



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

**BLUEBERRY RED RINGSPOT VIRUS (BRRSV)'ÜNÜN MAVİYEMİŞ
TÜRLERİNDE VE OLASI DİĞER KONUKÇULARINDA MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE TANILANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

ŞAHA GÜNEŞLİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
OCAK-2019**



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BLUEBERRY RED RINGSPOT VIRUS (BRRSV)'ÜNÜN MAVİYEMİŞ
TÜRLERİNDE VE OLASI DİĞER KONUKÇULARINDA MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE TANILANMASI VE KARAKTERİZASYONU

ŞAHA GÜNEŞLİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
OCAK-2019

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BLUEBERRY RED RİNGSPOT VİRUS (BRRSV)'ÜNÜN MAVİYEMİŞ
TÜRLERİNDE VE OLASI DİĞER KONUKÇULARINDA MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE TANILANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Şaha GÜNEŞLİ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

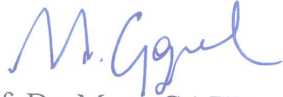
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN danışmanlığında hazırlanan bu tez 28/01/2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN

Başkan



Prof. Dr. Mona GAZEL

Üye



Doç. Dr. Kazım GÜNDÜZ

Üye

Kod No:

Prof. Dr. Erdal SERTKAYA
Enstitü Müdürü

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.

10.01.2019

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.

ŞAHA GÜNEŞLİ

ÖZET

BLUEBERRY RED RINGSPOT VIRUS (BRRSV)'ÜNÜN MAVİYEMİŞ TÜRLEİNDE VE OLASI DİĞER KONUKÇULARINDA MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANILANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Dünyanın birçok bölgesinde antioksidan kapasitesi ve antikanserojen etkileri nedeni ile Vaccinium türleri gün geçtikçe daha popüler olmaktadır. Türkiye'de birçok yabancı Vaccinium türü yanında kültür çeşidi olan *V. arctostaphylos* Marmara, Karadeniz ve Doğu Anadolu bölgeleri de dahil olmak üzere birçok bölgede yetişmektedir. Vaccinium türlerinde görülen en önemli virüslerden birisi de blueberry red ringspot virus (BRRSV) olup "kırmızı halkalı leke hastalığının" etmeni olarak tanımlanmıştır. Ülkemizde bu virüsün maviyemişlerde bulunduğu dair bir kayıt bulunmamakta olup bu tez kapsamında Karadeniz bölgesindeki önemli maviyemiş plantasyonlarının bulunduğu iller ile Bursa ve Mersin'den toplanan örnekler, BRRSV genel tanı primerleri (BRRSV3F/4R) ve narlarda saptanan ve henüz adlandırılmamış olan BRRSV-benzeri olası yeni bir virüse karşı geliştirilen primer çifti (27 F/R) kullanılarak PCR ve DNA sekans analiz yöntemleriyle testlenmiştir. Testlenen 179 maviyemiş örneğinin hiç birisinde her iki primer çifti ile de BRRSV saptanamamıştır. Buna karşın BRRSV3F/4R primer çifti ile testlenen 90 adet narın 3 tanesinde beklenen düzeyde bir amplifikasyon meydana gelmiş ve PCR ürünleri sekans analizine gönderildiğinde gen bankasında kayıtlı BRRSV genomu ile çok küçük bir gen bölgesinin eşleştiği görülmüştür. 27F/R nar primerleri ile yapılan RT-PCR analizlerinde ise testlenen 179 maviyemiş örneğinin 3 tanesinde beklenen düzeyde bir amplifikasyon gözlenmiş ancak sekans analizi sonuçlarına göre bu örneklerin tamamı bitki genomu ile eşleştiği için negatif olarak değerlendirilmiştir. Narlarda ise aynı primer çifti ile testlenen 90 nar örneğinin 3 tanesinde beklenen düzeyde bir amplifikasyon meydana gelmiştir. Bu primer çiftiyle çoğaltılan PCR ürünleri sekans analizine gönderildiğinde genomun oldukça büyük bir bölgesi tanımlanmış BRRSV izolatları ile yüksek oranda homoloji göstermiştir. Yapılan bu çalışma kapsamında maviyemişlerde BRRSV saptanmazken narlarda hem BRRSV-genel tanı primeri hem de narlar için geliştirilen 27F/R primeri ile BRRSV-benzeri virüs genomu tespit edilmiştir. Narların BRRSV ve/veya BRRSV-benzeri olası yeni bir virüsün konukçusu olma olasılığı oldukça yüksek görülmekte ve bu konuda çalışmalara devam edilmesi önerilmektedir.

2019, 41 sayfa

Anahtar kelimeler: Maviyemiş, Nar, BRRSV, PCR, Sekans Analizi

ABSTRACT

DETECTION AND CHARACTERIZATION OF BLUEBERRY RED RINGSPOT VIRUS (BRRSV) IN BLUEBERRIES AND OTHER POSSIBLE HOSTS

Due to their antioxidative properties and anticancerogenous effects, *Rubus* and *Vaccinium* species are getting more popular in almost all parts of the world. In Turkey, beside many wild *Vaccinium* species naturally growing, cultivated blueberry, *V. arctostaphylos*, can also be grown in many provinces including Blacksea, Marmara and Eastern Anatolia regions. One of the most important viruses in *Vaccinium* spp. is blueberry red ringspot virus (BRRSV) which is related to "blueberry red ringspot disease". There has been no any report for BRRSV in Turkey, therefore in this project the blueberry samples were collected from different provinces in Blacksea, Bursa and Mersin and tested for BRRSV using detection primers (BRRSV3F/4R) and 27F/R which was developed for a recently detected BRRSV-like virus in pomegranates by PCR and sequencing analyses. BRRSV was not detected in tested 179 blueberry samples by both primers. However, amplification as expected size was observed in 3 samples when 90 pomegranate samples were tested by BRRSV3F/4R primer pairs. When these PCR products were sequenced and compared with the other BRRSV isolates deposited in GeneBank, it showed homology with a small part of BRRSV genome. Among tested 179 blueberry samples by 27F/R pomegranate primers, expected size amplicons were observed in 3 samples but when PCR products were sequenced, sequences were found belong to the plant genome. Therefore, blueberry samples were regarded as negative for BRRSV with 27F/R primers as well. However, among 90 pomegranate samples 3 were found infected by BRRSV-like virus with the same primer pairs and sequencing results showed that they had a high homology with the BRRSV isolates deposited in GeneBank. In frame of this study, BRRSV was never detected in blueberries but a BRRSV-like virus genome was detected in pomegranates both primer pairs. As a result, there is a high possibility that pomegranates could be a new host for possible BRRSV-like virus and these studies should be continued.

2019, 41 pages

Key Words: Blueberry, Pomegranate, BRRSV, PCR, Sequencing

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez konusunun belirlenmesinde, araştırılmasında ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi ve tecrübesi ile çalışmayı yönlendiren ve her türlü yardımı esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam sayın Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında yardımlarını, değerli görüş ve katkılarını esirgemeyen hocam sayın Prof. Dr. Mona GAZEL'e, laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Zir. Yük. Müh. Kıvılcım SARI'ya, Zir. Yük. Müh. Mehtap ACIOĐLU'na ve ismini burada zikredemediğim diğer arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Her daim yanımda olup beni her konuda sonuna kadar destekleyen, vermiş oldukları maddi ve manevi emeklerden dolayı bu günlere gelmemi sağlayan ve başarılarımın asıl sahibi olan annem ve babama (Fatma-Sabri GÜNEŞLİ) sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
3. MATERYAL ve YÖNTEM	10
3.1. Arazi Çalışmaları ve Örnekleme	10
3.2. Moleküler Çalışmalar	10
3.2.1. Vaccinium sp. Ve Nar Örneklerinden Nükleik Asit (NA) İzolasyonu	10
3.2.1.1. Silica yöntemiyle RNA Ekstraksiyonu	11
3.2.1.2. Morante-Carriel Yöntemiyle RNA Ekstraksiyonu	12
3.2.1.3. Reverse Transkripsiyon (RT; Reverse Transcription)	13
3.2.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	14
3.2.1.5. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Jel Elektroforez	14
3.2.1.6. DNA Dizileme ve BLAST Analizleri	15
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	16
4.1. Arazi Çalışmaları	16
4.2. PCR Analizleri	17
4.2.1. Vaccinium ve Nar Örneklerinden RNA İzolasyonu	17
4.2.2 RT-PCR Analizleri	20
4.2.3 Filogenetik Analizler	32
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	34
KAYNAKÇA	35
ÖZGEÇMİŞ	38
EKLER	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1.	Giresun ilinden alınan <i>Vaccinium</i> üretim alanlarından toplanan yaprak örneklerinde görülen kırmızı klorotik lekeler	16
Şekil 4.2.	Giresun ilinden alınan <i>Vaccinium</i> üretim alanlarından toplanan sürgün örneklerinde görülen kırmızı klorotik lekeler	17
Şekil 4.3.	Hatay ilinden alınan Süs narlarının (<i>Punica granatum</i> L.) yapraklarında gözlenen sararmalı ve çiçeklerde erken kuruma belirtileri.....	17
Şekil 4.4.	Silica yöntemi kullanılarak narlardan izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD), 63N nolu Nar örneği.....	18
Şekil 4.5.	Silica yöntemi kullanılarak maviyemişlerden izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD) 242 nolu Maviyemiş örneği.....	18
Şekil 4.6.	Silica yöntemi kullanılarak maviyemişlerden izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD) 248 nolu Maviyemiş örneği.....	18
Şekil 4.7.	Silica yöntemi kullanılarak maviyemişlerden izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD) 253 nolu Maviyemiş örneği.....	19
Şekil 4.8.	Silica yöntemi kullanılarak maviyemişlerden izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD) 318 nolu Maviyemiş örneği.....	19
Şekil 4.9.	Morante-Cariel RNA Ekstraksiyon yöntemi kullanılarak maviyemişlerden izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD) 125 nolu Maviyemiş örneği.....	19
Şekil 4.10.	Morante-Cariel RNA Ekstraksiyon yöntemi kullanılarak narlardan izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD), 58N nolu Nar örneği	20
Şekil 4.11.	Samsun, Giresun, Trabzon ve Rize'den toplanan maviyemiş ve Hatay'dan toplanan kültür ve süs narı örneklerinde örneklerinde Blueberry red ringspot virüsünün tespitinde yapılan RT-PCR analizlerinde cDNAlar 1:4 oranında sulandırılmış ve 27F/R primer çifti kullanılarak yapılan PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); 188, 196,197: Trabzon Maviyemiş, 5N, 6N, 22N: Hatay Kültür Narı, 24N: Hatay Süs Narı, 27N, 28N, 29N: Hatay Kültür Narı, 52N, 58N, 59N, 60N: Hatay Süs Narı, 62N-82N: Hatay Kültür Narı, 2, 3, 4, 5: Hatay Süs Narı, 9: Hatay Kültür Narı, G7: Kocaeli Süs Narı, 16: Mersin Süs Narı, W: Su Kontrol +C: BRRSV Pozitif Kontroller.....	29
Şekil 4.12.	Artvin, Giresun, Trabzon, Samsun ve Rize'den toplanan maviyemiş ve Hatay'dan toplanan kültür ve süs narı örneklerinde Blueberry red ringspot virüs tespiti için cDNA doğrudan sulandırılmadan kullanılmış ve BRRSV3F/4R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); 127: Samsun Maviyemiş, 137: Giresun Maviyemiş, 155, 175, 185, 190, 201: Trabzon Maviyemiş, 224, 229, 233, 232, 236: Rize Maviyemiş,	

	31N: Hatay Kùltür Narı, 3, 5, 6: Hatay Sùs Narı 8N: Hatay Sùs Narı, 24N: Hatay Sùs Narı, 25N, 26N, 27N, 28N: Hatay Kùltür Narı, N1-N4: Hatay Sùs Narı, W: Su Kontrol, +C: BRRSV Pozitif Kontrol.....	29
Şekil 4.13.	Samsun, Giresun, Trabzon ve Rize'den toplanan maviyemiş ve Hatay'dan toplanan kùltür ve sùs narı örneklerinde örneklerinde Blueberry red ringspot virüsünün tespitinde yapılan RT-PCR analizlerinde cDNA lar 1:10 ve 1:4 oranında sulandırılmış ve BRRSV3F/4R primer çifti kullanılarak yapılan PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#383 MBI, Thermo Sci, ABD); 127: Samsun Maviyemiş, 137: Giresun Maviyemiş, 155, 175, 185, 190, 201: Trabzon Maviyemiş, 224, 229, 233, 232, 236: Rize Maviyemiş, W: Su Kontrol, +C: BRRSV Pozitif Kontroller	30
Şekil 4.14.	Artvin'den toplanan maviyemiş ve Hatay'dan toplanan kùltür ve sùs narı örneklerinde Blueberry red ringspot virüs tespiti için BRRSV3F/4R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); 5N: Hatay Kùltür Narı, 58N: Hatay Sùs Narı, 73N, 75N, 76N, 81N: Hatay Kùltür Narı, 9: Hatay Kùltür Narı, W: Su Kontrol, +C: BRRSV Pozitif Kontrol	30
Şekil 4.15.	Samsun, Trabzon, Ordu ve Rize'den toplanan maviyemiş ve Hatay'dan alınan kùltür ve sùs narı örneklerinde Blueberry red ringspot virüs tespiti için BRRSV3F/4R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); 5N, 22N: Hatay Kùltür Narı, 24N, 58N: Hatay Sùs Narı 73N, 81N: Hatay Kùltür Narı, 9N: Hatay Sùs Narı, 125, 127: Samsun Maviyemiş, 196,197,199: Trabzon Maviyemiş, 236, 239, 297: Rize Maviyemiş, 311: Ordu Maviyemiş, 342, 352: Rize Maviyemiş, W: Su Kontrol +C: BRRSV Pozitif Kontrol.	31
Şekil 4.16.	Samsun, Trabzon, Ordu ve Rize'den toplanan maviyemiş ve Hatay'dan alınan kùltür ve sùs narı örneklerinde Blueberry red ringspot virüs tespiti için BRRSV3F/4R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); 5N, 22N: Hatay Kùltür Narı, 24N,58N: Hatay Sùs Narı, 73N, 81N: Hatay Kùltür Narı, 9N: Hatay Sùs Narı 125: Samsun Maviyemiş, 196, 197, 199: Trabzon maviyemiş, 236, 239, 297: Rize Maviyemiş, 311: Ordu Maviyemiş, 342, 352: Rize Maviyemiş, 75N, 76N: Hatay Kùltür Narı	31
Şekil 4.17.	BRRSV tanı primerleri kullanılarak narlardan elde edilen PCR ürünlerinin sekans analiz sonucu Gen Bankasında kayıtlı izolatlarla benzerlik (homoloji) oranları	32
Şekil 4.18.	Narlarda olası yeni bir virüse karşı geliştirilen 27F/R primeri kullanılarak narlardan elde edilen PCR ürünlerinin sekans analiz sonucu Gen Bankasında kayıtlı izolatlarla benzerlik (homoloji) oranları	32
Şekil 4.19.	Blueberry red ringspot virus'unun saptanması amacıyla 27F/R primeri kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda elde edilen ürünlerinin sekans analizine göre çizilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde, MEGA 7 yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ)	

yöntemi kullanılmıştır. Dendrogramda bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir..... 33



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Vaccinium spp.'nin testlendiği virüs ve PCR analizlerinde kullanılan primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri ve baz büyüklükleri.....	14
Çizelge 4.1.	Maviyemiş (125, 242, 248, 253, 318) ve Nar (58N, 63N) örneklerinden izole edilen bazı RNA 'ların nanodrop ölçüm değerleri.....	20
Çizelge 4.2.	Maviyemiş ve Kültür Narı ve Süs Narı örneklerinin toplandığı iller ve BRRSV tespiti için yapılan RT-PCR analiz sonuçları	22
Çizelge 4.2.	(Devam). Maviyemiş, Kültür Narı ve Süs Narı örneklerinin toplandığı iller ve BRRSV tespiti için yapılan RT-PCR analiz sonuçları.....	23
Çizelge 4.2.	(Devam). Maviyemiş, Kültür Narı ve Süs Narı örneklerinin toplandığı iller ve BRRSV tespiti için yapılan RT-PCR analiz sonuçları.....	24
Çizelge 4.2.	(Devam) Maviyemiş, Kültür Narı ve Süs Narı örneklerinin toplandığı iller ve BRRSV tespiti için yapılan RT-PCR analiz sonuçları	25
Çizelge 4.2.	(Devam) Maviyemiş, Kültür Narı ve Süs Narı örneklerinin toplandığı iller ve BRRSV tespiti için yapılan RT-PCR analiz sonuçları.....	26
Çizelge 4.2.	(Devam) Maviyemiş, Kültür Narı ve Süs Narı örneklerinin toplandığı iller ve BRRSV tespiti için yapılan RT-PCR analiz sonuçları.....	27
Çizelge 4.2.	(Devam) Maviyemiş, Kültür Narı ve Süs Narı örneklerinin toplandığı iller ve BRRSV tespiti için yapılan RT-PCR analiz sonuçları.....	28

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
cm	: Santimetre
m	: Metre
mm	: Milimetre

KISALTMALAR

A.B.D.	: Amerika Birleşik Devletleri
bp	: Baz çifti
d ₂ H ₂ O	: Çift distile su
dk	: Dakika
sn	: Saniye
aa	: Aminoasit
nt	: Nükleotid
DNA	: Deoksiribonükleik Asid
RNA	: Ribonükleik Asid
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asid
ELİSA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	: Ethidium Bromid
ETOH	: Ethanol
PCR	: Polymerase Chain Reaction
rpm	: Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
TAE	: Tris asetat EDTA
TE	: Tris EDTA
NaCl	: Sodium Chloride
LiCl	: Lithium Chloride
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
dNTP	:Nükleozit Tri Fosfat

CTAB	: Heksadesil Trimetil Amonyum Bromit
H ₂ O	: Su
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
SNSV	: <i>Strawberry Necrotic Shock Virüs</i>
ToRSV	: <i>Tomato Ringspot Virüs</i>
BSSV	: <i>Blueberry Shoestring Virüs</i>
BFDaV	: <i>Blueberry fruit drop associated virüs</i>
BBLV	: <i>Blueberry latent virüs</i>
ArMV	: <i>Arabis mozaik virus</i>
TRSV	: <i>Tobacco ringspot virus</i>
BPRMV	: <i>Blueberry peach rosette mosaic virus</i>
BLMV	: <i>Blueberry leaf mottle virus</i>
BIMaV	: <i>Blueberry mosaic associated virus</i>
BNRBV	: <i>Blueberry necrotic ring blotch virus</i>
BIScV	: <i>Blueberry scorch virus</i>
BIShV	: <i>Blueberry shock virus</i>
BRRSV	: <i>Blueberry red ringspot virus</i>

1.GİRİŞ

Maviyemiş (*Vaccinium* spp.) ılıman iklim kuşağına adapte olmuş bir meyve türü olup, botanik anlamda gerçek üzümler grubunda yer almaktadır. Bu üzüksü meyve puslu veya parlak mavi rengiyle 'bluegold' olarak nitelendirilmektedir. 1900'lü yılların başında A.B.D'de yetiştirilmeye başlanan maviyemiş taze tüketimde ve gıda endüstrisinde çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. Maviyemiş üzerindeki çalışmalar İngilizlerin Amerika kıtasına yerleşmelerinden sonra başlamıştır. Doğal floradaki yabani *Vaccinium* türlerini gören ve yerli halkın bunları toplayarak yediklerini fark eden İngilizler 300 yıla yakın bir süre, bu meyvenin az miktarda kültürünü ve ıslahını yapmışlardır. Tarımı, bazı Avrupa ülkelerinde ve Amerika'da binlerce dönüm alanda yapılmaktadır. Günümüzde gelir elde etmek için yetiştirilen bu tarımsal ürün, 1906 yılından itibaren özellikle Amerika Birleşik Devletleri'nde başlatılan seleksiyon çalışmalarının ürünüdür. Islahı yapılan türler, "yüksek çalı formlular" ve "alçak çalı formlular" olmak üzere iki tiptir.

Maviyemiş, Bitkiler Alemi, Magnoliophyta Bölümü, Ericales Takımı, Ericaceae familyasında yer alan *Vaccinium* cinsine ait bir bitkidir. *Vaccinium* cinsine ait birçok tür bulunmakla birlikte en önemli türleri Turnayemişi (*Vaccinium macrocarpon*), Yüksek Boylu Maviyemiş (*Vaccinium corymbosum*), Alçak Boylu Maviyemiş (*Vaccinium angustifolium*), Tavşangözü Maviyemişi (*Vaccinium ashei Reade*) ve Çoban Üzüümü (*Vaccinium myrtilloides*)'dir (Gümüş ve ark., 2009). Ocak şeklinde bir görünüm sergileyen maviyemiş bitkisinin yüksek boylu çalı formundaki türleri 120-130 cm boylanabilirler. Alçak boylu türleri 90 cm boylanırken, Tavşangözü maviyemiş kuvvetli bir gelişim göstererek 610 cm'e kadar boylanabilirler. Türden türe göre farklılık gösteren bu boylanma oranı en fazla 5 m olurken modern bahçelerde bu oran 1.5 m'den fazla olmamasına özen gösterilir. Çok yıllık ve çalı formunda olan bu bitki kışın yaprağını döker. Kökleri ince, kök tüyleri olmayan lifli kök yapısına sahiptir. Bu kök yapısından dolayı zamanla bitkiler birbirine eklenerek tek gövdeliymiş gibi büyüme gösterirler. Meyvelerin şekilleri tür ve çeşitlere göre değişiklik göstermektedir. Tozlanma ve dölllenme için diğer meyve türlerine oranla daha uzun süre aktif kalabilen maviyemişlerde tozlanma entomofil (böceklerle) olarak sağlanır. Kış dinlenme periyodunda soğuklama ihtiyacı olan maviyemiş genellikle +7.2°C'nin altındaki

sıcaklıkları tercih ederler. Maviyemiş toprak ve iklim özelliği bakımından tam güneş alan veya biraz gölge olan, drenaj ve hava akımı iyi olan yerlerde, kuvvetli asit karakterli ve yüksek organik madde içeren çok özel alanlarda yetişmektedir (Retamales ve Hancock, 2012).

Son yıllarda popülaritesi artan bu meyve sağlık meyvesi olarak bilinmektedir. Besin içeriği miktarı olarak 100 gr'da 84.21 gr su, 57 kcal enerji, 0.74 g protein, 0.33 g toplam lipit, 14.49 g karbonhidrat, 2.4 g lif, 9.96 g şeker, bol miktarda vitamin ve mineral bulunmaktadır (Forney, 2001). Genişçe bir kullanım alanına sahip olan maviyemiş günümüzde antioksidan madde içeriği en yüksek bahçe bitkilerinden birisidir. Temelde taze meyve, meyve suyu, reçel, marmelat veya konserve olarak işlenen maviyemiş, kurutulmuş da tüketilen bir meyvedir. Meyve ve taze yapraklarından çay yapılırken meyvelerinden kaliteli ve pahalı şarap da yapılabilmektedir. Maviyemiş krem ve sabunlarda, cilt bakımında ve esans ham maddesi olarak kozmetik sanayisinde kullanılabilen bir meyvedir. Bu kullanım alanlarına ek olarak süt ve süt ürünleri teknolojisinde, baharat sanayisinde, çeşitli göz hastalıklarının koruyucu ve önleyici tedavisinde de kullanılmaktadır.

2000'li yılların başına kadar Türkiye'de bilinmeyen bu meyve renginden ötürü dünyada "Blueberry" olarak bilinmektedir. Bu meyve ülkemizde bulunduğu yörelere göre farklı şekilde isimlendirilmiştir. Ülke genelinde "Maviyemiş" olarak bilinse de Karadeniz Bölgesi'nde; Artvin'de Morsvi, Mahabak, Mesi, Rize'de Yabanmersini, Likaba, Çera, Kaskanaka, Trabzon'da Ligarba, Çalıçiçeği, Ardahan'da Mosi, Giresun'da Çalı Çiçeği, Ançela, Ordu'da Cırtlık Çiçeği, İç Anadolu'da; Yozgat'ta Köpek Üzümü diğer bölgelerde ise Ay Üzümü, Çay Üzümü veya Çoban Üzümü olarak isimlendirilmiştir (Çelik, 2012). Dünyada maviyemiş üretimi en fazla olan ülkeler sırasıyla Amerika, Kanada, Meksika, Almanya, Polonya, Fransa, İsveç ve İspanya'dır (FAO, 2016). Ülkemizde ise üretimi yapılan bölgeler sırasıyla Karadeniz Bölgesi'nde; Artvin, Rize, Trabzon, Ordu, Giresun, Gümüşhane, Samsun, Sinop, Kastamonu, Zonguldak, Bolu, Bartın ve Düzce; Marmara Bölgesi'nde Kocaeli, Sakarya, İstanbul, Kırklareli, Bursa ve Balıkesir ve Doğu Anadolu Bölgesi'nde ise Erzurum-Şenkaya ve Ardahan'dır (Çelik, 2012). Maviyemişlerde yetiştirme periyodu çeşitlere göre farklılık gösterir. Erkenci çeşit olarak Earlyblue, Duke, Patriot, Spartan, Northland, Bluejay; Orta mevsim çeşitleri Blueray, Toro, Bluecrop, Bluegold ve geçici çeşitler ise Chandler,

Berkeley, Jersey, Brigitta, Darrow olup bu çeşitler kullanılarak, ürün uzun bir periyoda yayılabilmektedir (Çelik, 2012).

Son yıllarda dünya çapında 10'dan fazla virüsün maviyemiş bitkisinde hastalık oluşturduğu bildirilmiştir. Söz konusu virüslerin bir kısmı geniş bir konukçu dizisine sahipken bir kısmı ise sadece maviyemişlere spesifik olan ve konukçu adıyla bilinen virüslerdir. Geniş konukçu dizisine sahip olan virüsler: tomato ringspot virus (ToRSV), arabis mozaik virus (ArMV), strawberry latent ringspot virus (SLRSV), tobacco ringspot virus (TRSV) olup maviyemişlere spesifik olan virüs grubu ise şunlardır: blueberry fruit drop associated virus (BFDAV), blueberry peach rosette mosaic virus (BPRMV), blueberry leaf mottle virus (BLMV), blueberry mosaic associated virus (BIMaV), blueberry necrotic ring blotch virus (BNRBV), blueberry shoestring virus (BSSV), blueberry scorch virus (BIScV), blueberry shock virus (BIShV) ve blueberry red ringspot virus (BRRSV)'dur (Martin, 2004).

Maviyemiş bitkisinde görülen en önemli viral hastalıklardan birisi de BRRSV ile ilişkili olan "Kırmızı Halkalı Leke Hastalığı'dır. Bu hastalık ABD (Hutchinson ve Vaney, 1954), Japonya (Isogai ve ark., 2009), Slovenya (Plesko ve ark., 2010), Çek Cumhuriyeti (Pribylova ve ark., 2010) ve Polonya (Kalinowska ve ark., 2011)'da saptanmıştır. Bu hastalığın en önemli semptomu yaprak ve sürgünlerde gözlenen 4-6 mm çapındaki dairesel kırmızı-kahverengi halkalı lekelerdir. Bu lekeler, yaz aylarının ortalarında görülmeye başlar ve yaz sonu-sonbahar dönemlerinde özellikle sürgün ve yaşlı yapraklarında görülür. Özellikle yaprakların üst yüzeyi üzerinde belirgin olan bu lekeler, bazı çeşitlerde yaprağın alt tarafında da görülebilir. Genç yapraklar genellikle semptomsuz kalır. Bu hastalığa duyarlı bazı maviyemiş çeşitlerinde meyvelerde de yaklaşık 2-3 mm çapında dairesel, açık renkli lekeler görülebilir. Bununla birlikte şiddetli enfeksiyonlarda bütün meyvelerde deformasyonu görülür (Ramsdel ve ark., 1987). Michigan'tan bir raporda bu hastalık nedeniyle enfekteli bitkilerin küçük meyveler verdiğini ve toplamda %25 ürün kaybına neden olduğu belirlenmiştir. BRRSV doğal yayılım yöntemi bilinmemekle birlikte aktif olarak taşınımında unlu bitlerin ve afitlerin rol oynadığı düşünülmektedir. BRRSV'nin üç izolatının (ABD, Çek Cumhuriyeti ve Polonya) tam genom sekansı yayınlanmış ve aminoasit sekanslarında yüksek derecede homoloji (%98) saptanmıştır. Üç ülkede tanımlanan bu durum

izolatlarının orijinlerinin aynı oldukları fikrini kuvvetlendirmektedir (Kalinowska ve ark., 2012).

Ülkemizde maviyemişlerde virus hastalıkları ile ilgili çok az çalışma yapılmış olup en kapsamlı çalışma son yıllarda TÜBİTAK tarafından desteklenen 213O042 nolu Türkiye-Slovenya İkili İşbirliği projesi kapsamında yapılmış ve ülkemizde gerek yabancı popülasyon gerekse ticari yetiştiricilik açısından maviyemiş yetişen önemli illerde (Trabzon, Rize, Ordu, Giresun ve Artvin) survey çalışmaları yürütülmüş ve bu çalışmalar sonucunda toplanan örneklerin BRRSV, BIMA_V, BLMo_V, BISc_V, BISH_V ve BSSV'lerinin ELISA ve PCR yöntemleri ile saptanmaları amaçlanmıştır. Ayrıca tespit edilen bütün virüslerin kısmi sekans analizleri yapılarak NCBI Gen bankasındaki uygun sekanslarla kıyaslanmış ve filogenetik analizleri yapılmıştır. Bu çalışma sonucunda gerek ülkemiz için ilk kayıt niteliğinde bazı virüsler tespit edilirken gerekse diğer bitki virüslerine göre çok az bilgi bulunan üzüksü meyve virüs gen bankası kayıtlarına da önemli katkılar sağlanmıştır. Ülkemizde maviyemişlerde sadece BIMA_V saptanmış ayrıca dünyada ilk kez maviyemiş dışında bir bitkide de (*Ranunculus spp.*) BIMA_V tespit edilmiştir. Çalışma yapılan illerden Rize'de BRRSV semptomlarına benzer bitkiler dikkat çekmesine karşın proje kapsamında çok sayıda virüse karşı testleme yapıldığı için bu konuda detaylı bir çalışma yapılamamıştır.

Bu çalışmanın amacı Karadeniz, Marmara ve Doğu Akdeniz bölgelerinde maviyemiş yetiştiriciliği açısından önemli illerden toplanan örneklerin BRRSV açısından PCR analizleri ile testlenmesi ve DNA sekans analiz yöntemiyle karakterizasyonunun yapılmasıdır.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Son yıllarda dünya çapında 10'dan fazla virüsün maviyemiş bitkisinde enfeksiyon yaptığı bildirilmiştir (Martin, 2004). Bu bitki çok sayıda virüs için iyi bir konukçudur . *Vaccinium* türlerinde virüslerin bir kısmı geniş bir konukçu dizisine sahipken bir kısmı ise sadece maviyemişlere spesifik olan ve konukçu adıyla bilinen virüslerdir. Geniş konukçu dizisine sahip olan virüsler; Blueberry fruit drop associated virus (BFDAV), blueberry peach rosette mosaic virus (BPRMV), tomato ringspot virus (ToRSV), arabis mozaik virus (ArMV), strawberry latent ringspot virus (SLRSV), tobacco ringspot virus (TRSV). Maviyemişlere spesifik olan virüs grubu ise şunlardır: Blueberry leaf mottle virus (BLMV), blueberry mosaic associated virus (BIMaV), blueberry necrotic ring blotch virus (BNRBV), blueberry red ringspot virus (BRRSV), blueberry scorch virus (BIScV), blueberry shock virus (BIShV) ve blueberry shoestering virus (BSSV).

Blueberry leaf mottle virus (BLMV) *Nepovirus* cinsine giren bu virüs ilk kez Amerika ve Kanada da tespit edilmiştir. İlerleyen yıllarda ise Bulgaristan, Macaristan ve Portekiz'de tespit edilmiş olup (Martin ve Tzanetakis, 2017), ülkemizde saptanmamıştır (Çağlayan ve ark., 2015). En önemli belirtileri yapraklarda lekeler ve şiddetli deformasyon, beneklenme, yuvarlak enfeksiyonlarda geriye doğru ölümdür. Hastalık etmeninin taşınmasında sorumlu nematod henüz tespit edilememiştir. Etmen polenle, tohumla ve bitki özsuyla taşınmaktadır. Blueberry mosaic associated virus (BIMaV) *Ophiovirus* cinsine ait son yıllarda saptanmış olan BIMaV ile ilişkilidir. Bu virüs ilk kez 1950 yılında Amerika'da saptanmıştır. Daha sonraları Yeni Zelanda, Avrupa, Arjantin ve Şili'de saptanmıştır (Martin ve Tzanetakis, 2017). Ülkemizde ise Karadeniz bölgesinden toplanan farklı maviyemiş türlerinde saptanmıştır (Çağlayan ve ark., 2015). Bu hastalığın en önemli belirtileri yapraklarda sararma, mozaik oluşumu ve nadiren pembemsi renklenmedir. Hastalığın vektörü henüz bilinmemekle birlikte toprak kökenli funguslar tarafından taşındığına dair ön bulgular bulunmaktadır. Blueberry necrotic ring blotch virus (BNRBV) ilk kez 2006 yılında ABD de tespit edilmiştir. Henüz virüsün saptanması için geliştirilmiş antiserum ve primer bulunmamaktadır. Hastalığın en önemli belirtileri yapraklarda görülen yuvarlak nekrotik lekelerdir. Hastalığın taşınmasına yönelik henüz bir bilgi bulunmamaktadır

(Brannen ve ark., 2017). Blueberry shock virus (BIShV)'nin neden olduğu hastalık ilk kez 1980 yılında ABD'de saptanmıştır. Bu hastalık bitkilerde özellikle çiçeklenme döneminde yaprak ve çiçeklerde tamamen nekrozlaşmaya neden olur. Yapraklarda solgunluk, damarlarda kararma ve yaprak sapında siyah çizgiler oluşur. İlerleyen zamanlarda yaprak tamamen turuncu rengine döner ve dökülür. Polen kaynaklı olan bu virüsün saptanmasında ELISA ve PCR yöntemleri kullanılmaktadır. Blueberry scorch virus (BIScV) *Carlavirus* cinsine giren bir RNA virüsü olup ilk kez 1970 yılında ABD'de saptanmıştır. İlerleyen yıllarda İtalya'da çiçeklerde görülen nekroz Avrupa ülkelerinde saptanmış olup ülkemizde herhangi bir kayıt bulunmamaktadır. Hastalığın taşınması afitlerle olurken en önemli simptomları yaprak ve çiçeklerde görülen nekrozlar ve yapraklardaki 'meşe yaprağı' simptomudur. Blueberry shoestring virus (BSSV) *Sobemovirus* cinsine ait bir RNA virüsü olup virüs ilk kez ABD ve Kanada'da tespit edilmiştir. Ürün veriminde % 25'e varan kayıplara yol açan bu virüsün en etkin taşınması maviyemiş afiti olarak adlandırılan *Illinoia pepperi* ile olur. Bu hastalığın en belirgin simptomları yaşlı sürgünlerde görülen uzun kırmızı lekelerdir. Ayrıca yapraklarda daralma, kızarma ve meşe yaprağı simptomu görülür. Söz konusu virüsün saptanmasında ELISA ve PCR yöntemleri kullanılmaktadır. *Vaccinium*'larda en önemli ve en yaygın olan virüs, Blueberry red ringspot virüsü ile ilişkili olan 'BRRSV' dir. *Caulimoviridae* familyasının *Soymovirus* cinsine ait olan blueberry red ringspot virüsü (BRRSV) çift iplikli DNA genomuna sahiptir. 8303 nt dizisinin genom organizasyonu ve ilişkileri, BRRSV'nin, geçici olarak yer aldığı *Caulimovirus* cinsinden ziyade "Soybean chlorotic mottle virus"un yer aldığı *Soymovirus* cinsiyle benzerlik gösterdiği belirtilmiştir (Glasheen ve ark., 2002). BRRSV genomu 100 aa'den daha uzun olan 7 ORF içermektedir. ORF1 hareketlilik proteini olarak görev yaparken ORF2 ve ORF3'ün vektörlerle taşınmadan sorumlu proteinler olduğu düşünülmektedir (Petrzik ve ark., 2011). ORF 4 kılıf proteini, ORF5 reverse transcriptase, ORF6 translasyonel transaktivatör proteinini kodlamakta olup ORF 7 fonksiyonu henüz bilinmeyen bir proteini kodlamaktadır. Bu virüsün neden olduğu kırmızı halkalı leke hastalığı yüksek çalı formundaki mavi yemiş bitkilerinde yaprak, gövde ve meyvelerde kırmızı halkalı lekelerle neden olmaktadır. BRRSV ilk olarak ABD'den rapor edilmiştir. Hastalık A.B.D' lerinin birçok eyaletinde yaygındır (Kim ve ark., 1981; Converse ve Ramsdell, 1982). BRRSV ile enfekteli *Vaccinium*

corymbosum bitkilerin sapları, yaprakları ve olgunlaşmakta olan meyvelerinde kırmızı halkalar görülür. İlk olarak New Jersey’ de gözlenen bu hastalık şu anda Amerika Birleşik Devletleri’ndeki diğer maviyemiş yetiştirme bölgelerinde ve Avrupa’ daki çeşitli yerlerde bildirilmiştir. Bugüne değin yapılan çalışmalarda en etkin ve tek taşınma yolu vegetatif üretim materyalleri ile olmaktadır (Cline ve ark., 2009). Böylece bu virüsün çoğaltma materyalleri ile yeni bölgelere yayılması mümkün olabilmektedir. A.B.D’ de yapılan bazı çalışmalarda BRRSV’ nin %25 oranında verim kayıplarına yol açabildiği bildirilmektedir (Gilett, 1988). Bu çalışma bir yıllık bir gözlem sonucu elde edilmiş olup son yıllarda yapılan ve beş yıllık verim değerlerinin analiz edildiği bir diğer çalışmada ise BRRSV’ nin verimde bir azalmaya neden olmadığı bildirilmiştir (Williford ve Vonder Heydt, 2016).

Enfekteli bitkilerde BRRSV'nin serolojik olarak tespiti başarılı sonuç vermemiştir. Etmenin rutin tespiti için bazı primerler tasarlanmış (BRRSV3 / BRRSV4) ve enfekteli yüksek boylu maviyemiş bitkilerinin tüm dokularından virüsün kısmi genomu başarılı bir şekilde çoğaltılabilmektedir. Aynı primer setini kullanarak, BRRSV'nin *V. virgatum* ve *V. constablae* türlerini doğal olarak enfekte edebildiği saptanmıştır. Bu türler daha önce bu virüsün konukçuları olarak rapor edilmemiştir. Bazı maviyemiş çeşitleri hastalığa karşı oldukça duyarlı olarak bilinirken (Blueray, Bluetta, Darrow gibi), Bluecrop çeşidi dayanıklı olarak bilinmektedir.

BRRSV’ nin maviyemişlerde bulunduğu Japonya’ dan da bildirilmiş ve virüs Blueray, Weymouth, Duke ve Sierra gibi yüksek boylu maviyemiş (*Vaccinium corymbosum*) çeşitlerinde saptanmıştır. PCR analizlerinde, BRRSV’ ye özgü primerler kullanılarak enfekteli maviyemiş bitkilerinden elde edilen toplam nükleik asit örneklerinden DNA çoğaltılmış ve PCR ürünlerinin sekans analizi sonucunda BRRSV genomu ile % 95.7-97.7 oranında nükleotit sekans özdeşliği gözlenmiştir (Isogai ve ark., 2009).

BRRSV’nin Çek Cumhuriyetinde varlığı araştırılmış ve Güney Bohemya’ da yetiştirilen yüksekboylu maviyemiş (*Vaccinium corymbosum* L.) çeşitlerinde Mayıs ve Temmuz aylarında bir survey çalışması yapılmıştır. Kırmızı halkalar şeklinde görülen tipik BRRSV simptomları için 10 farklı çeşitte (Berkeley, Burlington, BlueCrop, Bluetta, Darrow, Duke, Gila, Jersey, Late Blue ve Northland) toplam 67 bitki gözlenmiştir. Yaprak, sap ve meyveler gözlendiğinde kırmızı lekeler sadece eski

yaprakların üst yüzeyinde gözlenmiştir. Yaprak numuneleri toplanarak DNA ekstraksiyonu için kullanılabilecek kadar -20 ° C' de tutulmuş ve BRRSV15 / 16, BRRSV primer çifti kullanılarak PCR analizleri yapılmıştır. Erken ilkbahar döneminde bitkilerde BRRSV belirtileri görülmemiş ancak simptom göstermeyen bazı bitkilerde BRRSV tespit edilebilmiştir. Temmuz ayından itibaren tipik belirtiler gözlenmiş ve Darrow çeşidi PCR yöntemi ile pozitif bulunmuştur. Bu çalışma ile BRRSV Çek Cumhuriyeti'nde *V. corymbosum* L. çeşidinde ilk kez rapor edilmiştir (Spak ve ark., 2009).

Çek Cumhuriyeti ve Slovenya ülkelerinin beraber yürüttüğü bir çalışmada ise her iki ülkenin BRRSV izolatlarının genom organizasyonları araştırılmış ve Avrupa izolatları Amerika izolatlarından farklı bulunmuştur (Petrzik ve ark., 2011).

Polonya'da yapılan çalışmalarda ise ABD New Jersey ve Çek Cumhuriyeti'nden gen bankasına yüklenen izolatlarla Polonya izolatları kıyaslanmış ve bir Polonya izolatının tüm genom dizisi elde edilmiştir. Çek, ABD ve Polonya BRRSV izolatları arasında kodlama bölgelerinde yüksek düzeyde aminoasit sekans özdeşliği gözlenmiş ve bu durumun bu ülkelerdeki virüs izolatlarının ortak kökenden geldikleri yargısına varılmıştır (Kalinowska ve ark., 2012).

Kore'den bildirilen bir rapora göre *Caulimoviridae* familyası *Soymovirus* cinsine giren BRRSV, yüksek boylu maviyemişlerde (*Vaccinium corymbosum*) yapraklar, sapsar ve meyveler üzerinde kırmızı lekeler neden olur. Yaprakların üst yüzeyindeki kırmızı halkalar en belirgin simptom olup Ağustos ayından Ekim ayına kadar daha belirgin hale gelmiştir. Simptom gösteren bitkilerde BRRSV enfeksiyonu saptamak için PCR analizleri ve elektron mikroskop çalışmaları yapılmıştır. PCR analizlerinde BRRSV-New Jersey genomuna göre düzenlenen primerler kullanılmış ve simptomatik bitkilerde virüs saptanırken simptomsuz bitkiler negatif bulunmuştur. Enfekteli bitkilerden hazırlanan ince kesitler elektron ve ışık mikroskopunda incelendiğinde BRRSV için tipik olan 50 nm çapında hücre içi cisimcikler gözlenmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, Kore'deki yüksek boylu maviyemişlerde BRRSV ilk kez bildirilmiştir (Cho ve ark., 2012).

Ülkemizde maviyemiş bitkilerinde virüs taraması ilk kez TÜBİTAK 2130042 nolu proje kapsamında yapılmıştır. Testlenen *Vaccinium* türlerinde virüslerin hiçbiri DAS-ELISA ile saptanamazken RT-PCR analizlerinde testlenen 157 örneğin 23'ünde

Blueberry mosaic associated virus (BIMaV) tespit edilmiştir (Çağlayan ve ark., 2015). Özellikle Karadeniz Bölgesinde BRRSV benzeri belirtiler gözlenmesine karşın bugüne değin bu virüs testlenen hiçbir maviyemiş örneğinde saptanamamıştır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Arazi Çalışmaları ve Örnekleme

Bu çalışma kapsamında ülkemizde Artvin, Giresun, Ordu, Rize, Samsun, Trabzon, Bursa ve Mersin illerinde maviyemiş yetişen alanlarda ilkbahar döneminde virüs hastalıkları surveyi yapılmıştır. Yapılan surveylerde maviyemiş yetiştirilen ticari olarak tesis edilmiş olan bahçeler, fidanlıklar, koleksiyon bahçeleri ve doğal yayılma alanlarına gidilerek gerek tipik semptom gösteren gerekse latent (gizli) enfeksiyon olasılığına karşı semptomsuz bitkilerden örnek alınmıştır. Bu çalışma kapsamında Artvin ilinden 30, Samsun' dan 6, Giresun' dan 30, Trabzon' dan 54, Rize' den 28, Ordu' dan 12, Mersin' den 2 ve Bursa' dan 17 örnek alınarak toplamda 179 maviyemiş örneği toplanmıştır. Bölümümüzde yürütülen bir çalışmada nar bitkisinin “Yeni nesil dizileme (YND)” analizleri sonucunda blueberry red ringspot virus genomuna rastlanması sonucu bu çalışma kapsamında kültür (*Punica granatum* L.) ve süs narı bitkilerinden de örnek alınması planlanmıştır. *P. granatum* türünün özelliklerini gösteren ve süs narı olarak kullanılan iki tip nar bulunmaktadır. Bunlardan birisi “Nana” olarak adlandırılan bodur narlar, diğeri ise “double flower (çift katlı çiçek)” tipi narlardır (Jalikap, 2010). Bu çalışma kapsamında çift katlı çiçek yapısına sahip süs narlarından da örnek alınmıştır. Bu nedenle maviyemiş bitkisi dışında Hatay ilinden 51, Mersin' den 16, Kocaeli' den 12 ve Şanlıurfa' dan 11 olmak üzere toplamda 90 nar örneği toplanmıştır. Örnekler bitkinin yaprak ve sürgün gibi farklı bölgelerinden alınmıştır. Alınan bu örnekler muhafaza edilmesi gereken koşullarda korunarak laboratuvar ortamına getirilmiş ve testlenene kadar +4 °C'de saklanmıştır. Mevcut örnekler fotoğraflanıp numaralandırılarak kaydedilmiştir.

3.2. Moleküler Çalışmalar

3.2.1 *Vaccinium spp.* ve Nar Örneklerinden Nükleik Asit (NA) İzolasyonu

BRRSV DNA virüsü olmasına karşın yapılan ön denemelerde DNA izolasyon kiti kullanılarak yapılan analizlerde iyi sonuç alınmaması nedeniyle RNA izolasyonu

yapılıp cDNA sentezlenerek PCR analizleri yapılmıştır. Bu amaçla maviyemiş ve nar alanlarından toplanan örneklerden RNA izolasyonu için silica RNA protokolü (Poudel ve ark., 2013) ve Morante-Carriel ve arkadaşları tarafından geliştirilen Morante-Carriel RNA protokolü kullanılmıştır. Nükleik asit (NA) izolasyonlarında ilkbahar mevsiminde alınan yapraklar kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak, Dr. Darko Jevremovic'den (Cacenk Enstitüsü, Sırbistan/ Belgrad) sağlanan cDNA (Komplementer Deoksiribonükleik Asit)' lar kullanılmıştır. Her bir bitki materyalinden 0,5 g örnek alınarak sıvı azot içinde ezildikten sonra izole edilen RNA'lar PCR çalışmalarında kullanılmaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

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

- 0,2 g bitki dokusu üzerine 1 µl RNA ekstraksiyon Buffer ve 10 µl B-Mercaptoethanol eklenerek iyice karıştırılarak ependorf tüpe alınmıştır.
- Karışımdan ayrıca 600 µl çekilerek yeni ependorf tüpe konulmuştur. Tüpün içine 600 µl 5,8 molarlık Potasyum Asetat eklenmiş ve tüpler ters-düz edilmiştir.
- Tüpler 13.000 rpm'de 15 dk santrifüjleme yapılmıştır.
- Karışımdaki sıvı fazından 750 µl alınarak yeni bir tüpe konulmuştur. Üzerine 750 µl %100 İsoopropanol eklenerek -20'de en az yarım saat bekletilmiştir.
- Tüpler 13.000 rpm'de 30 dk santrifüj yapılmıştır.
- Karışımdaki sıvı fazı atılmıştır. Pellet üzerine 500 µl Wash Buffer (yıkama solüsyonu) eklemiştir. Vortexlenerek pellet çözündürülüp daha sonra üzerine 20 µl silica eklenmiştir.
- Tüpler 10.000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılmıştır.
- Karışımın sıvı fazı atılmıştır. Pellet üzerine 500 µl Wash Buffer (Yıkama Buffer) eklenerek pellet yıkanmış ve çözündürülmüştür.
- Tüpler 13.000 rpm' de 1 dk santrifüj yapılmıştır.
- Karışımın sıvı faz atılarak ve pellet oda sıcaklığında iyice kurutulmuştur (Alkol kokusu kalmayana kadar).
- Pellet üzerine 150 µl TE Buffer eklenerek pellet çözündürülmüştür. Oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir.

- Tüpler 13.000 rpm' de 2 dk santrifüjleme yapılmıştır.
- Karışımın sıvı fazından 100 µl alınmıştır. Alınan sıvı faz üzerine 8 µl 5 molarlık Sodyum Asetat ve 200 µl %100' lük Ethanol eklenmiştir.
- Tüpler -20 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir.
- Tüpler 12.000 rpm'de +4 °C'de 10 dk santrifüj yapılmıştır.
- Karışımın sıvı fazı atılarak pellet üzerine 200 µl %70' lik Ethanol eklenmiştir.
- Tüpler -20 °C'de 30 dk inkübe edilerek vortexlenmiştir.
- Tüpler 12.000 rpm' de +4 °C'de 3 dk santrifüj yapılmıştır (Bu işlem 2 defa tekrarlanmıştır).
- Pellete dokunmadan sıvı faz atılarak pellet oda sıcaklığında kurutulmuştur (Alkol kokusu kalmayana kadar).
- Pellet 80 µl TE Bufferda çözüldürülmüştür.
- Elde edilen RNA'lar konsantrasyonları ölçülerek moleküler analizlerde kullanmak için -80 °C'e saklanmıştır.

3.2.1.2. Morante-Carriell Yöntemiyle RNA Ekstraksiyonu (Morante-Carriell ve ark., 2014)

Yıkama Aşamasında;

- 150 mg bitki dokusu alınmıştır ve alınan bitki dokusu üzerine 1,5 ml' lik Washing buffer (Yıkama Buffer) eklenmiştir. Örnek havanda ezilerek 2 ml' lik ependorf tüpe aktarılmış ve vortexlenmiştir.
- Tüpler 5600 rpm 15 dk +4 °C'de santrifüjleme yapılarak üst kısım atılmıştır.

İzolasyon Aşamasında;

- Önceden 65 °C'ye ısıtılmış İzolasyon buffer (her bir örnek için 1,5 ml) eklenerek vortexlenmiştir.
- Tüpler 65 °C'de 10 dk inkübe edilmiştir (her 2 dk da bir karıştırılmıştır).
- Örnekten 1 ml çekilerek yeni tüpe aktarılmıştır. Üzerine eşit hacimde Chloroform İsoamilalkol (C:I:A, 24:1) eklenerek karıştırılmıştır (Süt beyaz olana kadar).
- Tüpler 6.700 rpm'de 10 dk +4 °C'de santrifüjleme yapılmıştır.

- Üst kısım dikkatlice yeni tüplere alınmıştır. Yine eşit hacimde C:I:A eklenerek iyice karıştırılmıştır.
 - Tüpler 10.000 rpm'de 10 dk +4 °C'de santrifüjleme yapılmıştır.
 - Üst kısım yeni bir tüpe alınmıştır. Üzerine Sodium Asetat (NaoAc) (0,1 hacim, 3M, pH:5,2) ile İsoopropanol (0,6 hacim) eklenerek karıştırılmıştır.
 - Tüpler -80 °C'de 30 dk veya -20'de 1 saat inkübe edilmiştir.
 - Daha sonra örnekler 14.000 rpm' de 20 dk +4 °C'de santrifüjleme yapılmıştır.
- Saflaştırma Aşamasında;
- Sonuç pelletinin üzerine 100 µl d₂H₂O eklenerek pellet çözündürülmüştür. Üzerine 0,3 hacim 10 M LiCl eklenerek buzun üzerinde 90 dk inkübe edilmiştir (2 defa tekrarlanmıştır).
 - Daha sonra tüpler 14.000 rpm'de 30 dk +4 °C'de santrifüjleme yapılmıştır.
 - Alternatif olarak tek sefer LiCl eklendikten sonra 1 gece +4 °C'de inkübe edilmiştir.
 - Sonrasında tüpler 14.000 rpm'de 30 dk +4 °C' de santrifüjleme yapılmıştır.
 - Santrifüjden sonra sıvı faz dökülmüştür.
 - Pellet üzerine 100 µl d₂H₂O eklenerek pellet çözündürülmüştür.
 - Üzerine 0,1 hacim NaoAc (3M) ve 2 hacim soğuk-ethanol (%96) eklenerek karıştırılmıştır.
 - Tüpler 14.000 rpm'de 20 dk +4 °C'de santrifüjleme yapılmıştır.
 - Pellet 200 µl %70' lik soğuk alkolle yıkanmıştır.
 - Kısa bir santrifüj yapılarak alkol dökülmüştür.
 - Tüpler 20 dk oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.
 - Pellet 40 µl d₂H₂O'da çözündürülmüştür.

3.2.1.3. Reverse Transkripsiyon (RT; Reverse Transcription)

RNA virüslerinin PCR ile testlenmesinde ilk aşamada, RNA' lardan cDNA için tek yöntem kullanıldı. Bu yöntemde her bir örnek için 1 µl Random Hexamer Primer, 6,5 µl d₂H₂O ve 5 µl RNA karışımı hazırlanarak PCR tüplerine konulmuştur. PCR cihazında 94 °C' de 5 dakika ve buz üzerinde 5 dakika bekletildikten sonra her bir tüpün içerisine 4 µl 5xRT tamponundan (Fermantase), 0,5 µl dNTP (10 mM), 2 µl d₂H₂O ve 1

μ l RT enziminden eklenmiştir. Tüpler PCR cihazında 42 °C’ de 1 saat, 72 °C’ de 10 dakika tutularak bu şekilde cDNA aşaması tamamlanmıştır.

3.2.1.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bu çalışma kapsamında *Vaccinium spp.*’ nin testlendiği blueberry red ringspot virus (BRRSV) için kullanılan primer baz dizileri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. *Vaccinium spp.*’ nin testlendiği virüs ve PCR analizlerinde kullanılan primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri ve baz büyüklükleri

VİRÜS ADI	PRİMER ADI	PRİMER DİZİLİMİ 5' → 3'	PRİMER UZUNLUĞU (bp)	KAYNAKÇA
Blueberry red ring spot virus (BRRSV)	3F	ATCAGTCCCAGAAGAAAAGAAGTA	549	(Polashock ve Ehlenfeldt, 2009)
	4R	TCCGAAAAATAGATAGTGTCAGC		
Nar Primeri (27F/27R)	27F	AGTCTACAACCACACATTCTTGA	211	(Çağlayan ve ark., 2018 Yayınlanmamış veriler)
	27R	AGCGGACATTATCCGATATCCT		

PCR analizlerinde BRRSV’ ye spesifik primerler kullanılarak PCR karışımı, 8 μ l d₂H₂O, 1,25 μ l 10XB, 1 μ l dNTP (2,5 mM), 0,75 μ l MgCl₂ (25 mM), virüse özgü 0,25 μ l primer çifti (her biri 10 pmol/ μ l), 0,1 μ l Taq-DNA polymerase ve 1,2 μ l cDNA olacak şekilde hazırlanmıştır. Primerlerin hedef DNA'ya bağlanma (annealing) ve uzama (extension) süre ve sıcaklıkları, döngüleri ise PCR cihazı 1 döngü 94 °C’de 3 dakika; 35 döngü 94 °C’de 30 saniye, 51 °C’de 45 saniye, 72 °C’de 1 dakika ve 1 döngü 72 °C’de 10 dakika olarak programlanmıştır.

3.2.1.5. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Jel Elektrofrez

RT-PCR ve PCR ürünlerinin görüntülenmesi için %1’ lik Agaroz Jel Elektrofrez işlemi yapılmıştır. 1 g Agaroz, 100 ml 1x TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu içerisinde mikrodalga fırında çözündürülüp tarak yerleştirilmiş ve jel tepsisine düz bir zemin üzerinde dökülerek agarozun polimerizasyonu için 20-30 dk

bekletilmiştir. Jelin polimerizasyonundan sonra tarak dikkatli bir şekilde alınarak jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir. 1xTAE tamponu tankın içerisine jeli kapatacak şekilde döküldükten sonra jel çukurlarına DNA marker ile beraber PCR ürünleri 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 konsantrasyonunda 100 ml suya karıştırılmış ve jel bu karışım içerisinde 5-6 dakika tutularak boyanmıştır. Jel UV ışıktaki görüntülenip oluşan bantların büyüklüğüne bakılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Testlenen virüslere karşı örnekler kullanılan pozitif kontrollerle karşılaştırılmış ve beklenen düzeyde bant oluşturanlar pozitif, oluşturmayanlar negatif kabul edilerek jel görüntüleme cihazında fotoğraflanmıştır.

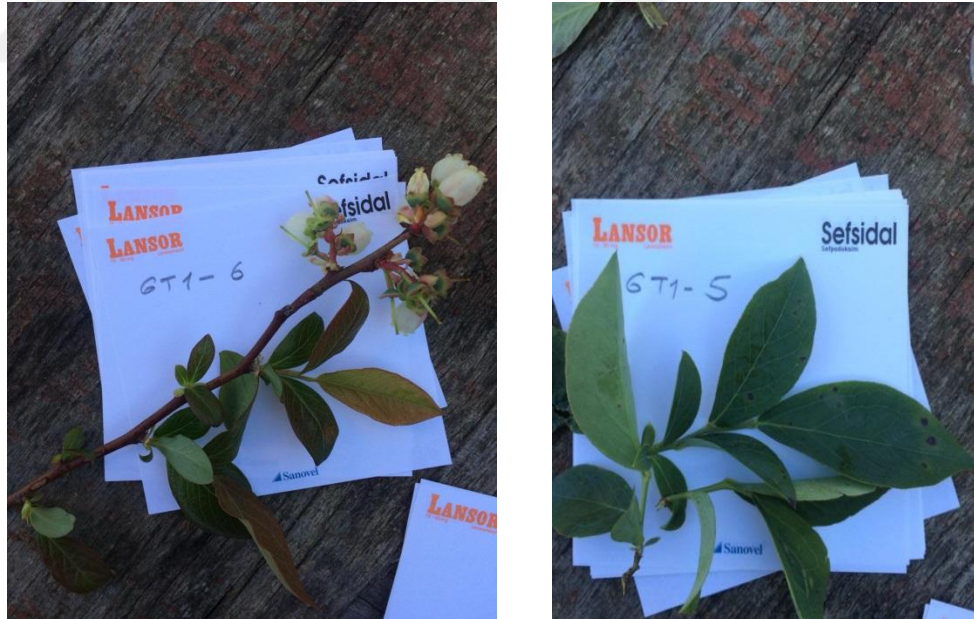
3.2.1.6. DNA Dizileme ve Blast Analizleri

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 on-line olarak alınmıştır. Çoklu baz dizisi karşılaştırmaları Bioedit bilgisayar yazılımının (Hall, 1999) Clustal W 2.0.11 seçeneğiyle yapılmıştır.

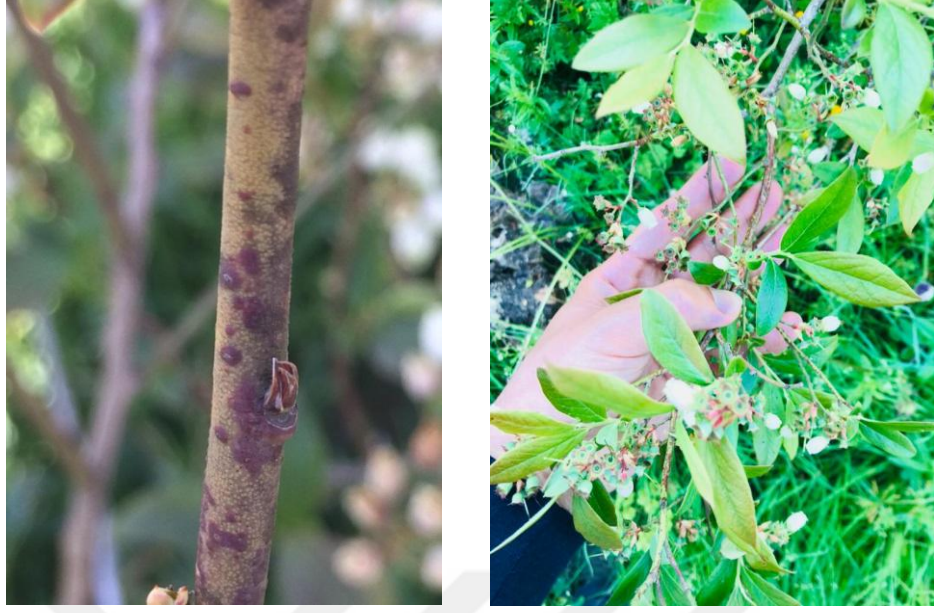
4.ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1 Arazi Çalışmaları

Bu çalışma kapsamında Karadeniz bölgesinden; Artvin ilinden 30, Samsun' dan 6, Giresun' dan 30, Trabzon' dan 54, Rize'den 28, Ordu' dan 12 ve bu bölge dışında bu illere ek olarak Mersin' den 2 ve Bursa' dan 17 örnek alınarak toplamda 179 örnek toplanmıştır. Yapılan arazi çalışmalarında maviyemiş bitkisi dışında nar bitkilerinden de örnek alınmıştır. Hatay ilinden 51, Mersin'den 16, Kocaeli' den 12 ve Şanlıurfa'dan 11 olmak üzere toplamda 90 örnek toplanmıştır. *Vaccinium* türlerinde gözlenen en yaygın belirtiler yaprak ve sürgünlerde kırmızı klorotik lekeler, meyvelerde küçülme ve gelişme geriliğidir (Şekil 4.1., Şekil 4.2.). Narlarda ise yapraklarda sararma ve çiçeklerde erken kurumalar gözlenmiştir (Şekil 4.3.). Örnekleme yapılırken gerek virüs benzeri semptom gösteren gerekse latent (gizli) belirtiler açısından semptomsuz *Vaccinium* bitkilerinden tesadüfi örnekler alınmıştır.



Şekil 4.1. Giresun ilinden alınan *Vaccinium* üretim alanlarından toplanan yaprak örneklerinde görülen kırmızı klorotik lekeler



Şekil 4.2. Giresun ilinden alınan *Vaccinium* üretim alanlarından toplanan sürgün örneklerinde görülen kırmızı klorotik lekeler



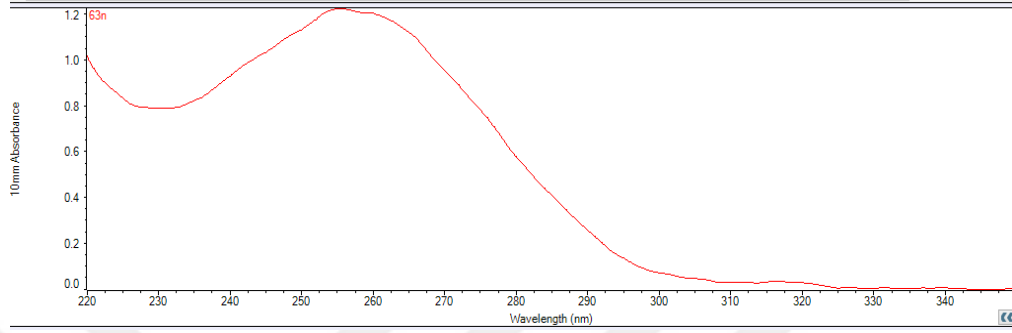
Şekil 4.3. Hatay ilinden alınan süs narlarının (*Punica granatum* L.) yapraklarında gözlenen sararmalar ve çiçeklerde erken kuruma belirtileri

4.2. PCR Analizleri (Polymerase Chain Reaction; PCR)

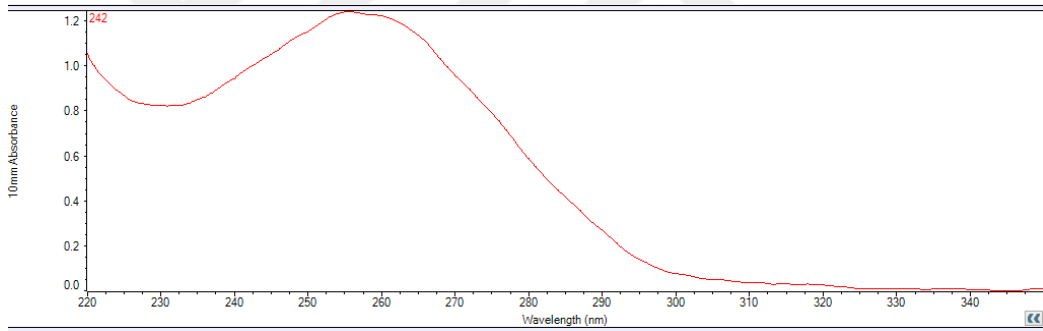
4.2.1. *Vaccinium* ve Nar Örneklerinden Toplam RNA İzolasyonu

Vaccinium ve Nar örneklerinden yapılan RNA izolasyonunda silica yöntemi ve Morante-Cariel RNA ekstraksiyon yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemlerle elde edilen RNA'lerden yapılan nanodrop spektrofotometre ölçümlerinde, elde edilen RNA'ların miktar ve kalite bakımından yeterli olduğu saptanmıştır (Şekil 4.4., Şekil

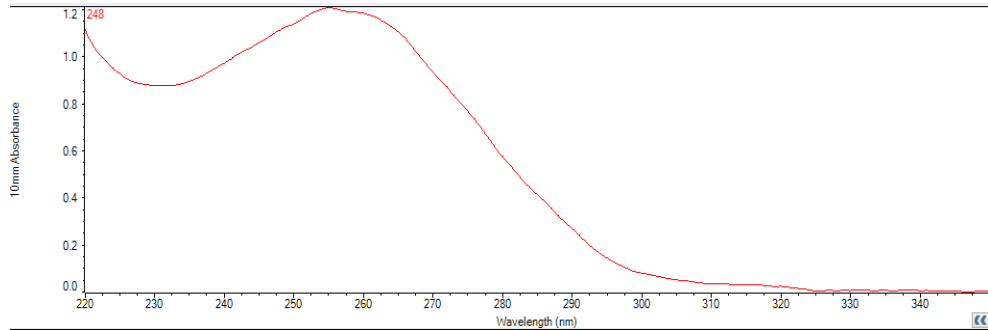
4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7., Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10.). Bununla birlikte gerek maviyemişlerde gerekse narlarda en iyi kalitede RNA'lar Morante-Carriel ve arkadaşları tarafından yenedünya bitkisi için geliştirilen Morante-Carriel RNA ekstraksiyon yöntemiyle elde edilmiştir. Testlemelerde kullanılan bazı örneklerin nanodrop değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.



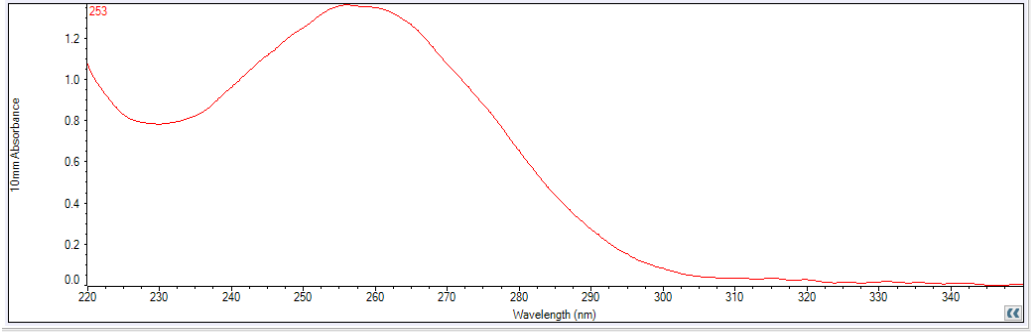
Şekil 4.4. Silica yöntemi kullanılarak narlardan izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD), 63N nolu Nar örneği



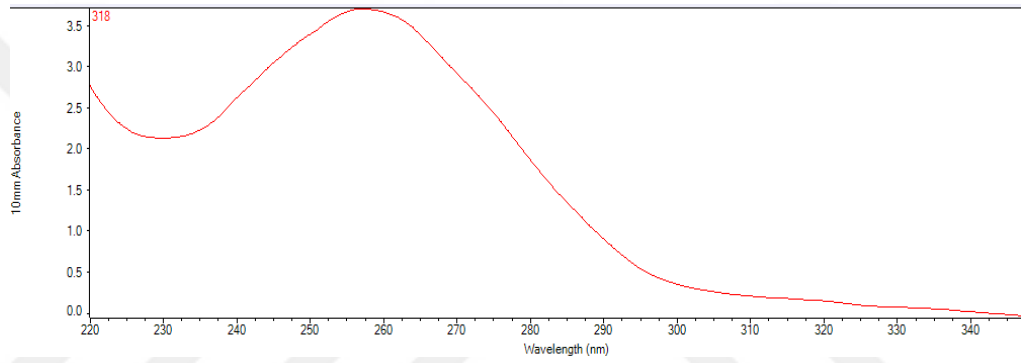
Şekil 4.5. Silica yöntemi kullanılarak maviyemişlerden izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD) 242 nolu Maviyemiş örneği



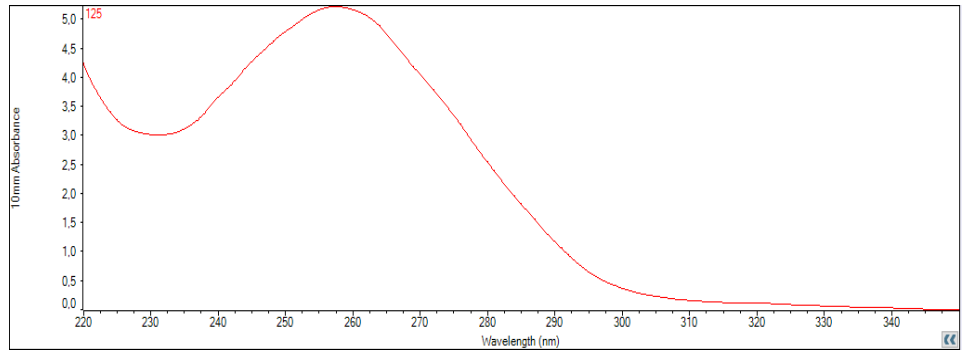
Şekil 4.6. Silica yöntemi kullanılarak maviyemişlerden izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD) 248 nolu Maviyemiş örneği



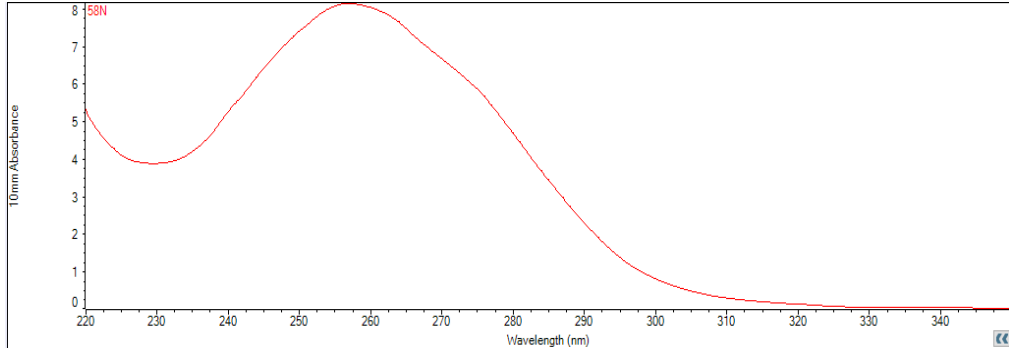
Şekil 4.7. Silica yöntemi kullanılarak maviyemişlerden izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD) 253 nolu Maviyemiş örneği



Şekil 4.8. Silica yöntemi kullanılarak maviyemişlerden izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD) 318 nolu Maviyemiş örneği



Şekil 4.9. Morante-Carriel RNA Ekstraksiyon yöntemi kullanılarak maviyemişlerden izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD) 125 nolu Maviyemiş örneği



Şekil 4.10. Morante-Carriel RNA Ekstraksiyon yöntemi kullanılarak narlardan izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD), 58N nolu Nar örneği

Çizelge 4.1. Maviyemiş (125, 242, 248, 253, 318) ve Nar (58N, 63N) örneklerinden izole edilen bazı RNA 'ların nanodrop ölçüm değerleri.

Örnek Numarası	Konsantrasyonlar ng/ µl	260/280	260/230
		Optik yoğunluk	Optik yoğunluk
58N	321.4	1.72	2.08
63N	48.0	2.09	1.53
125	206.3	2.04	1.72
242	48.0	2.09	1.49
248	47.3	2.07	1.35
253	67.4	2.07	1.73
318	146.3	1.97	1.73

4.2.2. RT-PCR Analizleri

Bu çalışma kapsamında toplanan *Vaccinium spp.* ve nar örneklerinden izole edilen RNA'lar RT-PCR yöntemi ile test edilmiştir. Toplanan örneklerin tamamı gerek BRRSV genel tanı primerleri (BRRSV3F/4R) gerekse narlarda saptanan BRRSV genomuna yönelik yeni geliştirilen primerle (27 F/R) testlendiğinde elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir (Şekil 4.11.). BRRSV3F/4R primerleri ile yapılan RT-PCR analizlerinde testlenen 179 maviyemiş örneğinin hiçbirisinde herhangi bir amplifikasyon gözlenmemiştir (Şekil 4.12., Şekil 4.13., Şekil 4.14., Şekil 4.15.). Buna karşın aynı primer çifti ile testlenen 90 adet narın 3 tanesinde (58N, 81N, 9) beklenen düzeyde bir amplifikasyon meydana gelmiş (Şekil 4.16.) ve PCR ürünleri sekans analizine gönderildiğinde gen bankasında kayıtlı BRRSV genomu ile çok küçük bir gen bölgesinin eşleştiği görülmüştür. Eşleşen gen bölgesi ise gen bankasına kayıtlı

izolatlarla %100 homoloji göstermiştir (Şekil 4.17.). Bu durum ülkemizde narlarda saptanan BRRSV genomunun ya virüsün yeni ve farklı bir izolatu ya da tamamen yeni bir virüs olma ihtimalini ortaya çıkarmaktadır.

27F/R nar primerleri ile yapılan RT-PCR analizlerinde testlenen 179 maviyemiş örneğinin 3 tanesinde (188, 196, 197) beklenen düzeyde bir amplifikasyon gözlenmiş ancak sekans analizi sonuçlarına göre bu örnekleri tamamı bitki genomu ile eşleştiği için negatif olarak değerlendirilmiştir. Narlarda ise aynı primer çifti ile testlenen 90 tane narın 23 tanesinde (9, 16, 5N, 31N, 52N, 58N, 62N, 63N, 64N, 65N, 66N, 67N, 68N, 69N, 73N, 74N, 75N, 76N, 77N, 78N, 79N, 81N, 82N) beklenen düzeyde bir amplifikasyon meydana gelmiştir. BRRSV genomuna benzer ve olasılıkla yeni bir virüse ait primer çifti (27F/R) ile yapılan PCR analizleri sonucuna göre bu virüs dünyada ilk kez narlarda saptanmıştır. Bununla birlikte bu primerlerle çoğaltılan PCR ürünleri sekans analizine gönderildiğinde genomun oldukça büyük bir bölgesi tanımlanmış BRRSV izolatları ile benzerlik göstermiştir (Şekil 4.18.).

Maviyemiş bitkisinde görülen en önemli virus hastalığı BRRSV ile ilişkili olan “Kırmızı halkalı leke” dir ve bu hastalık A.B.D. (Hutchinson ve Vaney, 1954), Japonya (Isogai ve ark., 2009), Çek cumhuriyeti (Pribylova ve ark., 2010), Slovenya (Plesko ve ark., 2010) ve Polonya (Kalinowska ve ark., 2011) ’da saptanmıştır. Bu hastalığın en belirgin simptomsu yaprak ve gövdede görülen kırmızı yuvarlak halkalı lekelerdir. Meyvelerde ise benzer lekeler erken dönemde görülmesine karşın olgunlaşma ile birlikte kaybolur (Ramsdel ve ark., 1987). Bu virüsün üç izolatının (A.B.D, Çek Cumhuriyeti ve Polonya) tam genom sekansı yayınlanmış ve amino asit sekanslarında yüksek derecede homoloji (%98) saptanmıştır. Bu durum üç ülkede tanımlanan izolatların orijinlerinin aynı oldukları fikrini güçlendirmektedir (Kalinowska ve ark., 2012). Ülkemizde maviyemiş plantasyonlarında BRRSV benzeri belirtiler gözlenmesine karşın virüs PCR analizleri ile saptanamamıştır. Bunun nedeni ya simptomların başka bir etmeden kaynaklanmış olması ya da A.B.D ve bazı Avrupa ülkelerinde geliştirilen BRRSV primerlerinin ülkemizdeki izolatları tanılamada yetersiz kalmasıdır.

Çizelge 4.2. Maviyemiş, Kültür Narı ve Süs Narı örneklerinin toplandığı iller ve BRRSV tespiti için yapılan RT-PCR analiz sonuçları

No	Örnek Kodu	Bölge Adı	Örnek Adı	BRRSV Genel Tanı Primeri (3F/4R)	Nar Primeri (27F/R)
1	1	Artvin	Maviyemiş	-	-
2	2	Artvin	Maviyemiş	-	-
3	3	Artvin	Maviyemiş	-	-
4	4	Artvin	Maviyemiş	-	-
5	5	Artvin	Maviyemiş	-	-
6	6	Artvin	Maviyemiş	-	-
7	7	Artvin	Maviyemiş	-	-
8	8	Artvin	Maviyemiş	-	-
9	9	Artvin	Maviyemiş	-	-
10	10	Artvin	Maviyemiş	-	-
11	11	Artvin	Maviyemiş	-	-
12	12	Artvin	Maviyemiş	-	-
13	13	Artvin	Maviyemiş	-	-
14	14	Artvin	Maviyemiş	-	-
15	15	Artvin	Maviyemiş	-	-
16	16	Artvin	Maviyemiş	-	-
17	17	Artvin	Maviyemiş	-	-
18	18	Artvin	Maviyemiş	-	-
19	19	Artvin	Maviyemiş	-	-
20	20	Artvin	Maviyemiş	-	-
21	21	Artvin	Maviyemiş	-	-
22	22	Artvin	Maviyemiş	-	-
23	23	Artvin	Maviyemiş	-	-
24	24	Artvin	Maviyemiş	-	-
25	25	Artvin	Maviyemiş	-	-
26	26	Artvin	Maviyemiş	-	-
27	27	Artvin	Maviyemiş	-	-
28	28	Artvin	Maviyemiş	-	-
29	29	Artvin	Maviyemiş	-	-
30	30	Artvin	Maviyemiş	-	-
31	123	Samsun	Maviyemiş	-	-
32	125	Samsun	Maviyemiş	-	-
33	127	Samsun	Maviyemiş	-	-
34	128	Samsun	Maviyemiş	-	-
35	130	Samsun	Maviyemiş	-	-
36	131	Samsun	Maviyemiş	-	-
37	132	Giresun	Maviyemiş	-	-
38	133	Giresun	Maviyemiş	-	-
39	134	Giresun	Maviyemiş	-	-
40	135	Giresun	Maviyemiş	-	-
41	136	Giresun	Maviyemiş	-	-

Çizelge 4.2. (Devam) Maviyemiş, Kültür Narı ve Süs Narı örneklerinin toplandığı iller ve BRRSV tespiti için yapılan RT-PCR analiz sonuçları

No	Örnek Kodu	Bölge Adı	Örnek Adı	BRRSV Genel Tanı Primeri (3F/4R)	Nar Primeri (27F/R)
42	137	Giresun	Maviyemiş	-	-
43	138	Giresun	Maviyemiş	-	-
44	139	Giresun	Maviyemiş	-	-
45	140	Giresun	Maviyemiş	-	-
46	141	Giresun	Maviyemiş	-	-
47	142	Giresun	Maviyemiş	-	-
48	143	Giresun	Maviyemiş	-	-
49	144	Giresun	Maviyemiş	-	-
50	145	Giresun	Maviyemiş	-	-
51	146	Giresun	Maviyemiş	-	-
52	147	Giresun	Maviyemiş	-	-
53	148	Giresun	Maviyemiş	-	-
54	149	Giresun	Maviyemiş	-	-
55	150	Giresun	Maviyemiş	-	-
56	151	Giresun	Maviyemiş	-	-
57	152	Giresun	Maviyemiş	-	-
58	153	Trabzon	Maviyemiş	-	-
59	154	Trabzon	Maviyemiş	-	-
60	155	Trabzon	Maviyemiş	-	-
61	156	Trabzon	Maviyemiş	-	-
62	157	Trabzon	Maviyemiş	-	-
63	162	Trabzon	Maviyemiş	-	-
64	164	Trabzon	Maviyemiş	-	-
65	165	Trabzon	Maviyemiş	-	-
66	166	Trabzon	Maviyemiş	-	-
67	167	Trabzon	Maviyemiş	-	-
68	173	Trabzon	Maviyemiş	-	-
69	174	Trabzon	Maviyemiş	-	-
70	175	Trabzon	Maviyemiş	-	-
71	176	Trabzon	Maviyemiş	-	-
72	177	Trabzon	Maviyemiş	-	-
73	178	Trabzon	Maviyemiş	-	-
74	179	Trabzon	Maviyemiş	-	-
75	180	Trabzon	Maviyemiş	-	-
76	181	Trabzon	Maviyemiş	-	-
77	182	Trabzon	Maviyemiş	-	-
78	183	Trabzon	Maviyemiş	-	-
79	184	Trabzon	Maviyemiş	-	-
80	185	Trabzon	Maviyemiş	-	-
81	186	Trabzon	Maviyemiş	-	-

Çizelge 4.2. (Devam) Maviyemiş, Kültür Narı ve Süs Narı örneklerinin toplandığı iller ve BRRSV tespiti için yapılan RT-PCR analiz sonuçları

No	Örnek Kodu	Bölge Adı	Örnek Adı	BRRSV Genel Tanı Primeri (3F/4R)	Nar Primeri (27F/R)
82	187	Trabzon	Maviyemiş	-	-
83	188	Trabzon	Maviyemiş	-	-
84	189	Trabzon	Maviyemiş	-	-
85	190	Trabzon	Maviyemiş	-	-
86	191	Trabzon	Maviyemiş	-	-
87	192	Trabzon	Maviyemiş	-	-
88	193	Trabzon	Maviyemiş	-	-
89	194	Trabzon	Maviyemiş	-	-
90	195	Trabzon	Maviyemiş	-	-
91	196	Trabzon	Maviyemiş	-	-
92	197	Trabzon	Maviyemiş	-	-
93	198	Trabzon	Maviyemiş	-	-
94	199	Trabzon	Maviyemiş	-	-
95	200	Trabzon	Maviyemiş	-	-
96	201	Trabzon	Maviyemiş	-	-
97	205	Trabzon	Maviyemiş	-	-
98	206	Trabzon	Maviyemiş	-	-
99	210	Trabzon	Maviyemiş	-	-
100	211	Trabzon	Maviyemiş	-	-
101	212	Trabzon	Maviyemiş	-	-
102	213	Trabzon	Maviyemiş	-	-
103	214	Trabzon	Maviyemiş	-	-
104	215	Trabzon	Maviyemiş	-	-
105	216	Trabzon	Maviyemiş	-	-
106	217	Trabzon	Maviyemiş	-	-
107	218	Trabzon	Maviyemiş	-	-
108	219	Trabzon	Maviyemiş	-	-
109	220	Trabzon	Maviyemiş	-	-
110	221	Trabzon	Maviyemiş	-	-
111	223	Trabzon	Maviyemiş	-	-
112	224	Rize	Maviyemiş	-	-
113	225	Rize	Maviyemiş	-	-
114	226	Rize	Maviyemiş	-	-
115	227	Rize	Maviyemiş	-	-
116	228	Rize	Maviyemiş	-	-
117	229	Rize	Maviyemiş	-	-
118	230	Rize	Maviyemiş	-	-
119	231	Rize	Maviyemiş	-	-
120	232	Rize	Maviyemiş	-	-
121	233	Rize	Maviyemiş	-	-

Çizelge 4.2. (Devam) Maviyemiş, Kültür Narı ve Süs Narı örneklerinin toplandığı iller ve BRRSV tespiti için yapılan RT-PCR analiz sonuçları

No	Örnek Kodu	Bölge Adı	Örnek Adı	BRRSV Genel Tanı Primeri (3F/4R)	Nar Primeri (27F/R)
122	234	Rize	Maviyemiş	-	-
123	235	Rize	Maviyemiş	-	-
124	236	Rize	Maviyemiş	-	-
125	237	Rize	Maviyemiş	-	-
126	238	Rize	Maviyemiş	-	-
127	239	Rize	Maviyemiş	-	-
128	240	Rize	Maviyemiş	-	-
129	241	Rize	Maviyemiş	-	-
130	242	Rize	Maviyemiş	-	-
131	243	Rize	Maviyemiş	-	-
132	244	Rize	Maviyemiş	-	-
133	245	Rize	Maviyemiş	-	-
134	246	Rize	Maviyemiş	-	-
135	247	Rize	Maviyemiş	-	-
136	248	Rize	Maviyemiş	-	-
137	249	Rize	Maviyemiş	-	-
138	250	Rize	Maviyemiş	-	-
139	295	Mersin	Maviyemiş	-	-
140	296	Mersin	Maviyemiş	-	-
141	297	Rize	Maviyemiş	-	-
142	298	Giresun	Maviyemiş	-	-
143	299	Giresun	Maviyemiş	-	-
144	300	Giresun	Maviyemiş	-	-
145	301	Giresun	Maviyemiş	-	-
146	302	Giresun	Maviyemiş	-	-
147	303	Giresun	Maviyemiş	-	-
148	304	Giresun	Maviyemiş	-	-
149	305	Giresun	Maviyemiş	-	-
150	306	Giresun	Maviyemiş	-	-
151	307	Ordu	Maviyemiş	-	-
152	308	Ordu	Maviyemiş	-	-
153	309	Ordu	Maviyemiş	-	-
154	310	Ordu	Maviyemiş	-	-
155	311	Ordu	Maviyemiş	-	-
156	312	Ordu	Maviyemiş	-	-
157	313	Ordu	Maviyemiş	-	-
158	314	Ordu	Maviyemiş	-	-
159	315	Ordu	Maviyemiş	-	-
160	316	Ordu	Maviyemiş	-	-
161	317	Ordu	Maviyemiş	-	-
162	B239	Bursa	Maviyemiş	-	-

Çizelge 4.2. (Devam) Maviyemiş, Kültür Narı ve Süs Narı örneklerinin toplandığı iller ve BRRSV tespiti için yapılan RT-PCR analiz sonuçları

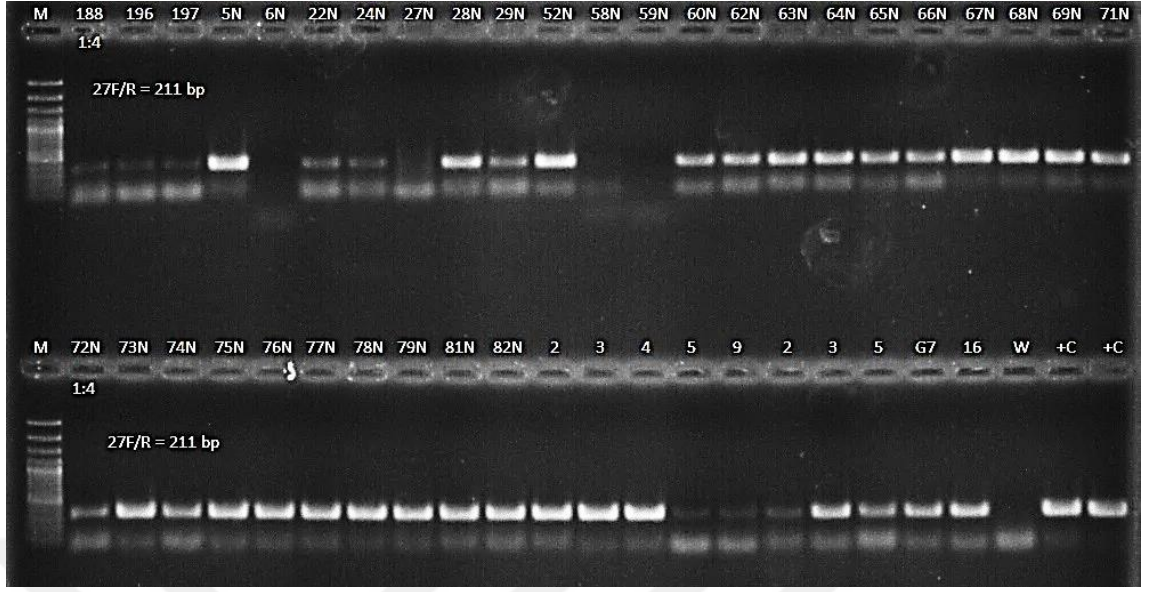
No	Örnek Kodu	Bölge Adı	Örnek Adı	BRRSV Genel Tanı Primeri (3F/4R)	Nar Primeri (27F/R)
163	B240	Bursa	Maviyemiş	-	-
164	B241	Bursa	Maviyemiş	-	-
165	B242	Bursa	Maviyemiş	-	-
166	B244	Bursa	Maviyemiş	-	-
167	B245	Bursa	Maviyemiş	-	-
168	B247	Bursa	Maviyemiş	-	-
169	B248	Bursa	Maviyemiş	-	-
170	B249	Bursa	Maviyemiş	-	-
171	B251	Bursa	Maviyemiş	-	-
172	B253	Bursa	Maviyemiş	-	-
173	B254	Bursa	Maviyemiş	-	-
174	B258	Bursa	Maviyemiş	-	-
175	B264	Bursa	Maviyemiş	-	-
176	B265	Bursa	Maviyemiş	-	-
177	B266	Bursa	Maviyemiş	-	-
178	B267	Bursa	Maviyemiş	-	-
179	1N	Hatay	Süs Narı	-	-
180	2N	Hatay	Süs Narı	-	-
181	3N	Hatay	Süs Narı	-	-
182	4N	Hatay	Süs Narı	-	-
183	5N	Hatay	Kültür Narı	-	+
184	6N	Hatay	Kültür Narı	-	-
185	7N	Hatay	Kültür Narı	-	-
186	8N	Hatay	Süs Narı	-	-
187	9N	Hatay	Süs Narı	-	-
188	10N	Kocaeli	Süs Narı	-	-
189	11N	Kocaeli	Süs Narı	-	-
190	12N	Kocaeli	Süs Narı	-	-
191	13N	Kocaeli	Süs Narı	-	-
192	14N	Kocaeli	Süs Narı	-	-
193	15N	Kocaeli	Süs Narı	-	-
194	16N	Kocaeli	Süs Narı	-	+
195	17N	Kocaeli	Süs Narı	-	-
196	18N	Kocaeli	Süs Narı	-	-
197	19N	Kocaeli	Süs Narı	-	-
198	20N	Kocaeli	Süs Narı	-	-
199	21N	Kocaeli	Süs Narı	-	-
200	23N	Hatay	Kültür Narı	-	-
201	28N	Hatay	Kültür Narı	-	+
202	29N	Hatay	Kültür Narı	-	+
203	31N	Hatay	Kültür Narı	-	+

Çizelge 4.2. (Devam) Maviyemiş, Kültür Narı ve Süs Narı örneklerinin toplandığı iller ve BRRSV tespiti için yapılan RT-PCR analiz sonuçları

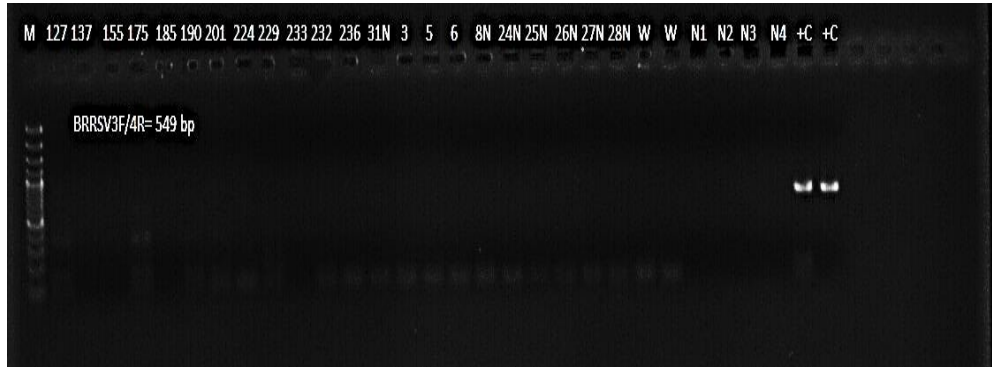
No	Örnek Kodu	Bölge Adı	Örnek Adı	BRRSV Genel Tanı Primeri (3F/4R)	Nar Primeri (27F/R)
204	48N	Hatay	Kültür Narı	-	-
205	49N	Hatay	Kültür Narı	-	-
206	50N	Hatay	Kültür Narı	-	-
207	51N	Şanlıurfa	Süs Narı	-	-
208	52N	Şanlıurfa	Süs Narı	-	+
209	53N	Şanlıurfa	Süs Narı	-	-
210	54N	Şanlıurfa	Süs Narı	-	-
211	55N	Şanlıurfa	Süs Narı	-	-
212	56N	Şanlıurfa	Süs Narı	-	-
213	57N	Şanlıurfa	Süs Narı	-	-
214	58N	Hatay	Süs Narı	+	+
215	59N	Hatay	Süs Narı	-	-
216	60N	Hatay	Süs Narı	-	-
217	61N	Hatay	Kültür Narı	-	-
218	62N	Hatay	Kültür Narı	-	+
219	63N	Hatay	Kültür Narı	-	+
220	64N	Hatay	Kültür Narı	-	+
221	65N	Hatay	Kültür Narı	-	+
222	66N	Hatay	Kültür Narı	-	+
223	67N	Hatay	Kültür Narı	-	+
224	68N	Hatay	Kültür Narı	-	+
225	69N	Hatay	Kültür Narı	-	+
226	70N	Hatay	Kültür Narı	-	-
227	73N	Hatay	Kültür Narı	-	+
228	74N	Hatay	Kültür Narı	-	+
229	75N	Hatay	Kültür Narı	-	+
230	76N	Hatay	Kültür Narı	-	+
231	77N	Hatay	Kültür Narı	-	+
232	78N	Hatay	Kültür Narı	-	+
233	79N	Hatay	Kültür Narı	-	+
234	80N	Hatay	Kültür Narı	-	-
235	81N	Hatay	Kültür narı	+	+
236	82N	Hatay	Kültür Narı	-	+
237	83N	Hatay	Kültür Narı	-	-
238	84N	Hatay	Kültür Narı	-	-
239	85N	Hatay	Kültür Narı	-	-
240	86N	Hatay	Kültür Narı	-	-
241	87N	Hatay	Kültür Narı	-	-
242	88N	Hatay	Kültür Narı	-	-
243	89N	Hatay	Kültür Narı	-	-
244	90N	Hatay	Kültür Narı	-	-

Çizelge 4.2. (Devam) Maviyemiş, Kültür Narı ve Süs Narı örneklerinin toplandığı iller ve BRRSV tespiti için yapılan RT-PCR analiz sonuçları

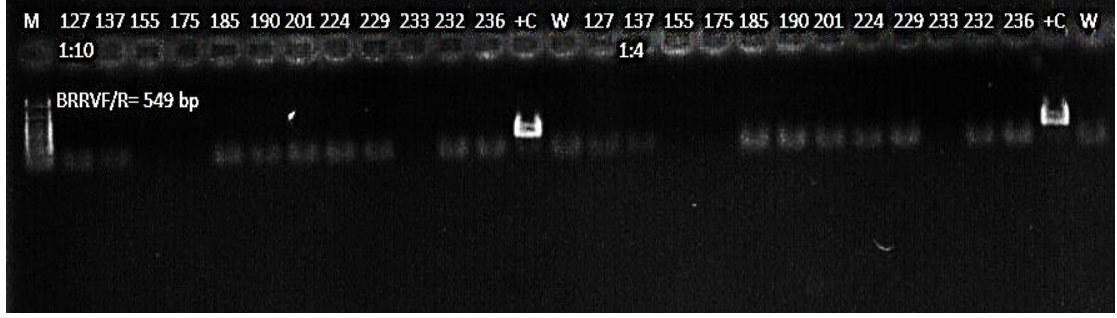
No	Örnek Kodu	Bölge Adı	Örnek Adı	BRRSV Genel Tanı Primeri (3F/4R)	Nar Primeri (27F/R)
245	91N	Hatay	Kültür Narı	-	-
246	92N	Hatay	Kültür Narı	-	-
247	93N	Şanlıurfa	Kültür Narı	-	-
248	94N	Şanlıurfa	Kültür Narı	-	-
249	95N	Şanlıurfa	Kültür Narı	-	-
250	96N	Şanlıurfa	Kültür Narı	-	-
251	97N	Hatay	Kültür Narı	-	-
252	1	Mersin	Süs Narı	-	-
253	2	Mersin	Süs Narı	-	-
254	3	Mersin	Süs Narı	-	-
255	4	Mersin	Süs Narı	-	-
256	5	Mersin	Süs Narı	-	-
257	6	Mersin	Süs Narı	-	-
258	7	Mersin	Süs Narı	-	-
259	8	Mersin	Süs Narı	-	-
260	9	Mersin	Süs Narı	-	-
261	10	Mersin	Süs Narı	-	-
262	11	Mersin	Süs Narı	-	-
263	12	Mersin	Süs Narı	-	-
264	13	Mersin	Süs Narı	-	-
265	14	Mersin	Süs Narı	-	-
266	15	Mersin	Süs Narı	-	-
267	16	Mersin	Süs Narı	-	+
268	9	Hatay	Kültür narı	+	+



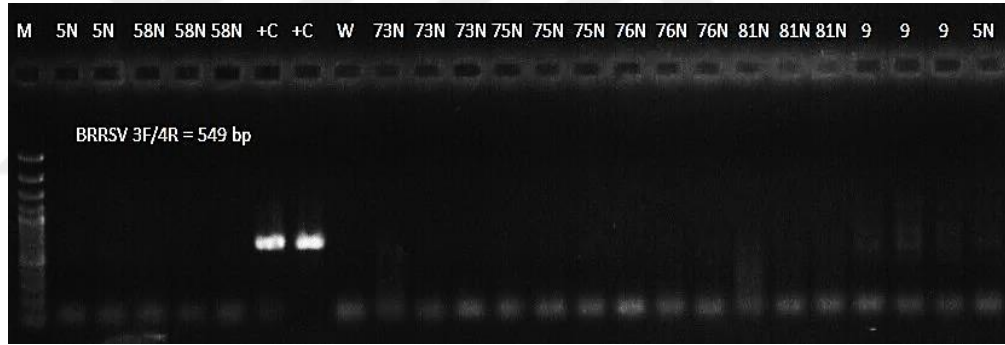
Şekil 4.11. Samsun, Giresun, Trabzon ve ve Rize'den toplanan maviyemiş ve Hatay'dan toplanan kültür ve süs narı örneklerinde örneklerinde Blueberry red ringspot virüsünün tespitinde yapılan RT-PCR analizlerinde cDNA lar 1:4 oranında sulandırılmış ve 27F/R primer çifti kullanılarak yapılan PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); 188, 196,197: Trabzon Maviyemiş, 5N, 6N, 22N: Hatay Kültür Narı, 24N: Hatay Süs Narı, 27N, 28N, 29N: Hatay Kültür Narı, 52N, 58N, 59N, 60N: Hatay Süs Narı, 62N-82N: Hatay Kültür Narı, 2, 3, 4, 5: Hatay Süs Narı, 9: Hatay Kültür Narı, G7: Kocaeli Süs Narı, 16: Mersin Süs Narı, W: Su Kontrol, +C: BRRSV Pozitif Kontroller



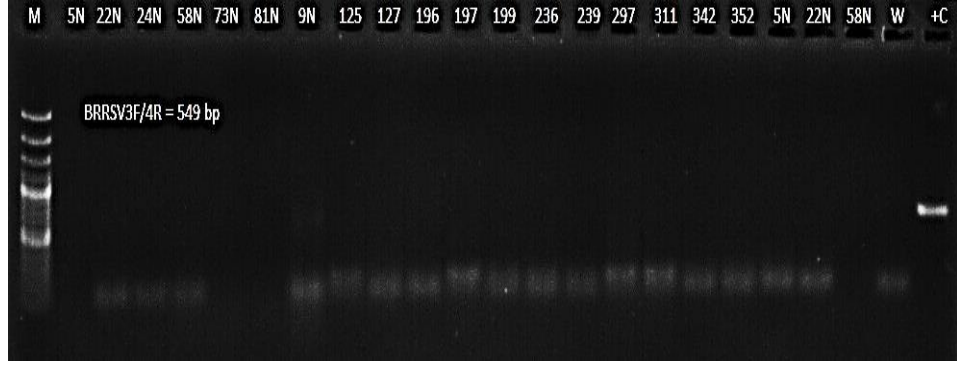
Şekil 4.12. Artvin, Giresun, Trabzon, Samsun ve Rize'den toplanan maviyemiş ve Hatay'dan toplanan kültür ve süs narı örneklerinde Blueberry red ringspot virüs tespiti için cDNA doğrudan sulandırılmadan kullanılmış ve BRRSV3F/4R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); 127: Samsun Maviyemiş, 137: Giresun Maviyemiş, 155, 175, 185, 190, 201: Trabzon Maviyemiş, 224, 229, 233, 232, 236: Rize Maviyemiş, 31N: Hatay Kültür Narı, 3, 5, 6: Hatay Süs Narı 8N: Hatay Süs Narı, 24N: Hatay Süs Narı, 25N, 26N, 27N, 28N: Hatay Kültür Narı, N1-N4: Hatay Süs Narı, W: Su Kontrol, +C: BRRSV Pozitif Kontroller



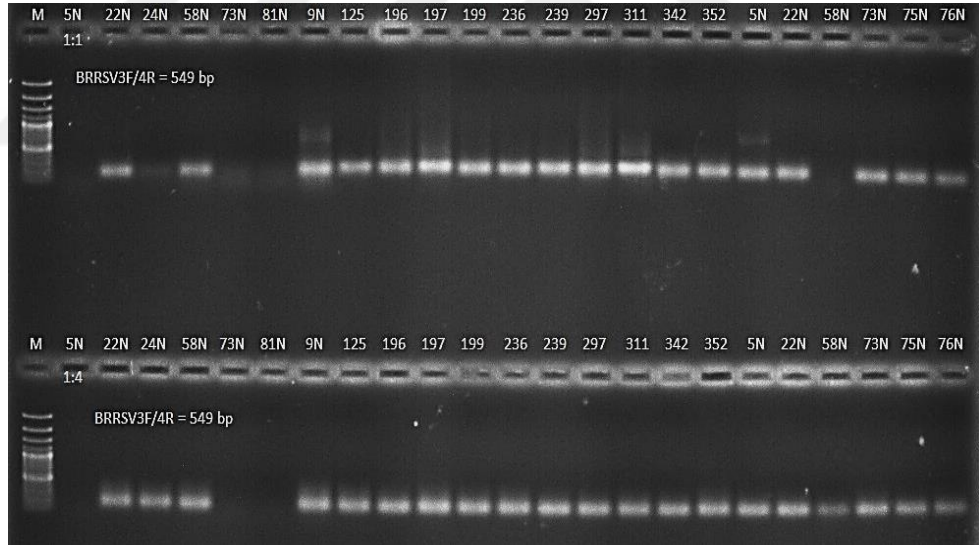
Şekil 4.13. Samsun, Giresun, Trabzon ve ve Rize'den toplanan maviyemiş örneklerinde Blueberry red ringspot virüsünün tespitinde yapılan RT-PCR analizlerinde cDNAlar 1:10 ve 1:4 oranında sulandırılmış ve BRRSV3F/4R primer çifti kullanılarak yapılan PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#383 MBI, Thermo Sci, ABD); 127: Samsun Maviyemiş, 137: Giresun Maviyemiş, 155, 175, 185, 190, 201: Trabzon Maviyemiş, 224, 229, 233, 232, 236: Rize Maviyemiş, W: Su Kontrol, +C: BRRSV Pozitif Kontroller



Şekil 4.14. Artvin' den toplanan maviyemiş ve Hatay' dan toplanan kültür ve süs narı örneklerinde Blueberry red ringspot virüs tespiti için BRRSV3F/4R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); 5N: Hatay Kültür Narı, 58N: Hatay Süs Narı, 73N, 75N, 76N, 81N: Hatay Kültür Narı, 9: Hatay Kültür Narı, W: Su Kontrol, +C: BRRSV Pozitif Kontroller



Şekil 4.15. Samsun, Trabzon, Ordu ve Rize’den toplanan maviyemiş ve Hatay’ dan alınan kültür ve süs narı örneklerinde Blueberry red ringspot virüs tespiti için BRRSV3F/4R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); 5N, 22N: Hatay Kültür Narı, 24N, 58N: Hatay Süs Narı 73N, 81N: Hatay Kültür Narı, 9N: Hatay Süs Narı, 125, 127: Samsun Maviyemiş, 196,197,199: Trabzon Maviyemiş, 236, 239, 297: Rize Maviyemiş, 311: Ordu Maviyemiş, 342, 352: Rize Maviyemiş, W: Su Kontrol +C: BRRSV Pozitif Kontrol



Şekil 4.16. Samsun, Trabzon, Ordu ve Rize’den toplanan maviyemiş ve Hatay’ dan alınan kültür ve süs narı örneklerinde Blueberry red ringspot virüs tespiti için analizlerinde cDNA lar doğrudan ve 1:4 oranında sulandırılmış ve BRRSV3F/4R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); 5N, 22N: Hatay Kültür Narı, 24N,58N: Hatay Süs Narı, 73N, 81N: Hatay Kültür Narı, 9N: Hatay Süs Narı 125: Samsun Maviyemiş, 196, 197, 199: Trabzon maviyemiş, 236, 239, 297: Rize Maviyemiş, 311: Ordu Maviyemiş, 342, 352: Rize Maviyemiş, 75N, 76N: Hatay Kültür Narı

Arabidopsis thaliana chromosome 5 sequence	46.4	46.4	8%	0.66	93%	CP002688.1
Sus scrofa mRNA, clone OVR010068811, expressed in ovary	46.4	46.4	11%	0.66	84%	AK347627.1
Vitis vinifera contig VV78X040608_26, whole genome shotgun sequence	46.4	46.4	17%	0.66	81%	AM435179.1
Vitis vinifera contig VV78X108700_15, whole genome shotgun sequence	46.4	46.4	12%	0.66	82%	AM472702.1
Sus scrofa mRNA, clone OVRM10087D02, expressed in ovary	46.4	46.4	11%	0.66	84%	AK235495.1
Sus scrofa mRNA, clone OVR010018G03, expressed in ovary	46.4	46.4	11%	0.66	84%	AK234172.1
Sus scrofa heme binding protein mRNA, partial cds	46.4	46.4	11%	0.66	84%	AY550056.1
Mus musculus chromosome 3, clone RP23-326F23, complete sequence	46.4	46.4	16%	0.66	81%	AC123693.13
Homo sapiens cDNA FLJ12379 fis, clone MAMMA1002554	46.4	46.4	11%	0.66	86%	AK022441.1
Homo sapiens chromosome 15, clone RP11-592N21, complete sequence	46.4	46.4	11%	0.66	86%	AC064799.6
Homo sapiens genomic DNA, cDNA DKFZc688P02129, (from clone DKFZc688P02129)	46.4	46.4	11%	0.66	86%	BX640772.1
Blueberry red ringspot virus, complete genome	46.4	46.4	7%	0.66	100%	AF404509.2
Arabidopsis thaliana genomic DNA, chromosome 5, CIC YAC clone CIC5B3	46.4	46.4	8%	0.66	93%	AP002549.1
Zebrafish DNA sequence from clone CH211-146M13 in linkage group 7, complete sequence	46.4	46.4	19%	0.66	79%	AL929115.9
Plasmodium falciparum genome assembly, chromosome 3	45.5	45.5	12%	2.3	86%	LR131483.1
Plasmodium falciparum genome assembly, chromosome 3	45.5	45.5	12%	2.3	86%	LR131468.1
Plasmodium falciparum genome assembly, chromosome 3	45.5	45.5	12%	2.3	86%	LR131452.1
Plasmodium falciparum genome assembly, chromosome 3	45.5	45.5	12%	2.3	86%	LR131436.1
Plasmodium falciparum strain KH1 genome assembly, chromosome 3	45.5	45.5	12%	2.3	86%	LR131420.1

Şekil 4.17. BRRSV tanı primerleri kullanılarak narlardan elde edilen PCR ürünlerinin sekans analiz sonucu Gen Bankasında kayıtlı izolatlarla benzerlik (homoloji) oranları

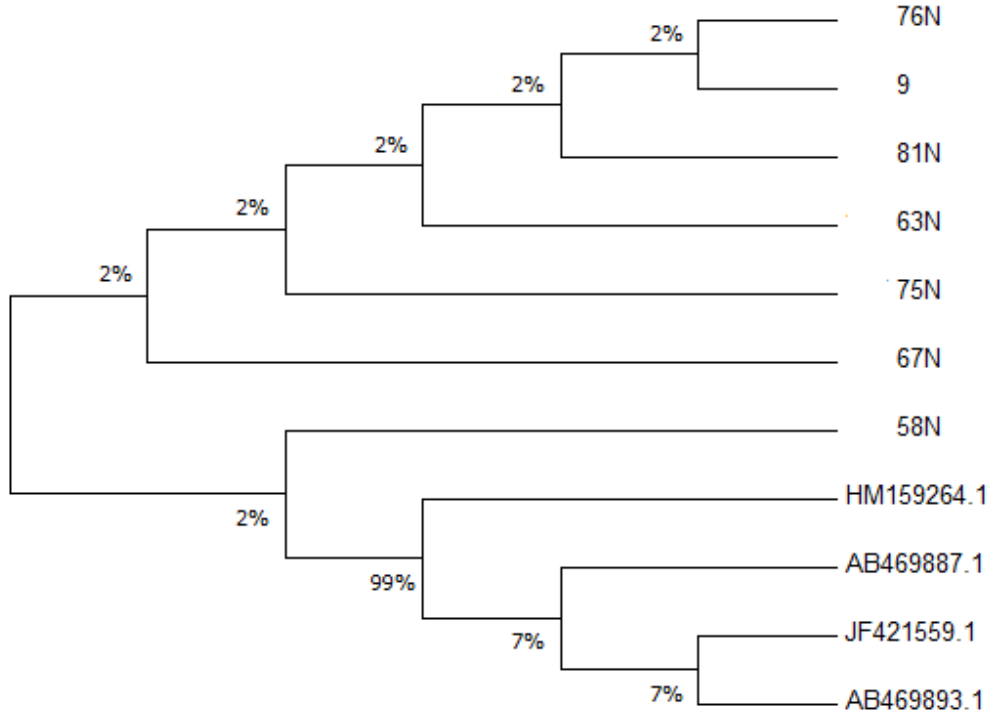
Blueberry red ringspot virus isolate BRRSV24, complete genome	50.0	50.0	24%	0.020	89%	JN205460.1
Blueberry red ringspot virus isolate BRRSV13 reverse transcriptase gene, complete cds	50.0	50.0	24%	0.020	89%	JF820972.1
Blueberry red ringspot virus isolate Coville 546 from Slovenia, complete genome	50.0	50.0	24%	0.020	89%	JF421559.1
Blueberry red ringspot virus isolate Darrow 5, complete genome	50.0	50.0	24%	0.020	89%	HM159264.1
Blueberry red ringspot virus isolate Darrow5 reverse transcriptase gene, partial cds	50.0	50.0	24%	0.020	89%	HM107773.1
Blueberry red ringspot virus RT gene for reverse transcriptase, partial cds, isolate: TAs2	50.0	50.0	24%	0.020	89%	AB469893.1
Blueberry red ringspot virus RT gene for reverse transcriptase, partial cds, isolate: TAs1	50.0	50.0	24%	0.020	89%	AB469892.1
Blueberry red ringspot virus RT gene for reverse transcriptase, partial cds, isolate: TAd2	50.0	50.0	24%	0.020	89%	AB469891.1
Blueberry red ringspot virus RT gene for reverse transcriptase, partial cds, isolate: TAd1	50.0	50.0	24%	0.020	89%	AB469890.1
Blueberry red ringspot virus RT gene for reverse transcriptase, partial cds, isolate: IRd1	50.0	50.0	24%	0.020	89%	AB469889.1
Blueberry red ringspot virus RT gene for reverse transcriptase, partial cds, isolate: HAd1	50.0	50.0	24%	0.020	89%	AB469888.1

Şekil 4.18. Narlarda olası yeni bir virüse karşı geliştirilen 27F/R primeri kullanılarak narlardan elde edilen PCR ürünlerinin sekans analiz sonucu Gen Bankasında kayıtlı izolatlarla benzerlik (homoloji) oranları

4.2.3 Filogenetik Analizler

Bu çalışma kapsamında 27F/R primerine karşı anlamlı gelen örnekler NCBI veri tabanındaki diğer blueberry red ringspot virüs izolatlarının dizileri ile Clustal W yöntemi kullanılarak hizalanmıştır. Hizalanan tüm nükleotid dizileri NJ (Neighbor Joining) yöntemi kullanılarak Mega 7 yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçta elde edilen dendrogramların birbiri ile oldukça uyumlu olduğu görülmüştür. 27F/R primeri ile çoğaltılan BRRSV izolatlarına ait NJ dendrogramı incelendiğinde, Türkiye izolatlarının 58 N izolatı hariç kendi içinde gruplandığı görülmüştür. Gen Bankasına kayıtlı BRRSV

izolatlarına en yakın homoloji gösteren nar izolatu 58N kodlu örnek olup süs narına aittir, diğere nar örnekleri ise kültür narı olup Hicaz çeşididir (Şekli 4.19).



Şekil 4.19. Blueberry red ringspot virus'ünün saptanması amacıyla 27F/R primeri kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda elde edilen ürünlerinin sekans analizine göre çizilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde, MEGA 7 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 maviyemişlerde önemli bir virüs olan BRRSV' nin gerek *Vaccinium* türlerinde gerekse narlarda moleküler yöntemlerle araştırılmasına yönelik ilk çalışmadır. Bu çalışma kapsamında Karadeniz bölgesinden Artvin ilinden 30, Samsun' dan 6, Giresun' dan 30, Trabzon' dan 54, Rize' den 28, Ordu' dan 12 ve bu bölge dışında bu illere ek olarak Mersin' den 2 ve Bursa' dan 17 örnek alınarak toplamda 179 maviyemiş örneği toplanmıştır. Ayrıca bölümümüzde yürütülen bir çalışmada narlarda "blueberry red ringspot virüs benzeri" bir genoma rastlanıldığından söz konusu nar örnekleri de testlenme programına alınmıştır. Bu nedenle Hatay ilinden 51, Mersin' den 16, Kocaeli' den 12 ve Şanlıurfa' dan 11 olmak üzere toplamda 90 nar örneği toplanmıştır. Yapılan bu çalışma kapsamında maviyemişlerde BRRSV saptanmazken narlarda hem BRRSV- genel tanı primeri hem de narlar için geliştirilen 27F/R primeri ile BRRSV genomu tespit edilmiştir. Narların BRRSV ve/veya BRRSV-benzeri olası yeni bir virüsün konukçusu olma olasılığı oldukça yüksektir ve bu konuda çalışmalara devam edilmesi önerilmektedir.

Bu çalışma ile ülkemizde son yıllarda üretimi ve tüketimi artan maviyemiş ve nar bitkilerinde A.B.D ve Avrupa ülkelerinde önemli ekonomik kayıplara yol açan BRRSV' nin saptanmamış olması olumlu bir sonuç olarak değerlendirilebilir. Bununla birlikte bu virüs açısından testlemelere devam edilmesi gerekmekte ve narlarda BRRSV genomuna benzer olası yeni bir virüsün saptanması bu konuda yeni çalışmaların yapılma gerekliliğini ortaya çıkarmaktadır.

KAYNAKLAR

- Brannen, P.M., Scherm, H., Martin, R.R., 2017. Necrotic ring blotch. In: Polashock, J.J., Caruso, F.L., Averill, A.L., Schilder, A.C., editors. **Compendium of Blueberry, Cranberry, and Lingonberry Diseases and Pests. 2nd edition.** St. Paul, MN: APS Press. 64-66.
- Cho, I.S., Chung, B.N., Cho, J.D., Choi, G.S. 2012. First report of *Blueberry red ringspot virus* infecting highbush blueberry in Korea. **Plant Disease.** 96:1074.
- Cline, W.O., Ballington J.R., Polashock J.J., 2009. Blueberry red ringspot observations and findings in North Carolina. **Acta Hort.** 810:305–312.
- Converse, R.I., Ramsdell D.C., 1982. Occurrence of tomato ringspot viruses and dagger and other nematodes associated with cultivated highbush blueberries in Oregon. **Plant Disease.** 66, 710-712.
- 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
- Çelik, H, 2012. **Yüksek boylu Maviyemiş yetiştiriciliği.** Mesleki kitaplar serisi III., İstanbul.
- FAO, 2016. FAOSTAT. <http://faostat.fao.org>.
- Forney CF. 2001. Horticultural and other factors affecting aroma volatile composition of small fruit., **Hort Technology.**; 11(4): 529–38.
- Gillett J.M., 1988. **Physical and chemical properties of blueberry red ringspot virus.** M.S. Thesis, Michigan State University, East Lansing, MI, USA,.
- Glasheen, B.M., Polashock, J.J., Lawrence, D.M., Gillett, J.M., Ramsdell, D.C., Vorsa, N., Hillman, B.I., 2002. Cloning, sequencing, and promoter identification of *Blueberry red ringspot virus*, a member of the family *Caulimoviridae* with similarities to the “*Soybean chlorotic mottle-like*” genus. **Archives of Virology**, 147: 2169–2186.
- Gümüş C, Ölmez Z, Hangişi Ölmez G, Kalender Ç., 2009. Artvin’de yaban mersini (*Vaccinium sp.*, *Likapa*) yetiştiriciliği eğitimi konulu AB projesinin tanıtımı ve projenin yürütülmesinde karşılaşılan güçlükler ve sorunlar (in Turkish). **II.Ormanlıkta Sosyo-Ekonomik Sorunlar Kongresi**, 19-21 Şubat, Isparta, 81-88
- 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.
- Hutchinson, M.T., Varney, E.H., 1954. Ringspot-A virus disease of cultivated blueberry. **Plant Disease Report** 38:260–262.
- Isogai, M., Ishii, K., Umemoto, S., Watanabe, M., Yoshikawa, N., 2009. First report of blueberry red ringspot disease caused by *Blueberry red ringspot virus* in Japan. **J Gen Plant Pathol** 75:140–143.
- Jalikip, S.H., 2010. Pomegranate breeding. Fruit, **Vegetable and Cereal Science Biotechnology Global Science Books**, 4, 26–34.
- Kalinowska, E., E. Paduch-Cichal and M. Chodorska, 2012. Molecular characterization of Polish *Blueberry red ringspot virus* isolate. **Virus Genes** 44 (2), 309-311.

- Kalinowska, E., E. Paduch-Cichal, M. Chodorska, 2011. First report of *Blueberry red ringspot virus* in highbush blueberry in Poland. **J. Plant Pathol.**
- Kim K.S., Ramsdell D.C., Gillett J.M., Fulton J.P., 1981. Virions and ultrastructural changes associated with blueberry red ringspot disease. **Phytopathology** 71: 673–678
- Maniatis, T., Fritsch, E. T. and Sambrook, 1982. Molecular cloning: A laboratory manual., Cold Spring Harbor, New York.
- Martin, R.R., 2004. Recommended procedures for detection of viruses of small fruit crops. **Acta Hort.** 656:199-207.
- Martin, R.R., and Tzanetakis, I., 2017. Disease caused by viruses in blueberries. In: Polashock, J.J., Caruso, F.L., Averill, A.L., Schilder, A.C., editors. **Compendium of Blueberry, Cranberry, and Lingonberry Diseases and Pests.** 2nd edition. St. Paul, MN: APS Press. 60-78.
- 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.
- Morante-Cariel, 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.
- Petrzik K., Pribylova J., Mavrič Plesko I., Spak J., 2011. Complete genome sequences of blueberry red ringspot virus (*Caulimoviridae*) isolates from the Czech Republic and Slovenia. **Archives of Virology**, 156: 1901–1903.
- Plesko, M.I., M.M. Virscek, D. Koron, 2010. Detection of *Blueberry red ringspot virus* in highbush blueberry cv. ‘Coville’ in Slovenia. Biotic and abiotic stress prevention on integrated berry fruits production 9–11th March 2009 (**Sofia-Bulgaria, 2010**) Abs. 34.
- Polashock, J.J., Ehlenfeldt, M.K., 2009. Molecular detection and discrimination of *Blueberry red ringspot virus* strains causing disease in cultivated blueberry and cranberry. **Plant Disease.** 93:727-733.
- 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.
- Pribylova, J., Špak, J., Kubelkova, D., Petrzik, K., 2010. First report of *Blueberry red ringspot virus* in highbush blueberry in the **Czech Republic**. **Plant Dis** 94:1071.
- Ramsdell, D.C., 1987. In: **Virus Diseases of Small Fruits**; ed. R.H. Converse. U.S. Dep. Agric. Hdbk No. 631, p. 112.
- Ramsdell, D.C., Kim, K.S., Fulton, J.P., 1987. Red Ringspot of Blueberry, in **Virus Diseases of Small Fruits, Agriculture Handbook.** No. 631, ed. by R.H. Converse (The United States Department of Agriculture, USA, 1987), pp. 121–123.
- Retamales, J.B. and Hancock, J.F., 2012. Blueberries. **Crop production science in horticulture series**, no:21, USA.
- Rott, M. E. & Jelkman 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 Plant Pathology.** 107:411-420.

- Spak, J., Kubelková, D., Přibyllová, J., Špaková, V., Petrzik K., 2009. Elucidation of the Roles of Blackcurrant reversion virus and Phytoplasma in the Etiology of Full Blossom Disease in currants *Plant Disease* 93: 832-838.
- Williford, J.R., Vonder Heydt, R., 2016. Data associated with publication “Figure-ground organization in visual cortex for natural scenes.”



ÖZGEÇMİŞ

Yazar 1995 yılında Şanlıurfa ili Kıyas Köyü'nde doğdu. İlk ve ortaokul öğrenimini Kıyas İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimini ise Kıyas Lisesi'nde tamamladı. 2012 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversite Ziraat Fakültesi Bitki Koruma bölümünü kazandı ve 2017 yılında aynı bölümden mezun oldu. 2017 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.



EKLER

SİLİCA RNA EXTRAKSİYON BUFFER (1000 ml) (Rott ve Jelkman-2001)

Tris- Base	24,2 g
LiCl	12,66 g
SDS	15 g
Sodium Deoxycholate	10 g
NP-40	10 ml

2,92 g EDTA veya 3,72 g EDTA*2H₂O

% 1 β-MCE (Kullanmadan hemen önce eklenmelidir.)

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

5 M Potasyum Asetat (pH 7.5)	60 ml
H ₂ O	28,5 ml
Glecial asetic asit	11,5 ml
Katı Potasyum Asetat	1 M

SİLİCA WASH BUFFER (1000 ml) (Rott ve Jelkman-2001)

Tris-HCl (pH 7.5)	10 mM
0,5 M EDTA	1 ml
5M NaCl	1 ml
% 100 EtOH	500 ml
Sterile H ₂ O	479 ml

TE BUFFER (pH 8) (1000 ml) (Rott ve Jelkman-2001)

1 M Tris-HCl (pH 8) 10 ml

0,5 M EDTA 2 ml

Sterile H₂O ile tamamlanır.

MORANTE-CARRIEL RNA EXTRAKSİYON BUFFER

YIKAMA BUFFER (100 ml)

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

İZOLASYON BUFFER (100 ml)

0,3 M Tris-HCl (pH 7.5)	3,6 g
25 mM EDTA	0,7 ml
2 M NaCl	11,6 g
%2 CTAB	2 g
%2 PVP	2 g
%0,005 Spermidine	0,10 g

SAFLAŞTIRMA BUFFER (100 ml)

10 M LiCl	42,3 g
3 M Sodium Asetat	40,8 ml

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

AGAROS JEL ELEKTROFOREZ (MANIATIS ve ark., 1982)

TAEX50 (100 ml)

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

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

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

Bromophenol blue	15 ml
Glycerol	18 g
TAEX50	6 ml

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.