



**TOKAT İLİ BAĞ ALANLARINDA *GRAPEVINE FANLEAF VIRUS* VE
GRAPEVINE LEAFROLL-ASSOCIATED VIRUS-1,2,3,4,9 VİRÜSLERİNİN
VARLIĞININ MOLEKÜLER OLARAK BELİRLENMESİ**

KÜBRA SARITAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI
Dr. Öğr. Üyesi ŞERİFE TOPKAYA
Ağustos - 2019
Her hakkı saklıdır**

**T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TOKAT İLİ BAĞ ALANLARINDA *GRAPEVINE FANLEAF VIRUS* VE
GRAPEVINE LEAFROLL-ASSOCIATED VIRUS-1,2,3,4,9
VİRÜSLERİNİN VARLIĞININ MOLEKÜLER OLARAK
BELİRLENMESİ**

KÜBRA SARITAŞ

**TOKAT
Ağustos - 2019**

Her hakkı saklıdır



Bu tez çalışması;

**Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi tarafından
(2018/52) nolu proje ile desteklenmiştir.**

KÜBRA SARITAŞ tarafından hazırlanan “**Tokat İli Bağ Alanlarında Grapevine fanleaf virus ve Grapevine leafroll-associated virus-1,2,3,4,9 Virüslerinin Varlığının Moleküler Olarak Belirlenmesi**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 2 AĞUSTOS 2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

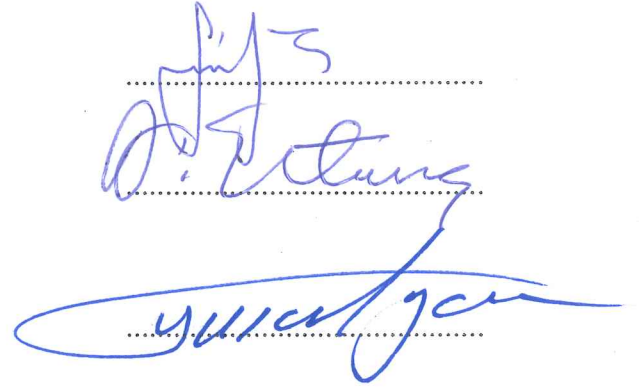
Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi ŞERİFE TOPKAYA

Üye
Prof. Dr. Filiz ERTUNÇ
Ankara Üniversitesi

Üye
Prof. Dr. Yusuf YANAR
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi



ONAY


Prof. Dr. Çetin ÇEKİÇ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
28/08/2019


TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

KÜBRA SARITAŞ

2 Ağustos 2019

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TOKAT İLİ BAĞ ALANLARINDA *GRAPEVINE FANLEAF VIRUS* VE *GRAPEVINE LEAFROLL-ASSOCIATED VIRUS-1,2,3,4,9* VİRÜSLERİNİN VARLIĞININ MOLEKÜLER OLARAK BELİRLENMESİ

KÜBRA SARITAŞ

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ ŞERİFE TOPKAYA)

2018 yılında Tokat ilinde yapılan bu çalışmada, bağcılığın yoğun olarak yapıldığı Merkez, Erbaa, Niksar ve Pazar ilçelerindeki bazı bağ alanlarından asmaların virüs belirtisi gösteren genç yapraklarından ve bir yaşlı sürgünlerinden örnekler toplanmıştır. Toplanan 197 adet asma örneği *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine leafroll-associated virus-1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll-associated virus-2* (GLRaV-2), *Grapevine leafroll-associated virus-3* (GLRaV-3), *Grapevine leafroll-associated virus-4* (GLRaV-4) ve *Grapevine leafroll-associated virus-9* (GLRaV-9) virüslerinin varlığını tespit etmek amacıyla, virüslere spesifik primerler kullanılarak moleküler bir yöntem olan RT-PCR testine tabi tutulmuştur. Test edilen 197 adet örneğin 106 (%53.80) tanesinde bir veya birden fazla virüse rastlanmıştır. Toplam 197 bitki örneğinin 103'ü GLRaV-1 (%52.28), 10'u GLRaV-3 (%5.18), 5'i GLRaV-4 (%2.53), 2'si GLRaV-2 (%1.03), 2'si GLRaV-9 (%1.01) ve 2'si GFLV (%1.01) ile enfekteli bulunmuştur. Tokat Merkez ve ilçelerinden toplanan bitki örneklerinde en yaygın görülen virüsün GLRaV-1 olduğu ve bunu GLRaV-3'ün izlediği saptanmıştır. En az saptanan virüsler ise GFLV, GLRaV-2 ve GLRaV-9 olarak tespit edilmiştir. Tespit edilen çoklu enfeksiyonlar içerisinde en fazla GLRaV-1 + GLRaV-3'ün birlikte enfeksiyonu olduğu belirlenmiştir. GLRaV-1 ve GLRaV-3 ile enfekteli izolatların çift yönlü sekans analizleri yapılmış ve MEGA10 bilgisayar programında hizalanmış ve gen bankasına kayıtlı izolatlarla karşılaştırması yapılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Filogenetik analiz çalışmalarına göre, GLRaV-1 gen bankasında kayıtlı farklı izolatlarla ve kendi içinde de farklı dallanmalar göstermiştir. GLRaV-3 ile enfekteli ÜÖ3-3 izolatı ise kayıtlı diğer izolatlarla %99-100 oranlarında benzerlik göstermiştir.

2019, 57 SAYFA

ANAHTAR KELİMELELER: Asma, Tokat, *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV), RT-PCR

ABSTRACT

MASTER THESIS

MOLECULAR IDENTIFICATION of *GRAPEVINE FANLEAF VIRUS* and *GRAPEVINE LEAFROLL-ASSOCIATED VIRUS-1,2,3,4,9* in VINEYARDS in TOKAT PROVINCE

KÜBRA SARITAŞ

TOKAT GAZIOSMANPASA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION

(SUPERVISOR:;) ASST. PROF. DR. ŞERİFE TOPKAYA

In this present research, during the 2018 summer season, samples were collected from fresh leaf and a one year old shoots showing virus-like symptoms from vineyards from Centrum, Erbaa, Niksar and Pazar districts of Tokat. Total 197 grapevine samples were tested molecularly and two step polymerase chain reaction (PCR) was performed with virus-specific primers to *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine leafroll-associated virus-1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll-associated virus-2* (GLRaV-2), *Grapevine leafroll-associated virus-3* (GLRaV-3), *Grapevine leafroll-associated virus-4* (GLRaV-4) and *Grapevine leafroll-associated virus-9* (GLRaV-9). Detection single or dual infections of these viruses have been determined in 106 (53.80%) samples. 103 (52.28%) out of 197 samples, tested resulted in positive with GLRaV-1, 10 out of 197 samples with GLRaV-3 (%5.18), 5 of samples with GLRaV-4 (%2.53), 2 of samples with GLRaV-2 (%1.03), 2 of samples with GLRaV-9 (%1.01) and 2 of samples with GFLV (%1.01). Positive PCR products of GLRaV-1 and GLRaV-3 were sequenced in two directions, aligned with MEGA10 and analysed in BLAST for multiple comparison of other isolates in Genebank. According to phlogenetic analysis of GLRaV-1 and GLRaV-3 isolates, isolates infected with GLRaV-1 showed 94-96% of identity with others in NCBI Genebank. UO3-3 isolate infected with GLRaV-3 showed 99-100% of identity with those from Genebank.

2019, 57 PAGE

KEYWORDS: *Vitis vinifera*, Tokat, *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV), RT-PCR

ÖNSÖZ

Öncelikle, bu çalışmada çalışmamın her aşamasında yardımını ve desteğini benden esirgemeyen ve her konuda yanımda olan danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi ŞERİFE TOPKAYA'ya (Gaziosmanpaşa Üniversitesi-Bitki Koruma Anabilim Dalı) teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans öğrencileri; VİLDAN KİLİNC, MERVE ENGÜR ve BURAK GÜVENATEŞ'e, çalıştığım kurumda yüksek lisans eğitimim için gerekli olan izinleri sağlayan idari amirlerime teşekkür ederim.

Ayrıca tüm hayatım boyunca olduğu gibi yüksek lisans öğrenimim süresince de beni hep destekleyen, her türlü fedakarlıkta bulunan, maddi manevi her zaman yanımda olan annem SAHURE TÜRKMEN ve kardeşim MURAT TEKİN'e sonsuz minnet ve sevgilerimi sunar, teşekkürü bir borç bilirim.

Son olarak, hayatımın her anında olduğu gibi yüksek lisans öğrenimim süresince de yardım ve desteğini benden esirgemeyen, sonsuz bir sabırla her türlü fedakarlığı gösteren değerli eşim ERSİN SARITAŞ'a ve varlığıyla bana her zaman güç veren biricik oğlum YUSUF SARITAŞ'a teşekkürü bir borç bilirim.

KÜBRA SARITAŞ

2 Ağustos 2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGE VE KISALTMALAR	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
ÇİZELGE LİSTESİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	8
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1. Materyal	20
3.2. RNA İzolasyonu	21
3.3. RT-PCR Yöntemi	21
3.3.1. Komplementer DNA (cDNA) sentezi.....	21
3.3.2.PCR yöntemi.....	22
3.4. Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları.....	23
3.5. Filogenetik Analiz Çalışmaları	24
4. BULGULAR	25
4.1. Sürvey Sonuçları.....	25
4.2. RT-PCR Sonuçları	32
4.3. Filogenetik Analiz Sonuçları	44
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	47
6. KAYNAKLAR	51
7. ÖZGEÇMİŞ	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar	Açıklamalar
bp	Baz çifti
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
GFLV	<i>Grapevine fanleaf virus</i>
GLRaV-1	<i>Grapevine leafroll-associated virus-1</i>
GLRaV-2	<i>Grapevine leafroll-associated virus-2</i>
GLRaV-3	<i>Grapevine leafroll-associated virus-3</i>
GLRaV-4	<i>Grapevine leafroll-associated virus-4</i>
GLRaV-9	<i>Grapevine leafroll-associated virus-9</i>
M	Molar
M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptaz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
RT	Ters Transkripsiyon
rpm	Dakikada Devir
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UV	Ultraviyole
V	Volt
µl	Mikrolitre

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Sürvey yapılan ilçeler	20
Şekil 4.1. a) Mozaik b) İrili ufaklı tane oluşumu c) Damar aralarında sararma d) Kırmızılaşma	26
Şekil 4.2. GLRaV-1'e spesifik primerle yapılan bazı izolatlara ait RT-PCR sonucu.	32
Şekil 4.3. GLRaV-2'ye spesifik primerle yapılan RT-PCR sonucu	32
Şekil 4.4. GLRaV-3'e spesifik primerle yapılan RT-PCR sonucu.	33
Şekil 4.5. GLRaV-4'e spesifik primerle yapılan RT-PCR sonucu.	33
Şekil 4.6. GFLV'ye spesifik primerle yapılan RT-PCR sonucu.	34
Şekil 4.7. GLRaV-9'a spesifik primerle yapılan RT-PCR sonucu.	34
Şekil 4.8. GLRaV-1 ile enfeksiyon tespit edilen asma örneklerindeki belirtiler.	35
Şekil 4.9. GLRaV-3 ile enfeksiyon tespit edilen asma örneklerindeki belirtiler (kırmızı çeşit).	35
Şekil 4.10. GFLV ve GLRaV-1 ile enfeksiyon tespit edilen asma örneklerindeki karışık enfeksiyon belirtileri (Narince çeşidi).	36
Şekil 4.11. GLRaV-1 ve GLRAV-2 ile karışık enfeksiyon belirtileri (kırmızı çeşit).	36
Şekil 4.12. GLRaV-1 ile elde edilen filogenetik ağaç.	45
Şekil 4.13. GLRaV-3 ile enfekteli ÜÖ3-3 izolatına ait filogenetik ağaç.	46

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1. Dünya’da bağ alanları ve üzüm üretim miktarı ile ilk 10’da yer alan ülkeler	2
Çizelge 1.2. 2018 yılı Tokat ili üzüm üretim alanları ve miktarları	2
Çizelge 1.3. GLRaVs’nin cins, vektör ve ilk kayıtlarına ilişkin bilgiler	5
Çizelge 3.1. Çalışmada virüslere spesifik olarak kullanılan primerler ve baz dizilimleri	22
Çizelge 4.1. Tokat Merkez, Erbaa, Niksar ve Pazar’dan alınan örnek sayıları	25
Çizelge 4.2. Tokat Merkez’den toplanan örnekler	26
Çizelge 4.3. Tokat Erbaa ilçesinden toplanan örnekler	28
Çizelge 4.4. Tokat Niksar ilçesinden toplanan örnekler	29
Çizelge 4.5. Tokat Pazar ilçesinden toplanan örnekler.....	29
Çizelge 4.6. Tokat Merkez örneklerinin RT-PCR sonuçları	37
Çizelge 4.7. Tokat Erbaa ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları	38
Çizelge 4.8. Tokat Niksar ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları.....	40
Çizelge 4.9. Tokat Pazar ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları	41
Çizelge 4.10. Tokat bağ alanlarında saptanan virüslerin ilçelere göre dağılımı	44
Çizelge 4.11. Test edilen bitki örneklerinde görülen virüs kombinasyonları...	44

1. GİRİŞ

Anavatanı Anadolu olarak bilinen asmanın (*Vitis vinifera* L.) geçmişi arkeolojik bulgulara göre binlerce yıl öncesine dayanmaktadır. Asma bitkisinin kültüre alınması M.Ö. 6000-6500 yıllarında Anadolu ve Kafkasya'da başlamış ve buradan da tüm dünyaya yayılmıştır. Dünyada önemli tarımsal geçim kaynaklarından birisi olan asma diğer meyvelerle kıyaslandığında en fazla çeşide sahip olan türler arasında yer almaktadır. Asma, çeşitli değerlendirme yöntemlerinin oluşu, iklim ve toprak istekleri yönünden çok seçici olmayışı, çok yıllık bir ürün olması ve çoğalma yöntemlerinin kolay olması gibi etkenlerden dolayı dünyadaki en yaygın kültür bitkilerindedir. Bağcılık için yerkürenin en elverişli iklim kuşağı üzerinde bulunan ülkemiz, asmanın gen merkezi olmasının yanı sıra son derece eski ve köklü bir bağcılık kültürüne de sahiptir (Çelik ve ark., 1998). Ülkemizde bağcılık tarımsal bir iş kolu olarak önemini korumaktadır. Taze ya da kuru üzüm olarak veya birçok sanayi kolunda (pekmez, şarap, sirke vs.) hammadde olarak tüketilen üzüm, şeker, nitrojen, mineral maddeler ve vitamin içeren önemli bir gıda maddesidir (Tarla, 2005). Türkiye'nin bitkisel üretiminde bağcılık sektörü önemli bir yere sahiptir. Ülkemizde üretilen yaş üzümün bir kısmı sofralık olarak tüketilirken, bir kısmı da çekirdeksiz kuru üzüm ve çekirdekli kuru üzüm olarak değerlendirilmektedir. Türkiye üzüm ihracatı ile ülke ekonomisi için önemli bir gelir kaynağını oluşturmaktadır.

2017 yılı istatistiklerine göre dünya bağ alanı 6 931 353 ha, dünya üzüm üretim miktarı ise 74 276 583 ton dur. 2017 yılı FAO verilerine göre dünyada bağ alanı en fazla olan ülke İspanya, üzüm üretim miktarı en yüksek ülke ise Çin'dir (Anonim, 2017a). Türkiye, bağcılık yapan ülkeler içerisinde üzüm üretimi açısından 6. sırada, bağ alanı açısından ise 5. sırada yer almaktadır (Çizelge 1.1).

Türkiye bağcılığına bakıldığında her ilin tarımsal ürün deseni içerisinde en az %1 bağ alanı olduğu görülmektedir. Yıldan yıla az miktarda değişiklik göstermekle birlikte 450 bin hektar ortalama bağ alanına sahip olan Türkiye'de en geniş alanda yetiştiricilik yapılan bölge Ege Bölgesi'dir. Ülke bağ alanlarının yarısına yakını bu bölgede yer almaktadır. Bu bölgede üretim alanı en büyük il Manisa'dır. Denizli ve Mersin illeri diğer büyük üzüm üreticisi illerdir. Mersin, Adana ve Antalya illerinde genellikle

erkenci sofralık üzüm çeşitlerinin yetiştiriciliği yapılmaktadır. Türkiye sofralık ve kurutmalık üzüm üretiminde Ege Bölgesi ilk sırada gelmektedir. Ülke üretiminin %50'den fazlası bu bölgeden karşılanmaktadır. Manisa ili tek başına Türkiye kurutmalık üzüm üretiminin %90'ını karşılamaktadır (Anonim, 2019a). 2018 yılı istatistiklerine göre, ülkemiz üzüm üretimi 4 170 410 da alanda 3 993 000 ton olarak gerçekleşmiştir. Toplam üretim miktarının 1 945 262 tonu sofralık, 1 524 091 tonu kurutmalık, 463 647 tonu ise şaraplık üzümdür. Tokat ilinde ise 60 836 da alandan 56 242 ton (Çizelge 1.2) üretim yapılmaktadır (Anonim, 2018).

Çizelge 1.1. Dünya'da bağ alanları ve üzüm üretim miktarı ile ilk 10'da yer alan ülkeler (Anonim, 2017a)

Sıra no	Ülkeler	Bağ alanı (ha)	Sıra no	Ülkeler	Üretim miktarı (ton)
1	İspanya	939 283	1	Çin	13 083 000
2	Çin	775 975	2	İtalya	7 169 745
3	Fransa	743 924	3	ABD	6 679 211
4	İtalya	670 085	4	Fransa	5 915 882
5	Türkiye	416 907	5	İspanya	5 387 379
6	ABD	404 969	6	Türkiye	4 200 000
7	Arjantin	220 848	7	Hindistan	2 922 000
8	Şili	215 000	8	Güney Afrika	2 032 582
9	Hindistan	137 000	9	Şili	2 000 000
10	Güney Afrika	119 181	10	Arjantin	1 965 206

Çizelge 1.2. 2018 yılı Tokat ili üzüm üretim alanları ve miktarları (Anonim, 2018)

İlçe Adı	Ekilen alan(dekar)	Üretim(ton)	Verim(kg/da)
Merkez	22 561	25 507	1 946
Erbaa	18 232	12 836	1 664
Niksar	6 854	7 032	1 553
Zile	6 218	3 209	516
Turhal	3 461	3 663	2 948
Pazar	3 311	3 962	2 369
Yeşilyurt	114	3	26
Artova	52	21	404
Almus	26	8	308
Reşadiye	7	1	143
Toplam	60 836	56 242	11 877

Ülkemizde üzümün yanında bağ alanlarından elde edilen diğer bir üründe yaprak olup, taze veya salamura asma yaprağına olan talep hızla artmaktadır. Ticari sarmalık yaprak üretiminde öne çıkan iki üzüm çeşidi Ege Bölgesi'nde Sultani çeşidiyken, Tokat ilinde Narince çeşididir. Bunların yanı sıra, her yörenin ince ve yumuşak yapılı, az dilimli, ince damarlı yapraklara sahip olan yerel çeşitleri de (Trakya'nın Yapıncak çeşidi gibi) bu amaçla yaygın olarak değerlendirilmektedir (Çelik, 2013). Narince, Tokat yöresinde yetiştirilen beyaz üzüm çeşididir ve bağların büyük çoğunluğu bu çeşitten kurulmuştur. Yerli üzüm çeşitlerimiz arasında en kaliteli sek ve dömisek şarap yapılan çeşitlerden birisidir. Oldukça verimli bir üzüm çeşidi olan Narince çeşidinden yetiştirildiği köylerde yapraklarından da yararlanır. Yapraklarının lezzeti iyi ve salamura olmaya elverişlidir.

Virüsler, ultramikroskopik partiküller olup, enleri 200 nm'den büyük olmayan, iki tip nükleik asitten yalnızca birini içeren (RNA veya DNA), patojenik ırklar oluşturabilme yeteneğine sahip, konukçu hücreleri içerisinde biyokimyasal olarak çoğalabilen, obligat parazit özellikte canlılar olarak bilinmektedirler. Virüsler tüm dünyada ekonomik olarak yetiştirilen birçok üründe önemli zararlara neden olmaktadır. Sadece elektron mikroskobu ile görülen virüsler morfolojik olarak çubuk, yuvarlak ve mermi şeklinde olmak üzere 3 grupta toplanırlar. Virüslerin çoğalabilmeleri için mutlaka canlı hücreye ihtiyaç vardır. Virüslerin çoğalmaları genç bitkilerde yaşlı bitkilere oranla daha hızlı olmaktadır. Virüsler mekanik yolla, toprakla, aşıyla, küskülle, tohumla, vejetatif çoğalma materyalleriyle, vektörlerle (funguslar, böcekler, nematodlar) taşınmaktadırlar. Virüsler bitkide lokal ve sistemik (mozaik, sarılık, nekroz, halkalı leke, cücelik, yapraklarda kıvrıcılık, anormal büyümeler ve şekil bozuklukları) semptomlara neden olmaktadır. Ayrıca hücre içi organellerde anormallikler ve ilgi cisimcikleri (Inclusion Bodies) oluşumuna da neden olmaktadır. Bitki virüs hastalıkları ile mücadelede böcekler ve fungal hastalıklara karşı yapılan mücadele gibi imkanlar bulunmamaktadır. Virüs hastalıklarına karşı alınan tedbirlerin büyük bir kısmı enfeksiyondan korunma şeklindedir. Virüslerle mücadelede eradikasyon, sanitasyon, dezenfeksiyon, sağlıklı ve sertifikalı tohum kullanılması, üretim alanlarının birbirinden ayrılması, vektörlerle mücadele, genetik ve biyolojik mücadele yöntemleri kullanılmaktadır (Anonim, 2019b).

Hastalıklar (fungus, bakteri, virüsler) dünyada bağcılığın ekonomik olarak önemli olduğu ülkelerde yaygın olarak rapor edilmiştir. Bu hastalıklara neden olan etmenlerle

bulaşık asmalarda büyüme geriliği, yaşam süresinin kısılması, en önemlisi meyve kalitesinde ve veriminde azalma görülmektedir (Garau ve ark., 1985; Goheen, 1988; Martelli, 2014, 2015). Asmada zarar yapan virüs ve virüs benzeri hastalık etmenleri bitkide gelişme geriliklerine, yapraklarda ve sürgünlerde şekil bozukluğuna, asmanın odunsu gövdesinde çukur ve oluk oluşumuna, yapraklarda renk değişimine ve ürün kayıplarına neden olmaktadır (Martelli, 2014). Bunlar içerisinde asmada ekonomik olarak zarar yapan en önemlileri yaprak kıvrıcıklığı (leafroll, LR), mantarimsı odun (rugose wood, RW) ve bulaşık soysuzlaşma (fanleaf) hastalıklarına neden olan viral etmenlerdir.

Günümüzde 65'i virüs, 8'i fitoplazma, 5'i viroid ve biri de vektör böceklerle taşınan ve ksilemde bulunan bir bakteri olmak üzere 70'den fazla etmenin bağlarda kayıt altına alındığı bilinmektedir. Bu, oldukça fazla sayıda hücre içi patojenin tek bir üründe bulunduğunu göstermektedir (Martelli, 2014).

GFLV (*Grapevine fanleaf virus*)'nin neden olduğu kısa boğum hastalığı 1950'li yıllarda keşfedilen ve asmanın bilinen en eski virüs hastalıklarından birisidir. Dünya'da asma yetiştiriciliğinin yapıldığı her yerde görülebilmektedir (Martelli, 2014). Coğrafi dağılımı ve ekonomik önemi göz önünde bulundurulduğunda GFLV, *V. vinifera* ve hibrit asma anaçları üzerinde yaygın ve çok sık görülen bir virüstür. GFLV, asmada büyüme ve gelişmeyi olumsuz etkilemektedir. Buna bağlı olarak meyve verimini ve kalitesini, bağ alanlarında üretimi önemli ölçüde düşürmektedir. GFLV, meyvelerde anomaliye, yaprak ve sürgünlerde dejenerasyona neden olmaktadır. Bitkinin ömrünü kısaltarak %80'e varan verim kaybına ve üründeki şeker miktarının azalmasına neden olduğundan önemli ekonomik zararlara da yol açmaktadır. GFLV vektörü *X. index* Dünya'daki bütün bağ alanlarında mevcuttur (Andret-Link ve ark., 2004). GFLV ile enfekte olmuş asmaların yaprakları yelpaze şekline benzemektedir. Virüsle bulaşık bitkilerde damar bantlaşması, anormal sürgün oluşumu, sürgünlerde zikzak oluşumu, boğum aralarının kısılması ve salkımlarda irili ufaklı tane oluşumu gözlenmektedir (Martelli ve Savino, 1988). GFLV; mekanik inokulasyonla, aşıyla ve vektör nematodlardan *Xiphinema index* ile taşınmaktadır (Martelli ve Boudon-Padieu, 2006).

Asma yaprak kıvrılma hastalığının ilk tanımlaması 19. yüzyılın ortalarına kadar uzanmaktadır. Fransız ve İtalyan kaynaklarında sırasıyla, fizyolojik bozukluklar olarak kabul edilen ve “Rugeau” veya “Rossore” olarak adlandırılan asma yapraklarının erken kızarması raporları vardır. Bağ alanlarında görülen viral etmenlerden *Grapevine leafroll-associated viruses* (GLRaVs), dünya bağ üretim alanlarında çok fazla yaygınlık göstermesi ve ekonomik açıdan ciddi verim ve kalite kayıplarına neden olmasından dolayı önemli bir yer tutmaktadır. Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler dünyada bağcılığın yapıldığı ülkelerin tamamında saptanmıştır (Martelli, 2014).

Asma yaprak kıvrıcıklığı virüsü, kırmızı üzüm çeşitlerinde iklime ve coğrafi bölgeye bağlı olarak, ilkbahar veya yaz sonlarında alt yapraklarda kırmızımsı lekeler oluşturmaktadır. Bu lekeler zamanla genişler ve birleşir, böylece sonbaharda yaprak yüzeyinin çoğu kırmızımsı hal alır ve bu alanlar genellikle birincil ve ikincil damarlar boyunca dar bir yeşil bant ile birbirinden ayrılır. Enfekteli yapraklar kalın, kırılğan bir hal almakta ve aşağı doğru kıvrılmaktadır. Bu belirtiler, mevsim ilerledikçe asmanın tepesine doğru ilerler ve enfeksiyonun şiddeti arttıkça bütün yaprak yüzeyi koyu mor bir renk alır. Meyveler genellikle geç ve düzensiz olgunlaşır, meyvelerin verim ve kalitesi düşük olup, şeker miktarı düşmektedir. Beyaz üzüm çeşitlerinde belirtiler benzerdir, ancak yapraklar kırmızımsı yerine klorotik sarımsı olur. Enfekteli asmalar birçok tipte, oldukça farklı görünümde yaprak kıvrılma belirtisi oluşturabilmektedir (Martelli, 2014). GLRaV’ye ait sınıflandırma ve bazı önemli bilgiler Çizelge 1.3’te verilmiştir.

Çizelge 1.3. GLRaVs’nin cins, vektör ve ilk kayıtlarına ilişkin bilgiler (Martelli ve ark., 2012)

Virüs	Cinsi	Vektörü	İlk kayıt
GLRaV-1	<i>Ampelovirus</i>	Pseudococcidae ve Coccidae familyasına ait bazı türler	Gugerli ve ark., 1984
GLRaV-2	<i>Closterovirus</i>	Bilinmiyor	Zimmermann ve ark., 1990
GLRaV-3	<i>Ampelovirus</i>	Pseudococcidae ve Coccidae familyasına ait bazı türler	Zee ve ark., 1987
GLRaV-4	<i>Ampelovirus</i>	Pseudococcidae familyasına ait bazı türler	Hu ve ark., 1990
GLRaV-9	<i>Ampelovirus</i>	Pseudococcidae familyasına ait bazı türler	Alkowni ve ark., 2004

Ülkemizde bu virüslerle ilgili bazı çalışmalara bakıldığında, Buzkan ve ark. (2012), Türkiye’de yaptıkları survey çalışmalarında, unlu bit istilası ile yaprak kıvrıcıklığı ve

mantarımı odun hastalıklarına neden olan viral ajanları araştırmışlar, GLRaV-1 ve GLRaV-3'ü tespit etmişlerdir. *Planococcus ficus* (Signoret)'un, örneklenen bölgelerde yaygın görülen tek unlu bit türü olduğunu saptamışlardır. Bu çalışma adı geçen virüslerin epidemiyoları ve bunların potansiyel vektörleri hakkında Türkiye'de yapılan ilk çalışma niteliğindedir. Kaya ve Erilmez (2012), İzmir ve Manisa illerindeki bağlarda yürüttükleri bir çalışmada yaprak kıvrılma hastalığıyla ilgili mevcut virüslerin dışında başka virüslerin varlığını tespit etmeyi amaçlamışlardır. Toplanan örnekleri DAS-ELISA ve PCR işlemine tabi tutmuşlar ve pozitif sonuç elde etmişlerdir. Bu çalışma GLRaV-4 için ilk kayıt niteliğini taşımaktadır. Önder (2016), İzmir, Aydın, Denizli, Manisa ve Uşak illerinden toplanan örneklerde gerçekleştirilen DAS-ELISA ve Real-time RT-PCR testleri sonucunda 424 örneğin 133 (%31.4)'ünün asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerden en az biri ile enfekteli olduğunu saptamıştır. Yapılan bu çalışma ile ülkemiz bağlarında GLRaV-9, GLRaV-Pr ve GLRaV-De virüslerinin varlığı ilk kez ortaya konmuştur.

Bağcılık Tokat ilinde ekonomik açıdan önemli bir yere sahiptir. Tokat ili bağ alanlarında viral etmenlerin bulunmasıyla ilgili daha önceden yapılmış az sayıda çalışma bulunmaktadır. Karadeniz (2016), Tokat ilinde yetiştiriciliği yapılan üzüm çeşitlerinde verim ve kalite kayıplarına neden olan ve sertifikasyon sistemi içerisinde yer alan bazı virüslerin varlığının belirlenmesi için çalışma yapmıştır. Yapılan bu çalışmada, bağcılığın yoğun olarak yapıldığı Tokat Merkez, Zile, Erbaa, Niksar, Pazar ve Turhal ilçelerinde bağcılık yapılan işletmelerden hastalık belirtisi gösteren bitkilerden örnek toplamıştır. Toplanan örnekleri, bağlarda önemli verim kayıplarına neden olan *Strawberry latent ring spot virus* (SLRSV), *Grapevine leafroll-associated virus 1* (GLRAV-1), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Arabis mosaic nepovirus* (ArMV), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine fleck virus* (GFkV) viral etmenlerinin varlığını belirlemek amacıyla “ Double Antibody Sandwich Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (DAS-ELISA) „ yöntemi ile testlemiştir. Test sonucuna göre toplanan örneklerde %11.78 GLRaV-1, %5.73 ArMV, %4.77 GVA, %4.45 SLRSV, %0.63 GFkV, %0.31 GFLV oranlarında viral etmenlerin varlığını tespit etmiştir.

Bu alışma ile Tokat ili bağ alanlarında GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4 ve GLRaV-9 viral etmenlerinin varlığının moleküler yöntemlerle tanılanması amaçlanmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bağcılık ekonomik açıdan önemli tarım kollarından biridir. Bağcılığın önemli sorunlarından biride virüs hastalıklarıdır. Virüs hastalıklarından dolayı üzümlerde önemli verim kayıpları yaşanmaktadır. Virüslerle ilgili günümüzde eradikasyon ve kültürel önlemler dışında herhangi bir mücadele yönteminin olmayışı, virüslerin tanısının modern teknikler kullanılarak erken dönemde hızlı ve güvenilir tanı yöntemleriyle başarılı bir şekilde yapılmasının ne kadar önemli olduğunu açıkça ortaya koymaktadır (Önder ve ark., 2016). Dünya’da bağ virüs ve virüs benzeri hastalık etmenleri ile ilgili çalışmalar 1960’lı yıllardan sonra hız kazanmaya başlamış, yalnızca 2 tane olan virüs hastalıklarının sayısı 1997’de 43’e 1998’de 46’ya çıkmıştır. Son yıllarda virüslerin tanısında ileri moleküler yöntemlerin kullanılmasıyla günümüzde bu sayının 60’dan fazla olduğu bilinmektedir. Ülkemizde ise bağ virüsleri ile ilgili çalışmalar 1950’li yıllarda başlamıştır (Martelli ve Boudon-Padieu, 2006).

Bağlarda önemli virüs hastalıklarından Asma yelpaze yaprak virüsü (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV)’nün yol açmış olduğu hastalık “bulaşık soysuzlaşma” olarak da bilinmektedir. Virüs *Nepovirus* (Secoviridae) cinsinde yer almaktadır. Bu familyaya ait bitki virüslerinin genomu pozitif duyarlı, tek sarmallı ssRNA yapısında olup, 30 nm çapında 2 parçalı izometrik partiküllere sahiptirler (Martelli, 2014).

GFLV; üretim materyallerinden kalem, anaç ve mekanik yolla; ayrıca vektörü olan kamalı nematodlardan *Xiphinema index* (Fam: Longidoridae) ve *X. italiae* ile de taşınır. Hastalığın asmalardaki belirtisi çeşitlere göre değişmektedir. Asma anaçları ve bunların melezleri bu virüse karşı herhangi bir dayanıklılık göstermemekle birlikte bütün *Vitis vinifera* çeşitleri bu hastalığa karşı duyarlıdır. Hastalığın yaprak belirtileri erken ilkbaharda gelişir ve vejetasyon boyunca devam eder, ancak yüksek sıcaklıklarda belirtiler maskelenir. Yapraklarda şekil bozuklukları görülür; yaprak simetrisi bozulur, yaprak ayası çukurlaşır ve karışır, yaprakta diş sayısı artar. Sarılık belirtileri, ilkbaharda erken dönemde gelişerek asmanın bütün vejetatif organlarını (yapraklar, taze sürgün uçları ve salkım taslakları) etkiler. Başlangıçta, yapraklarda birkaç sarı leke ve damar bantlaşması görülür. İlerleyen dönemde ise, damar aralarında çeşitli büyüklükteki benekler yayılarak yaprağın tümünün sararmasına neden olur. Bu tip belirtilere

GFLV'nin dışında diğerk bazı nepovirüsler de yol açmaktadır. GFLV, sürgünlerde anormal dallanmaya, boğum aralarında yassılaşma, kısalma ve zikzak gelişmelere neden olur. Bazen de çift boğum oluşumu ortaya çıkar. Salkım sayısı azalır ve küçülür, meyve tutumunda azalma, irili ufaklı tane tutumu ve düzensiz olgunlaşma görülür. Bulaşık asmalar ilkbaharda uzaktan fark edilebilir. Sıcak bölgelerde yazın gelişen yapraklar normal yeşil renkli iken, ilkbaharda açan yapraklar yazın beyazlaşır ve erkenden dökülme eğilimi gösterir. GFLV ile enfekteli asmalarda gelişme geriliği de görülebilir. GFLV'nin konukçusu bütün *V. vinifera* ve asma anaçları ile bunların melezleridir. Virüsün asma dışında odunsu konukçusu bilinmemektedir (Anonim, 2017b).

Asma yaprak kıvrıcıklığı virüsü (*Grapevine leafroll associated virus*, GLRaV) Closteroviridae familyasında farklı cinsler içerisinde yer almaktadır. Bu familyaya ait bitki virüslerinin genomu pozitif duyarlı, tek sarmallı ssRNA yapısında olup ipliksi partiküllere sahiptirler. Bu hastalığa hastalıkla ilişkili 11 farklı virüs neden olmaktadır. Bu virüslerden GLRaV-1, -3, -4 ve -9 *Ampelovirus* cinsi içerisinde, GLRaV-2 ise *Closterovirus* cinsi içerisinde yer almaktadır (Martelli, 2014). 2006 yılından beri yeni *Ampelovirüs* izolatları karakterize edilmiş, bunlardan üç tanesinin kısmi veya tam dizinleri çıkartılmış ve yeni türler olarak kaydedilmiştir: *Grapevine leafroll-associated virus Pr* (GLRaV-Pr, gen bankasında GLRaV-10 olarak kayıtlı), *Grapevine leafroll-associated virus De* (GLRaV-De, gen bankasında GLRaV-11 olarak kayıtlı), *Grapevine leafroll associated-Carnelian virus* (GLRaV-Car) (Saldarelli ve ark., 2006; Elbeaino ve ark., 2009; Maliogka ve ark., 2009; Abou Ghanem-Sabanadzovic ve ark., 2010). Yakın tarihte yapılan taksonomik revizyonda GLRaV-4, -5, -6, -9, -Pr, -De ve -Car'ın genom organizasyonları ve genom büyüklükleri bakımından GLRaV-4'e büyük benzerlik gösterdiği, bu virüslerin varyant olarak kabul edilip "GLRaV-4-benzer" virüsler olarak kayıt altına alındığı bildirilmektedir (Martelli ve ark., 2012).

Grapevine leafroll associated virus 1 (GLRaV-1), doğada unlu bitlerden (Pseudococcidae) *Heliococcus bohemicus*, *Phenacoccus aceris*, *Pseudococcus affinis*, *Ps. calceolariae*, *Ps. viburni*, *Ps. maritimus*, *Ps. comstocki* ve Coccidae familyasından *Pulvinaria vitis*, *Parthenolecanium corni* ve *Neopulvinaria innumerabilis* ile taşınmaktadır (Martelli, 2014).

Grapevine leafroll associated virus 2 (GLRaV-2)'nin vektörü bilinmemektedir. GLRaV-2 aşı ve mekanik inokulasyon (otsu indikatör *Nicotiana benthamiana*) ile taşınmaktadır (Gugerli, 2003).

Grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3)'ün vektörleri, unlu bitlerden (Pseudococcidae) *Planococcus ficus*, *Pl. citri*, *Pseudococcus longispinus*, *Ps. calceolariae*, *Ps. maritimus*, *Ps. affinis*, *Ps. viburni*, *Ps. comstocki*, *Ph. aceris*; kabuklu bitlerden (Coccidae) *Pulvinaria vitis*, *Neopulvinaria innumerabilis*, *Parthenolecanium corni*, *Coccus hesperidum*, *C. Longulus* ile taşınmaktadır (Martelli, 2014).

Grapevine leafroll associated virus 4 (GLRaV-4) ve strainlerinin bir kısmı (strain 9) unlu bitlerden (Pseudococcidae) *Ps. longispinus*, *Pl. ficus*, *Ph. aceris* ile taşınmaktadır (Martelli, 2014).

Genel olarak, GLRaV-1 ve GLRaV-3, güçlü yaprak kıvrıcıklığı semptomlarına sebep olurken, GLRaV-4 izolatları hafif semptomlara neden olmaktadır. GLRaV-2'nin bazı moleküler varyantları (örn., GLRaV-2 RG) yaprak kıvrıcıklığı belirtisi göstermez, ancak ciddi aşı uyumsuzluğu vakalarında rol oynar (Martelli, 2014).

Floemde bulunan bu farklı virüslerin ayrı ayrı ya da çeşitli kombinasyonlarda bitkiyi enfekte etmesi, yaprak kıvrılma hastalığı belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olur. Hastalık, ülkemizde bağ üretimi yapılan hemen her bölgede saptanmış olup, hastalıkla ilişkili en yaygın görülen virüslerin GLRaV-1 ve GLRaV-3 olduğu tespit edilmiştir (Gürsoy, 1991; Köklü ve Baloğlu, 2000; Ömeroğlu, 2016). Hastalığın yayılışı, enfekteli aşı kalemi ve virüsü latent olarak taşıyan asma anaçlarının kullanımı ile olmaktadır. Ayrıca, unlu bitlerden *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae) ve *P. citri* (Hemiptera: Pseudococcidae) ile Kahverengi koşnil (*Parthenolecanium corni*) (Homoptera: Coccidae) GLRaV-3'ün vektörü iken GLRaV-1'in vektörü *P. corni*'dir. Hastalığın belirtileri, büyüme mevsiminin sonuna doğru görülebilmektedir. İklim koşullarına bağlı olarak ağustos ve eylül başlarından itibaren kırmızı üzüm çeşitlerinin yaşlı yapraklarında kırmızımsı lekeler gelişir. Bu lekeler genişler ve birleşir, yaz sonunda veya sonbaharda kırmızımsı ve sarımsı renk, yaprak ayasının tamamını kapladığı halde, ana damarlar yeşil olarak kalır. Kırmızı ve beyaz üzüm çeşitlerinin her ikisinde de yaprak ayası kalınlaşır, kırılmanlaşır ve aşağı doğru kıvrılır. Enfekteli

asmalarda meyve salkımları çok kısadır. Üzümler geç ve düzensiz olgunlaşır. Sağlıklı üzüm çeşitlerinde meyveler olgun renklerini aldığı halde, hastalıklı meyveler yeşil ve beyazımsı kalır. Kırmızı üzüm çeşitlerinde salkımlarda düzensiz renklenme görülür. Bu belirtiler mevsim sonunda sürgün ucuna doğru yayılır. Beyaz üzüm çeşitlerinde ise yapraklarda beyaz-sarı renk değişimlerine ve yaprak kenarlarından aşağı doğru kıvrılmalara rastlanır. Hastalıklı asmalarda genel bodurluk ve gelişme durgunluğu hemen göze çarpar. Hastalık asma anaçlarında belirti oluşturmamasına rağmen gelişmeleri zayıflatır. Bu hastalık, meyve verimini %10-70 oranında azaltabildiği gibi, şeker oranını da düşürür. Aşı tutumu ve çeliklerin köklenme yeteneği azalır ve soğuk zararına duyarlılık artar. Bütün asma çeşitleri ve asma anaçları hastalığın konukçusudur (Anonim, 2017b).

Dünyada bu virüslerin varlığı ile ilgili çalışmalara bakıldığında,

Hewitt (1953, 1954), Amerika'da ilk olarak Santa Clara vadisinde 1948 yılında ortaya çıkan ve giderek artan cüceleşme, sürgünlerde kısıalma, yapraklarda benekleşme, şekil bozuklukları, çiçek dökümleri, ilk dönemlerde boğumlar arasında kısıalma, zikzak sürgün ve çift nodyum oluşumu gibi belirtiler oluşturan etmenin GFLV olduğunu bildirmiştir. Ancak çift nodyum oluşumu ve kısa boğumun bazen normal asmalarda da görülebildiği halde özellikle 8-11'inci boğumlardaki bu kısılmanın GFLV için tipik belirtiler olduğunu belirtmiştir.

Martelli ve Savino (1988), bağların GFLV ile bulaşık olması sonucu ömrünün kısaldığını belirtmişlerdir. GFLV ile bulaşık bitkilerde, ürünün kalitesinde ve verimde %80'e varan azalmalara neden olduğunu saptamışlardır.

Tanaka (1988), Japonya'da bağlara zarar veren virüs hastalıklarından GFLV, GFkV ve GLRV'yi sera koşullarında bazı *Vitis* türlerine ait indikatörler üzerinde yaptığı indekslemelerle saptamıştır. GFLV'nin *Chenopodium quinoa* ve *Gomphrena globosa* otsu indikatörleri üzerine mekanik inokülasyonunun zor olduğunu bildirmiştir.

Hu ve ark. (1990), bağlarda yaprak kıvrılmasına neden olan GLRaV'yi; ELISA, ISEM ve vitis indikatörler ile indeksleme yollarıyla testlemişler ve bu çalışmalarla virüsün Type 1, 2, 3 ve 4 adı verilen serotiplerini ayırmışlardır. Araştırmacılar yaprak kıvrılma

belirtilerinin bu serotiplerin bir karışımı tarafından oluşturulurken yaprak kızarıklığının farklı yoğunluk ve tipte her bir serotip tarafından bireysel olarak oluşturulabildiğini belirtmişlerdir.

Walter (1991), nepovirüslerin teşhisinde ELISA'nın yaygın olarak kullanılan güvenilir bir metod olduğunu belirtmiştir. PCR ve moleküler hibridizasyon yöntemlerinin de çok uygun yöntemler olduğunu belirtmiştir.

Rowhani (1992), GLRaV-3 ve GFLV'nin enfekteli dokularda varlığını ELISA'nın bir modifikasyonu olan F(ab')₂ antibody fragmentleri kullanarak belirlemiştir.

Sforza ve ark. (2003), Fransa'nın kuzey şarap üretim bölgelerinde GLRaV-1 ve GLRaV-3 ile enfekteli bağlardan, virüsün unlu bit ve kabuklu bitler ile taşınmasını araştırmışlardır. *Heliococcus bohemicus*, *Phenacoccus aceris* (Pseudococcidae) unlu bitleri ile *Parthenolecanium corni* (Coccidae) kabuklu bitinin taşıma verimlerinin sırasıyla %14, %23 ve %29 olduğunu bildirmişlerdir. Asmalarda virüslerin bu vektörler ile taşınmasından kaynaklanan GLRaV-1 ve GLRaV-3 enfeksiyonlarını poliklonal antikorlar kullanılarak DAS-ELISA ile doğrulamışlardır. Bu çalışma Fransa'da GLRaV-1 ve GLRaV-3'ün unlu bit ve coccid türleri ile taşındığını gösteren ilk kayıttır. Ayrıca *Heliococcus bohemicus* ile *Phenacoccus aceris*'in bu virüsleri asmalara taşıyabildiğini ortaya koyan ilk çalışmadır.

Fiore ve ark. (2009), Güney Amerika'da yaptıkları bir çalışmada, asma omcasının gelişimi boyunca farklı kısımlarından GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA ve GFkV ile enfekteli örnekleri alarak ELISA ve RT-PCR ile testlemişlerdir. Bu çalışma asma virüs hastalıklarının saptanmasında ELISA ve RT-PCR ile asma virüslerinin tespitini iyileştirmek için, en iyi bitki materyalini kullanmak ve örnekleme zamanını belirlemek için Güney Amerika'da yapılan ilk çalışmadır.

Ülkemizde bu virüslerin varlığı ile ilgili çalışmalara bakıldığında,

Akdoğan (1956, 1958, 1965), Trakya Bölgesi, Tekirdağ-Mürefte bağlarında yaygın olarak bulunan bir virüs hastalığını fizyolojik problemlerden ayırmak için çeşitli araştırmalar yapmıştır. Bu araştırmalarında, hastalıktan korunma yolları ve hastalığın

simptomatolojisi ile ilgili bilgiler vermiştir. Araştırmacı, bağlarda zararlı olan GFLV'yi simptomolojik olarak saptamıştır ve onu " Bulaşık Soysuzlaşma" olarak adlandırmıştır.

Azeri (1983), İzmir ve Manisa bağlarında Sultani çekirdeksiz çeşidinde gözlemsel olarak çalışmalar yapmıştır. Bu çalışmalarda, birçok virüs hastalığının yanı sıra GFLV'yi de saptamıştır ve bu virüsün infeksiyon oranını %100 olarak belirlemiştir.

Martelli (1987), Türkiye'de bağ alanlarında yapmış olduğu geniş kapsamlı bir survey çalışmasında, bağlarda GFLV, GLRaV, odun kırışıklığı (Rugose Wood Complex), gövde çukurlaşması (Stem Pitting), damarlarda renk açılması (*Grapevine fleck virus*) ve enasyon hastalıklarının varlığını simptomolojik olarak saptamıştır.

Azeri ve Fidan (1988), İzmir ve Manisa illerinde bağ alanlarında yaptıkları çalışmalarda, GFLV ve GLRaV virüslerini indikatör bitkiler üzerinde yaptıkları indekslemelerle saptamışlardır.

Gürsoy (1991), Tekirdağ, Yalova ve Manisa bölgesi bağlarında, bazı üzüm klon adayları üzerinde yaptığı çalışmalarda GLRaV-1 ve GLRaV-3'ün yaygın olduğunu ELISA testleriyle saptamıştır.

Özaslan ve ark. (1991), Kahramanmaraş iline ait bağlarda yaptıkları çalışmalarda, GFLV, GLRV-1, GLRV-3, GFkV ve *Alfalfa mosaic virus* (AMV)'ünü ELISA testleriyle saptamışlardır. Bölgede en yaygın virüsün GFLV olduğunu, bunu GLRV-3'ün izlediğini ve bu virüslerin bağlarda yaklaşık olarak %45 oranında ürün kayıplarına neden olduğunu saptamışlardır.

Akbaş ve Erdiller (1993), Ankara ilinde bağ alanlarında yapmış oldukları çalışmalar sonucunda bağlarda birçok virüs hastalığının yanı sıra GFLV'nin de varlığını ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar GLRaV-3'ün vitis indikatör bitkilerine indeksleme çalışmaları yapmışlardır. GFLV'yi ise serolojik ve simptomolojik olarak saptamışlardır.

Özaslan ve ark. (1993), Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgesindeki illerde, bağlarda yaptıkları araştırmalarda GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3, GFkV ve ArMV virüslerini ELISA ve vitis indikatörler üzerine indekslemelerle belirlemişlerdir.

Özaslan ve Yılmaz (1995), Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi bağlarında sürvey çalışması yapmışlardır. Toplanan örneklerde biyolojik ve serolojik testlemeler sonucunda, GFLV (%24)'nin en yaygın virüs olduğunu ve bunu Asma yaprak kıvrıcıklık virüsü (GLRaV-3) (%17.5), GLRaV-1 (%12.5), Asma flek virüsü (*Grapevine fleck virus*, GFkV) (%7.5) ve ArMV (%6.5) virüslerinin takip ettiğini saptamışlardır.

Yılmaz ve ark. (1997), Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde bağlarda sürvey çalışması yapmışlardır. Bu çalışma kapsamında, toplanan örneklerde GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3 ve GLRaV-7'nin varlığını serolojik olarak tespit etmişlerdir.

Akbaş (1998), Karaman, Konya ve Nevşehir illeri ve çevresinde bağlarda yaptığı çalışmalarda, 344 adet örneği biyolojik (otsu ve odunsu) ve serolojik (agar jel ve ELISA) olarak testlemiştir. Bu testlemeler sonucunda asma örneklerinin ArMV, GLRaV, GFLV, SLRSV, TBRV ve RpRSV ile enfekteli olduğunu tespit etmiştir. Bu üç ilin genelinde en yaygın olan virüsün GFLV olduğunu, bunu sırasıyla TBRV ve GLRaV'nin izlediğini saptamıştır. Test edilen 344 örneğin 247 (%71.8)'sinin bir ya da daha fazla virüs ile bulaşık olduğunu tespit etmiştir.

Köklü (1999), yürütmüş olduğu bir çalışmada, GLRaV-2 ile enfekteli iki farklı kaynaktan antiserum üretimi ve bu antiserumların rutin bir şekilde GLRaV-2 tespitinde kullanılmasını gerçekleştirerek (RG-40/5, 9/22) ve enfekteli *Nicotiana benthamiana* yaprakları ve floem dokularını (USA-9) kullanarak GLRaV-2'ye karşı iki ayrı antiserum elde etmiştir. USA-9 antiserumunun bağlarda virüs enfeksiyonlarının tespit edilmesinde daha etkili olduğunu saptamıştır. Biri biotin diğeri ise alkaline phosphatase ile işaretlemeye dayalı iki farklı sistem kullanmıştır. Virüsün tespitinde DASI-ELISA testlerinden DAS-ELISA'ya kıyasla daha güvenilir sonuçlar elde etmiştir.

Digiario ve ark. (2000), Güneydoğu Anadolu ve Orta Anadolu'daki bağ alanlarında yapmış oldukları çalışmalarda, GVA'nın en yaygın virüs olduğunu ve bunu GLRaV-3, GLRaV-1 ve GFkV'nin izlediğini saptamışlardır. Bunun yanı sıra GLRaV-2 ve GLRaV-6'nın da enfeksiyonlarının diğerlerine kıyasla az olmakla birlikte mevcut olduğunu tespit etmişlerdir.

Köklü ve Baloğlu (2000), 1997 ve 1998 yıllarında Trakya bölgesinde bazı üzüm çeşitlerinde asma yaprak kıvrılma virüs serotiplerinin yaygınlığının belirlenmesi amacıyla bir sürvey çalışması yapmışlardır. ELISA testlerinde toplam olarak 421 adet örneği GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3 ve GLRaV-7 açısından değerlendirmişlerdir. Toplam 421 örnekten 268'ini asma yaprak kıvrılması ile ilgili virüs serotipleriyle enfekteli olarak tespit etmişlerdir. En yaygın virüs serotipinin GLRaV-1 (%37.05) olduğunu, bunu sırasıyla GLRaV-3 (%33.01), GLRaV-2 (%7.83) ve GLRaV-7 (%4.03)'nin izlediğini belirlemişlerdir. ELISA sonucunda 191 bitki en az 1 virüs, 68'i 2 virüs, 9'u 3 virüs serotipi ile enfekteli durumda bulunmuştur. Bununla beraber 4 virüs serotipinin birlikte enfeksiyonu belirlenmemiştir. GLRaV-1 ve GLRaV-3 birlikte enfeksiyonları en sık rastlanan karışık enfeksiyon durumu olarak bulunmuştur.

Çığışar (2002), 1999-2002 yılları arasında Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Nevşehir ilinin önemli bağ alanlarında virüs ve virüs benzeri hastalıkların durumunu belirlemek amacıyla yaptığı çalışmada, toplam 1001 adet örnek toplayarak testlemiştir. Toplanan örnekler biyolojik ve serolojik teşhis metodları uygulamıştır. Bölgede en yaygın virüsün GVA (%41.2) olduğunu, bunu GLRaV-1 (%38.1), GFLV (%8.1) ve GFKV (%5.4)'nin izlediğini saptamıştır. GLRaV-1 birçok çeşitte ve ilde saptanmış, GFLV'nin yoğunluğu özellikle Elazığ'da yüksek (%46.9) olup, bu ilden toplanan tüm çeşitlere ait örneklerin bu virüsle belirli oranlarda bulaşık olduğunu saptamıştır.

Sarpkaya (2003), Gaziantep ili ve ilçelerinde bulunan bağlarda GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3 ve ArMV'yi serolojik yöntemlerle araştırmıştır. Bölgede en yaygın olarak bulunan virüsün GLRaV-3 (%30) olduğunu, bunu sırasıyla GFLV (%24), ArMV (%15) ve GLRaV-1 (%10)'in izlediğini saptamıştır. Toplanan 393 adet örneğin 181 adetini testlemiş, örneklerin %52.8'inin en az bir virüsle bulaşık olduğunu, %12.2'sinin ise birden fazla virüs etmeni içeren karışık enfeksiyonlar taşıdığını belirlemiştir.

Tarla (2005), Adana ve Mersin çevresindeki bağlarda, asmalarda GFLV varlığını serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak araştırmıştır. Toplam 384 örnek DAS-ELISA yöntemiyle testlenmiş ve 63 örnekte virüs bulaşıklığı tespit edilmiştir. Bu çalışma kapsamında, bağlarda bitkilerin kök bölgesinden alınan 307 toprak örneğinden 66'sında ise virüs vektörü *X. index*'i tespit etmiştir.

Buzkan ve ark. (2012), Türkiye’de 2006 ve 2007 yıllarının Temmuz ve Ağustos aylarında yaptıkları srvey çalışmalarında, unlu bit istilası ile yaprak kıvrıcıklığı ve mantarimsı odun hastalıklarına neden olan viral ajanları araştırmışlardır. zm yetiştiriciliğinin yaygın olarak yapıldığı bölgelerden asma ve böcek örneklerini toplamışlar ve bunlardan nükleik asit izole etmişlerdir. Bcekle taşınan virüslerden GVA, GVB, GLRaV-1 ve GLRaV-3’ tespit etmek için RT-PCR yöntemini kullanmışlardır. Örneklerde GVB dışında tüm virüsleri tespit etmişlerdir. *Planococcus ficus* (Signoret)’un, örneklenen bölgelerde yaygın görülen tek unlu bit türü olduğunu belirlemişlerdir. Bu alışma adı geçen virüslerin epidemiyojileri ve bunların potansiyel vektörleri hakkında Türkiye’de yapılan ilk çalışma niteliğindedir.

Kaya ve Erilmez (2014), 2007 ve 2010 yıllarında İzmir ve Manisa’da, 2009 ve 2010 yıllarında ise Çanakkale ve Denizli illerinde bağ alanlarındaki virüs hastalıklarını belirlemek amacıyla çalışma yapmışlardır. Hastalık etmenlerinin tanılanması serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak yapılmıştır. DAS-ELISA testi sonucu asma bitkilerinde GFLV, GFkV, ArMV, GLRaV-1, -2, -3, -4 ve -9 enfeksiyonu olduğunu saptamışlardır. PCR analiz sonuçları, DAS-ELISA sonuçları ile paralel olmuş ve birbirini doğrulamıştır. PCR alışmalarında, GFLV, GFkV, GLRaV-1, -2, -3 ve -4’e ait bantlar elde etmişlerdir.

Tülek (2014), 2013 ve 2014 yıllarında Edirne, Tekirdağ ve Kırklareli illerinde, bağ alanlarında asmalarda ve omcalarda kısa boğum hastalığına neden olan GFLV ile bu virüsün vektörü olan *Xiphinema index* nematodunun yaygınlık durumunun belirlenmesi ve vektör nematod ile GFLV arasındaki ilişkinin saptanması amacıyla araştırma yapmıştır. DAS-ELISA testi sonucuna göre, 152 adet yaprak ve doku örneğinin 35 adedini GFLV ile enfekteli olarak saptamıştır. GFLV enfekteli olarak saptanan omcaların 9 adedinin toprak rneğinde *Xiphinema index*’e rastlamış, 13 omcanın toprak rneğinde *Xiphinema pachtaicum* nematod türünü tanılanmış ve enfekteli omcalardan 13 adedinin toprak örneğinde ise herhangi bir *Xiphinema* nematod türünü saptamamıştır. GFLV saptanan omcalara virüsün aşılı asma fidanı üretimi sırasında, budama esnasında mekanik inokulasyonla bulaşmış olabileceğini ve hatalı fidan seçiminden de kaynaklanabileceğini bildirmektedir.

Türkmen (2014), Ankara, Manisa, İzmir, Denizli, Nevşehir, Elazığ, Çanakkale, Edirne, Tekirdağ ve Kırklareli'deki bağlarda, GLRaVs'nin varlığını DAS-ELISA yöntemini kullanarak araştırmıştır. Testlenen 213 asma örneğinden 143 (%67.14) 'ünde bir ya da birden fazla virüs tespit etmiştir. Örneklerin sırasıyla GLRaV 4-9 (%81.12), GLRaV-1 (%75), GLRaV-7 (%62.10), GLRaV-3 (%50.35), GLRaV-2 (%48.95) ve GLRaV-6 (%5.65) ile enfekteli olduğunu saptamıştır. En sık karşılaşılan karışık enfeksiyon şeklinin ise %25.95 ile GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV 4-9 ve GLRaV-7'nin birlikte oluşturduğu enfeksiyon olduğunu tespit etmiştir.

İnce ve Yavuz (2015), Doğu Akdeniz Bölgesi'ndeki bağlarda yapmış oldukları çalışmada, toplanan örnekleri serolojik bir tanılama yöntemi olan DAS-ELISA yöntemiyle testlemişlerdir. Test sonucunda GLRaV-1'in en yaygın virüs olduğunu tespit etmişlerdir. Bunu sırasıyla GLRaV-4, -9, -3, -2 ve -6'nın izlediğini rapor etmişlerdir. Bu çalışma Doğu Akdeniz Bölgesi'nde GLRaV-6'nın varlığına ilişkin ilk rapordur.

Önder ve ark. (2015), Ege Bölgesi'nde yetiştirilen üzüm çeşitlerinde GFLV'nin yaygınlık durumunu araştırmışlardır. Çalışma kapsamında 17 farklı asma çeşidinden GFLV'ye benzer simptomlar gösteren toplam 423 yaprak ve sürgün örneğini serolojik bir tanı yöntemi olan DAS-ELISA yöntemiyle testlemişlerdir. Test sonuçlarına göre 423 örnekten 88'ini GFLV ile enfekteli olarak tespit etmişlerdir. Bölge genelinde GFLV'nin yaygınlık oranını ise %20.8 olarak belirlemişlerdir. Çalışma, Ege Bölgesi bağlarında yetiştiricilik yapılan alanlar ve bu alanlarda yetiştirilen çeşitlerin dağılım oranları dikkate alınarak gerçekleştirilen ilk çalışma özelliğini taşımaktadır.

Balsak (2016), Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde yerli asma çeşitlerinin yetiştirildiği ticari bağ alanlarında toplam 206 adet bitkisel örnekte, *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB) ve GFLV'nin tanınmasını virüs spesifik primerle RT-PCR yöntemiyle gerçekleştirmiştir. RT-PCR testlerinde GVA, GVB, GFLV'nin sırasıyla 429 bç, 460 bç ve 259 bç büyüklüğünde DNA bantlarını elde etmiştir. Pozitif bulunan GVA, GVB ve GFLV izolatlarının nükleotid dizinleri ClustalW ile hizalanmış ve Blastn ile NCBI'da kayıtlı diğer izolatlarla filogenetik ilişkilerini neighbour-joining metoduyla incelemiştir.

Erilmez ve Kaya (2016), asma virüslerinin tanılanmasında DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemlerinin duyarlılıklarının karşılaştırılması amacıyla çalışma yapmışlardır. Manisa ve İzmir illerinde bağ alanlarından toplanan 50 örneği DAS-ELISA ve RT-PCR yöntemlerini kullanarak testlemişlerdir. Yapılan testlerin sonucunda asma bitkilerinde GFLV, GFkV, ArMV, GLRaV-1,-2,-3,-4 ve -9 etmenlerini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar PCR analiz sonuçları ve DAS-ELISA sonuçlarının paralel olduğunu ve birbirini doğruladığını belirtmişlerdir.

Ömeroğlu (2016), Tekirdağ il merkezi, Şarköy ve Marmara Ereğlisi ilçelerinde bazı bağ alanlarında asma yaprak kıvrılma virüslerinin (GLRaVs) yaygınlığını araştırmıştır. Toplam 298 adet örneği ELISA yöntemiyle testlemiştir. Test sonucunda 298 örneğin 117'sinde pozitif sonuç elde etmiştir. Test edilen 298 bitki örneğinden 82'sini GLRaV-1 (%27.5), 56'sını GLRaV-3 (%18.7), 8'ini GLRaV-2 (%2.6), 1'ini GLRaV-5 (%0.3) ile enfekteli bulmuştur. Çalışmada örneklerin 20'sini GLRaV-1 + GLRaV-3, 3'ünü GLRaV-1 + GLRaV-2, 2'sini GLRaV-2 + GLRaV-3, 1'ini GLRaV-1 + GLRaV-5, 2'sini ise GLRaV-1 + GLRaV-2 + GLRaV-3 çoklu enfeksiyonları ile enfekteli olarak tespit etmiştir. Enfeksiyon tipleri içerisinde sadece 1 virüsün tespit edildiği örnek sayısını 89 (%29.86), birden fazla virüs ile enfeksiyonların sayısını 28 (%9.3) olarak belirlemiştir.

Önder (2016), 2011-2015 yılları arasında Ege Bölgesi'nde bağcılığın yoğun olarak yapıldığı illerde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-6, GLRaV-7, GLRaV-9, GLRaV-Pr ve GLRaV-De) serolojik yöntemlerden DAS-ELISA ve moleküler yöntemlerden Real-time RT-PCR kullanılarak bulunma durumlarının saptanması amacıyla çalışma yapmıştır. 2011 ve 2012 yıllarında İzmir, Aydın, Denizli, Manisa ve Uşak illerinden toplanan örneklerde gerçekleştirilen DAS-ELISA ve Real-time RT-PCR testleri sonucunda 424 örneğin 133 (%31.4)'ünün asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerden en az biri ile enfekteli olduğunu saptamıştır. Karışık enfeksiyonlar dikkate alınmadan genel bir değerlendirme yapıldığında GLRaV-Pr'nin %16.8'lik bulunma durumuyla en yaygın virüs olduğunu, bunu GLRaV-De (%12), GLRaV-3 (%8.5), GLRaV-2 (%2.8), GLRaV-4 (%2.4), GLRaV-9 (%0.9), GLRaV-1 (%0.5), GLRaV-5 (%0.2) ve GLRaV-7 (%0.2)'nin izlediğini; GLRaV-6 açısından ise enfekteli örneğin

tespit edilemediğini belirtmiştir. Testlenen 424 örneğin %22.2'sinin bir, %9.2'sinin ise birden fazla virüsle enfekteli olduğunu saptamıştır. Bu çalışma ile ülkemiz bağlarında GLRaV-9, GLRaV-Pr ve GLRaV-De virüslerinin varlığı ilk kez saptanmıştır.

Önder ve ark. (2016), Ege Bölgesi bağ alanlarında sorun olan önemli bazı viral etmenlerden; GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2 ve GLRaV-3'ü Syber Green I temelli Real-Time PCR yöntemi ile teşhis etmişlerdir. Daha önceden serolojik (DAS-ELISA) ve konvansiyonel RT-PCR tanı yöntemleriyle GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2 ve GLRaV-3 virüsleri açısından enfekteli olduğu tespit edilen örnekleri kullanmışlar, sağlıklı bitki örneklerini ise negatif kontrol olarak kullanmışlardır. Söz konusu tüm virüs etmenlerini Syber Green I temelli Real-time PCR yöntemi ile başarılı bir şekilde teşhis etmişlerdir.

Öztürk (2017), Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde otokton asma varyetelerinde Asma virüs D (*Grapevine virus D*, GVD)'nin bulunma düzeyi ve izolatlarının populasyon çeşitliliğini araştırmıştır. Testlenen toplam 175 asma örneğinden hazırlanan cDNA'ların, GVD-spesifik primerleriyle elde edilen PCR DNA'larının elektroforetik analizinde 13 örnekte 474 bç büyüklüğünde DNA bantlarını gözlemlemiştir. GVD bu araştırmayla ilk kez Türkiye'de asmalarda rapor edilmiştir.

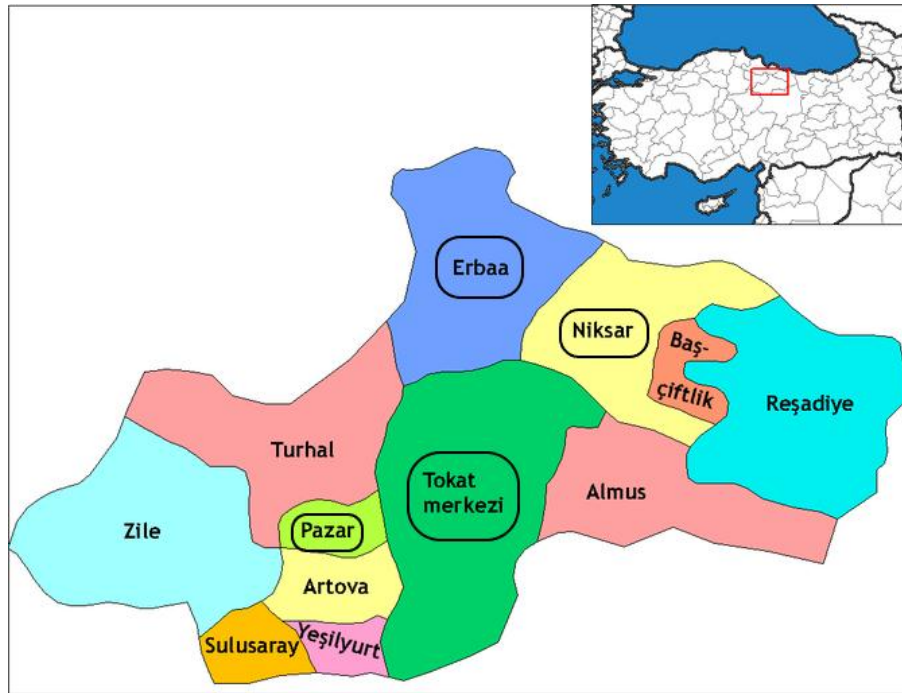
Yakar (2017), Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde bağcılığın yaygın olduğu alanlarda, otokton (yerli) asma varyetelerinde GLRaV-2'nin bulunma durumu ve izolatlarının genetik çeşitliliğini araştırmıştır. Bu amaçla iki aşamalı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemini, virüse spesifik hazırlanmış primer dizinlerini (LR-2F/LR-2R) kullanarak uygulamıştır. Testlenen toplam 206 adet asma örneğinden 4 tanesinde GLRaV-2 primerleriyle 543 bç büyüklüğünde DNA bantlarını gözlemlemiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan bitki materyali için, 2018 yılında Tokat ilinde bağcılığın yoğun olarak yapıldığı Merkez, Erbaa, Niksar ve Pazar ilçelerindeki bağ alanlarında sonbahar döneminde sürveyler yapılmıştır (Şekil 3.1). Sürveyler esnasında bağlarda, asmaların virüs belirtisi gösteren genç yapraklarından ve bir yaşlı sürgünlerinden örnekleme yapılmıştır. Toplanan örnekler polietilen torbalar içinde etiketlenerek buz kutusunda laboratuvara getirilmiştir. Örnekler testleninceye kadar kısa süre için +4 °C’de, uzun süre için -80 °C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Sürveyler esnasında güdümlü örnekleme yapılmış olup, alınan örnek sayısı bağın büyüklüğü göz önünde bulundurularak belirlenmiştir.

Asma yelpaze yaprak virüsü (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) ve Asma yaprak kıvrıcıklığı virüsü (*Grapevine leafroll associated virus*, GLRaV)’nün tespiti için tipik hastalık belirtisi gösteren asmalardan örnekler alınmıştır. Hastalık belirtisinin gözlemlenmediği şüpheli durumlarda (maskelenme) belirti göstermeyen asmalardan da örnekler alınmıştır.



Şekil 3.1. Sürvey yapılan ilçeler

3.2. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için toplanan örneklerin, yaprak ana damarları, sapları ve bir yaşlı sürgünlerin floem kazıntıları kullanılmıştır. Bağ alanlarından toplanan örneklerden RNA izolasyonu Li ve ark. (2008)'nin protokolü modifiye edilerek aşağıdaki gibi yapılmıştır.

Her bitki örneğinden 100 mg tartılıp üzerine sıvı azot ilave edilerek havanda ezilmiştir. Ezilen örnekler 1.5 ml'lik ependorf tüplere alınmıştır. Her bir tüp üzerine 1 ml CTAB buffer (%2 CTAB, %2 PVP-40, 100 mM Tris-HCl PH:8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA) ilave edilmiştir. Tüpler -20 °C'de 5-10 dk bekletilmiştir. Her bir tüpün içine %0.2 mercaptoethanol ilave edildikten sonra tüpler 65 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra tüpler 10 000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra yeni bir ependorf tüpe 650 µl supernatant transfer edildikten sonra üzerine eşit miktarda kloroform-isoamly alkol (24/1) ilave edilmiştir. Daha sonra bu karışım alt üst edilerek karıştırılıp 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Tüpler 15 000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra 500 µl supernatant yeni bir tüpe alınıp üzerine 350 µl isopropanol eklenip 10 dk -20 °C'de bekletilmiştir. Tüpler 15 000 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra oluşan üst sıvılar dökülmüş ve tüplerin içinde kalan peletler 500'er µl %70'lik alkol ile yıkayıp tekrar 15 000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra oluşan üst sıvılar uzaklaştırılmış ve tüpler kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek kurumaya bırakılmıştır. Kurutma işleminin ardından tüplerin içine 50'er µl RNase içermeyen saf su eklenip PCR işlemlerinde kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.3. RT-PCR Yöntemi

3.3.1. Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Toplam RNA izolasyonu yapılan örneklerden elde edilen RNA'lar kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezi iki farklı yöntem ile gerçekleştirilmiştir. İlk yöntemde, cDNA sentezi yapılırken ependorf tüpler içerisinde 2 µl toplam RNA, 1 µl random heksamer primer (5'-d(NNNNNN)-3'N = G, A, T veya C)(10 µmol) ve 8 µl distile su ile karıştırılmıştır. Karışım 65 °C'de 5 dakika inkübasyondan sonra buz üzerine alınmıştır ve 3 dakika buzda bekletilmiştir. Tüplerin içerisine 5X MMLV buffer

(5X), 0.2 mM dNTP (25 mM), 0.5 µl random hexamer primer (10 µmol), 0.25 µl RNAse inhibitör (10u/µl), 0.25 µl reverse transkriptaz (20-20u/µl) ve distile su bulunan karışımdan 10 µl ilave edilerek her bir tüp 20 µl'ye tamamlanmıştır. Tüpler daha sonra thermocycler cihazında 25 °C'de 5 dakika, 42 °C'de 60 dakika ve 72 °C'de 10 dakika inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

İkinci yöntemde ise, Wizscript marka enzimle cDNA sentezi yapılmış ve ependorf tüpler içerisine izolasyonu yapılan örneklerden 5 µl koyulmuştur, 65 °C'de 5 dakika inkübasyondan sonra buz üzerine alınmıştır ve 3 dakika buzda bekletilmiştir. Tüplerin içerisine 1 µl 10X reaction buffer, 0.5 µl 20X dNTP (2.5mM), 1 µl hexamer primer, 0.5 µl reverse transcriptase enzimi, 0.25 µl RNAse inhibitör, 1.75 µl distile su içeren karışımdan 5'er µl eklenmiştir. Daha sonra ependorf tüpler thermocycler cihazında 25 °C'de 10 dakika, 37 °C'de 120 dakika ve 85 °C'de 5 dakika inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. PCR yöntemi

İlk aşamada elde edilen cDNA kalıp olarak kullanılarak söz konusu virüslere spesifik primerlerle (Çizelge 3.1.) PCR işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada virüslere spesifik olarak kullanılan primerler ve baz dizilimleri

Hedef Virüs/Primer	Primer Dizilimi	Baz Uzunluğu	Referans
GFLV-V1-F GFLV-C1-R	ACCGGATTGACGTGGGTGAT CCAAAGTTGGTTTCCAAGA	321 bp	Rowhani ve ark., 1993
GLRaV 1-F GLRaV 1-R	CGACCCCTTATTGTTTGAGTATG GTTACGGCCCTTTGTTTATTATGG	401 bp	Martin ve ark., 2005
GLRaV 2-F GLRaV 2-R	ATAATTCGGCGTACATCCCCACTT GCCCTCCGCGCAACTAATGACAG	332 bp	Martin ve ark., 2005
GLRaV 3- LR3-8504V GLRaV 3- LR3-9445C	ATGGCATTGAACTGAAATT CTACTTCTTTTGCAATAGTT	940 bp	Ling ve ark., 2004
GLRaV 4up GLRaV 4do	CCAAGTGTGCGTGGGTATAAGGAAT CCCAGACACCGTCTTACTACTIA	243 bp	Maliogka ve ark., 2008
GLRaV 9-F GLRaV 9-R	CGGCATAAGAAAAGATGGCAC TCATTCACTGCTTTGAAC	393 bp	Alkowni ve ark., 2004

Sentezi yapılan cDNA'ların PCR analizi için; her örnek için toplam 25 µl hacimde; 2.5 µl cDNA, 2.5 µl 10X Taq polimeraz buffer, 0.2 µl dNTP (25mM), 0.5'er µl çalışma konusu virüse ait forward ve reverse primer, 2 µl MgCl₂, 0.25 µl Taq polimeraz ve 16.5

ul dH₂O eklenerek PCR tüplerinin içinde karışım hazırlanmıştır. Tüpler daha sonra thermocycler cihazına yerleştirilerek PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

PCR koşulları çalışmada kullanılan primerlerin bağlanma sıcaklığına göre değişmekte olup literatürde bildirilen koşullara göre aşağıdaki gibi uygulanmıştır.

PCR programları:

GFLV, GLRaV-1 ve GLRaV-2 için;

94 °C'de 5 dk
94 °C'de 1 dk
55 °C'de 1 dk
72 °C'de 2 dk
72 °C'de 10 dk

} 35 döngü

GLRaV-3 için;

95 °C'de 2 dk
95 °C'de 1 dk
48 °C'de 1 dk
72 °C'de 1 dk
72 °C'de 7 dk

} 35 döngü

GLRaV-4 ve GLRaV-9 için;

94 °C'de 2 dk
94 °C'de 30 sn
55 °C'de 45 sn
72 °C'de 30 sn
72 °C'de 7 dk

} 35 döngü

3.4 Agaroz Jel Elektroforez Çalışmaları

Virüslere spesifik primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen PCR ürünleri %1.2 oranında hazırlanan, içerisinde 10 mg/ml ethidium bromid bulunan agaroz jelde 100 V'ta 1 saat elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforez işlemi sonunda görüntüleme cihazında UV ışık altında görüntüleme işlemi yapılmıştır.

3.5 Filogenetik Analiz Çalışmaları

Filogenetik çalışmalar için, RT-PCR işlemi sonunda pozitif bant elde edilen PCR ürünleri Sanger yöntemi ile DNA dizi analizine gönderilmiştir. Sekanslama sonunda elde edilen veriler Chromas bilgisayar programı kullanılarak baştan ve sondan okunmayan kısımlar temizlenmiş ve tek bir dosya halinde kaydedilmiştir. Dizileme çalışmaları çift yönlü yapılmış olup elde edilen forward ve reverse diziler “CAP3 Sequence Assembly” bilgisayar programı kullanılarak birleştirilip konsensus diziler elde edilmiştir. Veriler daha sonra National Center for Biotechnology Information (NCBI) gen bankasında kayıtlı referans izolatlarla kıyaslanarak filogenetik ağaç oluşturulmuş ve akrabalık dereceleri karşılaştırılmıştır (Anonim, 2019c). Filogenetik analiz, MEGA10 bilgisayar programında neighbor-joining metodu kullanılarak ve bootstrap değeri (ağaç topolojisi kuvveti) 1000 alınarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

Tokat ilinde ekonomik açıdan bağcılık önemli bir yere sahiptir. Bağcılığın önemli sorunlarından biri olan virüs hastalıklarından dolayı üzümlerde önemli verim kayıpları yaşanmaktadır. Tokat ili bağ alanlarında viral etmenlerin bulunmasıyla ilgili daha önceden yapılmış az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yürütülen bu çalışma ile Tokat Merkez, Erbaa, Nıksar ve Pazar ilçelerindeki bazı bağ alanlarında GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4 ve GLRaV-9 virüslerinin varlığı moleküler yöntemlerle (RT-PCR) araştırılmıştır. Araştırmada filogenetik analiz çalışmaları yapılmış, RT-PCR testleri sonucunda pozitif sonuç veren izolatlar çift yönlü sekans analizine gönderilmiş olup, analiz sonucunda elde edilen veriler MEGA10 bilgisayar programı ile analiz edilerek filogenetik ağaç oluşturulmuş ve akrabalık dereceleri karşılaştırılmıştır.

4.1. Sürvey Sonuçları

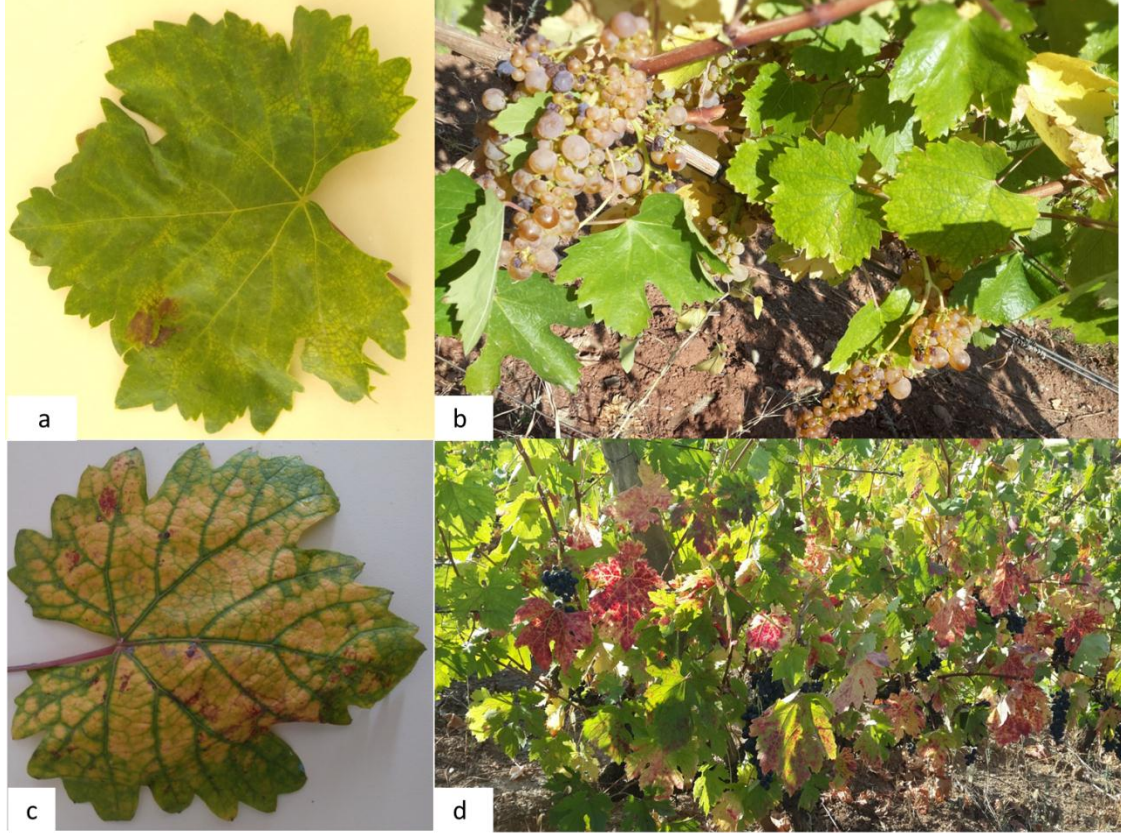
Çalışma için 2018 yılında Tokat Merkez köylerinden Emirseyit'ten 10, Büyükyıldız'dan 14, Küçükyıldız'dan 20, Merkez Fakülte bahçesinden 3 olmak üzere toplam 47 adet; Erbaa köylerinden Karakaya'dan 14, Ballıbağ'dan 18, Üzümlü'den 16 olmak üzere toplam 48 adet; Nıksar köylerinden Gökçeli'den 8, Gürçeşme'den 13 olmak üzere toplam 21 adet ve Pazar Üzümlü köyünden 81 adet olmak üzere toplam 197 adet asma örneği toplanmıştır (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Tokat Merkez, Erbaa, Nıksar ve Pazar'dan alınan örnek sayıları

İlçe	Örnek Sayısı (Adet)
Merkez	47
Erbaa	48
Nıksar	21
Pazar	81
Toplam	197

Alınan örneklerdeki belirtiler; mozaik, sararma, damarlar yeşil-damar aralarında sararma, damarlarda sararma-damar aralarında yeşil renk oluşumu, damarlarda renk açılması, damar bantlaşması, şekil bozuklukları, kızarıklık, yaprakların ana damarları yeşil-damar aralarında kırmızılaşma, nekrotik lekeler, kahverengi lekeler, beneklenme, kabarmalar, yapraklarda içe doğru kıvrılma, yaprakta diş sayısında artış, yelpaze yaprak oluşumu, salkım sayısında azalma ve küçülme, meyve tutumunda azalma, irili ufaklı

tane oluşumu, düzensiz renklenme, gelişme geriliği ve genel bodurluk şeklinde gözlemlenmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. a) Mozaik b) İrili ufaklı tane oluşumu c) Damar aralarında sararma d) Kırmızılaşma

Alınan asma örneklerinin alındığı bağın yeri, alınan örneklerin kodu ve örneklerde gözlemlenen simptomlar Çizelge 4.2- 4.5.'te verilmiştir.

Çizelge 4.2. Tokat Merkez'den toplanan örnekler

İlçe	Köy	Kod	Belirtiler
MERKEZ	Emirseyyit	Es1-1	Mozaik
	Emirseyyit	Es1-2	Sararma
	Emirseyyit	Es1-3	Damarlar yeşil, damar aralarında sararma, mozaik
	Emirseyyit	Es1-4	Damarlar yeşil, damar aralarında sararma, mozaik
	Emirseyyit	Es1-5	Damarlarda sararma, damar araları yeşil
	Emirseyyit	Es1-6	Damarlarda sararma, mozaik
	Emirseyyit	Es2-1	Sararma
	Emirseyyit	Es2-2	Mozaik, kabarmalar
	Emirseyyit	Es3-1	Sararma
	Emirseyyit	Es4-1	Damarlar yeşil, damar aralarında sararma, mozaik

Çizelge 4.2. (Devam) Tokat Merkez'den toplanan örnekler

MERKEZ	Büyükyıldız	By1-1	Kızarıklık ve mozaik
	Büyükyıldız	By1-4	Kızarıklık ve sararma, hafif kabarmalar
	Büyükyıldız	By2-1	Mozaik
	Büyükyıldız	By2-2	Sararma
	Büyükyıldız	By2-3	Damar bantlaşması, mozaik
	Büyükyıldız	By2-4	Mozaik
	Büyükyıldız	By3-1	Kızarıklık
	Büyükyıldız	By3-2	Mozaik ve şekil bozukluğu
	Büyükyıldız	By3-3	Hafif mozaik, şekil bozukluğu
	Büyükyıldız	By4-1	Sararma
	Büyükyıldız	By5-1	Sararma ve şekil bozukluğu
	Büyükyıldız	By5-2	Sararma ve mozaik
	Büyükyıldız	By5-3	Şiddetli mozaik
	Büyükyıldız	By5-4	Nekrotik leke
	Küçükyıldız	Ky1-1	Nekrotik leke ve sararma
	Küçükyıldız	Ky1-2	Şiddetli mozaik ve şekil bozukluğu
	Küçükyıldız	Ky1-3	Mozaik ve şekil bozukluğu
	Küçükyıldız	Ky1-4	Şekil bozukluğu ve mozaik, kabarmalar
	Küçükyıldız	Ky1-5	Nekrotik leke ve sararma
	Küçükyıldız	Ky1-6	Nekrotik leke ve sararma
	Küçükyıldız	Ky1-7	Şekil bozukluğu ve mozaik
	Küçükyıldız	Ky1-8	Şekil bozukluğu ve mozaik
	Küçükyıldız	Ky2-1	Şekil bozukluğu ve mozaik
	Küçükyıldız	Ky2-2	Şekil bozukluğu, nekrotik leke
	Küçükyıldız	Ky2-3	Nekrotik leke ve mozaik
	Küçükyıldız	Ky2-4	Şiddetli mozaik
	Küçükyıldız	Ky2-5	Mozaik
	Küçükyıldız	Ky3-1	Şekil bozukluğu ve mozaik
	Küçükyıldız	Ky3-2	Mozaik
	Küçükyıldız	Ky3-3	Nekrotik leke, mozaik
	Küçükyıldız	Ky3-4	Kızarıklık
	Küçükyıldız	Ky3-5	Şekil bozukluğu ve kabarmalar
	Küçükyıldız	Ky3-6	Sararma, şekil bozukluğu
	Küçükyıldız	Ky3-7	Mozaik
	Fakülte	4s-1o	Sararma, mozaik
	Fakülte	3s-8o	Sararma, mozaik
	Fakülte	10s-11o	Sararma, mozaik

Çizelge 4.3. Tokat Erbaa ilçesinden toplanan örnekler

İlçe	Köy	Kod	Belirtiler
ERBAA	Karayaka	Ka1-1	Belirti yok
	Karayaka	Ka1-2	Hafif mozaik
	Karayaka	Ka1-3	Hafif mozaik
	Karayaka	Ka2-1	Hafif sararma
	Karayaka	Ka2-2	Sararma
	Karayaka	Ka2-3	Şekil bozukluğu
	Karayaka	Ka2-4	Şekil bozukluğu
	Karayaka	Ka2-5	Nekrotik leke
	Karayaka	Ka2-6	Sararma
	Karayaka	Ka3-1	Nekrotik leke
	Karayaka	Ka3-2	Belirti yok
	Karayaka	Ka3-3	Belirti yok
	Karayaka	Ka4-1	Şiddetli mozaik
	Karayaka	Ka4-3	Belirti yok
	Ballıbağ	Ba1-1	Mozaik
	Ballıbağ	Ba1-2	Damar bantlaşması
	Ballıbağ	Ba1-3	Damar bantlaşması
	Ballıbağ	Ba1-4	Damar bantlaşması, mozaik
	Ballıbağ	Ba1-5	Hafif mozaik
	Ballıbağ	Ba1-7	Hafif sararma
	Ballıbağ	Ba2-1	Nekrotik leke
	Ballıbağ	Ba2-2	Mozaik
	Ballıbağ	Ba2-3	Nekrotik lekeler
	Ballıbağ	Ba2-4	Hafif mozaik
	Ballıbağ	Ba2-5	Nekrotik leke
	Ballıbağ	Ba2-6	Hafif mozaik
	Ballıbağ	Ba3-1	Kızarıklık
	Ballıbağ	Ba3-2	Belirti yok
	Ballıbağ	Ba3-3	Hafif mozaik
	Ballıbağ	Ba4-1	Mozaik, şekil bozukluğu
	Ballıbağ	Ba4-2	Hafif sararma, hafif mozaik, nekrotik leke
	Ballıbağ	Ba4-3	Belirti yok
	Üzümlü	Ü1-1	Mozaik, dişlenme
	Üzümlü	Ü1-5	Mozaik
Üzümlü	Ü2-1	Mozaik, hafif sararma	
Üzümlü	Ü2-2	Sararma, mozaik	
Üzümlü	Ü2-3	Sararma, mozaik	
Üzümlü	Ü2-4	Sararma, mozaik	
Üzümlü	Ü3-1	Sararma, mozaik	

Çizelge 4.3. (Devam) Tokat Erbaa ilçesinden toplanan örnekler

ERBAA	Üzümlü	Ü3-2	Hafif mozaik
	Üzümlü	Ü3-3	Mozaik
	Üzümlü	Ü3-4	Sararma, mozaik
	Üzümlü	Ü4-1	Damarlarda renk açılması
	Üzümlü	Ü4-2	Dışlenme, yelpaze yaprak oluşumu
	Üzümlü	Ü4-3	Dışlenme, yelpaze yaprak oluşumu
	Üzümlü	Ü4-4	Sararma, mozaik
	Üzümlü	Ü4-5	Dışlenme
	Üzümlü	Ü4-6	Nekrotik leke

Çizelge 4.4. Tokat Niksar ilçesinden toplanan örnekler

İlçe	Köy	Kod	Belirtiler
NIKSAR	Gökçeli	Gç2-1	Sararma, mozaik, nekrotik lekeler
	Gökçeli	Gç2-2	Sararma
	Gökçeli	Gç2-4	Sararma
	Gökçeli	Gç3-1	Sararma, mozaik
	Gökçeli	Gç3-2	Sararma, mozaik, nekrotik leke
	Gökçeli	Gç3-4	Sararma, mozaik
	Gökçeli	Gç3-5	Nekrotik lekeler
	Gökçeli	Gç3-6	Sararma, nekrotik leke
	Gürçeşme	G1-1	Mozaik, nekrotik lekeler
	Gürçeşme	G1-2	Kızarıklık, sararma
	Gürçeşme	G1-3	Kızarıklık
	Gürçeşme	G1-4	Kahverengi lekeler, nekrotik leke
	Gürçeşme	G1-6	Mozaik ve kızarıklık
	Gürçeşme	G2-1	Kızarıklık
	Gürçeşme	G2-2	Kızarıklık
	Gürçeşme	G2-3	Kızarıklık
	Gürçeşme	G2-4	Kızarıklık
	Gürçeşme	G2-5	Kızarıklık
	Gürçeşme	G3-1	Mozaik, şekil bozukluğu
	Gürçeşme	G3-2	Sararma, şekil bozukluğu
Gürçeşme	G3-3	Mozaik	

Çizelge 4.5. Tokat Pazar ilçesinden toplanan örnekler

İlçe	Köy	Kod	Belirtiler
PAZAR	Üzümören	ÜÖ1-1	Sararma
	Üzümören	ÜÖ1-2	Sararma
	Üzümören	ÜÖ1-3	Sararma
	Üzümören	ÜÖ1-4	Sararma
	Üzümören	ÜÖ1-5	Sararma

Çizelge 4.5. (Devam) Tokat Pazar ilçesinden toplanan örnekler

PAZAR	Üzümören	ÜÖ2-1	Sararma
	Üzümören	ÜÖ2-2	Sararma
	Üzümören	ÜÖ2-3	Sararma
	Üzümören	ÜÖ2-4	Sararma
	Üzümören	ÜÖ3-1	Kızarıklık
	Üzümören	ÜÖ3-2	Kızarıklık
	Üzümören	ÜÖ3-3	Kızarıklık
	Üzümören	ÜÖ3-4	Kızarıklık
	Üzümören	ÜÖ3-5	Kızarıklık
	Üzümören	ÜÖ3-6	Kızarıklık
	Üzümören	ÜÖ4-2	Sararma
	Üzümören	ÜÖ4-3	Sararma
	Üzümören	ÜÖ4-4	Sararma
	Üzümören	ÜÖ5-1	Sararma
	Üzümören	ÜÖ5-2	Sararma
	Üzümören	ÜÖ5-3	Sararma
	Üzümören	ÜÖ5-4	Sararma
	Üzümören	ÜÖ5-5	Sararma
	Üzümören	ÜÖ5-6	Sararma
	Üzümören	ÜÖ6-1	Kızarıklık
	Üzümören	ÜÖ6-2	Kızarıklık
	Üzümören	ÜÖ6-3	Kızarıklık
	Üzümören	ÜÖ6-5	Kızarıklık
	Üzümören	ÜÖ6-6	Kızarıklık
	Üzümören	ÜÖ7-1	Kızarıklık
	Üzümören	ÜÖ7-2	Kızarıklık
	Üzümören	ÜÖ7-3	Kızarıklık
	Üzümören	ÜÖ7-4	Kızarıklık
	Üzümören	ÜÖ7-5	Kızarıklık
	Üzümören	ÜÖ7-6	Kızarıklık
	Üzümören	ÜÖ7-7	Kızarıklık
	Üzümören	ÜÖ7-8	Kızarıklık
	Üzümören	ÜÖ7-9	Kızarıklık
	Üzümören	ÜÖ8-1	Sararma
	Üzümören	ÜÖ8-2	Sararma
	Üzümören	ÜÖ8-3	Sararma
	Üzümören	ÜÖ8-4	Sararma
	Üzümören	ÜÖ8-5	Sararma
	Üzümören	ÜÖ8-6	Sararma
	Üzümören	ÜÖ8-7	Sararma

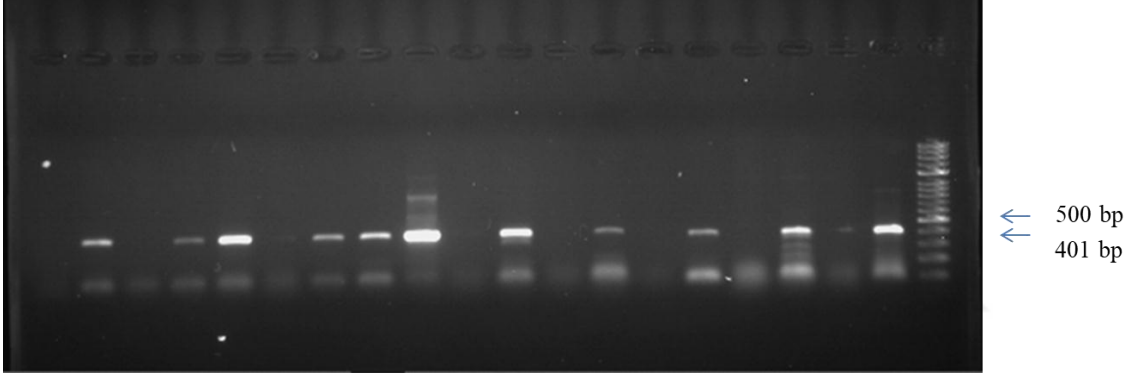
Çizelge 4.5. (Devam) Tokat Pazar ilçesinden toplanan örnekler

PAZAR	Üzümören	ÜÖ8-8	Sararma
	Üzümören	ÜÖ9-1	Sararma
	Üzümören	ÜÖ9-2	Sararma
	Üzümören	ÜÖ9-3	Sararma
	Üzümören	ÜÖ9-4	Sararma
	Üzümören	ÜÖ9-6	Sararma
	Üzümören	ÜÖ9-7	Sararma
	Üzümören	ÜÖ9-8	Sararma
	Üzümören	ÜÖ9-9	Sararma
	Üzümören	ÜÖ9-10	Sararma
	Üzümören	ÜÖ9-11	Sararma
	Üzümören	ÜÖ10-1	Sararma
	Üzümören	ÜÖ10-2	Sararma
	Üzümören	ÜÖ10-3	Sararma
	Üzümören	ÜÖ10-4	Sararma
	Üzümören	ÜÖ10-5	Sararma
	Üzümören	ÜÖ10-6	Sararma
	Üzümören	ÜÖ10-7	Sararma
	Üzümören	ÜÖ10-8	Sararma
	Üzümören	OS-1	Kızarıklık
	Üzümören	OS-2	Sararma
	Üzümören	OS-3	Sararma
	Üzümören	OS-4	Sararma
	Üzümören	OS-5	Sararma
	Üzümören	OS-6	Sararma
	Üzümören	OS-7	Sararma
	Üzümören	OS-8	Kızarıklık
	Üzümören	OS-9	Kızarıklık
	Üzümören	OS-10	Kızarıklık
	Üzümören	OS-11	Sararma
	Üzümören	OS-12	Kızarıklık
	Üzümören	OS-13	Kızarıklık
	Üzümören	OS-14	Kızarıklık
	Üzümören	OS-15	Kızarıklık
Üzümören	OS-16	Sararma	
Üzümören	OS-17	Sararma	

4.2. RT-PCR Sonuçları

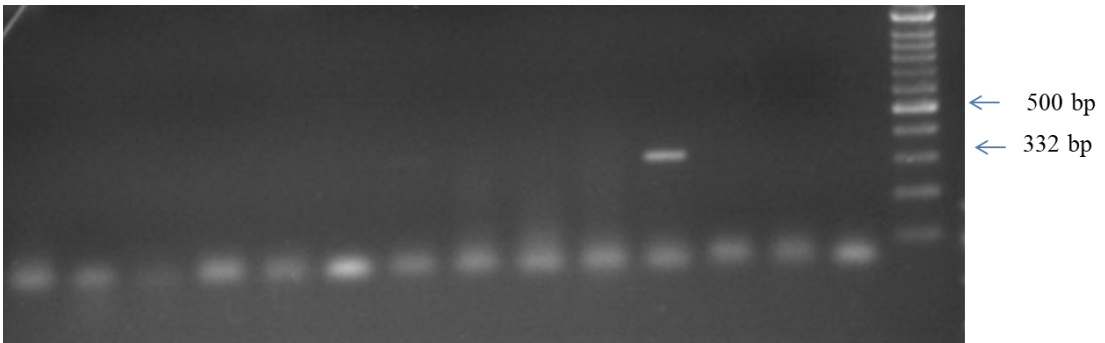
Toplanan 197 adet asma örneğinden virüslerin varlığını tespit etmek üzere RNA izolasyonu yapılmıştır. Daha sonra RNA izolasyonu yapılan örneklerden hexamer primerle cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir ve asma örnekleri araştırma konusu virüslerin (GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4 ve GLRaV-9) belirlenmesi için virüslere spesifik primerlerle RT-PCR işlemine tabi tutulmuştur.

GLRaV-1'e spesifik GLRaV 1-F ve GLRaV 1-R primerleri ile yapılan RT-PCR testi sonucunda toplam 103 örnekte beklenen büyüklükte (401 bp) bant elde edilmiştir (Şekil 4.2.).



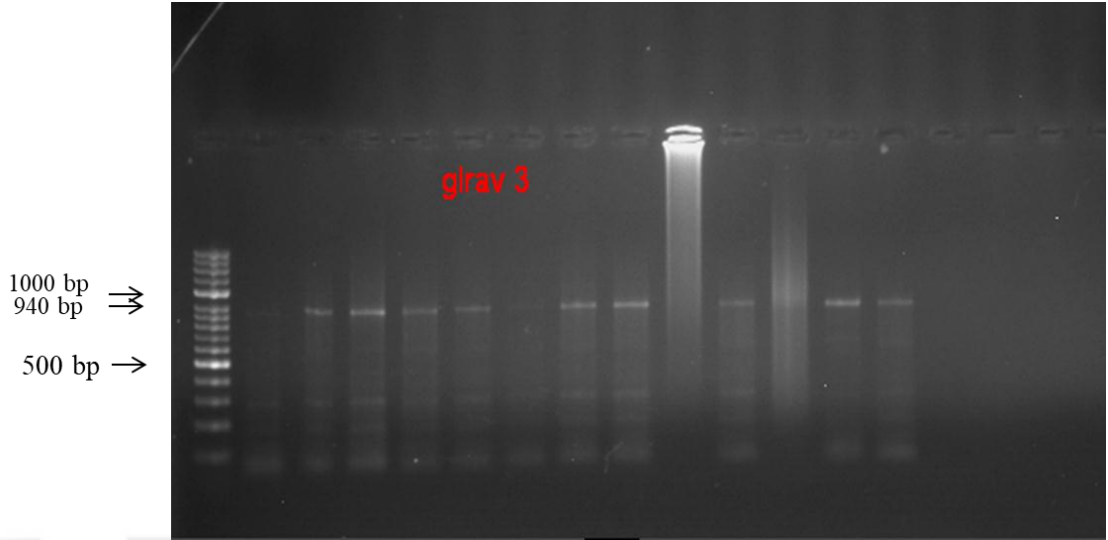
Şekil 4.2. GLRaV-1'e spesifik primerle yapılan bazı izolatlara ait RT-PCR sonucu

GLRaV-2'ye spesifik GLRaV 2-F ve GLRaV 2-R primerleri ile yapılan RT-PCR testi sonucunda iki örnekte beklenen büyüklükte (332 bp) bant elde edilmiştir (Şekil 4.3).



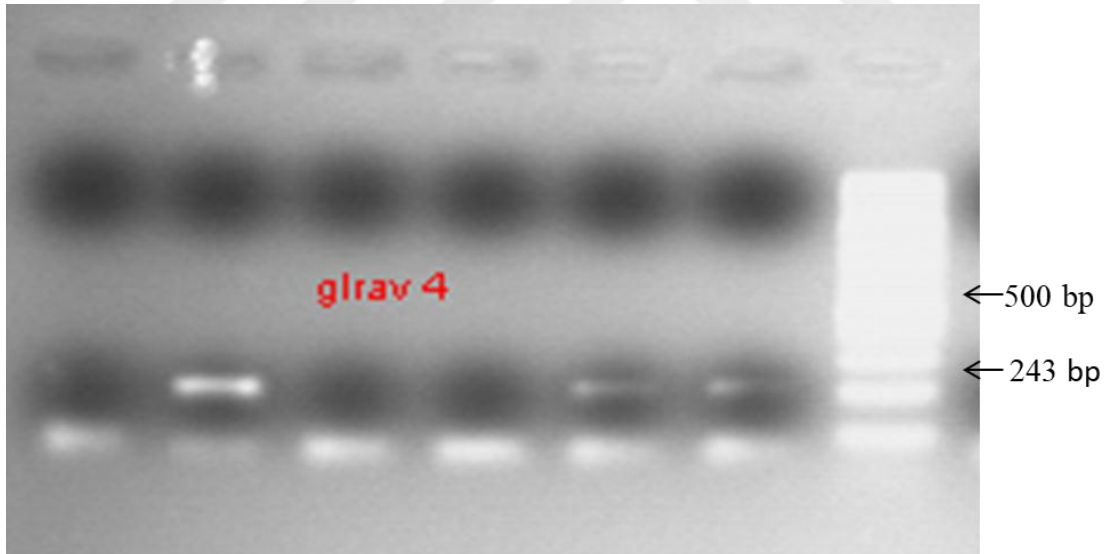
Şekil 4.3. GLRaV-2'ye spesifik primerle yapılan RT-PCR sonucu

GLRaV-3'e spesifik GLRaV 3- LR3-8504V ve GLRaV 3- LR3-9445C primerleri ile yapılan RT-PCR testi sonucunda 10 örnekte beklenen büyüklükte (940 bp) bant elde edilmiştir (Şekil 4.4).



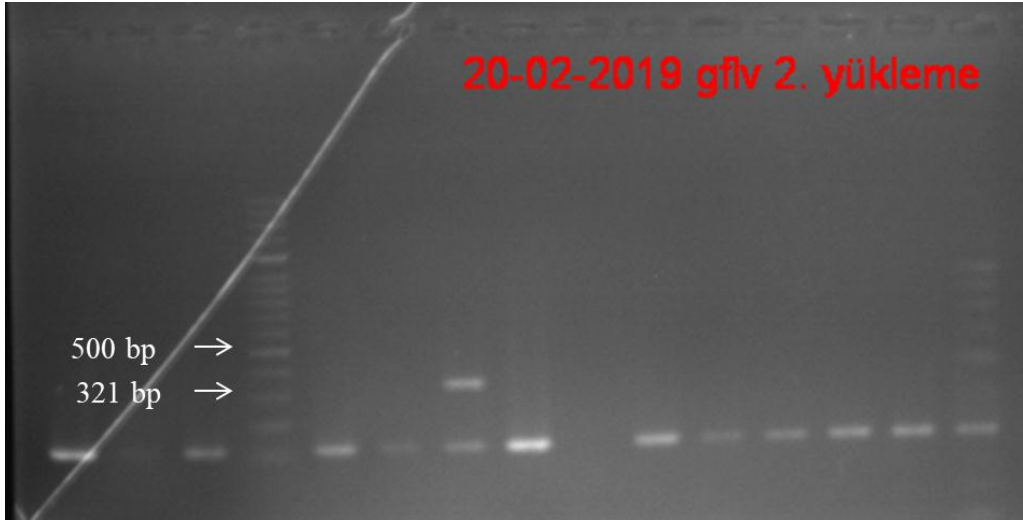
Şekil 4.4. GLRaV-3'e spesifik primerle yapılan RT-PCR sonucu

GLRaV-4'e spesifik GLRaV 4up ve GLRaV 4do primerleri ile yapılan RT-PCR testi sonucunda Üzümören köyüne ait dört örnekte (ÜÖ7-1, ÜÖ7-2, OS-6 ve OS-17) beklenen büyüklükte (243 bp) bant elde edilmiştir (Şekil 4.5.).



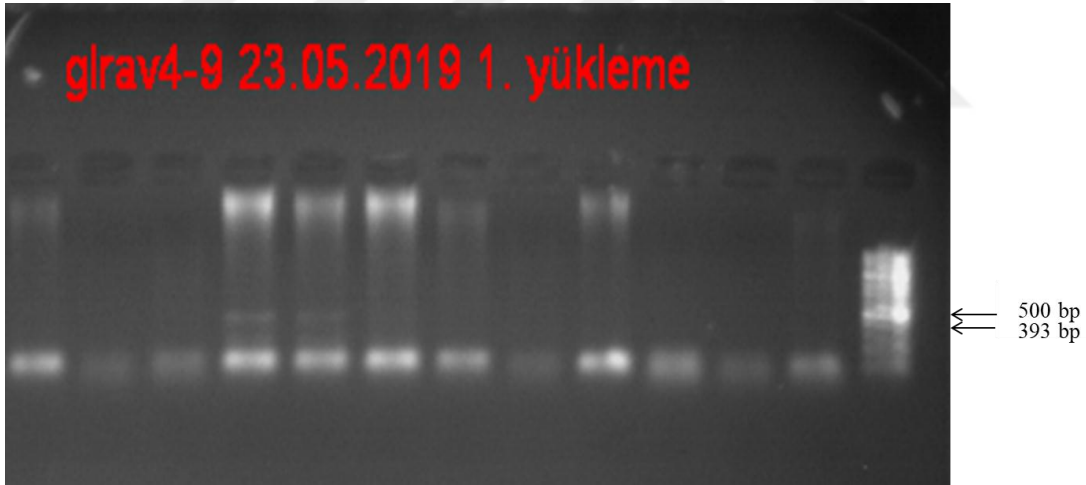
Şekil 4.5. GLRaV-4'e spesifik primerle yapılan RT-PCR sonucu

GFLV'ye spesifik GFLV-V1-F ve GFLV-C1-R primerleri ile yapılan RT-PCR testi sonucunda Niksar ilçesi Gürçeşme (G3-2) ve Merkez ilçe Küçükyıldız köylerine ait 1'er örnekte (Ky1-4) beklenen büyüklükte (321 bp) bant elde edilmiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. GFLV'ye spesifik primerle yapılan RT-PCR sonucu

GLRaV-9'a spesifik olan GLRaV 9-F ve GLRaV 9-R primer çifti ile yapılan RT-PCR testi sonucunda Üzümlen köyüne ait iki örnekte (ÜÖ7-1 ve ÜÖ7-2) beklenen büyüklükte (393 bp) bant elde edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. GLRaV-9'a spesifik primerle yapılan RT-PCR sonucu

RT-PCR çalışmaları sonunda tespit edilen virüslerin yapraklarda oluşturduğu belirtileri karşılaştırdığımızda, GLRaV-1 ile enfekteli bitkilerdeki görülen belirtiler mozaik, damar bantlaşması ve kızarıklık (Şekil 4.8.), GLRaV-3 ile enfekteli bitkilerdeki görülen belirtiler kızarıklık (Şekil 4.9.), GFLV ve GLRaV-1 ile karışık enfekteli yapraklarda görülen belirtiler damar aralarında sararma (Şekil 4.10), GLRaV-1 ve GLRaV-2 ile karışık enfekteli yapraklarda görülen belirtiler ise kızarıklık (Şekil 4.11) şeklinde gözlemlenmiştir.



Şekil 4.8. GLRAV-1 ile enfeksiyon tespit edilen asma örneklerindeki belirtiler



Şekil 4.9. GLRAV-3 ile enfeksiyon tespit edilen asma örneklerindeki belirtiler (kırmızı çeşit)



Şekil 4.10. GFLV ve GLRaV-1 ile enfeksiyon tespit edilen asma örneklerindeki karışık enfeksiyon belirtileri (Narince çeşidi)



Şekil 4.11. GLRaV-1 ve GLRaV-2 ile karışık enfeksiyon belirtileri (kırmızı çeşit)

Test edilen örnekler ve RT-PCR testi sonuçlarına göre belirlenen virüs varlıkları Çizelge 4.6.- 4.9.'te verilmiştir.

Çizelge 4.6. Tokat Merkez örneklerinin RT-PCR sonuçları

Kodu	GFLV	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-4	GLRaV-9
Es1-1	-	+	-	-	-	-
Es1-2	-	+	-	-	-	-
Es1-3	-	-	-	-	-	-
Es1-4	-	-	-	-	-	-
Es1-5	-	+	-	-	-	-
Es1-6	-	+	-	-	-	-
Es2-1	-	+	-	-	-	-
Es2-2	-	-	-	-	-	-
Es3-1	-	+	-	-	-	-
Es4-1	-	+	-	-	+	-
By1-1	-	+	-	-	-	-
By1-4	-	-	-	-	-	-
By2-1	-	-	-	-	-	-
By2-2	-	+	-	-	-	-
By2-3	-	-	-	-	-	-
By2-4	-	-	-	-	-	-
By3-1	-	-	-	+	-	-
By3-2	-	-	-	-	-	-
By3-3	-	+	-	-	-	-
By4-1	-	+	-	-	-	-
By5-1	-	+	-	-	-	-
By5-2	-	+	-	-	-	-
By5-3	-	-	-	-	-	-
By5-4	-	-	-	-	-	-
Ky1-1	-	-	-	-	-	-
Ky1-2	-	+	-	-	-	-
Ky1-3	-	-	-	-	-	-
Ky1-4	+	+	-	-	-	-
Ky1-5	-	+	-	-	-	-
Ky1-6	-	-	-	-	-	-
Ky1-7	-	-	-	-	-	-
Ky1-8	-	+	-	-	-	-
Ky2-1	-	+	-	-	-	-
Ky2-2	-	+	-	-	-	-
Ky2-3	-	-	-	-	-	-
Ky2-4	-	+	-	-	-	-
Ky2-5	-	+	-	-	-	-
Ky3-1	-	+	-	-	-	-
Ky3-2	-	+	-	-	-	-

Çizelge 4.6. (Devam) Tokat Merkez örneklerinin RT-PCR sonuçları

Ky3-2	–	+	–	–	–	–
Ky3-3	–	+	–	–	–	–
Ky3-4	–	+	–	–	–	–
Ky3-5	–	+	–	–	–	–
Ky3-6	–	+	□	□	–	–
Ky3-7	–	+	–	–	–	–
4s-1o	–	+	–	–	–	–
3s-8o	–	–	–	–	–	–
10s-11o	–	+	–	–	–	–

+: pozitif sonuç –: negatif sonuç □: çalışılmadı

Çizelge 4.6.'da görüldüğü gibi RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılan testler sonucunda Tokat Merkez'den toplanan 47 adet örneğin 31 tanesinin (%65.95) bir veya birden fazla virüs ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Test edilen 47 adet örneğin 30 tanesi (%63.83) GLRaV-1, 1 tanesi (%2.17) GLRaV-3, 1 tanesi (%2.12) GLRaV-4 ve 1 tanesi (%2.12) ise GFLV ile enfekteli olarak tespit edilmiştir. Tokat Merkez'den toplanan asma örneklerinde GLRaV-2 ve GLRaV-9 virüsleri ile bulaşık örnek tespit edilmemiştir. Ayrıca enfekteli örneklerin 1'inin GLRaV-1 + GLRaV-4, 1'i ise GFLV + GLRaV-1 virüsleri tarafından çoklu enfeksiyona maruz kaldığı saptanmıştır. Merkez'den toplanan ve enfekteli bulunan örnekler içerisinde en yaygın görülen virüsün GLRaV-1 olduğu saptanmıştır. Merkez'de bağ alanlarından alınan örnekler içerisinde en fazla enfekteli örnek Küçükyıldız köyünde tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. Tokat Erbaa ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları

Kodu	GFLV	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-4	GLRaV-9
Ka1-1	–	+	–	–	–	–
Ka1-2	–	+	–	–	–	–
Ka1-3	–	+	–	–	–	–
Ka2-1	–	+	–	–	–	–
Ka2-2	–	–	–	–	–	–
Ka2-3	–	–	–	–	–	–
Ka2-4	–	–	–	–	–	–
Ka2-5	–	–	–	–	–	–
Ka2-6	–	–	–	–	–	–
Ka3-1	–	–	–	–	–	–
Ka3-2	–	+	–	–	–	–
Ka3-3	–	+	–	–	–	–

Çizelge 4.7. (Devam) Tokat Erbaa ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları

Ka4-1	-	+	-	-	-	-
Ka4-3	-	+	-	-	-	-
Ba1-1	-	-	-	-	-	-
Ba1-2	-	-	-	-	-	-
Ba1-3	-	+	-	-	-	-
Ba1-4	-	-	-	-	-	-
Ba1-5	-	-	-	-	-	-
Ba1-7	-	+	-	-	-	-
Ba2-1	-	+	-	-	-	-
Ba2-2	-	-	-	-	-	-
Ba2-3	-	-	-	-	-	-
Ba2-4	-	-	-	-	-	-
Ba2-5	-	+	-	-	-	-
Ba2-6	-	+	-	-	-	-
Ba3-1	-	-	-	-	-	-
Ba3-2	-	-	-	-	-	-
Ba3-3	-	-	-	-	-	-
Ba4-1	-	-	-	-	-	-
Ba4-2	-	-	-	-	-	-
Ba4-3	-	+	-	-	-	-
Ü1-1	-	-	-	-	-	-
Ü1-5	-	-	-	-	-	-
Ü2-1	-	-	-	-	-	-
Ü2-2	-	-	-	-	-	-
Ü2-3	-	-	-	-	-	-
Ü2-4	-	-	-	-	-	-
Ü3-1	-	-	-	-	-	-
Ü3-2	-	-	-	-	-	-
Ü3-3	-	-	-	-	-	-
Ü3-4	-	-	-	-	-	-
Ü4-1	-	-	-	-	-	-
Ü4-2	-	-	-	-	-	-
Ü4-3	-	+	-	-	-	-
Ü4-4	-	+	-	-	-	-
Ü4-5	-	-	-	-	-	-
Ü4-6	-	+	-	-	-	-

+: pozitif sonuç - : negatif sonuç □ : çalışılmadı

Çizelge 4.7.'de belirtildiği gibi RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılan testler sonucunda Tokat Erbaa ilçesinden toplanan ve test edilen 48 adet örneğin 17 tanesi (%35.41)

GLRaV-1 ile enfekteli olarak tespit edilmiştir. GFLV, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4 ve GLRaV-9 virüsleri ile bulaşık örnek tespit edilmemiştir. Erbaa ilçesinden toplanan ve enfekteli bulunan örnekler içerisinde en yaygın görülen virüsün GLRaV-1 olduğu saptanmıştır. Erbaa ilçesindeki bağ alanlarından alınan örnekler içerisinde en fazla enfekteli örnek Karayaka köyünde tespit edilmiştir.

Çizelge 4.8. Tokat Niksar ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları

Kodu	GFLV	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-4	GLRaV-9
Gç2-1	-	-	-	-	-	-
Gç2-2	-	-	-	□	-	-
Gç2-4	-	-	-	-	-	-
Gç3-1	-	+	-	-	-	-
Gç3-2	-	+	-	-	-	-
Gç3-4	-	+	-	-	-	-
Gç3-5	-	-	-	-	-	-
Gç3-6	-	-	-	-	-	-
G1-1	-	+	-	-	-	-
G1-2	-	+	-	-	-	-
G1-3	-	+	-	-	-	-
G1-4	-	+	-	-	-	-
G1-6	-	-	-	-	-	-
G2-1	-	+	-	-	-	-
G2-2	-	+	-	-	-	-
G2-3	-	-	-	-	-	-
G2-4	-	+	+	-	-	-
G2-5	-	+	□	□	-	-
G3-1	-	+	-	-	-	-
G3-2	+	+	□	□	-	-
G3-3	-	+	-	-	-	-

+: pozitif sonuç -: negatif sonuç □: çalışılmadı

Çizelge 4.8.'de belirtildiği gibi RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılan testler sonucunda Tokat Niksar'dan toplanan 21 adet örneğin 14 tanesinin (%66.66) bir veya birden fazla virüs ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Test edilen 21 adet örneğin 14 tanesi (%66.66) GLRaV-1, 1 tanesi (%5.26) GLRaV-2 ve 1 tanesi (%4.76) ise GFLV ile enfekteli olarak tespit edilmiştir. GLRaV-3, GLRaV-4 ve GLRaV-9 virüsleri ile bulaşık örnek tespit edilmemiştir. Ayrıca enfekteli örneklerin 1'i GLRaV-1 + GLRaV-2, 1'i ise GFLV + GLRaV-1 çoklu enfeksiyonları ile enfekteli olarak saptanmıştır. Niksar ilçesinden

toplanan ve enfekteli bulunan örnekler içerisinde en yaygın görülen virüsün GLRaV-1 olduğu saptanmıştır. Niksar ilçesindeki bağ alanlarından alınan örnekler içerisinde en fazla enfekteli örnek Gürçeşme köyünde tespit edilmiştir.

Çizelge 4.9. Tokat Pazar ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları

Kodu	GFLV	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-4	GLRaV-9
ÜÖ1-1	-	-	-	-	-	-
ÜÖ1-2	-	-	-	-	-	-
ÜÖ1-3	-	+	-	-	-	-
ÜÖ1-4	-	-	-	-	-	-
ÜÖ1-5	-	-	-	-	-	-
ÜÖ2-1	-	+	-	-	-	-
ÜÖ2-2	-	+	-	-	-	-
ÜÖ2-3	-	+	-	-	-	-
ÜÖ2-4	-	-	-	-	-	-
ÜÖ3-1	-	+	-	-	-	-
ÜÖ3-2	-	+	-	+	-	-
ÜÖ3-3	-	+	-	+	-	-
ÜÖ3-4	-	+	-	+	-	-
ÜÖ3-5	-	+	-	-	-	-
ÜÖ3-6	-	+	-	-	-	-
ÜÖ4-2	-	-	-	-	-	-
ÜÖ4-3	-	-	-	-	-	-
ÜÖ4-4	-	-	-	-	-	-
ÜÖ5-1	-	-	-	-	-	-
ÜÖ5-2	-	-	-	-	-	-
ÜÖ5-3	-	-	-	-	-	-
ÜÖ5-4	-	-	-	-	-	-
ÜÖ5-5	-	-	-	-	-	-
ÜÖ5-6	-	-	-	-	-	-
ÜÖ6-1	-	+	-	+	-	-
ÜÖ6-2	-	+	-	-	-	-
ÜÖ6-3	-	-	-	-	-	-
ÜÖ6-5	-	-	-	-	-	-
ÜÖ6-6	-	+	-	-	-	-
ÜÖ7-1	-	+	-	-	+	+
ÜÖ7-2	-	-	-	-	+	+
ÜÖ7-3	-	+	-	-	-	-
ÜÖ7-4	-	+	-	-	-	-
ÜÖ7-5	-	+	-	-	-	-

Çizelge 4.9. (Devam) Tokat Pazar ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları

ÜÖ7-6	-	+	-	-	-	-
ÜÖ7-7	-	+	-	-	-	-
ÜÖ7-8	-	+	-	-	-	-
ÜÖ7-9	-	+	-	-	-	-
ÜÖ8-1	-	+	-	-	-	-
ÜÖ8-2	-	-	-	-	-	-
ÜÖ8-3	-	-	-	-	-	-
ÜÖ8-4	-	+	-	-	-	-
ÜÖ8-5	-	-	-	-	-	-
ÜÖ8-6	-	-	-	-	-	-
ÜÖ8-7	-	-	-	-	-	-
ÜÖ8-8	-	-	-	-	-	-
ÜÖ9-1	-	-	-	-	-	-
ÜÖ9-2	-	+	-	-	-	-
ÜÖ9-3	-	+	+	-	-	-
ÜÖ9-4	-	-	-	-	-	-
ÜÖ9-6	-	-	-	-	-	-
ÜÖ9-7	-	-	-	-	-	-
ÜÖ9-8	-	-	-	-	-	-
ÜÖ9-9	-	-	-	-	-	-
ÜÖ9-10	-	-	-	-	-	-
ÜÖ9-11	-	-	-	-	-	-
ÜÖ10-1	-	-	-	-	-	-
ÜÖ10-2	-	-	-	-	-	-
ÜÖ10-3	-	+	-	-	-	-
ÜÖ10-4	-	-	-	-	-	-
ÜÖ10-5	-	-	-	-	-	-
ÜÖ10-6	-	+	-	-	-	-
ÜÖ10-7	-	+	-	-	-	-
ÜÖ10-8	-	-	-	-	-	-
OS-1	-	+	-	-	-	-
OS-2	-	+	-	-	-	-
OS-3	-	+	-	-	-	-
OS-4	-	+	-	-	-	-
OS-5	-	+	-	-	-	-
OS-6	-	+	-	-	+	-
OS-7	-	+	-	+	-	-
OS-8	-	+	-	-	-	-
OS-9	-	-	-	-	-	-
OS-10	-	-	-	-	-	-

Çizelge 4.9. (Devam) Tokat Pazar ilçesi örneklerinin RT-PCR sonuçları

OS-11	-	+	-	-	-	-
OS-12	-	+	-	-	-	-
OS-13	-	+	-	+	-	-
OS-14	-	-	-	+	-	-
OS-15	-	+	-	+	-	-
OS-16	-	+	-	+	-	-
OS-17	-	+	-	-	+	-

+: pozitif sonuç - : negatif sonuç □ : çalışılmadı

Çizelge 4.9’da belirtildiği gibi RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılan testler sonucunda Tokat Pazar’da toplanan 81 adet örneğin 44 tanesinin (%54.32) bir veya birden fazla virüs ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Test edilen 81 adet örneğin 42 tanesi (%51.85) GLRaV-1, 9 tanesi (%11.11) GLRaV-3, 4 tanesi (%4.93) GLRaV-4, 2 tanesi (%2.46) GLRaV-9 ve 1 tanesi (%1.23) ise GLRaV-2 ile enfekteli olarak tespit edilmiştir. GFLV virüsleri ile bulaşık örnek tespit edilmemiştir. Ayrıca enfekteli örneklerin 8’i GLRaV-1 + GLRaV-3, 2’si GLRaV-1 + GLRaV-4, 1’i GLRaV-1 + GLRaV-2, 1’i GLRaV-4 + GLRaV-9 ve 1’i ise GLRaV-1 + GLRaV-4 + GLRaV-9 çoklu enfeksiyonları ile enfekteli olarak saptanmıştır. Pazar ilçesi Üzümlü köyünden toplanan ve enfekteli bulunan örnekler içerisinde en yaygın görülen virüsün GLRaV-1 olduğu saptanmıştır.

Tokat Merkez ve ilçelerinden alınan toplam 197 tane örnek GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4 ve GLRaV-9 virüslerinin varlığı açısından test edilmiştir. Test edilen toplam 197 adet asma örneğinin 106’sında pozitif sonuç elde edilmiştir. Test edilen toplam 197 bitki örneğinin 103’ü GLRaV-1 (%52.28), 10’u GLRaV-3 (%5.18), 5’i GLRaV-4 (%2.53), 2’si GLRaV-2 (%1.03), 2’si GLRaV-9 (%1.01) ve 2’si GFLV (%1.01) ile enfekteli bulunmuştur. Tokat Merkez ve ilçelerinden toplanan bitki örneklerinde en yaygın görülen virüsün GLRaV-1 olduğu ve bunu GLRaV-3’ün izlediği saptanmıştır. En az saptanan virüsler ise GFLV, GLRaV-2 ve GLRaV-9 olarak tespit edilmiştir. Tokat bağ alanlarında saptanan virüslerin ilçelere göre dağılımı aşağıda verilmiştir (Çizelge 4.10.).

Çizelge 4.10. Tokat bağ alanlarında saptanan virüslerin ilçelere göre dağılımı

İlçe	Enfekteli Bitki Sayısı	GFLV	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3	GLRaV-4	GLRaV-9
Merkez	31	1	30	–	1	1	–
Erbaa	17	–	17	–	–	–	–
Niksar	14	1	14	1	–	–	–
Pazar	44	–	42	1	9	4	2
Toplam	106	2	103	2	10	5	2

Test edilen asma örneklerinden elde edilen sonuçlara bakıldığında, bazı örneklerde tekli bazılarında ise birden fazla virüsün bir araya gelerek çoklu (2'li, 3'lü) kombinasyonlar meydana getirdiği görülmektedir. Bu kombinasyon şekilleri ve görüldüğü örnek sayısı aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 4.11.).

Çizelge 4.11. Test edilen bitki örneklerinde görülen virüs kombinasyonları

Virüs Kombinasyonları	Örnek Sayısı (Adet)
GFLV (tekli)	–
GLRaV-1 (tekli)	87
GLRaV-2 (tekli)	–
GLRaV-3 (tekli)	2
GLRaV-4 (tekli)	–
GLRaV-9 (tekli)	–
GLRaV-1 + GLRaV-3	8
GLRaV-1 + GLRaV-4	3
GLRaV-1 + GLRaV-2	2
GFLV + GLRaV-1	2
GLRaV-4 + GLRaV-9	1
GLRaV-1 + GLRaV-4 + GLRaV-9	1

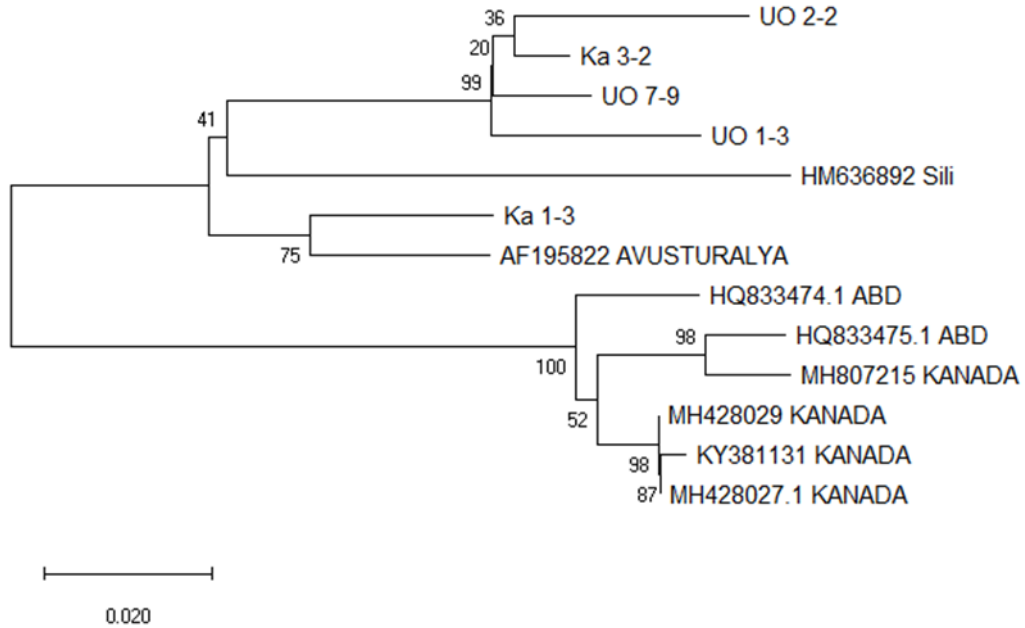
Çizelge 4.11'de görüldüğü üzere çalışmada örneklerin 87'si GLRaV-1 ve 2'si GLRaV-3 tekli enfeksiyonlarını oluştururken, 8'i GLRaV-1 + GLRaV-3, 3'ü GLRaV-1 + GLRaV-4, 2'si GLRaV-1 + GLRaV-2, 2'si GFLV + GLRaV-1, 1'i GLRaV-4 + GLRaV-9 ve 1'i GLRaV-1 + GLRaV-4 + GLRaV-9 çoklu enfeksiyonlarını oluşturduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen çoklu enfeksiyonlarından en fazla görülen kombinasyonun GLRaV-1 + GLRaV-3 kombinasyonu olduğu belirlenmiştir.

4.3. Filogenetik Analiz Sonuçları

Filogenetik çalışmalar için, RT-PCR sonunda elde edilen pozitif PCR ürünlerinden GLRaV-1 için 8 örnek, pozitif çıkan GFLV için iki örnek (G2-3, Ky1-4), GLRaV-2 için

1 örnek (ÜÖ9-3), GLRaV-3 için 5 (By3-1, ÜÖ3-4, ÜÖ3-3, Ba2-5, OS-7) ve GLRAV-4 için 3 örnek sekansa gönderilmiştir. Sekans verileri sonucunda GLRaV-1'den 5 örnekten çift yönlü ve GLRaV-3'ten bir örneğin Reverse yönü ile sonuç alınmış ve bu veriler üzerinde çalışmaya devam edilmiştir. GLRaV-2, GLRaV-4, GLRaV-9 ve GFLV ile yapılan analizlerde sonuç alınamamış olup, bunun nedenleri arasında PCR aşamasında elde edilen ürünlerin sekanslama için yeterli olmadığı düşünülmektedir. Çalışmanın farklı primerlerle yapılması düşünülmektedir.

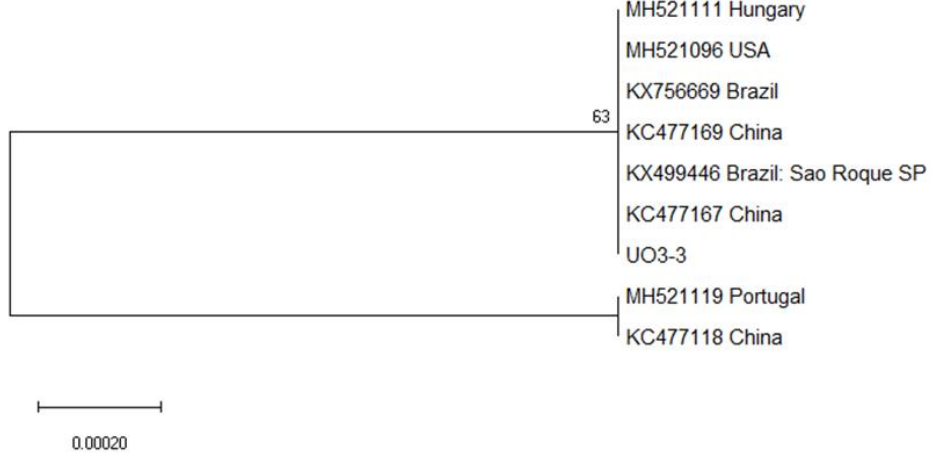
GLRaV-1 ile enfekteli örneklere (ÜÖ1-3, ÜÖ2-2, ÜÖ7-9, Ka3-2, Ka1-3) ait 323 baz uzunluğundaki bölgenin sekans verileri ile yapılan filogenetik analiz sonucunda, çalışmamızda elde edilen Ka1-3 izolatu Avusturalya izolatu ile benzer dallanma gösterirken, diğer dört izolat Şili izolatına yakın benzerlik göstermiş ve ayrı bir dallanma oluşturmuştur (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. GLRaV-1 ile elde edilen filogenetik ağaç

GLRaV-3 reverse primeri ile elde edilen 505 baz uzunluğundaki bölge gen bankasında kayıtlı izolatlarla karşılaştırılmış (Şekil 4.13.) ve ÜÖ3-3 izolatu Çin, Brezilya, Macaristan ve ABD'den farklı izolatlarla %100 oranında benzerlik göstermiştir ve filogenetik ağaç üzerinde aynı dalda yer almıştır. Bir baz farklılığı ile Portekiz ve Çin'e

ait olan iki izolatla %99 benzerlik göstermiş olup, filogenetik ağaçta farklı bir dallanma göstermiştir. Ancak bu baz farklılığı proteinde farklılığa neden olmamıştır.



Şekil 4.13. GLRaV-3 ile enfekteli ÜÖ3-3 izolatına ait filogenetik ağaç.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Virüs hastalıkları, kültür bitkilerini değişik ölçülerde etkileyerek verimlerinin azalmasına neden olurlar. Zararları da nicel ve nitel olarak senelik veya çok senelik bitkilerin ürünlerine yansır. Asma bitkisi gibi çok yıllık kültür bitkilerinde bu zarar her yıl devam ederek gideceğinden dikimden 10-20 yıl sonra bile kendisini gösterir.

Virüs hastalıklarına yakalanan çok yıllık bitkilerin ömürleri boyunca enfekteli olarak kalması gerek ürün kaybı ve gerekse de inokulum kaynağı olarak hizmet etmesi açısından oldukça önemlidir. Belirli bir ağaçta virüsün neden olduğu belirtilerle ortaya çıkan ürün kaybı mevsimden mevsime değişebilir. Şiddetli enfeksiyon sonucu meyve ağaçları ürün vermezse veya hastalık bahçede hızlı bir yayılma eğilimi gösterirse enfekteli ağaçların kesilmesi gerekir. Bu durumda üründe hemen ortaya çıkan bir kayıp yanında, yerine dikilen ağaçların ürün verir duruma gelmesine kadar geçen sürede gelir elde edilemeyeceğinden ekonomik kayıp, tek yıllık bitkilere göre daha fazla ve hem de uzun süreli olarak devam edebilir.

Virüsler dünyada çok sayıda kültür bitkisinde önemli düzeyde ürün kayıplarına neden olmaktadır. Bitkilerdeki diğer patojenlerin aksine, virüsleri kontrol etmek için kullanılan doğrudan mücadele yöntemleri mevcut değildir. Ayrıca, virüs hastalıklarının kontrolünde yararlanılan önlemlerin çoğu bitkileri tedaviden ziyade korumayı temel aldığından, virüs hastalıklarının yönetiminde patojenin tanısı için güvenilir ve duyarlı yöntemlere ya da tekniklere sahip olmak önemlidir. Bitki virüs hastalıklarının tanılanmasında serolojik yöntemlerin yanı sıra moleküler yöntemler de kullanılmaktadır. Bu yöntemler, çok yönlü olmaları nedeniyle tanılama daha güvenilir sonuçlar vermektedir (Erkan ve ark., 2011).

Asmada zarar yapan virüs ve virüs benzeri hastalık etmenleri bitkide gelişme geriliklerine, şekil bozukluğuna, yapraklarda renk değişimine ve ürün kayıplarına neden olmaktadır. Bunlar içerisinde asmada ekonomik olarak zarar yapan en önemli etmenler içerisinde asma kısa boğum hastalığı ve asma yaprak kıvrılma hastalıklarına neden olan viral etmenlerdir (Martelli, 2014).

GFLV bitkide anormal sürgün oluşumu, sürgünlerde zikzak oluşumu, boğum aralarının kısalmasına neden olmaktadır. Ayrıca asmada büyüme ve gelişmeyi olumsuz etkilemekte, meyve verimini ve kalitesini önemli ölçüde düşürmektedir. Bitkide %80'e varan verim kayıplarına ve meyvedeki şeker miktarının azalmasına neden olarak önemli ekonomik zararlara yol açmaktadır. GLRaV'ler ise asmalarda yapraklarda kıvrımlara, düzensiz meyve tutumuna, genel bodurluk ve gelişme durgunluğuna neden olmaktadır. Ayrıca meyve verimini %10-70 oranında azaltarak, şeker oranını da düşürmektedir. Aşı tutumunu ve bitkide köklenme yeteneğini azaltmaktadır. Yapılan çalışmalara baktığımızda ülkemizde bağ alanlarında söz konusu virüslere rastlamak mümkündür (Sarpkaya, 2003; Türkmen, 2014; Önder, 2016).

Gürsoy (1991), Tekirdağ, Yalova ve Manisa bölgesinde ELISA testleri sonucunda GLRaV-1 ve GLRaV-3'ün; Köklü ve Baloğlu (2000), Trakya bölgesinde ELISA testleri sonucunda GLRaV-1 ve GLRaV-3'ün; İnce ve Yavuz (2015), Doğu Akdeniz Bölgesi'nde DAS-ELISA testi sonucunda GLRaV-1'in; Ömeroğlu (2016), Tekirdağ il merkezi, Şarköy ve Marmara Ereğlisi ilçelerinde yapmış olduğu çalışmasında ELISA testleri sonucunda GLRaV-1 ve GLRaV-3'ün en yaygın virüsler olduğunu belirtmişlerdir. Ülkemizde GLRaV etmenlerinin varlığına ilişkin yürütülen diğer çalışmalara bakıldığında genel olarak en yaygın görülen asma yaprak kıvrılma virüslerinin GLRaV-1 ve GLRaV-3 olduğunu görmekteyiz. Yapmış olduğumuz çalışmada Tokat bağ alanlarında da benzer şekilde GLRaV-1 ve GLRaV-3 en yaygın olarak bulunan viral etmenlerdir.

Türkmen (2014), Ankara, Manisa, İzmir, Denizli, Nevşehir, Elazığ, Çanakkale, Edirne, Tekirdağ ve Kırklareli'de DAS-ELISA testleri sonucunda ilk sırada GLRaV 4-9 virüslerinin olduğunu belirtirken, bizim yapmış olduğumuz çalışmada Tokat yöresinde GLRaV-4 ve GLRaV-9 virüslerine sık rastlanmamıştır.

Tokat ilinde Karadeniz (2016), tarafından yürütülen çalışmada serolojik bir yöntem olan DAS-ELISA testleri sonucunda en fazla GLRaV-1 bulunmuş, en az ise GFLV bulunmuştur. Bizim yaptığımız çalışmada ise moleküler bir yöntem olan RT-PCR testleri sonucunda Tokat ilinde GLRaV-1'in yanı sıra farklı olarak GLRaV-3'ün de yaygın olduğunu saptamış bulunmaktayız. Bu çalışma ile GLRaV-3 viral etmeni Tokat

ilinde ilk defa belirlenmiştir. GFLV bulguları açısından sonuçlar benzerlik göstermektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmada en az rastlanan virüsler ise GFLV, GLRaV-2 ve GLRaV-9 olmuştur. GFLV etmenlerinin varlığına ilişkin yürütülen diğer çalışmalara bakıldığında virüsün bazı bölgelerde ilk sırayı yer aldığını görmekteyiz (Özaslan ve ark., 1991; Özaslan ve Yılmaz, 1995; Akbaş, 1998). Araştırma sonuçlarımıza baktığımızda ise Tokat yöresinde GFLV yoğunluğuna çok fazla rastlanılmamıştır.

Bu çalışma Tokat ilinde asma virüsleri ile ilgili olarak moleküler düzeyde yapılan ilk çalışmadır. Yapılan bu çalışma ile Tokat Merkez, Erbaa, Niksar ve Pazar ilçelerindeki bazı bağ alanlarında GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4 ve GLRaV-9 viral etmenlerinin varlığı araştırılmıştır. Araştırma konusu virüslerin tanınması moleküler bir yöntem olan RT-PCR yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elektroforez işlemi sonunda UV görüntüleme sonucunda pozitif bantlar elde edilmiştir. Yapılan testler sonucunda bağ alanlarından alınan 197 adet örneğin 106 (%53.80) tanesinde bir veya birden fazla virüse rastlanmıştır. Tokat Merkez ve ilçelerinden toplanan bitki örneklerinde en yaygın görülen virüsün GLRaV-1 olduğu ve bunu GLRaV-3'ün izlediği saptanmıştır. Tespit edilen çoklu enfeksiyonlar içerisinde en fazla GLRaV-1 + GLRaV-3'ün birlikte enfeksiyonu olduğu belirlenmiştir. Yapılan sekanslama ve filogenetik çalışmalarda GLRaV-1 ve GLRaV-3 ile sonuç alınmış olup, diğer etmenlerin analizleri için daha detaylı çalışmalara devam edilmesi planlanmaktadır.

Türkiye'de bağcılık tarımsal bir iş kolu olarak önem arz etmekte ve bitkisel üretimde önemli bir paya sahip olmaktadır. Üzüm üretiminin yanı sıra taze ve salamuralık asma yaprağına olan talep giderek artmaktadır. Tokat yöresinde yetiştirilen ve bağların büyük bir kısmını oluşturan Narince çeşidi ticari sarmalık yaprak üretiminde önem kazanmaktadır. Söz konusu virüsler meyvede oluşturduğu zararların yanı sıra asma yapraklarında deformasyonlara ve yaprak kalitesinin düşmesine neden olmaktadır. Bitki virüs hastalıkları ile kimyasal mücadele böcekler ve fungal hastalıklara karşı yapılan mücadele gibi mümkün değildir. Bu nedenle GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4 ve GLRaV-9 etmenlerinin yayılmasında önemli rol oynayan kalem, anaç gibi

aşı materyalinin virüsten ari olmasına dikkat edilmeli ve bunun için fidan üretiminde gerekli tedbirler alınmalıdır. Üreticiler sertifikalı asma fidanı kullanma konusunda bilinçlendirilmelidir. GFLV ve GLRaV-2 virüsleri mekanik yollarla da taşınabildiğinden bağlarda kullanılan alet ve ekipmanlar dezenfekte edilmeli ve mücadelede koruyucu önlemler alınmalıdır. Ayrıca GFLV etmeninin taşınmasında rol alan vektör nematodlarla da mücadele edilmelidir. Araştırma konusu diğer virüsler kabuklu bit ve unlu bit türleriyle taşınabilmektedir. Dolayısıyla vektör böceklerle mücadele edilmelidir.



6. KAYNAKLAR

- Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Sabanadzovic, S., Uyemoto, J.K., Golino, D. Ve Rowhani, A., 2010. A putative new ampelovirus associated with grapevine leafroll disease. *Archives of Virology*, 155, 1871-1876
- Akbaş, B. ve Erdiller, G., 1993. Researches on Grapevine Virus Diseases and Determination of Their Incidences in Ankara, Türkiye. *The Journal of Turkish Phytopathology Soc.*, 22 (2-3), 47-54.
- Akbaş, B., 1998. Karaman, Konya ve Nevşehir İllerindeki Bağ Sahalarında Görülen Virüs Hastalıkları ve Yayılışlarının Tesbiti Üzerine Araştırmalar. (Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Akdoğan, N., 1956. Kısa Boğum (Degeneressans Infecteus). Sakarya Ziraat Mücadele Enstitüsü Halk Broşürleri, No:5, 6 s, İstanbul.
- Akdoğan, N., 1958. Kısa Boğum “Bulaşık Soysuzlaşma”. Ziraat Vekaleti T.E.S.C. 102.
- Akdoğan, N., 1965. Bağlarda Bulaşık Soysuzlaşma (Kısa Boğum) ve Korunma Çareleri. Yenilik Basımevi, 8 s, İstanbul.
- Alknowni, R., Rowhani, A., Daubert, S. ve Golino, D., 2004. Partial Characterization of a New *Ampelovirus* Associated Evolutionary Distinct Lineage Within the *Ampelovirus* Genus. *Journal Of Virological Methods*, 154, 41-47.
- Andret-Link, P., Laporte, C., Valat, L., Ritzenthaler, C., Demangeat, G., Vigne, E., Laval, V., Pfeiffer, P., Stussi-Garaud, C. ve Fuchs, M., 2004. *Grapevine fanleaf virus*: still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology*, 86, 183–195.
- Anonim, 2017a. Agricultural Statistics Database. <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (18.05.2019).
- Anonim, 2017b. Bağ Entegre Mücadele Teknik Talimatı. Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, <https://www.tarim.gov.tr/TAGEM> (18.05.2019).
- Anonim, 2018. Bitkisel Üretim İstatistikleri. <https://www.tuik.gov.tr> (18.05.2019).
- Anonim, 2019a. Tarım Ürünleri Piyasa Raporları. Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü Müdürlüğü, <https://www.arastirma.tarim.gov.tr/tepge> (18.05.2019).
- Anonim, 2019b. Bitki Patojeni Virüsler. Tarım ve Orman Bakanlığı Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/ktae> (13.06.2019).
- Anonim, 2019c. National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (20.06.2019).
- Azeri, T., 1983. Ülkemiz Bağcılığında Virüs Sorunu ve Virüssüz Bağ Üretim Programı. *Yıllık*, 1 (1), 61-69.
- Azeri, T. ve Fidan, Ü., 1988. Virus and Virus-Like Diseases Effecting Grapevine and Growing Virus-Free Grapes in the Aegean Coast. *Proc. of the V. Congress of Turk. Phyt. Soc.*, Oct. 1988, Antalya, Türkiye.

- Balsak, S.C., 2016. Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi Bağlarında Otokton Asma Varyetelerinde Bazı *Vitivirus* (GVA, GVB) ve *Nepovirus* (GFLV) Grubu Virüslerin Genetik Çeşitliliğinin Araştırılması. (Y. Lisans Tezi), Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Buzkan, N., Karadağ, S., Kaya, A., Baloğlu, S., Minafra, A. ve Ben-Dov, Y., 2012. Investigating the presence of mealybug species as vectors for viruses in grapegrowing areas in Turkey. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne de Phytopathologie*, 34 (2), 298-305.
- Çelik, H., Ağaoğlu, Y.S., Fidan, Y., Marasalı, B. ve Söylemezoğlu, G., 1998. Genel Bağcılık. SUNFİDAN A.Ş. Mesleki Kitaplar Serisi:1, 253 s, Ankara.
- Çelik, H., 2013. Türkiye Bağcılığında Üretim Hedefleri. Vizyon 2023 Bağcılık Çalıştayı, 26-27 Haziran 2013, Tekirdağ Bağcılık Araştırma İstasyonu, Tekirdağ.
- Çığışar, İ., 2002. Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Nevşehir İlinde Bağlarda Zararlı Virüs ve Virüs Benzeri Hastalıkların Biyolojik ve Serolojik Yöntemlerle Saptanması ve İki Yeni Nepovirüsün Karakterizasyonu. (Doktora Tezi), Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Digiario, M., Martelli, G.P. ve Savino, V., 2000. Phloem-limited viruses of the grapevine in the Mediterranean and Near East. *Proc. 13th Meeting of ICGV*, Adelaide, 7, 5-76.
- Elbeaino, T., Nusic, F., Digiario, M., Sabanadzovic, S. ve Martelli, G.P., 2009. Partial characterization of a *Grapevine leafroll associated virus* from an infected Cypriot vine of cv. Mavro. *Journal of Plant Pathology*, 91, 479-484.
- Erilmez, S. ve Kaya, A., 2016. Asma Virüslerinin Tanılanmasında DAS-ELISA ve RT-PCR Yöntemlerinin Duyarlılıklarının Karşılaştırılması. *Bitki Koruma Bülteni*, 56 (1), 1-14.
- Erkan, S., Gümüş, M., Paylan, İ. C. ve Sipahioğlu, H. M., 2011. Bitki Virüslerinin Tanılanmasında Kullanılan Serolojik Yöntemler. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 9 (2) 35-49.
- Fiore, N., Prodan, S. ve Pino, A.M., 2009. Monitoring Grapevine Viruses by ELISA and RT-PCR Throughout the Year. *Journal of Plant Pathology*, 91 (2), 489-493.
- Garau, R., Cugusi, M., Dore, M. ve Prota, U., 1985. Investigations on the yield of "Monica" and "Italia" vines affected by legno riccio (stem pitting). *Phytopathol. Mediterr.*, 24, 64-67.
- Goheen, A.C., 1988. *Compendium of Grape Diseases*, Ed: Pearson, R.C. ve Goheen, A.C. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, s. 53.
- Gugerli, P., Brugger, J.J. ve Bovey, R., 1984. L'enroulement de la vigne: mise en évidence de particules virales et développement d'une méthode immunoenzymatique pour le diagnostic rapide. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture*, 16, 299-304.

- Gugerli, P., 2003. Grapevine leafroll and related viruses. In Proc. 14th ICVG Conference, Sept. 12-17, Locorotondo, Italy.
- Gürsoy, Y.Z., 1991. Asma Yaprak Kıvrılma Virüsü (*Grapevine leafroll virus* Tip I ve III)'nün Bazı Üzüm Çeşitlerinde ELISA Testi İle Saptanması. VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, 7-11 Ekim 1991, İzmir, 397-400.
- Hewitt, B.W., 1953. Virus Diseases of Grapevine. Plant Diseases. The Year Book of Agriculture, 744-753.
- Hewitt, B.W., 1954. Some Virus and Virus-like Diseases of Grapevines. Bull. Calif. Dept. Agric., 43, 47-64.
- Hu, J.S., Gonsalves, D. ve Teliz, D., 1990. Characterization of Closterovirus-like Particles Associated with Grapevine Leafroll Disease. Journal of Phytopathology, 128 (1), 1-14.
- İnce, E. ve Yavuz, Ş., 2015. Current status of *Grapevine leafroll associated viruses* in East Mediterranean Region of Turkey. Proceedings of the 18th Congress of ICVG, 7-11 September 2015, Ankara, Turkey.
- Karadeniz, H., 2016. Tokat İli ve İlçelerinde Bağ Virüs Hastalıklarının Serolojik Yöntemlerle Saptanması. (Y. Lisans Tezi), Gaziosmanpaşa Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Kaya, A. ve Erilmez, S., 2012. First Report of *Grapevine Leafroll-associated Virus 4* in Vineyards of Turkey. Plant Disease, 96 (8), 1230.
- Kaya, A. ve Erilmez, S., 2014. Ege Bölgesi Bağlarında Virüs Hastalıklarının Belirlenmesi. The Journal of Turkish Phytopathology, 43 (1-3), 45-57.
- Köklü, G., 1999. Production of Antisera to *Grapevine leafroll associated virus 2* and Evaluation in the Serological Diagnosis in Infected Plants. The Journal of Turkish Phytopathology, 28 (3), 119-131.
- Köklü, G. ve Baloğlu, S., 2000. Determination of Incidence of *Grapevine leafroll associated viruses* in Some Grapevine Varieties Grown in Thrace Region. The Journal of Turkish Phytopathology, 29 (2-3), 85-94.
- Li, R., Mocka, R., Huang, Q., Abad, J., Hartung, J. ve Kinarda, G., 2008. A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. Journal of Virological Methods, 154, 48-55.
- Ling, K.S., Zhu, H.Y. ve Gonsalves, D., 2004. Complete nucleotide sequence and genome organization of *Grapevine leafroll-associated virus 3*, type member of the genus *Ampelovirus*. Journal of General Virology, 85, 2099-2102.
- Maliogka, V.I., Dovas, C.I. ve Katis, N.I., 2008. Generic and Species-Specific Detection of Viruses Belonging to an Evolutionary Distinct Lineage Within the *Ampelovirus* Genus. Journal of Virological Methods, 154, 41-47.
- Maliogka, V.I., Dovas, C.I., Lotos, L., Efthimiou, K. ve Katis, N.I., 2009. Complete genome analysis and immunodetection of a member of a novel virus species belonging to the genus *Ampelovirus*. Archives of Virology, 154, 209-218.
- Martelli, G.P., 1987. Virus and Virus-like Diseases of Grapevine in Turkey. A Report to the Government of Turkey, Published by FAO, Rome.

- Martelli, G.P. ve Savino, V.C., 1988. Fanleaf Degeneration. Compendium of Grape Diseases, Ed: Pearson, R.C. ve Goheen, A. APS Press, St. Paul, MN, USA.
- Martelli, G.P. ve Boudon-Padieu, E., 2006. Directory of Infectious Diseases of Grapevines and Viroses and Viruslike Diseases of the Grapevine. Bibliographic Report 1998-2004, Chiam.
- Martelli, G.P., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Agranovsky, A.A., Al Rwahnih, M., Dolja, V.V., Dovas, C.I., Fuchs, M., Gugerli, P., Hu, J.S., Jelkmann, W., Katis, N.I., Maliogka, V.I., Melzer, M.J., Menzel, W., Minafra, A., Rott, M.E., Rowhani, A., Sabanadzovic, S. ve Saldarelli, P., 2012. Taxonomic revision of the family Closteroviridae with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus *Ampelovirus* and the putative species unassigned to the family. *Journal of Plant Pathology*, 94 (1), 7-19.
- Martelli, G.P., 2014. Directory of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine and Their Agents. *Journal of Plant Pathology*, 96 (1), 1-136.
- Martelli, G.P., 2015. A historical account with an eye to the studies of the last 60 years or so. Extended Abstracts 18th Meeting ICVG, Ankara.
- Martin, R.R., Eastwell, K.C., Wagner, A., Lamprecht, S. ve Tzanetakis, I.E., 2005. Sürvey for Viruses of Grapevine in Oregon and Washington. *Plant Disease*, 89 (7), 763-766.
- Ömeroğlu, E., 2016. Tekirdağ İli Bağ Alanlarında Bazı Üzüm Çeşitlerinde Asma Yaprak Kıvrılma Virüsünün (GLRaVs) Belirlenmesi. (Y. Lisans Tezi), Namık Kemal Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Önder, S., Akgül, S., Gümüş, M. ve Paylan, İ.C., 2015. Ege Bölgesi'nde Yetiştirilen Üzüm Çeşitlerinde *Grapevine fanleaf nepovirus* (GFLV)'nin Yaygınlık Durumu. *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi-A*, 27 (Türkiye 8. Bağcılık ve Teknolojileri Sempozyumu Özel Sayısı), 627-636.
- Önder, S., 2016. Ege Bölgesi Bağlarında Asma Yaprak Kıvrılma Hastalığı İle İlişkili Virüslerin Tanılanması ve Karakterizasyonu. (Doktora Tezi), Ege Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Önder, S., Paylan, İ.C. ve Gümüş, M., 2016. Ege Bölgesi Bağ Alanlarında Sorun Olan Bazı Viral Etmenlerin Real-Time PCR İle Teşhisi. *Türkiye Fitopatoloji Derneği Dergisi*, 45 (1), 21-29.
- Özaslan, M., Baloğlu, S. ve Yılmaz, M.A., 1991. Kahramanmaraş Bölgesinde Lokal Olarak Yetiştirilen Üzüm Çeşitlerinde Virüs Hastalıkları. VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi, Türkiye Fitopatoloji Derneği, Bildiriler, 401-406.
- Özaslan, M., Baloğlu, S. ve Yılmaz, M.A., 1993. Virus Diseases of Grapevine in Southeastern Anatolian Region in Türkiye. 11th Proc. of ICVG, Montreux, Switzerland, 62, 122.
- Özaslan, M. ve Yılmaz, M.A., 1995. Adana, Tarsus, Şanlıurfa ve Adıyaman Bölgelerinde Yetiştirilen Bağlara Zarar Veren Virüs Hastalıkları. Türkiye VII. Fitopatoloji Kongresi, Adana, 306-312.

- Öztırak, M. K., 2017. Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde Otokton Asma Varyetelerinde Asma Virüs D (*Grapevine virus D*, GVD)'nin Bulunma Durumu ve Genetik Çeşitliliği. (Y. Lisans Tezi), Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Rowhani, A., 1992. Use of F(ab')₂ Antibody Fragment in ELISA for Detection of Grapevine Viruses. *Am. J. Enol. Vitic.*, 43 (1), 38-40.
- Rowhani, A., Chay, C., Golino, D.A. ve Folk, B.W., 1993. Development of a Polymerase Chain Reaction Technique for the Detection of *Grapevine fanleaf virus* in Grapevine Tissue. *Phytopathology*, 83 (7), 749-753.
- Saldarelli, P., Cornuet, P., Vigne, E., Talas, F., Bronnebkant, I., Dridi, A.M., Andret-Link, P., Boscia, D., Gugerli, P., Fuchs, M. ve Martelli, G.P., 2006. Partial characterization of two divergent variants of *Grapevine leafroll-associated virus 4*. *Journal of Plant Pathology*, 88, 204-214.
- Sarpkaya, K., 2003. Gaziantep İli ve İlçelerinde Bağ Virüs Hastalıklarının Serolojik Yöntemlerle Saptanması. (Y. Lisans Tezi), Gaziantep Üniversitesi. Biyoloji bölümü, Gaziantep.
- Sforza, R., Boudon-Padieu, E. ve Greif, C., 2003. New mealybug species vectoring *Grapevine leafroll-associated viruses-1 and-3* (GLRaV-1 and -3). *European Journal of Plant Pathology*, 109 (9), 975-981.
- Tanaka, H., 1988. Virus Infection of Grapevine Rootstock Varieties in Japan. *Bulletin of the Fruit Tree Res. Sta.*, Tsukuba, Ibaraki, Japan, 15, 83-91.
- Tarla, G., 2005. Adana ve Mersin İllerindeki Asma Kısa Boğum Virüs Hastalığının Bağlarda ve Virüs Vektörü Nematodlarda Serolojik ve PCR Yöntemleriyle Belirlenmesi. (Doktora Tezi), Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Tülek, B., 2014. Asmalarda Kısa Boğum Hastalığı [*Grapevine fanleaf virus* (GFLV)] ile Vektör Nematod *Xiphinema Spp.* İlişkilerinin Araştırılması. (Y. Lisans Tezi), Namık Kemal Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Türkmen, Y., 2014. Türkiye Bağlarında Yaprak Kıvrılma Virüs Türlerinin Tespiti ve Yaygınlığı. (Y. Lisans Tezi), Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Walter, B., 1991. New or Improved Procedures for the Detection and Identification of Viruses or Agents or Virus-like Diseases of Grapevine and for Diagnosis. *Proc. 10th Meeting of ICGV, Montreux, Switzerland*, 127-130.
- Yakar, M., 2017. Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi Bağlarında Otokton Asma Varyetelerinde Asma Yaprak Kıvrıcılık İlişkili Virüs-2 (GLRaV-2)'ün Genetik Çeşitliliğinin Belirlenmesi. (Y. Lisans Tezi), Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Yılmaz, M.A., Yurtmen, M.İ., Çığşar, İ. ve Özasan, M., 1997. A Survey of Grapevine Viruses in Turkey. *12th Meeting of the ICGV, Extended Abstracts, Lisbon, Portugal*, 113.

- Zee, F., Gonsalves, D., Kim, K.S., Pool, R. ve Lee, R.F., 1987. Cytopathology of leafroll diseases grapevine and the purification and serology of associated closteroviruslike particles. *Phytopathology*, 77, 1427-1434.
- Zimmermann, D., Bass, P., Legin, R. ve Walter, B., 1990. Characterization and serological detection of four closterovirus-like particles associated with leafroll disease on grapevine. *Journal of Phytopathology*, 130 (3), 205-218.



7. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Kübra SARITAŞ

Doğum Yeri: Bakırköy/İSTANBUL

Doğum Tarihi: 30.12.1987

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu/ Mezuniyet Tarihi

Lise: Ordu Atatürk Lisesi (2004)

Önlisans: Uludağ Üniversitesi, Gıda Teknolojisi (2008)

Lisans: Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü (2012 Yılı Fakülte Birincisi)

Yüksek Lisans: Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı (2016/2019)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar

Fiskobirlik (Fındık Tarım Satış Kooperatifi), Tarım Danışmanı, 2016-Devam ediyor.

Yayımlar

1. Sarıtaş, K., ve Topkaya, Ş., 2019. Tokat İli Bağlarında *Grapevine fanleaf virus* ve *Grapevine leafroll associated Virus-1, 2, 3, 4, 9* Virüslerin Moleküler Olarak Belirlenmesi. 3. Uluslararası ÜNİDOKAP Karadeniz Sempozyumu Özet Kitapçığı, 21-23 Haziran 2019, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat.