



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***RUBUS VE VACCINIUM* TÜRLERİNDE YENİ GİRİŞ YAPAN
VİRÜSLERİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANILANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

MEHTAP ACIOĞLU

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
TEMMUZ-2018



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RUBUS VE VACCINIUM TÜRLERİNDE YENİ GİRİŞ YAPAN
VİRÜSLERİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANILANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

MEHTAP ACIOĞLU

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
TEMMUZ-2018**

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RUBUS VE VACCINIUM TÜRLERİNDE YENİ GİRİŞ YAPAN VİRÜSLERİN
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANILANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

MEHTAP ACIOĞLU

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Kadriye Çağlayan danışmanlığında hazırlanan bu tez **27/07/2018** tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kadriye Çağlayan
Başkan

Prof. Dr. Mona Gazel
Üye

Dr.Öğr.Üyesi. Eminur Elçi
Üye

Kod No:

Prof. Dr. Erdal SERTKAYA
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 18.YL.025

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.

26.07.2018

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.

MEHTAP ACIOĞLU

ÖZET

***Rubus* ve *Vaccinium* TÜRLERİNDE YENİ GİRİŞ YAPAN VİRÜSLERİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE TANILANMASI ve KARAKTERİZASYONU**

Türkiye’de *Rubus* ve mavi yemiş virüsleri ile ilgili çalışmalar çok sınırlı sayıda olup son yıllarda başlamıştır. Bu çalışmada, Hatay, Adana, Mersin, Kahramanmaraş, Bursa, Trabzon, Rize, Artvin ve Giresun illerindeki böğürtlen, ahududu ve mavi yemiş plantasyonlarında bu bitki türlerinde son yıllarda saptanan bazı yeni virüslerin RT-PCR analizleriyle saptanması amaçlanmıştır. Bu amaçla Hatay ilinden 38, Bursa’dan 95, Mersin’den 40, Kahramanmaraş’ tan 20 *Rubus spp.* örneği ile Karadeniz bölgesinden 102, Bursa ilinden 20 mavi yemiş (*Vaccinium spp.*) örneği toplanmış ve strawberry necrotic shock virus (SNSV), raspberry leaf mottle virus (RLMV), blackberry yellow vein-associated virus (BYVaV), blackberry chlorotic ringspot virus (BCRV), blackraspberry necrosis virüs (BRNV), blueberry shoestring virüs (BSSV), blueberry fruit drop associated virus (BFDaV) ve blueberry latent virüs (BBLV)’lerin ülkemizdeki durumunu tespit etmek için RT-PCR analizleri ile testlenmiştir. Ayrıca ülkemiz rubus plantasyonlarında varlığı doğrulanmamış olan tomato ringspot virus (ToRSV) de testleme programına alınmıştır. Testlenen örneklerin hiçbirisinde yeni giriş yapan virüsler saptanmazken SNSV, ToRSV ve BYVaV ile ilgili çelişkili bazı sonuçlar elde edilmiştir. Bu virüslerden özellikle BYVaV rubuslarda çok önemli bir hastalık kompleksine neden olduğu için bu virüsün varlığı ve yaygınlığı ile ilgili gelecekte daha detaylı çalışmaların yapılması önerilmektedir.

2018, 37 sayfa

Anahtar Kelimeler: Böğürtlen, ahududu, mavi yemiş, yeni virüsler, RT-PCR

ABSTRACT

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NEW EMERGING VIRUSES IN *Rubus* AND *Vaccinium* spp. BY MOLECULAR METHODS

There are very limited studies on rubus and blueberry viruses in Turkey and some studies were very recently started. The aim of this study is testing blackberries, raspberries and blueberries growing in Hatay, Adana, Mersin, Kahramanmaraş, Bursa, Trabzon, Rize, Artvin and Giresun provinces by RT-PCR analysis for new emerging viruses. For this purpose, 38 *Rubus* samples from Hatay, 95 from Bursa, 40 from Mersin and 20 from Kahramanmaraş; 102 blueberry samples from Blacksea Region and 20 samples from Bursa were collected and tested for some new emerging viruses. *Rubus* samples were tested for strawberry necrotic shock virus (SNSV), raspberry leaf mottle virus (RLMV), blackberry yellow vein-associated virus (BYVaV), blackberry chlorotic ringspot virus (BCRV), blackraspberry necrosis virus (BRNV) whereas blueberry samples were tested for blueberry shoestring virus (BSSV), blueberry fruit drop associated virus (BFDaV) and blueberry latent virus (BBLV). Beside this, in order to confirm the presence of tomato ringspot virus (ToRSV) in *Rubus* plantation in Turkey, this virus was also involved in this study. Not any new emerging viruses were detected in any samples except there was some suspicious results for SNSV, ToRSV and BYVaV which is one of the viruses, causing very important disease complex in *Rubus* spp. Therefore detailed studies regarding presence and distribution of these viruses was recommended.

2018, 37 pages

Key words: Blackberry, raspberry, blueberry, new emerging viruses, RT-PCR

TEŞEKKÜR

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 Hocam Sayın Prof Dr. Mona GAZEL'e, çalışmamda konusunda yardımcı olan Ziraat Yüksek Mühendisi Kıvılcım ÖRDEK ve Ziraat Mühendisi Hülya ÜSTÜNKAYA' ya ve isimlerini burada zikredemediğim ama yardımlarını esirgememiş tüm arkadaşlarıma ve çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen, her zaman arkamda olan babama çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	12
3.1. Materyal	12
3.2. Yöntem.....	12
3.2.1 Arazi Çalışmaları ve Örneklemeler.....	12
3.2.2 Moleküler Çalışmalar.....	12
3.2.2.1 Rubus sp. ve Vaccinium sp. Örneklerinden Nükleik Asit (NA) İzolasyonu	12
3.2.2.1.1 Qiagen RNA Ekstraksiyon Kiti ile modifiye MacKenzie yöntemiyle RNA İzolasyonu	13
3.2.2.1.2 Silica Yöntemiyle RNA Ekstraksiyonu (Rott ve Jelkmann, 2001).....	13
3.2.2.1.3 RNA kalitesini arttırmak için DNase uygulaması	14
3.2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) Analizleri.....	15
3.2.2.2.1 Reverse Transkripsiyon (RT; Reverse Transcription).....	15
3.2.2.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	15
3.2.2.3 PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Jel Elektrophorez	17
3.2.2.4 DNA Dizileme ve BLAST Analizleri.....	18
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	19
4.1. Arazi Çalışmaları	19
4.2. RT-PCR ve PCR Analizleri	21
4.2.1 Rubus ve Vaccinium örneklerinden RNA İzolasyonu	21
4.2.2 RT-PCR ve PCR analizleri	23
4.2.2.1 Strawberry necrotic shock virus (SNSV)' ü için RT-PCR ve PCR analizleri.....	24
4.2.2.2 Blackberry chlorotic ringspot virus(BCRV) ve Tomato ringspot virus(ToRSV)' lerinin PCR analizleri.....	26
4.2.2.3 Blackberry yellow vein associated virüs(BYVaV)' in PCR analizleri	28
4.2.2.4 Blueberry shoestring virüs (BSSV), Blueberry fruit drop associated virüs(BFDaV) ve Blueberry latent virüs(BBLV)' leri için PCR analizleri için PCR analizleri	30
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	32
KAYNAKÇA	33
ÖZGEÇMİŞ	38
EKLER.....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1.	Vaccinium üretim alanlarında bitkilerin sürgün ve yapraklarında gözlenen kırmızı klorotik lekeler	19
Şekil 4.1(Devam).	Vaccinium üretim alanlarında bitkilerin sürgün ve yapraklarında gözlenen kırmızı klorotik lekeler	20
Şekil 4.2.	Rubus alanlarında gözlenen virüs benzeri simptomlar A- Yapraklarda mozaikleşme ve klorotik lekeler B, C- Yapraklarda damarlar boyunca kızarma, D- Yaprakta damar açılmaları ve klorotik lekeler	20
Şekil 4.3.	RNeasy Qiagen ticari kit (Qiagen Sci-Almanya) kullanılarak böğürtlenlerden izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD), 282 Böğürtlen örneği	21
Şekil 4.4.	Silica yöntemi kullanılarak böğürtlenlerden izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD, 282 Böğürtlen örneği	21
Şekil 4.5.	Silica yöntemi kullanılarak ahududulardan izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD), 273 Ahududu örneği	22
Şekil 4.6.	Silica yöntemi kullanılarak ahududulardan izole edilen RNA'lara Dnase uygulanmasından sonraki spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD), 273 Ahududu örneği.....	22
Şekil 4.7.	Silica yöntemi kullanılarak maviyemişlerden izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD), 318 Mavi yemiş örneği	22
Şekil 4.8.	Rubus ve Vaccinium virüslerinin pozitif kontrolleri ile optimizasyon amacıyla yapılan RT-PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI,Thermo Sci, ABD); 1: BYVaV-doğrudan cDNA; 2: BYVaV,-1:4 sulandırma; 3: Su kontrol; 4: BRNV- doğrudan cDNA; 5: BRNV-1:4 sulandırma; 6: Su kontrol; 7: SNSV- doğrudan cDNA; 8: SNSV-1:4 sulandırma; 9: Su kontrol; 10: BCRV- doğrudan cDNA; 11: BCRV-1:4 sulandırma; 12: Su kontrol; 13: ToRSV- doğrudan cDNA; 14: ToRSV-1:4 sulandırma; 15-16: Su kontrol; 17: BSSV: doğrudan cDNA; 18: BSSV-1:4 sulandırma; 19: Su kontrol.....	23
Şekil 4.9.	Mersin ili rubus örneklerinden izole edilen RNA'lara DNaz uygulanmadan Strawberry necrotic shock virüs tespiti amacıyla yapılan RT-PCR analiz sonucu. M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 1-29: Mersin rubus örnekleri; W: Su kontrol; +C : Pozitif kontrol- +C1; doğrudan cDNA, +C2; 1/4 cDNA sulandırma, +C3; 1/10 cDNA sulandırma.....	24
Şekil 4.10.	Mersin ili rubus örneklerinden izole edilen RNA'lara DNaz uygulanarak Strawberry necrotic shock virüs tespiti amacıyla yapılan RT-PCR analiz sonucu. M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 176 (14), 178 (16), 234 (19): Mersin rubus örnekleri; W: Su kontrol; +C: Pozitif kontrol	25

Şekil 4.11. Bursa, Hatay ve Kahramanmaraş'tan toplanan Rubus örneklerinde . blackberry chlorotic ringspot virus tespiti için BCRVF/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi. M: Marker (SMO#383 MBI Thermo Sci, ABD); 1-18: Bursa, Hatay, Mersin ve Kahramanmaraş rubus örnekleri; W: Su kontrol; +C: Pozitif kontrol (1/1-doğrudan cDNA, 1/4 ve 1/10 cDNA sulandırma serileri).....	26
Şekil 4.12. Bursa rubus örneklerinde ToRSVF/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 1-64: Bursa rubus örnekleri; W: Su kontrol; +C: Pozitif kontrol ((1/1-Doğrudan cDNA, 1/4 ve 1/10 sulandırma serileri).....	27
Şekil 4.13. Hatay rubus örneklerinde ToRSVF/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 1-15: Hatay rubus örnekleri; W: Su kontrol; +C: Pozitif kontrol (1/1- doğrudan cDNA ve 1/4 , 1/10 sulandırma serileri).....	28
Şekil 4.14. Bursa'dan toplanan rubus örneklerinde blackberry yellow vein associated virüs tespiti için BYVaVF/R primer çifti kullanılarak yapılan PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#383 MBI Thermo Sci,ABD); 1-19: Bursa rubus örnkeleri; W: Su kontrol; +C: Pozitif kontrol 1:1 ve 1:4 seyreltme)	29
Şekil 4.15. Hatay rubus örneklerinde blackberry yellow vein associated virüs tespiti için BYVaVF/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 1-21: Hatay rubus örnekleri; W: Su kontrol; +C: Pozitif kontrol (doğrudan cDNA kullanılarak)	29
Şekil 4.16. Hatay ili rubus örneklerinde blackberry yellow vein associated virüs tespiti için BYVaVF/R primer çifti ve cDNA'ların farklı sulandırma serileri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 276-282 Hatay rubus örnekleri; W: Su kontrol; +C: Pozitif kontrol (1/1-doğrudan cDNA kullanılarak, 1/4, 1/10 seyreltme).....	27
Şekil 4.17. Karadeniz mavi yemiş örneklerinde blueberry shoestring virus tespiti için BSSVF/R primer çifti ve cDNA'ların 1:4 sulandırma kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 1- 15 Karadeniz mavi yemiş örnekleri; W: Su kontrol; +C: Pozitif kontrol (1/4 cDNA seyreltme).....	31
Şekil 4.18. Bursa mavi yemiş örneklerinde blueberry shoestring virus tespiti için BSSVF/R primer çifti ve cDNA'ların 1:1, 1:4, 1:10 sulandırma kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 234-248: Bursa mavi yemiş örnekleri; W: Su kontrol; +C: Pozitif kontrol (1:1- doğrudan cDNA , 1:4, 1:10 oranlarında cDNA seyreltme)	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

- Çizelge 3.1. *Rubus* ve *Vaccinium* spp. örneklerinin testlendiği virüsler ve RT-PCR analizlerinde kullanılan primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri ve baz büyüklükleri..... 16
- Çizelge 4.1. 282 Böğürtlen, 273 Ahududu, 318 Maviyemiş örneklerinden ekstrakte edilen bazı RNA' ların nanodrop ölçüm değerleri23



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 ₂ 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)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TAE	Tris asetat EDTA
TE	Tris EDTA
UV	Ultraviyole
V	Volt

BYVaV	<i>Blackberry yellow Vein associated Virus</i>
SNSV	<i>Strawberry Necrotic Shock Virüs</i>
ToRSV	<i>Tomato Ringspot Virüs</i>
BSSV	<i>Blueberry Shoestring Virüs</i>
BCRV	<i>Blackberry chlorotik ringspot virüs</i>
BFDaV	<i>Blueberry fruit drop associated virüs</i>
BBLV	<i>Blueberry latent virüs</i>
NaCl	Sodium Chloride
LiCl	Lithium Chloride



1. GİRİŞ

Üzümsü meyveler dünyada çok sevilen, çok tüketilen ve çeşitli şekillerde değerlendirilen meyve türleridir. Kuzey yarım küresinde çok geniş bir alana (arktik ve tropik iklim sınırlarına kadar) yayılmışlardır. Türkiye bu türlerin doğal yayılma alanı içinde bulunmakta, hemen bütün bölgelerde bir veya birkaç türün farklı formlarına rastlanmaktadır (Ağaoğlu 1986, Onur ve ark., 1999). "Üzümsü meyveler" denildiği zaman daha çok üzüm (*Vitis*), çilek (*Fragaria*), ahududu ve böğürtlen (*Rubus*), frenk üzümü ve beктаşi üzümü (*Ribes*), kültür yaban mersini (*Vaccinium*), kuşbunu (*Rosa*), mürver yemişi (*Sambucus*), yabani iğde (*Hippophae*), amberbaris (=kadın tuzluğu; *Berberis*), çakal eriği (*Prunus*) gibi cinsler ve bunlara bağlı türler akla gelmektedir.

Ülkemizde son yıllara kadar çilek dışında üretim istatistikleri saptanan tek üzüksü meyve türü ahududu olmuştur. İlk defa 1995 yılında bu tür ile ilgili bilgiler toplanmış ve DİE'nün resmi kayıtlarına girmiştir. Frenk üzümü, ahududu ve böğürtlenlerin kültür çeşitleri Türkiye'ye ilk olarak 1968 yılında ABD ve Fransa'dan getirilmiş, bunu 1972 ve 1974 yıllarında getirilen diğer partiler izlemiştir. Daha o yıllarda üzüksü meyvelerin Türkiye tarımı açısından önemi irdelenmiş (Onur 1976), getirilen materyaller arasında 3 ahududu, 1 böğürtlen ve 5 frenk üzümü çeşidi ümitvar bulunmuştur (Onur 1977a ve 1977b). Aynı yıllarda Fidan ve ark. (1976) ahududu ve böğürtlen üzerinde araştırmalar yaparak ülkemiz koşullarına uygun çeşitleri belirlemişlerdir.

Ahududu ve Böğürtlen; Rosales takımı *Rosaceae* familyası (Gülgiller), *Rubus* cinsine aittirler. Ahududu dünya üzerinde Asya, Avrupa ve Amerika'nın ılıman iklim kuşağında doğal olarak yetişmektedir. Türkiye'nin ise kuzeyinde, batıdan doğuya uzanan bir kuşak boyunca, genellikle 1000 m ve daha fazla yüksekliklerde, hava oransal nemi ve toprak nemi fazla olan yerlerde doğal olarak bulunur. Bu yörelerde bulunan halk tarafından çeşitli isimler altında (ağaç çileği, ayı üzümü, more, madımak, kavuklu çilek, kırmızı böğürtlen vb.) tanınırlar. Taze olarak veya reçel, şurup olarak değerlendirilirler. 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 25.000 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 2017 yılı istatistiklerine göre 5,916 da alanda 4,989 ton ahududu, 3,079 da alanda da 2,739 ton böğürtlen üretimi gerçekleşmiştir (TÜİK , 2018).

Maviyemiş bitkisi Ericales takımı, *Ericaceae* (Fundagiller) familyası, *Vaccinium* cinsine giren bir bitkidir. Bu cinse giren çok sayıda türü bulunmakta olup en önemlileri *Vaccinium corymbosum*, *V. myrtilloides* ve *V. ashei reade*'dir. Bu bitki ülkemizin farklı yörelerinde farklı isimlerle anılmaktadır. Ardahan'da Mosi, Rize'de Likapa, Trabzon'da Ligarba, Karakavuz'da Çalıçileği, Rize Pazar ilçesinde Kaskanaka, Rize Ardeşen ilçesinde Çera (Çela), Artvin'de Morsvi, Mahabak, Mesı; Giresun'da Çalı Çiçeği, Ordu'da Cırtlık Çileği, Yozgat'ta Köpek Üzümü, diğer bölgelerde ise Ayı Üzümü, Çay Üzümü veya Çoban Üzümü olarak isimlendirilen literatürümüze mavi yemiş olarak girmiştir. Bu üzüm sü meyve puslu veya parlak mavi rengi ile Mavi Altın (bluegold) olarak da nitelendirilmektedir. Bu bitki ilk olarak 1900'lü yıllarda ABD 'de yetiştirilmeye başlanmıştır. Dünyada Maviyemiş üretiminin en fazla olduğu ülkeler sırasıyla ABD, Kanada, Polonya, Almanya, Fransa ve Meksika, Hollanda, İspanya ve İsveç'dir. Taze tüketimde gıda endüstrisinde çok kullanım olmasına rağmen ülkemizde maalesef yetiştiriciliği fazla yapılmamaktadır. 2000'li yıllarda Türkiye'ye egzotik bir tür olarak girmiştir. Ülkemizde 2013 yılında 485 dekar alandan 170 ton üretim yapılırken 2017 yılında 582 dekar alandan 225 ton elde edilmiştir.

Son yıllarda dünya çapında 40'dan fazla virüsün üzüm sü meyvelerde enfeksiyon yaptığı bildirilmektedir (Martin, 2004). Bu virüslerden en az 10 tanesinin Rubuslarda en önemli hastalıklardan birisi olan "Böğürtlen sarı damar hastalığı (BSDH)" ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Hassan ve ark. 2017). Bu hastalıktan ari olan bitkilerin yaşam süresi en az 20 yıl olurken BSDH ile enfekteli bitkilerin en fazla 5-7 yıl içinde değiştirilmesi gerekmektedir (Martin ve ark. 2013). *Rubus* cinsine ait bitkileri enfekte eden virüsler başlıca üç yolla taşınmaktadır: polen, nematod ve afidler. Polen yoluyla taşınan en önemli virüsler *Raspberry bushy dwarf virus* (RBDV) ve *Tobacco streak virus* (TSV) olup en yaygın olan RBDV'dir (Martin, 2002). Bu virüs böğürtlenle birlikte kırmızı ve siyah ahududuları ve bazı hibrit üzüm sü meyveleri de enfekte

edebilmekte, bitkilerde bodurlaşma, yapraklarda sararma, meyvelerde ufalanma (crumbly fruit) gibi simptomların yanı sıra bazı koşullarda hiçbir belirti vermeden de enfeksiyon yapabilmektedir (latent simptom) (Jones ve ark., 1982). RBDV'nin afidle taşınan bir virüs olan *Black raspberry necrosis virus* (BRNV) ile birlikte bulunması durumunda “çalımsı cücelik” görünümüne neden olduğu bildirilmiştir (Martin, 2002). Bu hastalık nedeniyle verimde %40'lara varan azalmalar olabilmektedir (Strik ve Martin, 2002).

Avrupa'da *Rubus* türlerinde nematodla taşınan 4 virüs bulunmaktadır: *Xiphinema* spp. nematodlarla taşınan *Arabidopsis mosaic virus* (ArMV) ve *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV); *Longidorus* spp. ile taşınan *Raspberry ringspot virus* (RpRSV) ve *Tomato black ring virus* (TBRV) ABD'de yapılan çalışmalarda ise bu bitki grubunun en önemli virüsleri *X. americanum* nematodu ile taşınan *Tomato ringspot virus* (ToRSV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), ve *Cherry rasp leaf virus* (CRLV)'dur (Martin, 2002). Nepovirüslerin neden olduğu genel hastalık görünümü ise bitkilerde zayıflama görünümüleri, yaprak beneklenmesi ve deformasyonları ile meyvelerde dağılmadır (Ellis ve ark., 1991). Nematodla taşınan virüslerde hastalığın yayılması sıra aralarına göre sıra üzeri boyunca çok daha hızlı olmaktadır (Jones ve ark., 1998).

Afidlerle taşınan virüslerin neden olduğu en önemli hastalık “Ahududu mozaik hastalığı”dır ve bu hastalığa ABD'de *Black raspberry necrosis virus* (BRNV) ve *Rubus yellow net virus* (RYNV) birlikte neden olurken (Stace-Smith, 1956) Avrupa'da RYNV ve *Raspberry leaf mottle virus* (RLMV) 'un bir kombinasyonu neden olmaktadır (Jones, 1991).

Rubus türlerinde uzun yıllardan beri saptanan bu virüslerin yanı sıra *Rubus*'ların en önemli hastalığı olarak kabul edilen “Böğürtlen Sarı Damar Hastalığı (BSDH)”na neden olan virüsler konusunda son yıllara kadar kesin bir bulgu elde edilememiştir (Khadgi, 2015). Bu hastalıkla ilişkili olarak Blackberry yellow vein-associated virus (BYVaV), blackberry chlorotic ringspot virus (BCRV), beet pseudo-yellows virus (BPYV), blackberry virus S (BIVS) ve blackberry virus Y (BVY) bildirilmiştir. *Rubus*larda görülen ikinci önemli hastalık kompleksi “Ahududu Mozaik Hastalığı (AMoH)” olup bu komplekse neden olan virüsler black raspberry necrosis virus (BRNV), raspberry leaf mottle virus (RLMV) ve rubus yellow net virus (RYNV)'dür. *Rubus* türlerinde görülen ve henüz etiyolojisi tam olarak anlaşılamamış olan diğer bir

hastalık kompleksi ise “Ahududu Meyvelerinde Ufalanma Hastalığı”dır ve bu komplekse de RBDV ve raspberry latent virus (RpLV)’un neden olduğu düşünülmektedir (Martin ve ark., 2013). Bu hastalıklara neden olan virüslerin yanı sıra Rubus türlerinde rubus yellow net virus (RYNV), raspberry leaf mottle virus (RLMV) ve strawberry necrotic shock virus (SNSV) gibi virüslerin de varlığı bildirilmiş olup bu virüslerle ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Rubus türlerinde virüs hastalıklarının kontrol edilebilmesi için virüs biyolojisinin iyi bilinmesi gerekmektedir. RBDV polenle taşınan bir virüs olduğu için yayılmasında bal arılarının önemli rol oynadığı düşünülmektedir. RLMV ve RpLV afidlerle taşınmaktadır. RLMV semi-persistent olarak taşınırken (Stace-Smith., 1987), RpLV yaklaşık 24 saatte afidin bünyesine alınmakta ve yine 24 saat içinde sağlıklı bitkilere aktarılabilmeyle birlikte bazı durumlarda virüs afidin bünyesine alındıktan sonra 6 gün kadar latent bir dönem geçirebilmektedir (Quito ve ark., 2012). Virüsün bu özelliği nedeniyle RpLV açık alanlarda daha az yaygınlıkta görülmekte ve kontrol stratejilerinin geliştirilmesinde öncelikli bir virüs olarak değerlendirilmemektedir (Martin ve ark., 2013).

Mavi yemiş bitkilerinde görülen virüs hastalıkları *Rubus* türlerine göre daha az karmaşıktır. Bu bitkide görülen virüslerin bir kısmı geniş konukçu dizisine sahip olan arabis mosaic virus (ArMV), strawberry latent ringspot virus (SLRSV), tobacco ringspot virus (TRSV) ve tomato ringspot virus (ToRSV) gibi virüslerken bir kısmı sadece *Vaccinium* türlerinde görülen ve konukçusunun adı ile anılan virüslerdir. İkinci gruba giren en önemli virüsler; blueberry leaf mottle virus (BLMV), blueberry scorch virus (BIScV), blueberry shock virus (BIShV), blueberry shoestring virus (BSSV), blueberry red ringspot virus (BRRV) ve blueberry mosaic virus (BMV)’dür. Mavi yemiş bitkisinde görülen en önemli virus hastalığı BRRV ile ilişkili olan “Kırmızı halkalı leke hastalığıdır 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 (ABD, Çek Cumhuriyeti ve Polonya) tam genom sekansı yayınlanmış ve aminoasit sekanslarında yüksek derecede homoloji (%98) saptanmıştır. Bu durum üç ülkede tanımlanan

izolatların orijinlerinin aynı oldukları fikrini güçlendirmektedir (Kalinowska ve ark., 2012). B1MaV yapraklarda mozaik şeklinde açık yeşil, sarı veya pembemsi lekeler oluşturur. Meyve verim ve kalitesini etkileyen bu virüsün taşınma şekli bilinmemektedir (Caruso ve Ramsdell., 1995).

B1ScV ve B1ShV benzer symptom oluşturan virüslerdir. B1ScV ilkbaharda genç sürgünlerde geriye doğru ölüm ve çiçeklerde yanıklığa neden olur ve bakteriyel kanser görünümü ile karıştırılabilir. B1ShV’de ilk enfeksiyonu izleyen ilkbahar aylarında bitk enfekteli olduğu halde symptom göstermeyebilir. Her iki virus de bazı çeşitlerde latenttir (Ramsdell, 1987). BSSV afidle taşınan bir virüştür ve en belirgin symptomları gövdede ve çiçeklenme döneminde çiçek petal yapraklarında uzun kırmızı çizgiler, yapraklarda kıvrılma ve verimde azalmadır.

Ülkemizde gerek *Rubus* gerekse *Vaccinum* türlerinde virus hastalıkları ile ilgili çok az çalışma yapılmıştır. Ülkemizde bu konuda yapılan bir çalışmada Doğu Akdeniz bölgesinde sınırlı sayıda böğürtlenlerin yabani ve kültür formları ile kırmızı ahududular biyolojik ve serolojik yöntemlerle testlenmiş ve *Rubus* türlerinde sadece ToRSV’ün varlığı bildirilmiştir (Dolunay ve Sertkaya, 2011; Sertkaya ve ark., 2011). Bu konuda yapılan en kapsamlı çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenen 213O042 nolu Türkiye-Slovenya İkili İşbirliği projesi ile yapılmış ve ülkemizde gerek yabani populasyon gerekse ticari yetiştiricilik açısından böğürtlen, ahududu ve mavi yemiş yetişen önemli illerde (Hatay, Adana, Mersin, Kahramanmaraş, Bursa, Trabzon, Rize ve Artvin) survey çalışmaları yürütülmüş ve bu çalışmalar sonucunda toplanan örnekler RBDV, ArMV, SLRSV, ToRSV, TRSV, RLMV, RYNV, RLBV, BRRV, B1MaV, BLMoV, B1ScV ve B1ShV’lerinin ELISA ve/veya 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 *Rubus* plantasyonlarında en yaygın virüsün RBDV, maviyemişlerde ise B1MaV olduğu saptanmıştır (Çağlayan ve ark., 2015).

Bu çalışmada *Rubus* türlerinde henüz etiyolojisi bilinmeyen hastalıklardan sorumlu olduğu bildirilen BYVaV, BCRV, BRNV, RLMV, SNSV’nin ülkemizdeki *Rubus* plantasyonlarda bulunma durumu RT-PCR yöntemiyle ilk kez araştırılmış ayrıca aynı örnekler daha önceki çalışmalarla varlığı bildirilmiş olan ancak RT-PCR analizleri ile teyit edilmemiş olan ToRSV açısından da moleküler olarak testlenmiştir.

Maviyemişlerde ise yeni giriş yapan ve ülkemizde hiç araştırılmamış olan BBLV, BSSV ve BFDAV'nin gerek Karadeniz gerekse Marmara Bölgesi'nden toplanan örneklerde bulunma durumu RT-PCR yöntemiyle araştırılmıştır.

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 birçok virüs ile polenle taşınan 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. Rubus cinsine ait bitkileri enfekte eden virüsler başlıca üç yolla taşınmaktadır: polen, nematod ve afidler. Polen yoluyla taşınan en önemli virüsler RBDV ve TSV olup en yaygın olan RBDV'dir (Martin, 2002). Bu virüs böğürtlen yanında kırmızı ve siyah ahududuları ve bazı hibrit üzüksü meyveleri de enfekte edebilmekte, bitkilerde bodurlaşma, yapraklarda sararma, meyvelerde dağılma (crumbly fruit) gibi simptomların yanı sıra bazı koşullarda hiçbir belirti vermeden de enfeksiyon yapabilmektedir (latent simptom) (Jones ve ark., 1982). Özellikle bu hastalığın meyve simptomu diğer nepovirüs belirtileri ve genetik anormalliklerle de karıştırılabilmektedir. RBDV'nin afidle taşınan bir virüs olan BRNV ile birlikte bulunması durumunda "çalımsı cücelik" görünümüne neden olduğu bildirilmiştir (Martin, 2002). Bu hastalık nedeniyle verimde %40'lara varan azalmalar olabilmektedir (Strikve Martin, 2002). RBDV çok hızlı yayılan bir virüsdür 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 ırkıdan farklı olup siyah ahududu çeşitlerinde görülmektedir (Barbara ve ark., 1984).

Avrupa'da Rubus türlerinde nematodla taşınan 4 virüs bulunmaktadır: *Xiphinema* spp. nematodlarla taşınan arabis mosaic virus (ArMV) ve strawberry latent ringspot virus (SLRSV); *Longidorus* spp. ile taşınan raspberry ringspot virus (RpRSV) ve tomato black ring virus (TBRV), ABD'de yapılan çalışmalarda ise bu bitki grubunun en önemli virüsleri *X. amafricanum* nematodu ile taşınan tomato ringspot virus (ToRSV), tobacco ringspot virus (TRSV), ve cherry rasp leaf virus (CRLV)'dur (Martin, 2002). Nepovirüslerin neden olduğu genel hastalık görünümüleri ise bitkilerde zayıflama görünümüleri, yaprak beneklenmesi ve deformasyonları ile meyvelerde

dağılıma ve ufalanma görünümleridir (Ellis ve ark., 1991). Nematodla taşınan virüslerde hastalığın yayılması sıra aralarına göre sıra üzeri boyunca çok daha hızlı olmaktadır (Jones ve ark., 1998).

Afidlerle taşınan virüslerin neden olduğu en önemli hastalık “Ahududu mozaik hastalığı”dır ve bu hastalığa BRNV ve RYNV birlikte neden olurken (Stace-Smith, 1956) Avrupa’da RYNV ve RLMV’un bir kombinasyonu neden olmaktadır (Jones, 1991). Bu hastalığa neden olan virüsler *Amphorophora* cinsine ait afid türleri ile taşınır. Mozaik simptomları BRNV+RLSV virüslerinin RYNV+RLMV virüsleri ile kombinasyonu sonucu daha da şiddetli olarak ortaya çıkar. RLMV ve RLSV’nin tek başlarına enfeksiyon yapma durumlarında ise şiddetli klorotik lekeler, yaprak deformasyonları ve bodurlaşma belirtileri görülür (Martin, 2002). Ahududu mozaik hastalık kompleksine neden olan bu dört virüsü birbirinden ayırt etmek için indikatör bitkilere aşılama veya afidler yoluyla taşıma denemelerinin kurulması gerekir (Converse, 1987; Ellis ve ark., 1991). RLCV) *Aphis rubicola* ile taşınan ve sadece A.B.D’ de rapor edilmiş bir virüstür. Enfekteli bitkilerde bodurlaşma, kış donlarına duyarlılık, yapraklarda kıvrılma, meyve verim ve kalitesinde azalma ortaya çıkmaktadır (Stace-Smith ve Converse., 1987). Raspberry vein chlorosis virüs (RVCV), *A. ideai* türü afidlerle taşınan ve Avrupa’da yaygın olan bir virüstür. En belirgin simptomsu yan damarlarda görülen sararmalardır. Afidle taşınan virüslerden cucumber mozaic virus da *Rubus* türlerinde saptanmış olmasına karşın yaygın değildir ve önemli zarara yol açmaz (Jones, 1987).

RYNV, *Caulimoviridae* familyasına ait *Badnavirüs* cinsinin bir üyesidir ve sadece *Rubus* türlerinde saptanmıştır. Bu virüs yaprak bitleri veya aşılama ile taşınmaktadır (Jones, ve ark. 1975). Bu virüs bir DNA virüsü olup tüm kırmızı ahududu ve muhtemelen tüm böğürtlen çeşitlerinde hastalık oluşturmaktadır. RYNV bazı durumlarda hiç belirti oluşturmazken bazen de yaprak damarlarında sararmalar oluşturmaktadır (Stace Smith, 1987).

RpRSV, ilk önce 1950’lerde ahududularda yaprak kıvrılma etmeni olarak tanımlanmıştır. Bu virüs Avrupa’da tespit edilmiş ve en az 14 dikotiledon ve monokotiledon bitki türlerinde enfeksiyon yaptığı bildirilmiştir (Murant, 1978) RpRSV, Nepovirus cinsinin A alt grubuna aittir ve *Longidorus* cinsine ait nematodlarla taşınmaktadır (Ebel ve ark., 2003). *Paratrichodorus* ve *Xiphinema* cinslerinin üyeleri

tarafından da taşındığına dair raporlar bulunmaktadır (Trudgill ve ark., 1983). Bazı Kırmızı ahududu çeşitlerinin RpRSV'ye dirençli olduğu bildirilmiştir (Stace-Smith, 1987).

BRNV, *Sadwavirus* cinsine ait bir virüstür (Sabanadzovic ve ark., 2008). BRNV, ilk olarak 1955'te tanımlanmış (Stace-Smith, 1955) ve siyah ahududu bitkilerinde uç bölgelerde nekrozlara neden olduğu ve yaprak bitleriyle taşındığı bildirilmiştir (Jones ve Wood., 1979). BRNV, kırmızı ahududu (*R. idaeus*), herdem yeşil böğürtlen (*R. laciniatus*) ve 'Marion' böğürtlen çeşidinde (*R. idaeus*, *R. armeniacus* ve *R. armeniacus*' la kompleks bir melez) gözlenmiş ancak belirgin bir semptom oluşturmadığı bildirilmiştir.

RLMV ve RLSV İngiltere'de "Raspberry mozaik hastalığı"nın etmenleri olarak bildirilmiş ve yapraklarda klorotik lekeler ve kıvrımlara neden oldukları gözlenmiştir (Murant, 1974). Son yıllarda ahududularda yeni bir virüs tanımlanmış ve geçici olarak *Closterovirus* cinsine dahil edilen bu virüs raspberry mottle virus (RMoV) olarak adlandırılmıştır (Tzanetakos ve ark., 2007). İngiltere'de RLMV veya RLSV ile enfekte olmuş veya RMD belirtileri gösteren bitkilerin ileri moleküler analizleri sonucunda RLSV, RLMV ve RMoV'nin aynı virüse ait izolatlar olduğu ve birlikte RLMV olarak adlandırılması gerektiği bildirilmiştir (McGavin ve MacFarlane., 2010).

RLBV, *Emaravirus* cinsinin yeni bir üyesidir ve son yıllarda İskoçya ve Sırbistan'da açık alanda yetiştirilen kırmızı ahududularda yaygın olarak saptanmıştır (McGavin ve ark., 2012). Emaravirüsler, iplik benzeri ribonükleoprotein kompleksleri oluşturan çoklu negatif iplikçikli genomik RNA'lara sahiptir ve konak hücredeki membranımsı yapılardır (Jones, A. T ve ark., 1984). Virüs genomunun detaylı incelenmesi sonucunda BLRV'nin 5 RNA'sı olduğu bildirilmekle birlikte son yıllarda en az 8 RNA'nın varlığı bildirilmiştir (Lu ve ark.,2015).

Raspberry vein chlorosis virus (RVCV), basiliform (kurşun-şekilli) virüs parçacıklarına sahip olan ve negatif iplikçikli bir RNA genomu içeren bir rabdovirüsüdür. Son yıllarda RVCV RNA'sının kısmi dizilemesi yapılmış ve bitkilerde virüs tespitine yönelik RT-PCR analizleri geliştirilmiştir (McGavin ve ark., 2011). Virüsün neden olduğu en yaygın belirtiler yaprak damarlarında görülen klorozlardır (Brich, A. N. E ve ark., 2002). RVCV, küçük ahududu yaprak biti (*Aphis idaei*) ile

taşınmakta ancak RMD ile ilişkili virüslerin vektörü olan büyük ahududu yaprak biti (*Amphorophora idaei*) tarafından taşınmamaktadır.

Mavi yemiş bitkilerinde görülen virüslerin bir kısmı geniş konukçu dizisine sahip olan arabis mosaic virus (ArMV), strawberry latent ringspot virus (SLRSV), tobacco ringspot virus (TRSV) ve tomato ringspot virus (ToRSV) gibi virüslerken bir kısmı ise sadece *Vaccinium* türlerinde görülen ve konukçusunun adı ile anılan blueberry leaf mottle virus (BLMV), blueberry scorch virus (BIScV), blueberry shock virus (BIShV), blueberry shoestring virus (BSSV), blueberry red ringspot virus (BRRV) ve blueberry mosaic associated virus (BIMaV)'dür. Mavi yemiş bitkisinde görülen en önemli virus hastalığı BRRV ile ilişkili olan "Kırmızı halkalı leke" 'dir ve bu hastalık ABD (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 olgulaşma ile birlikte kaybolur (Ramsdel ve ark., 1987). Bu virüsün üç izolatının (ABD, 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). BIMaV yapraklarda mozaik şeklinde açık yeşil, sarı veya pembemsi lekeler oluşturur. Meyve verim ve kalitesini etkileyen bu virüsün taşınma şekli bilinmemektedir (Caruso ve Ramsdell., 1995).

BIScV ve BIShV benzer symptom oluşturan virüslerdir. BIScV ilkbaharda genç sürgünlerde geriye doğru ölüm ve çiçeklerde yanıklığa neden olur ve bakteriyel kanser görünümü ile karıştırılabilir. BIShV'de ilk enfeksiyonu izleyen ilkbahar aylarında bitk enfekteli olduğu halde symptom göstermeyebilir. Her iki virus de bazı çeşitlerde latenttir (Ramsdell, 1987). BSSV afidle taşınan bir virüstür ve en belirgin simptomsu gövdede ve çiçeklenme döneminde çiçek petal yapraklarında uzun kırmızı çizgiler, yapraklarda kıvrılma ve verimde azalmadır.

Vaccinium virüslerinden son yıllarda yeni tespit edilen bazı virüsler vardır ve bunlardan blueberry necrotic ring blotch virus (BNRBV) ve blueberry latent virus (BBLV) sadece ABD'de tespit edilirken (Martin ve ark., 2011), blueberry latent spherical virus (BLSV) Japonya'dan bildirilmiştir. (Isogai ve ark., 2012). BRNBV

yaprak ve meyvelerde nekrotik halkalalı lekelere neden olan bir virüstür. Bu virüsün genom organizasyonu incelendiğinde yeni bir cins içine dahil olabileceği bildirilmektedir (Martin ve Tzenatakis., 2017). BBLV, dsRNA virüsü olup yeni bir cinse ait olduğu düşünülmektedir. Yüksek oranda tohumla taşınmaktadır. ABD’de *Vaccinium* ekim alanlarının yaklaşık %50si bu virüsle bulaşık olarak tespit edilmiştir (Tzenatakis ve Martin., 2017). BLSV ise izometrik şekilli ve *Nepovirus* cinsine dahil edilen bir virüsdür. Şu ana değin sadece varlığı Japonya’dan bildirilmiştir (Isogai ve ark., 2012).

Ülkemizde *Rubus* spp. ‘de virus hastalıkları ile ilgili çok az çalışma yapılmış, mavi yemişlerde ise herhangi bir virus taraması yapılmamıştır. Doğu Akdeniz Bölgesinde yürütülen bir çalışmada sınırlı sayıda örnekte böğürtlenlerin yabani ve kültür formları ile kırmızı ahududularda biyolojik ve serolojik yöntemlerle sadece Tomato ringspot virus bildirilmiştir (Dolunay ve Sertkaya., 2011; Sertkaya ve ark., 2011). *Rubus* ve Maviyemiş bitkilerindeki virüslerin moleküler yöntemlerle testlenmesi ilk kez TÜBİTAK 2130042 nolu proje kapsamında yapılmış ve *Rubus* örneklerinin DAS-ELISA ile testlenmesi sonucunda testlenen toplam 454 örneğin 30 tanesinde RBDV, 14 tanesinde SLRSV, 8 tanesinde TRSV ve 4 tanesinde de ToRSV saptanmıştır. RT-PCR analizlerinde ise *Rubus* örneklerinde toplam 52 bitkide RBDV saptanırken diğer virüslerin varlığı kanıtlanamamıştır. *Vaccinium* türlerinde ise testlenen virüslerin hiç birisi DAS-ELISA ile saptanamazken RT-PCR analizleri ile testlenen 157 örneğin 23’ünde blueberry mosaic associated virus tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışma ile dünyada ilk kez kirazlarda RBDV, *Ranunculus* spp.’de ise B1MaV tespit edilmiştir. *Rubus*larda en yaygın olarak bulunan RBDV ’nin filogenetik analizleri sonucunda Türk RBDV izolatları iki ana grupta kümelenmiştir. Her iki grupta yer alan izolatlar en yüksek homolojiyi Slovenya izolatlarıyla göstermiştir. B1MaV filogenetik analizleri ise Türk B1MaV izolatlarının kendi içinde büyük benzerlik gösterdiğini ancak diğer bütün ülkelere ait izolatlardan oldukça farklı olduğunu ortaya çıkarmıştır (Çağlayan ve ark., 2015,2016, 2017 (a) ve (b); Gazel ve ark., 2015; Elçi ve ark., 2015).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Arazi Çalışmaları ve Örnekleme

Bu çalışma kapsamında ülkemizde Hatay, Adana, Mersin, Kahramanmaraş, Bursa, Trabzon, Rize, Artvin ve Giresun illerinde böğürtlen, ahududu ve mavi yemiş yetişen alanlarda ilkbahar mevsiminde virus hastalıkları surveyi yapılmıştır. Survey çalışmalarında her ildeki damızlık parseller, fidanlıklar, ticari bahçeler ve doğal bitki popülasyonları ziyaret edilerek tipik semptom gösteren bitkilerin yanı sıra latent enfeksiyonlar için semptomsuz bitkilerden de örnek alınmıştır. Semptomlar kaydedilerek her bir bitkinin farklı yerinden 10-15 cm uzunluğunda sürgün örnekleri alınarak uygun koşullarda laboratuvara getirilmiş ve testleninceye kadar +4 °C’de saklanmıştır. Örnekler kayıt altına alınarak semptomolojik açıdan karakteristik olanlar numaralandırılarak fotoğraflanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Moleküler Çalışmalar

3.2.1.1. *Rubus* sp. Ve *Vaccinium* sp. Örneklerinden Nükleik Asit (NA) İzolasyonu

Rubus ve *Vaccinium* bahçelerinden toplanan örneklerden RNA izolasyonu için Qiagen RNeasy plant mini kiti ve Silica RNA protokolü kullanılmıştır. Qiagen RNA ekstraksiyon kiti firma önerisine göre ve MacKenzie ve ark (1997)’nin önerdiği modifiye yöntemine göre kullanılmıştır. Silica RNA protokolü Rott ve Jelkmann (2001)’e göre yapılmıştır. NA izolasyonlarında ilkbahar döneminde alınan yapraklar kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak, Dr. Tzenatakis-Arkansas Üniversitesi, ABD’nden getirilen cDNA (komplementer deoksiribonükleik asit) lar kullanılmıştır. Her bir bitki materyalinden 0,5 gr örnek sıvı azot içinde ezildikten sonra izole edilen RNA’lar PCR çalışmalarında kullanılmaya kadar -80 °C’de saklanmıştır.

3.2.1.1.1. Qiagen RNA Ekstraksiyon Kiti ile modifiye MacKenzie yöntemiyle RNA İzolasyonu

- Örnekler sıvı azot ile ezildikten sonra ezilen dokudan 0,5 g alınıp Mackenzie ekstraksiyon tampon çözeltisi eklenerek, ezilmiş ve örnekler 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı.
- Bu örneklerin üzerine 150 µl %20'lik sarkozyl eklendi ve hafifçe karıştırıldı.
- 70°C'de 10 dk ara ara karıştırılarak inkübe edildi.
- 14.000 rpm' de 5 dk santrifüj yapıldı.
- Sıvı kısım pellet hareket ettirilmeden 2 µl'lik toplama tüpüne yerleştirildi Q/Ashredder mor renkli spin kolon'a alınmıştır.
- Tüpler 14.000 rpm'de 2 dk santrifüjlenmiştir.
- Sıvı kısım ependorf tüplere alınarak üzerine 0,5 hacim %96'lık alkol eklendi ve pipetle karıştırılmıştır.
- Karışımdan 650 µl alınarak RNeasy mini spin kolona (pembe renkli) alınmıştır.
- 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. 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 yapılarak sıvı kısım atıldı.
- RNeasy mini spin kolonlar yeni tüplere yerleştirilerek üzerine 500 µl RPE buffer eklenmiş ve tüpler 10.000 2 dk santrifüj yapıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı.
- Kolona 40 µl RNase ari su eklenerek 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve RNA -80 °C'de saklandı.

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

- 50 mg bitki dokusu üzerine 1000 µl silica ekstraksiyon buffer içerisine 1 µl B-Mercaptoethanol eklenir, iyice karıştırılır ve ependorfa alınır.
- Santrifüj yapılmadan 600 µl sıvı fazdan çekilerek yeni ependorf tüpe konuldu. Ama tüpün içine 600 µl 5.8 molarlık potasyum asetat eklenir. Tüpler ters- düz edilir ve 13.000 rpm' de 15 dk santrifüj edildi.

- Üstteki sıvı fazdan 750 µl alınarak yeni bir tüpe konular üzerine 750 µl % 100 isopropanol eklendi. – 20 °C’de en az yarım saat bekletildi daha sonra 13.000 rpm’ de 30 dk santrifüj yapıldı.
- Sıvı faz atılır, pellet üzerine 500 µl yıkama solüsyonu eklendi. Vortexlendi ve pellet çözündürülür. Daha sonra üzerine 20 µl silica eklendi ve 10.000 rpm’ de 1 dk santrifüj yapıldı.
- Sıvı faz atılır. Pellet 500 µl wash buffer ile yıkandı ve çözündürüldü.
- 13.000 rpm’ de 1 dk santrifüj yapılır, sıvı faz atılır pellet oda sıcaklığında iyice kurutuldu. (Alkol kokusu kalmayana kadar)
- Pelletin üzerine 150 µl TE buffer eklenir ve pellet çözündürülür. Oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
- 13.000 rpm’de 2 dk santrifüj yapılır. 100 µl sıvı faz alınır. Alınan sıvı fazın üzerine 8 µl sodium asetat ve 200 µl % 100 ethanol eklendi.
- 20 ° C’ de 30 dk inkübe edilir. Santrifüj 10 dk +4 °C’ de 12. 000 rpm’ de santrifüj edildi. Sonra sıvı faz atıldı.
- Pellet üzerine 200 µl % 70’ lik ethanol eklenip. – 20 °C’de 30 dk inkübe edildi.
- Vortexlenir ve + 4 °C’ de 3 dk 12. 000 rpm’ de santrifüj yapıldı ve sıvı faz atıldı (bu aşama 2 defa tekrarlanır).
- Pellete dokunmadan sıvı faz atıldı. Pellet 20 dk oda sıcaklığında kurutuldu(alkol kokusu kalmayana kadar).
- Pellet 80 µl TE buffer ile çözündürüldü.
- Elde edilen RNA’ ların konsatrasyonları ölçülür moleküler analizlerde kullanmak için -80 °C’de saklanmıştır.

3.2.1.1.3. RNA kalitesini arttırmak için DNaz uygulaması

İzolasyonu sonucunda elde edilen RNA’ların kalitesini arttırmak amacıyla bazı örneklerde DNaz uygulaması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla her bir örnek için 1µg total nükleik asit, 1µl 10x reaksiyon buffer, 1 µl DNaz I eklendikten sonra DEPC-uygulanmış su ile 9 µl’ye tamamlanmıştır. Tüpler 37 °C’ de 30 dk inkübe edildikten sonra üzerlerine 1 µl 25 mM EDTA eklenmiş ve 65 °C’ de 10 dk inkübe edilmiştir. Elde edilen DNaz uygulanmış RNA’ların nanodrop spektrofotometre ile ölçümleri yapılarak

RNA kaliteleri ve konsantrasyonları belirlenmiştir. Daha sonra DNAz uygulanmış olan RNA'lerden cDNA yapılarak PCR işlemine tabi tutulmuştur.

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'lerden cDNA elde edilmiştir. cDNA için 2 farklı yöntem kullanılmıştır. İlk yöntem olarak Arkansas üniversitesinde uygulanan yöntem kullanılmıştır (Tzenatakis, kişisel görüşme). 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.

2. yöntem olarak 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 tüp içine 5xRT tamponundan (Fermatas) 4 µl, d₂H₂O 2 µl, dNTP (10 mM) 0,5 µl ve RT enziminden 1 µl eklenmiştir. Tüpler PCR cihazında 42 °C' de 1 saat 72 °C' de 10 dakika tutularak cDNA aşaması tamamlanmıştır.

3.2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bu çalışma kapsamında *Rubus* ve *Vaccinium* spp. örneklerinin testlendiği Strawberry necrotic shock virüs (SNSV), Blackberry chlorotic ringspot virüs (BCRV), Blackraspberry necrosis virüs (BRNV), Blackberry yellow vein associated virüs (BYVaV), raspberry leaf mottle virüs (RLMV), tomato ringspot virüs (ToRSV), Blueberry latent virüs (BBLV), Blueberry fruit drop associated virüs (BFDaV), Blueberry shoe string virüs (BSSV) için kullanılan primer baz dizileri. Çizelge 3.1'de verilmiştir. BSSV, BCRV, BRNV, BYVaV, SNSV, BFDaV, BBLV ve ToRSV'nin PCR koşulları tamamen aynı olduğu için ortak döngüler kullanılmış, RLMV, BBLV ve

BFDaV için ise PCR koşulları farklı olduğu için bu virüsler ayrı ayrı PCR analizine tabii tutulmuştur.

Çizelge 3.1. *Rubus* ve *Vaccinium* spp. örneklerinin testlendiği virüsler ve PCR analizlerinde kullanılan primer çiftlerinin nükleotid dizilimleri ve baz büyüklükleri

VİRÜS	PRİMER ADI	PRİMER DİZİLİMİ	UZUNLUK (bp)	REFERANS
SNSV	uni-F	AACAACCTCCAATGGTT GCCCAACT	372	Thekke-Vetil ve ark. 2016
	uni-R	ACCAAATGTCCCATCG GACACGGCA		
BCRV	F	ACCTGCTGATCAGCT WTCAGAGAA	401	Tzanetakıs ve ark. 2006
	R	TAGAACATCGACCCA AAGGT		
BRNV	2F	CAATGTCTTGGGAAGCC AC	350	Halgren ve ark.. 2007
	2R	AGCATGGTTCGTCATC TG		
BYVaV	4736-F	TTGAAAGGAAACTTC ACGGA	301	Tzanetakıs ve ark. 2013
	5039-R	TAAGTTCATACGTTTC CTGCG		
RLMV	F	CGAAACTTYTACGGG GAAC	452	(Tzanetakıs ve ark., 2007).
	R	CCTTTGAAYTCTTTAA CATCGT		
ToRSV	F	CCGTTAGCAGCTTCCA AAAG	493	RobertR. Martin ve ark. 2009
	R	GTCCTCATGGAACCTT TCTC		
BBLV	FD2-F	CTGAGGCGGTGAAGC ATTATAG	1300	Tzanetakıs ve ark. 2004
	FD2-R	CCGTCTGTATGCTCCT AACAA		
BFDaV	F	GACAACAGCATCTAC ATCTCTGC	395	Diaz ve Martin, 2016
	R	GGTCGTTCTACCACGT TTCTG		
BSSV	F	ATGGGATTGTCGGTTG CC	387	Tzanetakıs ve ark., yayınlanmamış veriler
	R	CACCAATCAGATCCA ATGAG		

SNSV, BCRV, BNRV, BYVaV, BSSV, BFDaV, BBLV, RLMV ve ToRSV' lerin PCR analizleri

SNSV, BCRV, BNRV, BYVaV, ToRSV, BFDaV, BBLV, RLMV, BSSV' lerinin PCR analizlerinde her bir virüse spesifik primerler kullanılarak PCR karışımı, 16,8 µl d₂H₂O, 2,5 µl 10XB, 2µl dNTP (2,5 mM), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), virüse özgü 1 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl), 0,2 µl Taq-DNA polymerase ve 2 µl cDNA olacak şekilde hazırlanmıştır. SNSV, BCRV, BNRV, BYVaV, ToRSV, BSSV primerlerin hedef DNA' ya bağlanma (annealing) ve uzama(extension) süre ve sıcaklıkları ise döngüleri ortak olup PCR cihazı 1 döngü 94 °C'de 2 dakika; 35 döngü 94 °C'de 20 saniye, 55°C'de 20 saniye, 72 °C'de 30 saniye ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika olarak programlanmıştır. BFDaV, BBLV, RLMV primerlerin hedef DNA' ya bağlanma (annealing) ve uzama (extension) süre ve sıcaklıkları ise döngüleri farklı olup BFDaV primeri için 1 döngü 94 °C'de 2 dakika; 35 döngü 94 °C'de 20 saniye, 53 °C'de 40 saniye, 72 °C'de 40 saniye ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika olacak şekilde programlanmıştır. BBLV primeri için PCR koşulları; 1 döngü 94 °C'de 2 dakika; 35 döngü 94 °C'de 20 saniye, 55 °C'de 20 saniye, 72 °C'de 1 dakika 30 saniye ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika olacak şekilde programlanmıştır. RLMV primeri için 1 döngü 94 °C'de 2 dakika; 35 döngü 94 °C'de 20 saniye, 58°C'de 20 saniye, 72 °C'de 30 saniye ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika şeklinde programlanmıştır.

3.2.2.3. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Jel Elektrophorez

RT-PCR ve PCR ürünlerinin görüntülenmesi için %1'lik Agaroz jel elektrophorez işlemi yapılmıştır. 1 gr Agaroz, 100 ml 1x TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu içerisinde mikrodalga fırında çözündürülüp tarak yerleştirilmişve jel tepsisine düz bir zemin üzerinde dökülerek agarozun polimerizasyonu için 20 dk süre ile bekletilmiştir. Jelin polimerizasyonundan sonra tarak dikkatli bir şekilde alınıp jel elektrophorez tankına yerleştirilmiştir. 1xTAE tamponu tankın içersine jeli kapatacak şekilde döküldükten sonra jel çukurlarına DNA marker ile beraber PCR ürünleri jel çukurlarına yüklenmiştir. Yükleme tamamlandıktan sonra elektrophorez güç kaynağı ile elektrophorez tankına 150 V'luk elektrik akımı 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 ışıktaki 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.

3.2.2.4 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 Hatay ilinden 38, Bursa'dan 95, Mersin'den 40, Kahramanmaraş' tan 20 olmak üzere toplam 193 *Rubus spp.* örneği ile Karadeniz bölgesinden 102, Bursa ilinden 20 olmak üzere toplam 122 maviyemiş (*Vaccinium spp.*) örneği toplanmıştır. Örnek toplama işlemi semptomların yoğun görüldüğü ilkbahar döneminde yapılarak alınan örnekler etiketlenip, polietilen torbalar içinde buz kutusunda laboratuvara getirilmiş ve testleninceye kadar +4°C'de saklanmıştır.

Bu çalışmada *Rubus* türlerinde gözlenen en yaygın semptomlar yapraklarda küçülme, deformasyonlar, yaprak kırışıklıkları, damar aralarında sararma ve kızarma, kıvrılma ve damar açılmaları; *Vaccinium* türlerinde ise sürgünlerde ve yapraklarda kırmızı klorotik lekeler ile gelişme geriliği olmuştur (Şekil 4. 1, 4. 2). Örnekleme yapılırken gerek virüs benzeri semptom gösteren gerekse semptomsuz *Rubus* ve *Vaccinium* bitkilerinden tesadüfi olarak örnekler alınmıştır.



Şekil 4.1. *Vaccinium* üretim alanlarında bitkilerinin sürgün ve yapraklarında gözlenen kırmızı klorotik lekeler



Şekil 4.1 (Devam). Vaccinium üretim alanlarında bitkilerinin sürgün ve yapraklarında gözlenen kırmızı klorotik lekeler

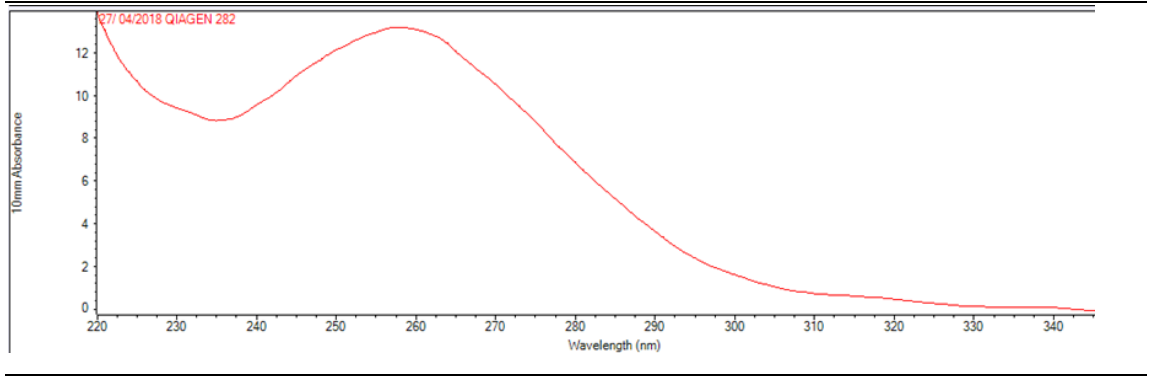


Şekil 4.2. Rubus alanlarında gözlenen virüs benzeri belirtiler A- Yapraklarda mozaik ve klorotik lekeler B, C- Yapraklarda damarlar boyunca kızarma, D- Yaprakta damar açılmaları ve klorotik lekeler

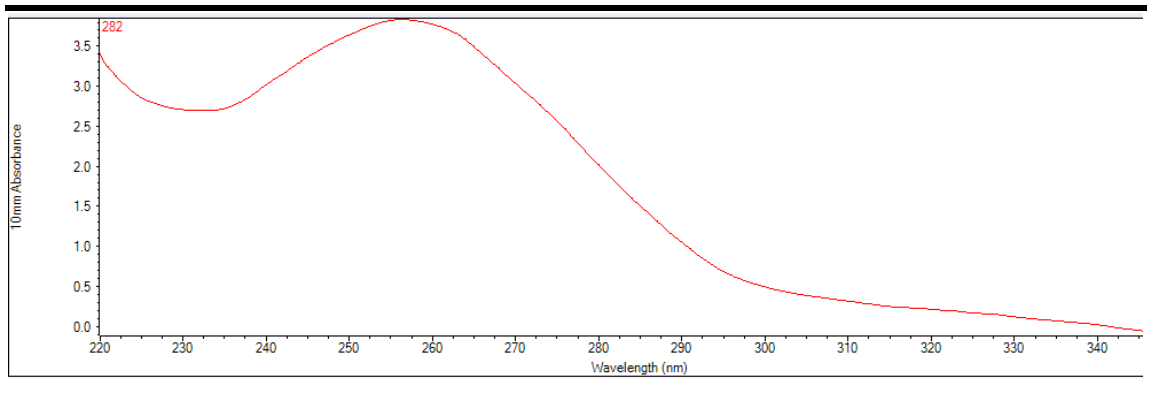
4.2. PCR Analizleri (Polymerase Chain Reaction; PCR)

4.2.1. Rubus ve Vaccinium örneklerinden RNA İzolasyonu

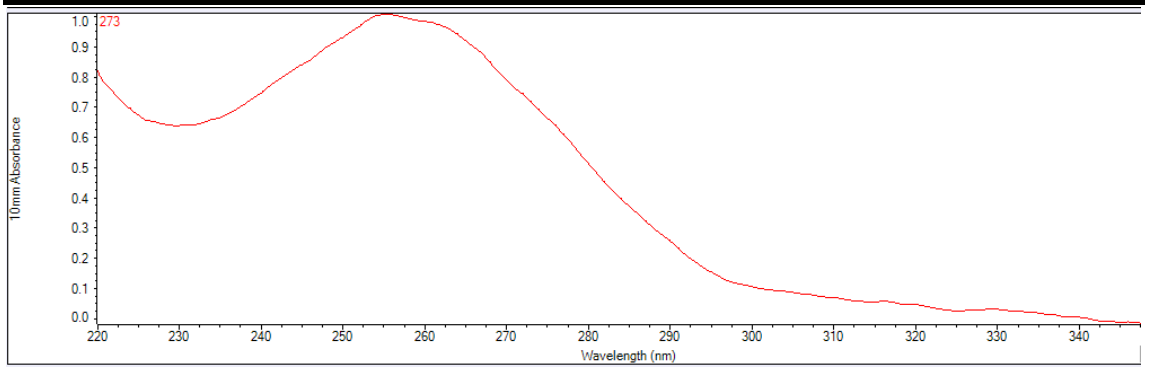
Rubus ve Vaccinium örneklerinden RNA izole etmek için Qiagen RNA kiti ve silica yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemlerle yapılan izolasyonlarda RNA kalitesini belirlemek amacıyla yapılan nanodrop spektrofotometre ölçümlerinde elde edilen RNA'ların yeterli miktarda ve kalitede olduğu saptanmıştır (Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7). Testlemelerde kullanılan bu örneklerin bazılarının nanodrop değerleri çizelge 4.1'de verilmiştir.



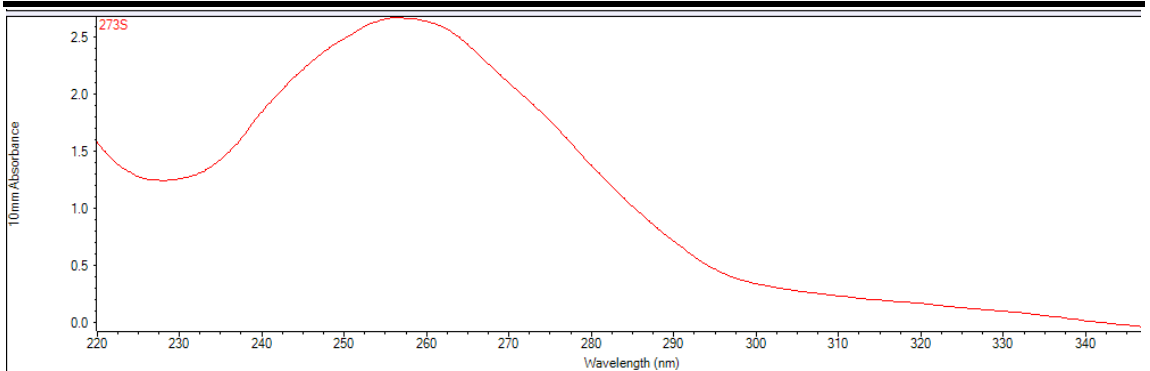
Şekil 4.3. RNeasy Qiagen ticari kit (Qiagen Sci-Almanya) kullanılarak böğürtlenlerden izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD), 282 Böğürtlen örneği



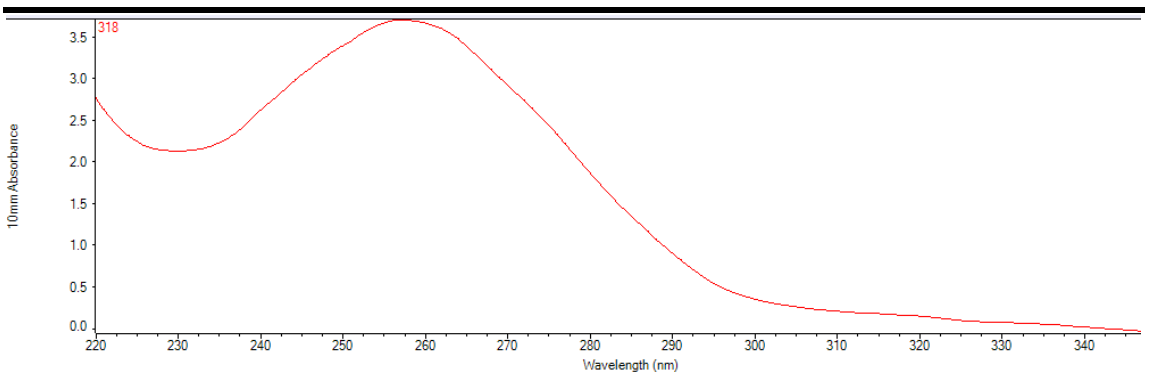
Şekil 4.4. Silica yöntemi kullanılarak böğürtlenlerden izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD), 282 Böğürtlen örneği



Şekil 4.5. Silica yöntemi kullanılarak ahududulardan izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD), 273 Ahududu örneği



Şekil 4.6. Silica yöntemi kullanılarak ahududulardan izole edilen RNA'lara Dnase uygulanmasından sonraki spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD), 273 Ahududu örneği



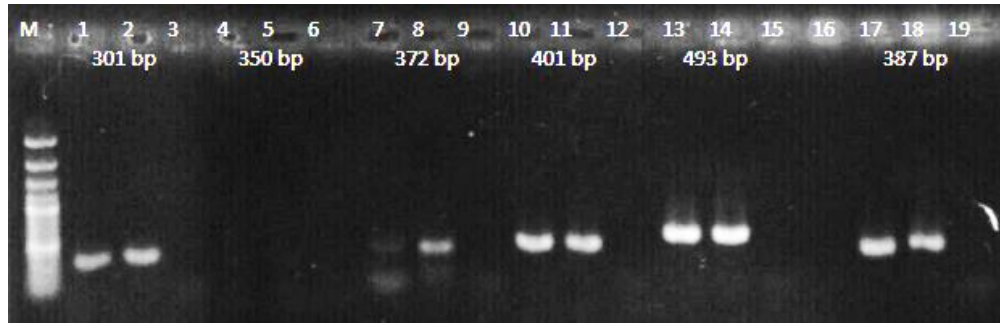
Şekil 4.7. Silica yöntemi kullanılarak mavi yemişlerden izole edilen RNA'ların spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD), 318 Maviyemiş örneği

Çizelge 4.1. Böğürtlen (282), Ahududu (273) ve Maviyemiş (318) örneklerinden ekstrakte edilen bazı RNA'ların nanodrop ölçüm değerleri.

ÖRNEK NUMARASI	KONSANTRASYON ng/ µl	260/ 280 Optical Density	260/ 230 Optical Density
282 QIAGEN	522.5	1.91	1.39
282 SİLİCA	150.8	1.88	1.40
273 SİLİCA	39.4	1.92	1.55
273 SİLİCA- DNAz	35.6	1.91	3.25
318 SİLİCA	146.3	1.97	1.73

4.2.2. RT-PCR analizleri

Bu çalışma kapsamında toplanan *Rubus* ve *Vaccinium* örneklerinden izole edilen RNA'lar RT-PCR yöntemi ile testlenmiştir. Örnekler testlenmeden önce her bir virüs için spesifik primerlerle sadece pozitif kontroller kullanılarak sistem kurma çalışmaları yapılmıştır. Sistem kurma çalışmaları esnasında Arkansas Üniversitesinden Dr. Tzanetakis'den temin edilen cDNA'lar doğrudan ve 1/4 oranında sulandırılarak testlenmişlerdir (Şekil 4.8).



Şekil 4. 8 *Rubus* ve *Vaccinium* virüslerinin pozitif kontrolleri ile optimizasyon amacıyla yapılan RT-PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); 1: BYVaV-doğrudan cDNA; 2: BYVaV,-1:4 cDNA sulandırma; 3: Su kontrol; 4: BRNV-doğrudan cDNA; 5: BRNV-1/4 cDNA sulandırma; 6: Su kontrol; 7: SNSV-doğrudan cDNA; 8: SNSV-1/4 cDNA sulandırma; 9: Su kontrol; 10: BCRV-doğrudan cDNA; 11: BCRV-1/4 cDNA sulandırma; 12: Su kontrol; 13: ToRSV-doğrudan cDNA; 14: ToRSV-1/4 cDNA sulandırma; 15-16: Su kontrol; 17: BSSV:doğrudan cDNA; 18: BSSV-1/4 cDNA sulandırma; 19: Su kontrol

Pozitif kontroller kullanılarak sistem kurma çalışmalarında BYVaV (301 bp), BRNV (350 bp), SNSV (372 bp), BCRV (401 bp), ToRSV (493 bp) ve BSSV (387 bp)' tespitlerinde hem doğrudan hemde ¼ oranında sulandırılan cDNA'lar kullanıldığında beklenen düzeyde bant elde edilmiştir. Bu çalışma kapsamında testlenen *Rubus* ve *Vaccinium* virüslerinden RLMV, BBLV ve BFDAV için Arkansas Üniversitesi'nden getirilen pozitif kontrol cDNA'ları ile yapılan optimizasyon çalışmalarında negatif sonuç alındığı için bu virüslere karşı yapılan testlemelerde pozitif kontrol kullanılamamış ve "kör testleme" yapılmıştır.

4.2.2.1. *Strawberry necrotic shock virus* (SNSV) için RT-PCR analizleri

SNSV'nin saptanması amacıyla virüsün kılıf protein genini çoğaltan SNSVuni-F/uniR primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR analizlerinde Bursa, Hatay ve Kahramanmaraş'tan toplanmış olan *Rubus* örneklerinin hiçbirinde bir amplifikasyon gözlenmezken Mersin *Rubus* örneklerinin 3 tanesinde (14, 16 ve 19) amplifikasyon meydana gelmiştir (Şekil 4. 9). SNSV virüsü için beklenen baz büyüklüğü 372 bp iken bu PCR analizi sonucunda 14, 16 ve 19 nolu örneklerde gözlenen bant seviyesinin beklenen düzeyin biraz üzerinde olduğu gözlenmiştir. Pozitif kontrollerde ise beklenen düzeyde bant elde edilmiştir . Bu virüs için pozitif kontrol olarak kullanılan cDNA'lar doğrudan ve 1/4, 1/10 oranlarında sulandırılmış ve doğrudan kullanılan cDNA ve 1/4 sulandırmalarda amplifikasyon gözlenirken 1/10 sulandırmada herhangi bir bant gözlenmemiştir. Bu durumda *Rubus* örneklerinde SNSV tespitlerinde kullanılacak cDNA'ların ya seyreltilmeden ya da en fazla 1/4 oranında seyreltilerek kullanılması önerilmektedir.



Şekil 4.9 Mersin ili *Rubus* örneklerinden izole edilen RNA'lara DNaz uygulanmadan *Strawberry necrotic shock virüs* tespiti amacıyla yapılan RT-PCR analiz sonucu. M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 1-29: Mersin *Rubus* örnekleri; W: Su kontrol; +C : Pozitif kontrol- +C1; doğrudan cDNA, +C2; 1/4 cDNA sulandırma, +C3; 1/10 cDNA sulandırma

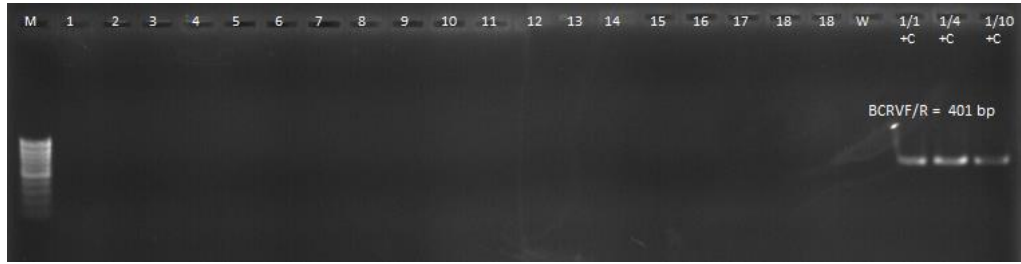
Mersin ili rubus örneklerinin üç tanesinde beklenen düzeyin biraz üzerinde amplifikasyon elde edilmesi üzerine sadece bu üç örnekten elde edilen RNA'ya DNAz uygulaması yapılmıştır. DNAz uygulanmış RNA' lardan tekrar cDNA yapılarak PCR aşaması tekrarlandığında üç örnekte de (372 bp) amplifikasyon elde edilmiştir (Şekil 4.10). Şekil 4.9'da amplifikasyon elde edilen 14, 16, 19 nolu örnekler, sırasıyla Şekil 4.10'daki 176, 178, 234 nolu örnekler ile aynıdır. RT-PCR analizlerinde virüs RNA'sı yanında bitki kaynaklı ribozomal veya diğer RNA'larında hatalı olarak amplifiye olabileceğini ve DNAz uygulaması ile bu sorunun üstesinden gelinebileceği başka araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da bildirilmiştir (Siebert ve ark. 1993). Beklenen düzeyde amplifikasyon elde edilen üç örnekte en iyi çoğalma gösteren 2 Rubus örneği sekans analizlerine gönderilmiş fakat gelen DNA dizilerinde Blast analizleri yapıldığında virüs genomuna yönelik bir sekansa rastlanmamıştır. Pozitif kontrollerle aynı düzeyde amplifikasyon elde edilmesine karşın sekans analizleri sonucu iki Rubus örneğine ait sekansların bitki genomu olarak elde edilmesi sonucunda bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan örneğin PCR ürünü de sekans analizine gönderilmiştir. Pozitif kontrol PCR ürününün sekansları ise SNSV olarak teyit edilmiştir. Bu çalışma kapsamında testlenen Rubus örneklerinden iki tanesinde pozitif kontrol ile birlikte beklenen düzeyde amplifikasyon elde edilmesine karşın tekrarlanan sekans analizleri sonucu sadece bitki genomu elde edilmesi bu iki örnek SNSV açısından "şüpheli örnek" olarak değerlendirilmesi gerekmekte olup bu virüs ile ilgili testleme çalışmalarının devam etmesi önerilmektedir.



Şekil 4.10. Mersin ili rubus örneklerinden izole edilen RNA'lara DNAz uygulanarak *Strawberry necrotic shock virüs* tespiti amacıyla yapılan RT-PCR analiz sonucu. M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 176 (14), 178 (16), 234 (19): Mersin rubus örnekleri; W: Su kontrol; +C: Pozitif kontrol

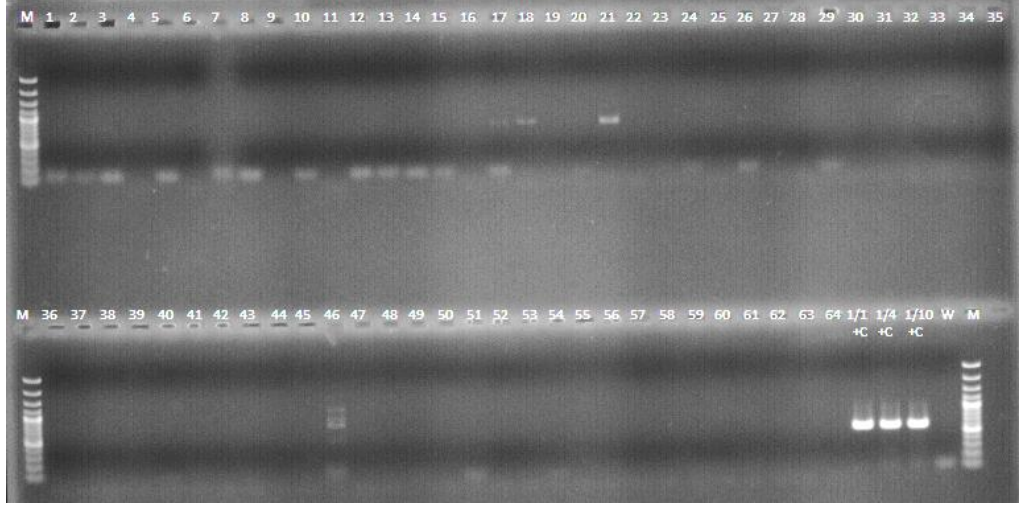
4.2.2.2. Blackberry chlorotic ringspot virus (BCRV) ve tomato ringspot virus (ToRSV) lerinin RT-PCR analizleri;

BCRV'nin saptanması amacıyla yapılan RT-PCR analizlerinde Bursa, Hatay, Mersin ve Kahramanmaraş'tan toplanan hiçbir rubus örneğinde herhangi bir amplifikasyon gözlenmezken pozitif kontrollerde beklenen düzeyde bant elde edilmiştir. Bu virüs için pozitif kontrol olarak kullanılan cDNA'ların doğrudan, 1/4 ve 1/10 sulandırma serilerinin üçünde de amplifikasyon gözlenmiştir (Şekil 4.11). Bu durumda örneklerin BCRV tespitlerinde kullanılacak olan cDNA'ların farklı sulandırma serilerinde kullanılmasının PCR analizlerinin güvenilirliğini arttıracakı düşünülmektedir.



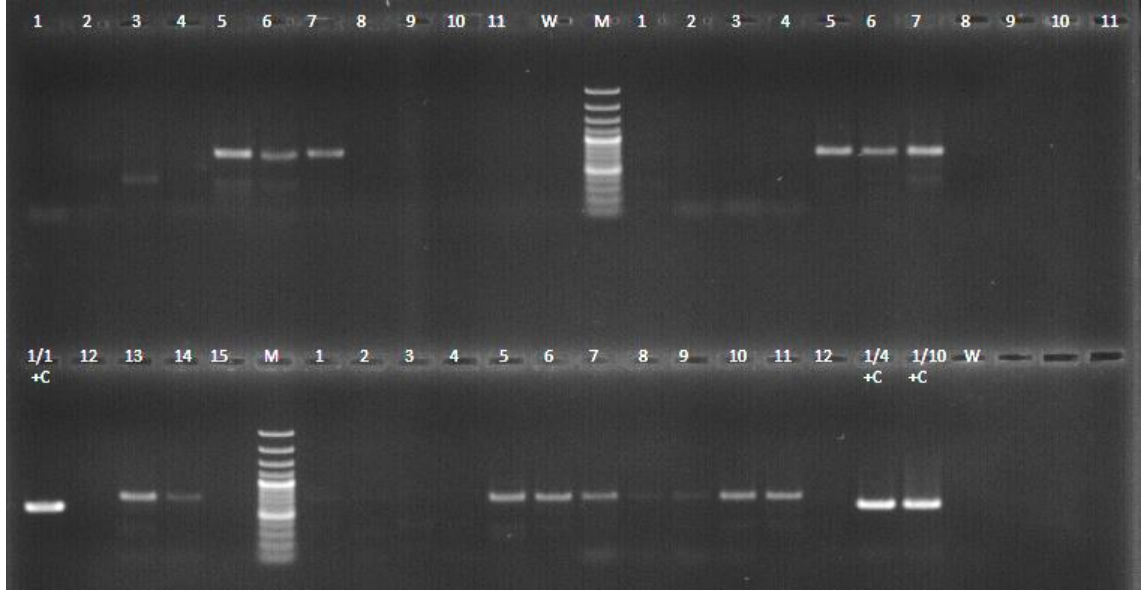
Şekil 4.11 Bursa, Hatay ve Kahramanmaraş'tan toplanan Rubus örneklerinde . blackberry chlorotic ringspot virus tespiti için BCRVF/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizi. M: Marker (SMO#383 MBI Thermo Sci, ABD); 1-18: Bursa, Hatay, Mersin ve Kahramanmaraş rubus örnekleri; W: Su kontrol; +C: Pozitif kontrol (1/1-doğrudan cDNA, 1/4 ve 1/10 cDNA sulandırma serileri)

Bursa ilinden alınan 95 Rubus örneğinde ToRSVF/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizlerinde 3 örnekte beklenen düzeyin üstünde amplifikasyon meydana gelmiştir. Analizlerde kullanılan örneklerin cDNA'ları doğrudan ve 1/4 , 1/10 sulandırılarak kullanılmış, 1/4 sulandırma serisinde amplifikasyon meydana gelirken doğrudan cDNA kullanımında ve 1/10 sulandırma serisinde herhangi bir amplifikasyon gözlenmemiştir. Bu virüs için pozitif kontrol olarak kullanılan cDNA'ların ise doğrudan, 1/4 ve 1/10 sulandırma serilerinin üçünde de amplifikasyon gözlenmiştir (Şekil 4.12). ToRSV F/R primer çifti ile beklenen baz büyüklüğü 493 bp olması gerekirken 3 örnekte de 700 bp'nin üzerinde amplifikasyon gerçekleşmiştir. Bu nedenle elde edilen PCR ürünleri sekans analizine gönderilmiş ve gelen sekans sonuçlarının bitki genomuna ait olduğu görülmüştür.



Şekil.4.12 Bursa rubus örneklerinde ToRSVF/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 1-64: Bursa rubus örnekleri; W: Su kontrol; +C: Pozitif kontrol ((1/1-Doğradan cDNA, 1/4 ve 1/10 sulandırma serileri)

Hatay ilinden toplanan 38 Rubus örneğinde ToRSVF/R primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizlerinde ise 5 örnekte amplifikasyon meydana gelmiştir. Analizlerde kullanılan örneklerin cDNA'larının bütün sulandırma serilerinde amplifikasyon gözlenmiş ancak Bursa örneklerinde olduğu gibi beklenen baz seviyesinin üzerinde yaklaşık 700bp büyüklüğünde bir amplifikasyon gerçekleşmiştir (Şekil 4.13). Kahramanmaraş ilinden alınan 20 rubus örneğinde ise ToRSVF/R primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizleri sonucunda hiçbir örnekte amplifikasyon gözlenmemiştir. Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar daha önceki çalışmalarla paralel sonuç vermiştir. Ülkemizde gerek Doğu Akdeniz gerekse Bursa ili rubus plantasyonlarında ToRSV'nin varlığına yönelik yapılan çalışmalarda bu virüsün varlığı sadece DAS-ELISA ile saptanmış (Çağlayan ve ark. 2015; Dolunay ve Sertkaya, 2011) ve TÜBİTAK 2130042 nolu proje kapsamında yürütülen çalışmalarda Bursa ve Hatay ili rubus örneklerinde DAS-ELISA sonuçları RT-PCR analizleri ile doğrulanamamıştır (Çağlayan, Kişisel görüşme).



Şekil.4.13 Hatay rubus örneklerinde ToRSVF/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 1-15: Hatay rubus örnekleri; W: Su kontrol; +C: Pozitif kontrol (1/1- doğrudan cDNA ve 1/4 , 1/10 sulandırma serileri)

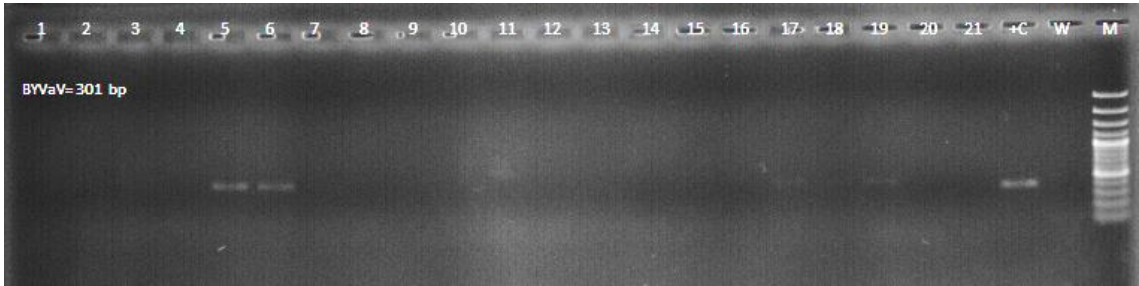
4.2.2.3. Blackberry yellow vein associated virüs (BYVaV) ’ ün RT-PCR analizleri;

BYVaV'nin saptanması amacıyla BYVaV F/R primerleri kullanılarak yapılan PCR analizlerinde Mersin ve Kahramanmaraş'tan toplanmış olan rubus örneklerinde amplifikasyon gözlenmezken, Bursa'dan 3, Hatay'dan 5 örnekte amplifikasyon meydana gelmiştir. Bununla birlikte Bursa örneklerinde amplifikasyonun beklenen düzeyde (301 bp) gerçekleşmesine karşın ABD'den cDNA olarak getirilen pozitif kontrollerin gerek doğrudan gerekse iki seyreltme serisinde (1/4 ve 1/10) beklenen düzeyin üstünde (yaklaşık 700 bp) ürün vermesi nedeniyle sonuçlar çelişkili olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.14). Bu nedenle Bursa rubus örneklerinden 2, 4 ve 13 nolu örneklerin PCR ürünleri sekans analizine gönderilmiş ve anlamlı sonuç elde edilememiştir. Hatay rubus örneklerinin PCR analizlerinde ise daha farklı bir durum gözlenmiştir. Beklenen baz büyüklüğü 301 bp olması gerekirken pozitif kontrolde 400 bp civarı, pozitif bulunan iki örnekte ise 450 bp civarı bir amplifikasyon gözlenmiştir (Şekil 4.15). Bunun üzerine amplifikasyon elde edilen iki rubus örneği ve symptom gözlendiği halde örnek RNA'larında seyreltme yapılmadan kullanılan PCR analizlerinde negatif sonuç veren üç örnek seçilerek tekrar analiz edilmiştir . Üç farklı

seyreltme yapılan cDNA'ların (doğrudan, 1/4, 1/10) kullanıldığı PCR analiz sonuçlarına göre testlenen beş örneğin üç tanesinde bütün seyreltme serilerinde pozitif kontrole göre daha hafif olmakla birlikte aynı düzeyde fakat yine beklenen baz seviyesinin biraz üzerinde (yaklaşık 400 bp) ürünler elde edilmiştir (Şekil 4.16). Bu ürünler sekans analizine gönderildiğinde sadece 1 örnekte (276 nolu örnek) küçük bir bölge BYVaV ile düşük oranda homoloji göstermiştir. Bu durumda bu virüs ile ilgili çalışmalara devam edilmesi önerilmektedir.



Şekil 4.14 Bursa' dan toplanan rubus örneklerinde blackberry yellow vein associated virüs tespiti için BYVaVF/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#383 MBI Thermo Sci, ABD); 1-19: Bursa rubus örnekleri; W: Su kontrol; +C: Pozitif kontrol 1/1- doğrudan ve 1/4 seyreltme)



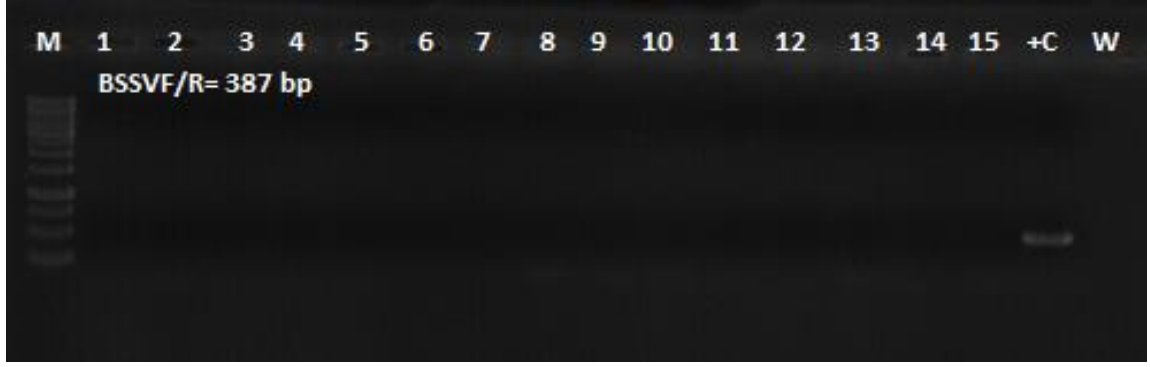
Şekil 4.15 Hatay rubus örneklerinde blackberry yellow vein associated virüs tespiti için BYVaVF/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 1-21: Hatay rubus örnekleri; W: Su kontrol; +C: Pozitif kontrol (doğrudan cDNA kullanılarak)



Şekil 4.16 Hatay ili rubus örneklerinde blackberry yellow vein associated virüs tespiti için BYVaVF/R primer çifti ve cDNA'ların farklı sulandırma serileri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 276-282 Hatay rubus örnekleri; W: Su kontrol; +C: Pozitif kontrol (1/1-doğrudan cDNA kullanılarak, 1/4, 1/10 seyreltme)

4.2.2.4. Blueberry shoestring virus (BSSV), blueberry fruit drop associated virus (BFDAV) ve blueberry latent virüs (BBLV)' lerinin RT-PCR analizleri

Bursa, Mersin, ve Karadeniz bölgesinden toplanan mavi yemiş örneklerinden Silica yakalama yöntemi ve RNeasy Qiagen kit kullanarak izole edilen RNA'larından yapılan RT-PCR analizlerinde gerek örneklerin gerekse pozitif kontrollerin cDNA'ları doğrudan, 1/4, 1/10, 1/50 ve 1/100 oranında sulandırılarak kullanılmıştır. Örneklerde herhangi bir amplifikasyon gözlenmezken pozitif kontrol olarak kullanılan cDNA'ların bütün seyreltme serilerinde beklenen düzeyde amplifikasyon meydana gelmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Karadeniz mavi yemiş örneklerinde blueberry shoestring virus tespiti için BSSVF/R primer çifti ve cDNA'ların 1:4 sulandırma kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 1- 15 Karadeniz mavi yemiş örnekleri; W: Su kontrol; +C: Pozitif kontrol (1/4 cDNA seyreltme)



Şekil 4. 18. Bursa mavi yemiş örneklerinde blueberry shoestring virus tespiti için BSSVF/R primer çifti ve cDNA'ların 1:1, 1:4, 1:10 sulandırma kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 234-248: Bursa mavi yemiş örnekleri; W: Su kontrol; +C: Pozitif kontrol (1:1- doğrudan cDNA , 1:4, 1:10 oranlarında cDNA seyreltme)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırma, *Rubus* ve mavi yemiş bitkilerinde son yıllarda “Yeni nesil dizileme (YND)” yönteminin kullanılmasıyla çok sayıda yeni virüs tespit edilmesi nedeniyle bu virüslerin ülkemizdeki plantasyonlarda bulunma durumunun moleküler yöntemlerle araştırılmasına yönelik ilk çalışmadır. Ülkemizde son yıllarda yetiştiriciliği yaygınlaşan bu bitki türlerinde mevcut virüs hastalıklarının tespit edilmesi, uygun kontrol stratejilerinin geliştirilmesine ve bu hastalıkların ulusal sertifikasyon programlarında yer almasına önemli katkı sağlayacaktır. Bu çalışma kapsamında Hatay ilinden 38, Bursa’dan 95, Mersin’den 40, Kahramanmaraş’ tan 20 *Rubus spp.* örneği ile Karadeniz bölgesinden 102, Bursa ilinden 20 Maviyemiş (*Vaccinium spp.*) örneği toplanmış ve bu örnekler özellikle son yıllarda ABD’de saptanan strawberry necrotic shock virus (SNSV), raspberry leaf mottle virus (RLMV), blackberry yellow vein-associated virus (BYVaV), blackberry chlorotic ringspot virus (BCRV), blackraspberry necrosis virüs (BRNV), blueberry shoestring virüs (BSSV), blueberry fruit drop associated virus (BFDaV) ve blueberry latent virüs (BBLV) için RT-PCR analizleri ile testlenmiştir. Ayrıca ülkemiz *rubus* plantasyonlarında sadece DAS-ELISA yöntemi ile varlığı bildirilen tomato ringspot virus (ToRSV)’un PCR analizleri ile teyit edilmesi amacıyla bu virüs de testleme programına alınmıştır. Testlenen örneklerin hiçbirisinde yeni giriş yapan virüsler saptanmazken sadece ToRSV, SNSV ve BYVaV ile ilgili bazı çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Özellikle BYVaV, ABD’de önemli verim kayıplarına yol açan “Böğürtlen Sarı Damar Hastalık (BSDH) kompleksine neden olan virüslerden birisi olması nedeniyle bu virüsle ilgili çalışmalara devam edilmesi ve bu çalışma kapsamında elde edilen ön verilerin göz önünde bulundurularak geliştirilmesi önerilmektedir. Bu konuda daha önce yürütülen çalışmalarda da ülkemizde böğürtlen ve ahududulardan elde edilen raspberry busy dwarf virus gibi bazı virüs izolatlarının filogenetik analizleri sonucunda ülkemizde dünya izolatlarından farklı bazı izolatlar tespit edilmiştir. Bu çalışmalar ile elde edilen ön bulgular ışığında simptom gözlemlendiği halde herhangi bilinen bir virüsün saptanamadığı *Rubus* ve *Vaccinium* örneklerinin “Yeni nesil dizileme” yöntemiyle tüm bitki genomlarının taranarak ülkemize özgü yeni virüs ve/veya bilinen virüslerin yeni ırklarının tespit edilmesine yönelik çalışmaların yapılması yararlı olacaktır.

KAYNAKÇA

Anonim, 2018. (TÜİK)

Agaoglu, Y.S., 1986. Grape Fruits. 1st Edn., **Ankara University Agriculture Faculty Publications, Ankara**, pp: 377.

Barbara ve ark 2001. A testbed for exploring the use of data mining in intrusion detection. **ACM SIGMOD Record**, 30(4):15-24

Brinch, A.N.E., Geoghegan, I.E, Majerus, M.E.N., Hackett, C and Allen J. (1997) Interactions between plant resistance genes, pest aphid populations and beneficial aphid predators. 68-72

Caruso F.L. Ramsdell D.C. 1995. Alexandria Univ. (Egypt). Faculty of Agriculture. Compendium of blueberry and cranberry **diseases**.

Converse, R.H., 1987. Virus Diseases of Small Fruits. **USDA-ARS Agriculture Handbook 631**.

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

Çağlayan, K., Çelik, H., Gazel, M., Elçi, E., Gündüz, K., Grubar, B., Marn, M. V. 2016. Occurrence of Vaccinium viruses in Black Sea region of Turkey. **XI. International Vaccinium Symposium, Orlando-Florida, U.S.A**, 10-14 April, 2016, p,170.

Çağlayan, K., Gazel, M., Elçi, E., Plesko, I. M., Viršček Marn, M., 2017 (a). Viruses Infecting Small Fruits in Turkey. International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies, **Cappadocia-Turkey**, 15-17 May, 2017, p,1154.

Çağlayan, K., Gazel, M., Elçi, E., Viršček Marn M., Mavric Pleško, I., 2017 (b). Detection and characterization of Raspberry bushy dwarf virus in different hosts in Turkey. 24. International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops [ICVF]. **Thessaloniki, Greece**, 5-9 June 2017, p, 96.

Diaz-Lara, A.; Martin, R.R. 2016. Blueberry fruit drop-associated virus: A new member of the family Caulimoviridae isolated from blueberry exhibiting fruit-drop symptoms. **Plant Dis**, 100, 2211–2214.

Gazel, M., Elçi, E., Çelik, H., Gündüz, K., Plesko, I.M, Marn, M.V., Çağlayan, K., 2015. The presence of Blueberry mosaic associated virus in Vaccinium spp. in Turkey. 23. International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops [ICVF]. 8-12 Haziran 2015, **Morioka Japan**, s **100**. poster-özet

Ebel,R., Schnabel, A., Reustle, G. M., Krczal, G., and Wetzel, T. 2003. Complete nucleotide sequence of an isolate of the nepovirus raspberry ringspot virus from grapevine . **Virus Res**.97:141-144.

Elçi, E., Gazel, M., Pleško, I.M., Marn, M.V., Çağlayan, K., 2015. RNA2 Sequences of Raspberry Bushy Dwarf Virus (RBDV) Isolates from Rubus spp. in Turkey. 23. International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops [ICVF]. **8-12 Haziran 2015, Morioka Japan**,

- Ellis R, Jacobson DM, Horvitz H. poster-özet 1991. Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**. 1991 Sep;129(1):79-94.
- 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.
- Fidan, Y., Ağaoğlu, Y.S. ve Çelik, H., 1976. Ankara şartlarında yetiştirilen muhtelif ahududu ve böğürtlen çeşitlerinin bazı özelliklerinin tespiti üzerinde bir araştırma. **Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yıllığı** 25 (4): 904-917.
- Halgren, A. B. 2006. Characterization, epidemiology, and ecology of a virus associated with black raspberry decline . Ph .D. diss. **Oregon State University, Corvallis**.
- Halgren, A., Tzanetakis, I. E., and Martin, R. R. 2007. Identification, characterization, and detection of Black raspberry necrosis virus . **Phytopathology** 97:44-50.
- 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.
- Hillier,J., and Begg,G.2002. Resistance-breaking raspberry aphid biotypes:Constraints to sustainable control through plant breeding.**Acta Hortic.**585:315-317.
- Hutchinson M., Varney E.H. (1954): Ringspot-A virus disease of cultivated blueberry. **Plant Disease Reporter**, 38: 260–262.
- 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., and Wood, G.A.1979. The virüs status of raspberries(*Rubus idaeus* L) in New Zealand. **N. Z. J Agric. Res.**22:173-182
- 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.
- Jones, A. T., Gordon, s. C., and Jennigs, D. L. 1984. A leaf-blotch disorder of tayberry associated with the leaf and bud mite (*Phyllocoptes gracilis*) and some effects of three aphid-borne viruses. **J. Hortic. Sci.** 59:523-528
- Jones, A.T., 1987. Raspberry leaf mottle and Raspberry leaf spot. Pp. 183-187. In: Virus Diseases of Small Fruits. R. H. Converse, ed. US. Dept. **Agric. Agric Handb.** 631. 124
- Jones, A.T., 1991. *Rubus* host range of rubus yellow net virus and its involvement with other aphid-borne latent viruses in inducing raspberry veinbanding mosaic disease. **Ann. Appl. Biol.** 118:331-338.
- Jones, A.T., Angel-Diaz, J.E. and Lemmety, A. 1998. Recent progress towards control of two important viruses and their variants in small fruit crops in Europe. **Acta Hort.**:87-92.
- Jones, A. T., McGavin, W. J., Geering, A. D. W., and Lockhart, B. E. L. 2002. Identification of *Rubus* yellow net virus as a distinct badnavirus and its detection by PCR in *Rubus* species and in aphids. **Ann. Appl. Biol.** 141:1-10
- Kalinowska, E., E. Paduch-Cichal, M. Chodorska, 2011. First report of Blueberry red ringspot virus in highbush blueberry in Poland. **J. Plant Pathol.**
- Kalinowska, E., E. Paduch-Cichal and M. Chodorska, 2012. Molecular characterization of Polish Blueberry red ringspot virus isolate. **Virus Genes** 44 (2), 309-311.

- Kumar S, Stecher G, and Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Mol Biol Evol** 33:1870-1874
- Lu S, et al. (2015) Short Inverted Repeats Are Hotspots for Genetic Instability: Relevance to **Cancer Genomes**. *Cell Rep*
- 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. 2002. Virus Diseases of Rubus and Strategies for Their Control. **Acta Hort.** 585:265-270.
- 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.
- Martin, Kanchon K. Dasmahapatra, Nicola J. Nadeau, Camilo Salazar, James R. Walters, Fraser Simpson, Mark Blaxter, Andrea Manica, James Mallet, and Chris D. Jiggins 2013. Genome-wide evidence for speciation with gene flow in *Heliconius* butterflies, **genome.cshlp.org** on July 25, 2018
- Martin A, et al. (2002) Prp43 is an essential RNA-dependent ATPase required for release of lariat-intron from the spliceosome. **J Biol Chem** 277(20):17743-50
- Martin M, et al. (2009) Nitric oxide accumulation is required to protect against iron-mediated oxidative stress in frataxin-deficient Arabidopsis plants. **FEBS Lett** 583(3):542-8
- Martin DC, et al. (2011) New regulators of a high affinity Ca²⁺ influx system revealed through a genome-wide screen in yeast. **J Biol Chem** 286(12):10744-54
- McGavin, W.J.; MacFarlane, S.A., (2010) Sequence similarities between Raspberry leaf mottle virus, Raspberry leaf spot virus and the closterovirus Raspberry mottle virus., **Annals of Applied Biology**, 156, 439-448.
- McGavin, W. J., Cock, P. J. A., and MacFarlane, S. A. 2011. Partial sequence and RT-PCR diagnostic test for the plant rhabdovirus Raspberry vein chlorosis virus. **Plant Pathol.** 60:462-467
- McGavin, W. J., and MacFarlane, S. A. 2010. Sequence similarities between Raspberry leaf mottle virus, Raspberry leaf spot virus and the Closterovirus Raspberry mottle virus. **Ann. Appl. Biol.** 156:439-448
- McGavin, W. J., McMenemy, L. S., and MacFarlane, S. A. 2010. The complete nucleotide sequence of a UK strain of black raspberry necrosis virus. **Arch. Virol.** 155:1897- 1899.
- McGavin, W. J., Mitchell, C., Cock, P. J. A., Wright, K. M., and MacFarlane, S. A. 2012. Raspberry leaf blotch virus, a putative new member of the genus Emaravirus, encodes a novel genomic RNA. **J. Gen. Virol.** 93:430-437
- Murant, A. F. 1978. CMI/AAB Descr. Plant VIRUSES- Raspberry ringspot virus. No. 198. P. 5.
- 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.

- Quito-Avila, D. F., Lightle, D., Lee, J., and Martin, R. R. 2012. Transmission biology of Raspberry latent virus, the first aphid-borne reovirus. **Phytopathology** 102:547-553.
- Onur, C., Türemiş, N., Aġaoġlu, S. Y., Çelik, M., Kepenek, K., Barut, E., Güteryüz, M., Kaplan, N., Erenoġlu, B., Yılmaz, H., 1999. Bazı Frenküzümü (*Ribes* ssp) Ahududu ve Böġürtlen (*Rubus* ssp) Çeşitlerinin Evalüasyonu. **Ulusal III. Bahçe Bitkileri Kongresi**. 14-17 Eylül 1999. Sayfa: 772-775. Ankara.
- Prıbylova' 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., K.S. Kim, J.P. Fulton, 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.
- Ples'ko, M.I., M.M. Virš'ek, 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**, Abs. 34.
- 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.
- Robert, 2009. Captive breeding genetics and reintroduction success **Biological Conservation** 2915-2922
- R.R. Martin et al. 2009. The use of collagenase to improve the detection of plant viruses in vector nematodes by RT-PCR. **Journal of Virological Methods** 155 :91–95
- Sabanadzovic, S., and Abou Ghanem-Sabanadzovic, N. 2008. First report of Blackraspberry necrosis virüs in *Rubus canadensis* in Tennessee. **Plant Dis**. 92:1254.
- Saitou N, Nei M. 1987. The Neighbor-Joining Method—a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**. 4:406–425.
- Stace-Smith, R. 1955. Studies on *Rubus* virüs diseases in British Columbia. II. Black raspberry necrosis. **Can . J. Bot**. 33: 314- 322.
- Stace-Smith, R. 1987. Virus and virüs- like diseases of *Rubus* (Raspberry and Blackberry). In: *Virus Diseases of Small Fruits*. R. H. Converse, ed. U. S. **Government Printing Office, Washington, D. C.**
- Stace-Smith, R., 1956. Studies on *Rubus* virus diseases in British Columbia. III. Separation of components of raspberry mosaic. **Canadian J. Bot**. 34:435-442.
- Strik, B. and Martin, R.R., 2002. *Raspberry bushy dwarf virus* (RBDV) reduces yield of 'Marion' blackberry.
- Špak, J.; 1995: The occurrence of nepoviruses on raspberries and blackberries in the Czech Republic. **Acta Horticulturae** 385, 117-121.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Mol. Bio. Evol**. 30:2725-2729.

- Thekke-Veetil, T., Ho, T., Moyer, C., Whitaker, V.M., Tzanetakis, I.E. 2016. Detection of Strawberry necrotic shock virus using conventional and TaqMan® quantitative RTPCR. **J. Virol. Methods** 235, 176–181.
- Trudgill, D. L., Brown, D. J. F., and McNamara, D. G. 1983. Methods and criteria for assessing the transmission of plant viruses by longidorid nematodes. **Rev. Nematol.** 6:133- 141.
- Tzanetakis I.E., Gergerich R.C., Martin R.R. 2006. A new Ilarvirus found in rose. **Plant Pathology**, 55, 568.
- Tzanetakis, I. E., Halgren. A. B., Mosier, N., and Martin, R. R. 2007. Identification and characterization of Raspberry mottle virüs, a novel member of the Closteroviridae. **Virus Res.** 127: 26- 33.
- Tzanetakis, I.E., Keller, K.E. and Martin, R.R. 2004. A simplified eDNA cloning method for recalcitrant double-stranded RNA viral templates using reverse transcriptase. **Phytopathology** S94:104.
- 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 1996 yılında Şanlıurfa ili Bozova ilçesinde doğdu. İlk ve orta okul Bozova'da Yaylak ilköğretim okulunda, Lise eğitimini Yaylak IMKB lisesinde tamamladı. 2012 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki koruma bölümünü kazandı ve 2016 yılında aynı bölümden mezun oldu. 2016 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.

EKLER

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*2H₂O

10 g Sodium Deoxycholate

10 ml NP- 40

% 1 β-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 H₂O

11,5 ml Glesial 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 H₂O

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 H₂O ile tamamlanır.

MACKENZİE EZME TAMPONU (100 ml)

Guanidine isothiacyonate 47.26 g

Sodium acetat 2.72 g

25 mM EDTA 0.7305 g

PVP-40 2.5 g

Karışım 100 ml d₂H₂O' ya tamamlanıp oda sıcaklığında saklanmıştır.

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.