215.1</a>

Şekil 4.12 Bursa'dan toplanan *Rubus* örneklerinde CPUP/RNA1,2LO primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi sonucunda RBDV pozitif çıkan örneklerin sekans analizi sonrasında blast sonucu

Virüsün RNA 2 tarafından kodlanan hareketlilik proteinini saptamak için MPUP/ MPLO primer çifti ile yapılan RT-PCR analizlerinde ise tanı primerleri ile RBDV pozitif bulunan Hatay örneklerinin hiçbirisinde amplifikasyon gözlenmezken, 21 Bursa örneğinin 9 tanesinde (B85, B157, B158, B160, B162, B163, B164, B165, B167 nolu örnekler) beklenen düzeyde (1328 bp) bant gözlenmiştir (Şekil 4.13). Amplifikasyon elde edilen 9 Bursa RBDV izolatu çoğaltılarak PCR ürünleri sekans

analizine gönderilmiş ve sadece 5 örneğin (B157, B160, B163, B164, B167) sekansı RBDV bakımından anlamlı sonuç vermiştir (Çizelge 4.14).



Şekil 4.13 Bursa'dan toplanan *Rubus* örneklerinde raspberry bushy dwarf virus tespiti için RBDV MPUP/ MPLO primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi. Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); B157, B158, B160, B162, B163, B164, B165: Bursa örnekleri ; TS1, TS2, TS3, TS4, TS5, TS6, TS7 : Hatay örnekleri ; W: Su kontrol; +C: Pozitif Kontrol (doğrudan cDNA kullanılarak)

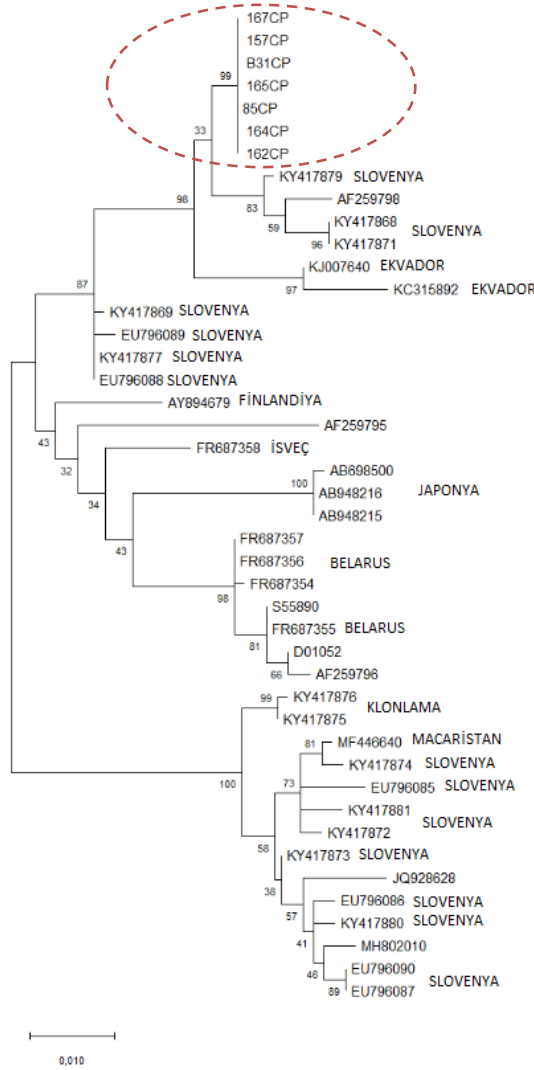
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Raspberry bushy dwarf virus isolate RR5 movement protein and coat protein genes, complete cds</a>	1427	1427	96%	0.0	93.03%	KY417870.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Raspberry bushy dwarf virus segment 2 movement protein and capsid protein genes, complete cds</a>	1427	1427	96%	0.0	93.03%	KJ007640.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Raspberry bushy dwarf virus isolate RR8 movement protein and coat protein genes, complete cds</a>	1423	1423	96%	0.0	92.93%	KY417871.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Raspberry bushy dwarf virus isolate RR2 movement protein and coat protein genes, complete cds</a>	1423	1423	96%	0.0	92.93%	KY417868.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Raspberry bushy dwarf virus isolate RR3 movement protein and coat protein genes, complete cds</a>	1414	1414	96%	0.0	92.73%	KY417869.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Raspberry bushy dwarf virus isolate CmRR-1 segment RNA2, complete sequence</a>	1414	1414	96%	0.0	92.73%	EU796089.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Raspberry bushy dwarf virus isolate RR-1 segment RNA2, complete sequence</a>	1414	1414	96%	0.0	92.73%	EU796088.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Raspberry bushy dwarf virus MP gene for movement protein and CP gene for coat protein, isolate SE3, genomic RNA</a>	1387	1387	96%	0.0	92.12%	FR687358.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Raspberry bushy dwarf virus genomic RNA, segment-RNA2, complete sequence, isolate_J1</a>	1373	1373	96%	0.0	91.82%	AB948215.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">RNA-3 coat protein homolog, alfalfa mosaic virus RNA-3 32K protein homolog (RNA-2) [raspberry bushy dwarf virus, Genomic RNA, 223]</a>	1364	1364	96%	0.0	91.52%	S55890.1
<input type="checkbox"/> <a href="#">Raspberry bushy dwarf virus MP gene for movement protein and CP gene for coat protein, isolate BY8, genomic RNA</a>	1355	1355	96%	0.0	91.31%	FR687356.1

Şekil 4.14 Bursa'dan toplanan *Rubus* örneklerinde RBDV MPUP/ MPLO primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi sonucunda elde edilen PCR ürünlerinin sekans analizi sonrasında blast sonucu

#### 4.2.4. Filogenetik Analizler

Sekans analizleri sonuçlarına göre RBDV açısından anlamlı DNA dizilerine sahip olan 7 örneğe (B31, B85, B157, B162, B164, B165, B167) ait sekanslar 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. RBDV izolatlarına ait NJ dendrogramı incelendiğinde,

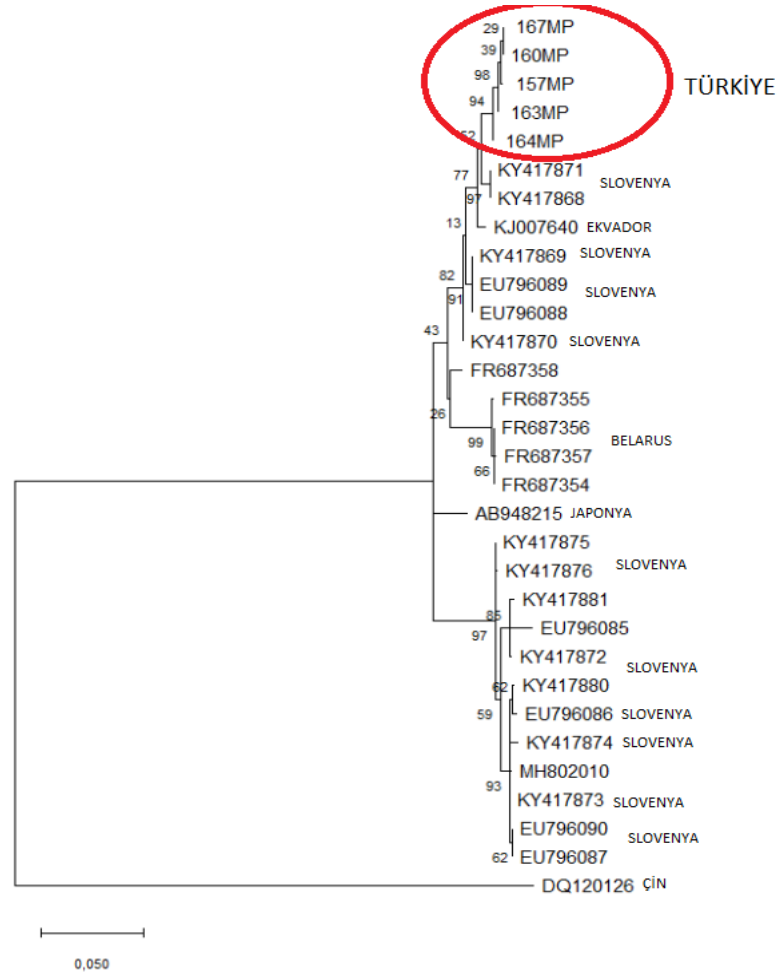
RBDV Türkiye izolatlarının birbirine çok benzediği, aynı grup içerisinde yer aldığı ve en yakın bootstrap değeri % 97 benzerlik oranıyla Slovenya izolatları (KY417879, KY417868, KY417871) ile gösterdiği saptanmıştır (Şekli 4.15).



Şekil 4.15. Raspberry bushy dwarf virus 'un RNA3 (CP) gen bölgesini çoğaltan CPUP/RNA1,2LO 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

RNA 2'nin kodladığı hareketlilik genini amplifiye eden MPUP/ MPLO primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizlerinde ise 9 Bursa örneğinde (B85, B157, B158, B160, B162, B163, B164, B165, B167 nolu örnekler) beklenen düzeyde (1328

bp) amplifikasyon meydana gelmiştir. Beklenen düzeydeki 9 örnek çoğaltılarak sekansa gönderilmiştir. Sekans analizleri sonuçları incelendiğinde bu örneklerden sadece 5 örnek (B157, B160, B163, B164, B167) RBDV bakımından anlamlı sonuç vermiştir. 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. RBDV izolatlarına ait NJ dendrogramı incelendiğinde, RBDV Türkiye izolatlarının birbirine çok benzediği, aynı grup içerisinde yer aldığı ve en yakın bootstrap değeri % 93 benzerlik oranıyla Slovenya izolatları, en uzak homolojiyi ise Çin izolatı (DQ120126) ile gösterdiği saptanmıştır (Şekli 4.16).



Şekil 4.16. Raspberry bushy dwarf virus 'un RNA2 (MP) gen bölgesi için RBDV MPUP/ MPLO 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 araştırma, ülkemizde son yıllarda popülaritesi yüksek olan ve yetiştiriciliği yaygınlaşan yabancı ve kültüre alınan ahududu ve böğürtlen bitkilerinden izole edilen raspberry bushy dwarf virus (RBDV) izolatlarının kısmi sekanslarının karşılaştırmalı genomik analizlerine yönelik bir çalışmadır. Bu çalışma kapsamında Akdeniz Bölgesinde Hatay'dan 153, Kahramanmaraş'tan 17, Adana'dan 37, Mersin'den 45; Marmara Bögesinde Bursa'dan 230 örnek alınarak toplamda 482 *Rubus spp* örneği RBDV açısından testlenmiş, tanı primeri ile pozitif bulunan örnekler virüsün kılıf ve hareketlilik proteinlerini kodlayan primerlerle de testlenerek genetik çeşitlilikleri araştırılmıştır. En yaygın RBDV enfeksiyonu %13.72 oranı ile Hatay ilinde tespit edilirken bunu %9.13 enfeksiyon oranı ile Bursa ili izlemiştir. Diğer illerden toplanan *Rubus spp.* örneklerinde RBDV tespit edilememiştir. Bursa ili ülkemizde ticari olarak *Rubus* türlerinin en yoğun yetiştirildiği ilimiz olup özellikle ahududu yetiştiriciliği açısından çok uygun ekolojiye sahiptir. Bu çalışma kapsamında Bursa yöresinden toplanan *Rubus* türlerinin büyük bir çoğunluğunu ahududu oluşturmuş ve testlenen toplam 230 örneğin 108 tanesi ahududu, 81 tanesi böğürtlen ve 41 tanesi de yabancı böğürtlen iken Hatay'dan 125 böğürtlen, 28 ahududu testlenmiştir. Ahududu yetiştiriciliği açısından Hatay ili uygun iklim koşullarına sahip olmadığı için bu ildeki ahududularda yoğun kurumalar ve bitki ölümleri gözlenmiştir. RBDV'nin il ve *Rubus* türü bazındaki durumu incelendiğinde ise RBDV'nin Hatay ilinde Bursa iline göre daha yaygın ve enfeksiyon oranının ahududularda böğürtlene göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Hatay ilinde enfeksiyon oranının daha yüksek bulunmasının bahçe sayısının daha az olması ve ildeki plantasyonların tek bir fidanlıktan dağıtılan fidanlarla kurulmuş olması nedeniyle olduğu düşünülmektedir. RBDV'nin ahududularda böğürtlenlere göre daha yaygın olduğu ve virüsün yayılmasının ahududularda böğürtlenlerden daha hızlı olduğu önceki çalışmalarda da tespit edilmiştir. RBDV'nin genetik çeşitliliğinin araştırıldığı bu çalışmada Bursa iline ait *Rubus* örneklerinde, virüsün kılıf ve hareketlilik genlerini çoğaltan ve 1000bp üzerinde ürün veren primerlerle başarılı bir amplifikasyon elde edilirken Hatay ili izolatlarının çoğaltılamamış olması bu ildeki RBDV izolatlarının genom yapısında farklılık olabileceğinin bir göstergesi olarak düşünülmüştür. Bu çalışma sonuçları temel alınarak özellikle Hatay ili RBDV

izolatlarının “Yeni Nesil Dizileme” yöntemi kullanılarak tüm genom analizlerinin yapılması önerilmektedir.





## KAYNAKÇA

- Ağaoğlu, Y.S., 1986. Grape Fruits. 1st Edn., **Ankara University Agriculture Faculty Publications**, Ankara, pp: 377.
- Ağaoğlu, Y.S., 2003. Past, Present and Future of Small Fruits in Turkey. **I. National Kiwifruit and Small Fruits Symposium**, Ordu. pp. 1-13.
- Ağaoğlu, Y.S., 2003. Üzümsü Meyveler Üretimi. **Türkiye'de Meyve Üretiminin Geliştirilmesi Çalıştayı**, 24 Eylül 2003, 20 s. Ankara.
- Barbara, D.J., Jones, A.T., Henderson, S.J., Wilson, S.C. and Knight, V.H. 1984. Isolates of raspberry bushy dwarf virus differing in Rubus host range. **Ann. Appl. Biol.** 105:49-54.
- Barbara D.J., Morton A., Ramcharan S., Cole I.W., Phillips A., Knight V.H. 2001. Occurrence and distribution of Raspberry bushy dwarf virus in commercial Rubus plantations in England and Wales. **Plant Pathol** 50:747-754.
- Chamberlain, C. J.; Kraus; J., Kohlen, P. D.; Finn, C. E.; Martin, R. R.; 2003. First report of Raspberry bushy dwarf virus in Rubus multibracteatus in China. **Plant. Dis.** 87, 603.
- 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]. (2015), **Morioka Japan**, s 66. Sözlü-özet.
- Dolunay, E.H., Sertkaya, G., 2011. Hatay ili böğürtlen alanlarında virüslerin araştırılması. **Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, Kahramanmaraş**, (Özet). 404.
- Ellis, M.A., Martin, R.R., Wright, S.R., 2005. First report of raspberry bushy dwarf virus in Ohio. **Plant Health Progress**. PHP-2005-0510-01-HN.
- Hall T.A. 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** 41: 95-98.
- Jennings, D. L., and Jones, A. T. 1986. Immunity from raspberry vein chlorosis virus in raspberry and its potential for control of the virus through plant breeding. **Ann. Appl. Biol.** 108:417-422.
- Jones, A.T., Murant, A.F., Jennings, D.L., Wood, G.A., 1982. Association of raspberry bushy dwarf virus with raspberry yellows disease; reaction of Rubus species and cultivars, and the inheritance of resistance. **Annals of Applied Biology** 100: 135-147. ( 9 )
- Jones, Mayo & Murant, 1996. The Plant Viruses, Vol. 5: Polyhedral Virions and Bipartite RNA Genomes, **Plenum Press**, NY, p. 283,
- Kokko H., Lemmetty A., Haimi P., Kfirenlampi S., 1996. New host for raspberry bushy dwarf virus: arctic bramble (Rubus arcticus). **Eur J Plant Pathol** 102:713-717. ( 10 )
- MacFarlane S.A., McGavin W.J. 2009. Genome activation by raspberry bushy dwarf virus coat protein. **J. Gen. Virol.** 90:747-753.
- 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.
- Martin, R.R. 1998. Raspberry viruses in Oregon, Washington and British Columbia. **Acta Hort.** 471:71-74.

- Martin, R.R., Strik B., 2000-2001. Is Raspberry Bushy Dwarf Virus (RBDV) going to be a problem in 'Marion' blackberry? Progress Reports to Agricultural Reesearch Foundation for the Oregon Raspberry/Blackberry Commission. P7-10
- Martin, R.R. 2002. Virus Diseases of Rubus and Strategies for Their Control. **Acta Hort.** 585:265-270.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: **Cold Spring Harbor Laboratory**.
- Mavric Plesko I., Virscek Marn M., Sirca S., Urek G., 2009. Biological, serological and molecular characterisation of Raspberry bushy dwarf virus from grapevine and its detection in the nematode *Longidorus juvenilis*. **Eur J Plant Pathol** 123:261–268. ( 12 )
- Morante-Carriel, J., Sellés-Marchart, S., Martínez-Márquez, A., Martínez-Esteso, 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.
- Martin, R.R. 2004. Recommended procedures for detection of viruses of small fruit crops. **Acta Hort.** 656:199-207.
- Martin, R.R., Tzanetakis, I.E., Gergerich, R., Fernandez, G. and Pesic, Z. 2004. Blackberry yellow vein associated virus: a new crinivirus found in blackberry. **Acta Hort.** 656:137-142.
- Natsuaki T., Mayo MA., Jolly CA., Murrant AF., 1991. Nucleotide <sup>sequence of</sup> raspberry bushy dwarf virus RNA-2: a bicistronic component of a bipartite genome. **Journal of General Virology** 72: 2183-2189
- Okinaka T., Mise K., Suzuki E., Okuno T., Furusawa I., 2001. The C Terminus of brome mosaic virus coat protein controls viral cell-to-cell and long-distance movement. **Journal of Virology** 75: 5385-5390
- Poudel, B., Wintermantel, W. M., Cortez, A. A., Ho, T., Khadgi, A., and Tzanetakis, I. E. 2013. Epidemiology of Blackberry yellow vein associated virus. **Plant Dis.** 97:1352-1357.
- Rott ME, Jelkmann W 2001. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR) and modification of an RNA extraction protocol. **European Journal of Plant Pathology** 107:411-420.
- Sertkaya, G., A.E.Yıldırım, E.H. Dolunay, 2011. Hatay ilinde kırmızı ahududu (*Rubus idaeus*)’da domates halkalı leke virüsü (ToRSV) ve nematode vektörünün araştırılması. **Türkiye IV. Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, Kahramanmaraş, (Özet)**.405.
- Strik, B. and Martin, R. 2002. Raspberry Bushy Dwarf Virus (Rbdv) Reduces Yield Of 'Marion' Blackberry. **Acta Hort.** 585, 413-416
- Strik B, Martin RR 2003. Impact of Raspberry bushy dwarf virus on 'Marion' blackberry. **Plant Dis** 87:294–296. ( 18 )
- Špak, J.; 1995. The occurrence of nepoviruses on raspberries and blackberries in the Czech Republic. **Acta Horticulturae** 385, 117-121.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2018. MEGAX: 'Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods', **Mol. Biol. and Evolution** 35:1547-1549.

- Ananim, 2019. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) WebSayfası. Bitkisel Üretim İstatistikleri. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>.
- Valasevich, N.; Kolbanova, E., 2011. Occurrence of small fruit viruses in Belarus. **21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops.** Julius-Kühn-Archiv, 427,129.
- Viršček Marn, M.; Mavrič, I.; 2006. The occurrence of Raspberry bushy dwarf virus in different grapevine varieties in Slovenia. In: 15th Meeting of the International Council for the Study Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine – Extended Abstracts, 266, Stellenbosch (**South Africa Society for Enology and Viticulture**).



## ÖZGEÇMİŞ

Yazar 1992 yılında Mardin ili Kızıltepe ilçesinde doğdu. İlk ve orta okul Kızıltepe’de Fırat ilköğretim okulunda, Lise eğitimini Kızıltepe lisesinde tamamladı. 2013 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma bölümünü kazandı ve 2017 yılında aynı bölümden mezun oldu. 2017 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.



## **EKLER**

### **MORANTE-CARRIEL VE ARK. (2014)' NIN RNA EXT. BUFFER**

#### **WASHING BUFFER (100 ml)**

TRİS-HCl (pH 7.5)	0,1 M
Sorbitol	0,35 M
10 PEG	%10
Mercaptoethanol	%2

#### **İSOLATION BUFFER (100 ml)**

TRİS-HCl (pH 7.5)	0,3 M
EDTA	25 mM
NaCl	2 M
CTAB	%2
PVP	%2
Spermidine	%0,005

#### **SAFLAŞTIRMA BUFFER (100ml)**

10 M LİCl	10 M
3 M Sodium Asetat	3 M

%70'lik, %96'lık Soğuk Ethanol kullanıldı.

#### **SİLİCA RNA EXT. BUFFER( 1000 ml) (Rott and Jelkmann-2001)**

24,2 g Tris- Base  
12,66 g LiCl  
15 g SDS 2,92 g EDTA veya 3,72 g EDTA\*2H<sub>2</sub>O

10 g Sodium Deoxycholate 10 ml NP- 40  
% 1  $\beta$ -MCE ( Kullanmadan hemen önce eklenmelidir).

**5,8 M POTASYUM ASETAT ( pH 6.5) ( 100 ml)**

60 ml 5 M Potasyum Asetat ( pH 7.5)  
28,5 ml H<sub>2</sub>O  
11,5 ml Glacial asetic asit  
1 M Katı Potasyum Asetat

**SİLİCA WASH BUFFER ( 1000 ml) (Rott and Jelkmann-2001)**

10 mM Tris- HCl ( pH 7.5)  
1 ml 0.5 M EDTA  
1 ml 5M NaCl  
500 ml 100% EtOH  
479 ml sterile H<sub>2</sub>O

**TE BUFFER ( pH 8) ( 1000 ml) (Rott and Jelkmann-2001)**

10 ml 1 M Tris- HCl ( pH 8)  
2 ml 0,5 M EDTA  
Sterile H<sub>2</sub>O ile tamamlanır.

**AGAROS JEL ELEKTROFOREZ (MANIATIS ve ark., 1992)**

**TAEX50 (100 ml)**

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

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

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

Bromophenol blue 15 ml

Glycerol 18 g

TAEX50 6 ml

Hazırlanan ortam -20 °C'de saklanmıştır.

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

0.5X TAE 200 ml

Ethidium bromide 200 µl

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

**%1 Agarose Jel Elektroforezi**

1 g 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.