



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOĞU AKDENİZ VE GÜNEYDOĞU ANADOLU
BÖLGELERİNDE OTOKTON ASMA
VARYETELERİNDE ASMA VİRÜS D (*Grapevine virus*
D, GVD)' NİN BULUNMA DURUMU VE GENETİK
ÇEŞİTLİLİĞİ

MUSTAFA KEMAL ÖZTIRAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA BÖLÜMÜ ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2017

T.C

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOĞU AKDENİZ VE GÜNEYDOĞU ANADOLU
BÖLGELERİNDE OTOKTON ASMA
VARYETELERİNDE ASMA VİRÜS D (*Grapevine virus*
D, GVD)'NİN BULUNMA DURUMU VE GENETİK
ÇEŞİTLİLİĞİ

MUSTAFA KEMAL ÖZTIRAK

Bu tez,
Bitki Koruma Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS
derecesi için hazırlanmıştır

KAHRAMANMARAŞ 2017

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Mustafa Kemal ÖZTIRAK tarafından hazırlanan ‘**DOĞU AKDENİZ VE GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGELERİNDE OTOKTON ASMA VARYETELERİNDE ASMA VİRÜS D (*Grapevine virus D, GVD*)’ NİN BULUNMA DURUMU VE GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİ**’ adlı bu tez jürimiz tarafından 17/07/2017 tarihinde oy birliği ile Bitki Koruma Bölümü Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nihal BUZKAN (DANIŞMAN)

Bitki Koruma

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Yrd.Doç.Dr. B. Bülent ARPACI (ÜYE)

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Kilis Yedi Aralık Üniversitesi

Prof.Dr. Mürüvvet ILGIN (ÜYE)

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Mustafa ŞEKKELİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazma kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Mustafa Kemal ÖZTIRAK

Bu çalışma KSÜ BAP tarafından desteklenmiştir.
Proje no : 2016/6-8 YLS

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılır Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

**DOĞU AKDENİZ VE GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGELERİNDE OTOKTON
ASMA VARYETELERİNDE ASMA VİRÜS D (*Grapevine virus D*, GVD)'NİN
BULUNMA DURUMU VE GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

MUSTAFA KEMAL ÖZTIRAK

ÖZET

Asma virüs D (GVD)'nin otokton asma varyetelerinde bulunma düzeyi ve izolatlarının populasyon çeşitliliği iki önemli bağcılık bölgesinde (Doğu Akdeniz, Güneydoğu Anadolu) araştırılmıştır. Bağ alanlarından toplanmış ve soğuk ortamda depolanmış yaprak ve sürgün örnekleriyle, sera koşullarında köklendirilmiş bir yaşlı çeliklerden alınan taze sürgünlerden toplam nükleik asit (TNA) izolasyonu silika yakalama yöntemiyle yapılmıştır. TNA'lardan hazırlanan cDNA'lar, GVD'nin CP7V/CP471C primer dizinleri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonuyla çoğaltılmıştır. Testlenen toplam 175 asma örneğinden hazırlanan cDNA'ların, GVD-spesifik primerleriyle elde edilen PCR DNA'larının elektroforetik analizinde 13 örnekte 474 bp büyüklüğünde DNA bantları gözlenmiştir. GVD tanılanmış asmaların mekanik inokülasyonu, *Nicotiana occidentalis* ve *N. benthamiana* bitkilerine yapılmıştır.

PCR DNA'larının nükleotid dizilemesi doğrudan iki yönlü olarak yaptırılmış ve BLAST programıyla gen bankasında kayıtlı benzerlik gösterdiği dizinlerle karşılaştırılmıştır. Türk izolatları İtalya'da otsu konukçudan (*Nicotiana occidentalis*) (Gen bankası erişim: Y07764) izole edilmiş GVD izolatıyla %90, Brezilya'daki GVD izolatıyla (Gen Bankası erişim: JQ031716) %98 nükleotid homolojisi göstermiştir.

N. occidentalis bitkilerinde damarlarda kloroz semptomları gözlenmiştir. Otsu konukçulardan izole edilen TNA'lardan hazırlanan cDNA'ların analizi *Viti-/Foveavirus* cinsler için hazırlanmış dejenere primerlerle nested-PCR ile yapılmıştır. PCR DNA'larının nükleotid dizinleri, GVD ile homoloji göstermemiştir. GVD bu araştırmayla ilk kez Türkiye'de asmalarda rapor edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Asma, Virüs, *Vitivirus*, *Grapevine virus D*

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, Temmuz/2017

Danışman : Prof. Dr. Nihal BUZKAN

Sayfa sayısı : 37

**OCCURRENCE AND GENETIC DIVERSITY OF *Grapevine virus D* IN
AUTOCHTHONOUS GRAPEVINE VARIETIES IN THE EASTERN
MEDITERRANEAN AND SOUTHEAST ANATOLIA REGIONS**

(M.Sc. THESIS)

MUSTAFA KEMAL ÖZTIRAK

SUMMARY

GVD was investigated in vineyards with autochthonous grapevine varieties in two viticultural areas in Turkey, Eastern Mediterranean and Southeast Anatolia. Total RNA was extracted from a total of 175 samples from several cultivars and the samples were tested for the presence of GVD by RT-PCR using primers CP7V/CP471C (Abou-Ghanem *et al.*, 1997). A 474 bp-product corresponding to a fragment of the coat protein gene was amplified 13 samples. Samples resulting positive for GVD were used for mechanical transmission on *Nicotiana occidentalis* and *N. benthamiana*.

PCR amplicons were subsequently sequenced and subject to BLASTN search to confirm the identity of the target virus. The Turkish isolates showed 90% nucleotide sequence identity of a GVD isolate from herbaceous host (*Nicotiana occidentalis*) from Italy (GenBank Accession No. Y07764) and 98% of a GVD isolate from Brasil (GenBank Accession No. JQ031716).

Vein chlorosis was the symptom observed in *N. occidentalis* after mechanical inoculation. cDNAs prepared from TNAs of herbaceous indicator plants were used in nested-PCR with primer pairs for *Viti-/Foveavirus* genus. Nucleotide sequence from PCR DNA did not show homology with GVD. To our knowledge, this is the first report on the occurrence of GVD in Turkish grapevines.

Key words: Grapevine, Virus, *Vitivirus*, *Grapevine virus D*

Kahramanmaraş Sütçü Imam University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection, July /2017

Supervisor : Prof. Dr. Nihal BUZKAN

Page number : 37

TEŞEKKÜR

Tez alıőmam sırasında bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan danışman hocam sayın Prof. Dr. Nihal BUZKAN'a, ilgisini ve önerilerini göstermekten kaçınmayan Araştırma Görevlisi Selin Ceren BALSAK'a, sağladığı güzel çalışma ortamı ve manevi destekleri nedeniyle Döne KILIÇ ve Merve YAKAR'a, hayatımın her aőamasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	i
SUMMARY	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
2.1. Mantarimsı Odun (Rugose wood, RW) Sendromlarıyla İlişkilendirilmiş Virüsler ile İlgili Yurt Dışında Yapılmış Çalışmalar	7
2.2. Mantarimsı Odun (Rugose wood, RW) Sendromlarıyla İlişkilendirilmiş Virüsler ile İlgili Türkiye'de Yapılmış Çalışmalar	11
3. MATERYAL VE METOT	14
3.1. Materyal	14
3.2. Metot	14
3.2.1. Asma Yapraklarından Toplam Nükleik Asit (TNA) İzolasyonu	14
3.2.2. Tersine transkripsiyon (Reverse Transcription, RT) ve cDNA sentezi .	15
3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR)	15
3.2.3. PCR DNA'larının nükleotid dizi analizi	16
3.2.4. Mekanik inokulasyon	16
3.2.5. Nested-RT-PCR	18
4. BULGULAR	19
4.1. Arazi Surveyi	19
4.2. PCR Analizi	20
4.3. Mekanik İnokulasyon sonrası virüs-benzeri belirtiler ve PCR analiz değerlendirmesi	21
4.4. Asma GVD izolatlarının Filogenetik Analizi	22

5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	28
6. KAYNAKLAR.....	30
ÖZGEÇMİŞ.....	37



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 3.1. İnokulasyon işleminde kullanılan tütün bitkileri (a) <i>Nicotiana benthamiana</i> , (b) <i>Nicotiana occidentalis</i>	17
Şekil 3.2. Hazırlanan inokulum ve tütün yapraklarına GVD'nin mekanik inokulasyonu ...	18
Şekil 4.1. GVD enfeksiyonunu gösteren 474 bç büyüklüğündeki DNA bantları.....	21
Şekil 4.2. <i>Nicotiana occidentalis</i> bitkileri üzerinde GVD-pozitif tanılanan asma örnekleriyle yapılan mekanik inokülasyon sonrası meydana gelen damar klorozu belirtileri.....	23
Şekil 4.3. Dış bölge primerleriyle yapılan Nested-RT-PCR testinde çoğaltılan cDNA'ların elektroforetik analizinde 363 bç büyüklüğündeki DNA bantları.	24
Şekil 4.4. İç bölge primerleriyle yapılan Nested-RT-PCR testinde çoğaltılan cDNA'ların elektroforetik analizinde 198 bç büyüklüğündeki DNA bantları.	24
Şekil 4.5. TR GVD izolatlarının 474 bç büyüklüğündeki ORF4 bölgesi nükleotid dizinlerine göre neighbor-joining (NJ) yöntemiyle gen bankasından kayıtlı, izolatlarla oluşturulmuş filogenetik ağacı.....	25

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Asmada hastalık yapan virüsler ve taksonomik ilişkileri.....	4
Çizelge 2.1. RW hastalık sendromları ve biyolojik indekslemede kullanılan indikatör bitkiler.....	7
Çizelge 2.2. GVA, GVB ve GVD Açık okuma bölgeleri arasındaki aminoasit dizi benzerlik oranı	10
Çizelge 3.1. GVD (<i>Vitivirus</i>) tanınması için PCR' da kullanılan primer dizinleri.....	16
Çizelge 3.2. <i>Vitivirus</i> ve <i>Foveavirus</i> cinsinde, virüs türlerinin nested-PCR ile tanınmasında kullanılan dejenere primer dizinleri ve çoğalttıkları DNA parçalarının büyüklükleri.....	18
Çizelge 4.1. GVD tanısı için kullanılan otokton asma varyeteleri ve alındıkları lokasyonlar	19
Çizelge 4.2. Survey alanlarından alınan toplam ve GVD ile enfekteli olduğu saptanan örnek sayısı.....	21
Çizelge 4.3. Türk ve NCBI'da kayıtlı GVD ve GVA izolatlarının nükleotid dizini karşılaştırması.....	24
Çizelge 4.4. GVD izolatlarının amino asit dizinlerinin karşılaştırması.....	27

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Aa	:	Aminoasit
ArMV	:	<i>Arabidopsis mosaic virus</i>
bç	:	Baz çifti
bp	:	Baz çifti (Base pair)
cDNA	:	Tamamlayıcı DNA (Complementary DNA)
dk	:	Dakika
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	:	Deoksi Nükleotid Trifosfat
dsRNA	:	Çift iplikli RNA (Double-stranded RNA)
EDTA	:	Ethylene diamine tetra acetic acid
ELISA	:	Enzyme-linked immunosorbent assay
GFLV	:	<i>Grapevine fanleaf virus</i>
GLRaV	:	<i>Grapevine leafroll associated 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>
GVA	:	<i>Grapevine virus A</i>
GRSPaV	:	<i>Grapevine rupestris stem pitting- associated virus</i>
GVB	:	<i>Grapevine virus B</i>
GVD	:	<i>Grapevine virus D</i>
gr	:	Gram
kDA	:	Kilodalton
M	:	Molar
MAbs	:	Monoclonal antibodies
MgCl₂	:	Magnezyum klorür
mM	:	Milimolar

NaI	:	Sodyum iyodür
ng	:	Nanogram
nm	:	Nanometre
nt	:	Nükleotid
ORF	:	Açık okuma bölgesi (Open Reading Frame)
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
RdRp	:	RNA dependent RNA polimeraz
RNA	:	Ribonükleik asit
rpm	:	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions per minute)
RT	:	Tersine Transkripsiyon (Reverse transcription)
RW	:	Mantarımsı odun (Rugose wood)
sn	:	Saniye
ssRNA	:	Tek iplikli RNA (Single-stranded RNA)
TAS-ELISA	:	Triple Antibody Sandwich-Enzyme linked immunosorbent assay
Taq	:	<i>Thermus aquaticus</i>
TNA	:	Toplam nükleik asit
ToBRV	:	<i>Tobacco black ringspot virus</i>
ToRSV	:	<i>Tomato ringspot virus</i>
UV	:	Ultraviyole
V	:	Volt
µl	:	Mikrolitre

1. GİRİŞ

Asma (*Vitis* spp.) ılıman iklim kuşağında yaygın olarak yetiştirilen yüksek tarımsal değere sahip bir bitki türüdür. Türkiye sadece asmanın farklılaşmasının gerçekleştiği alanlardan biri olmayıp, çok eskiye dayanan bağcılık tecrübesine de sahiptir. Asmanın yüzlerce yıl yetiştirildiği bu topraklarda doğal olarak meydana gelen melezlemeyle, geniş çeşit zenginliğine ve genetik potansiyele sahiptir (Uzun ve Bayır, 2010). Vejetatif olarak çoğaltılan bitki türlerinde olduğu gibi asma da hücre içinde enfeksiyon yapan patojen (virüsler, viroidler, floem ve ksilem de bulunan prokaryotlar) ve zararlının saldırısına maruz kalmaktadır. Zararlı ve patojenler ürün kayıplarına, bağın verimlilik süresinin kısılmasına ve asma ölümlerine neden olmaktadır.

Asmada enfeksiyon yapan 70'den fazla etmen içerisinde virüsler (65), viroidler (5), fitoplazmalar (8) ve böceklerle taşınan ksilem bakterileri (1) rapor edilmiştir (Çizelge 1.1) (Martelli, 2014). Viral türler içinde en önemlileri bulaşık soysuzlaşma, yaprak kıvrıcıklığı, flek ve mantarimsı odun hastalıklarıyla ilişkilendirilmiş olanlarıdır (Martelli, 2010).

Toprak kökenli nepovirüsler, Asma kısa boğum virüsü (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) ve Arabis mozaik virüsü (*Arabis mosaic virus*, ArMV) Avrupa'daki bağlarda yaygın olan kısa boğum dejenerasyonuna neden olmaktadır (Martelli, 1993a; Andret-Link ve ark., 2004). Bulaşık soysuzlaşma olarak bilinen hastalığın etmeni Asma kısa boğum virüsü (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV)'dür. Virüs *Nepovirus* (Secoviridae) cinsinde yer almaktadır.

Closteroviridae familyasında en az beş farklı tür, asmada (*Vitis* spp.) yaprak kıvrıcıklığı hastalığıyla ilişkilidir. Yaprak kıvrıcıklık hastalığı meyve rengine bozulmaya, danelerin geç olgunlaşmasına ve ürün miktarında %20-40 düzeyinde azalmalara neden olmaktadır (Goheen ve Cook, 1959; Woodrum ve ark., 1984; Goheen, 1988; Bovey ve Martelli, 1992). Yaz aylarında geç dönemlerde ve sonbaharda kırmızı çeşitlerde yapraklarda damarlar arasında kırmızılığa, beyaz çeşitlerde sarılığa neden olur. Bu familyaya bağlı dört yeni cins tanımlanmıştır: *Ampelovirus* cinsi altgrup I'de Asma yaprak kıvrıcıklık ilişkili virüs (*Grapevine leafroll-associated virus*)-1 ve -3, altgrup II'de GLRaV-4 ve 6'nın moleküler varyantları (GLRaV-4 streyn-5, streyn-6, streyn-9, streyn-Pr, streyn-De ve streyn-Car) bulunmaktadır. Altgrup II'de yer alan virüslerin okunuşlarını kolaylaştırmak için GLRaV-5, -6, -9 olarak isimlendirilmeleri kabul edilmiştir.

GLRaV-2'nin yer aldığı *Closterovirus* cinsi ve GLRaV-7'nin daha sonra sınıflandığı *Velarivirus* cinsi kurulmuştur. Son olarak *Crinivirus* cinsinde asmada enfeksiyon yapan virüs bulunmamaktadır (Martelli ve ark., 2012).

Mantarımsı odun (Rugose wood, RW), asmada en yaygın ve aşıyla taşınan hastalıklardan bir tanesidir. Bu hastalıkla ilişkili virüsler *Betaflexiviridae* familyasında *Vitivirus* ve *Foveavirus* cinslerinde bulunmaktadır. Dört vitivirüs Asma A (*Grapevine virus A*, GVA) (Chevalier ve ark., 1995), B (*Grapevine virus B*, GVB) (Boscia ve ark., 1993), D (*Grapevine virus D*, GVD) (Boscia ve ark., 2001) ve E (*Grapevine virus E*, GVE) (Nakaune ve ark., 2008a) ile bir foveavirüs olan Asma rupestris gövde çukurlaşması ilişkili virüs (*Grapevine rupestris stem pitting-associated virus*, GRSPaV) RW ile ilişkilendirilmiştir (Carstens, 2010).

RW hastalık kompleksini meydana getiren sendromlar; (i) Kober gövde oluşu (Kober stem grooving), (ii) Mantarımsı doku (corky bark), (iii) LN33 gövde oluşu (LN33 stem grooving), (iv) Rupestris gövde çukurlaşması (Rupestris stem pitting)'dir. Bu hastalıklar duyarlı indikatör bitkilerde meydana getirdikleri farklı simptomlara göre adlandırılmıştır. Kober stem grooving, Kober 5BB (*Vitis berlandieri* × *V. riparia*); corky bark ve LN33 stem grooving, LN33 (Couderc 1613 x *V. berlandieri*); rupestris stem pitting, *V. rupestris* cv. St George anaçları üzerine biyolojik olarak indekslendiklerinde bu anaçlar üzerinde meydana getirdikleri spesifik simptomlar ile ayırt edilmektedir (Garau ve ark., 1997). Kompleks hastalıklar, dünya'nın birçok yerinde ve aynı zamanda ülkemizde oldukça yaygındır ve asmanın odunsu gövdesi üzerinde meydana getirdiği çukurluklar ve oluklar ile karakterize edilir.

RW sendromlarıyla ilişkilendirilmiş virüslerin partikülleri uzun iplikli şekilde ve pozitif anlamlı RNA bulundurmaktadır (Minafra ve ark., 1997). Virüsler konukçu floeminde yerleşmiştir ve *V. vinifera* üzerinde simptom vermeksizin bulunmaktadır. Bitkiden bitkiye enfekteli bitkisel materyalle taşınmakla birlikte bazıları floemde emgi yapan Hemiptera takımında *Pseudococcidae* ve *Coccidae* familyasında unlu bitler ve koşnillerle taşınmaktadır (Cabaleiro ve Segura, 2006; Cabaleiro ve ark., 2008).

Flek hastalığı *Tymoviridae* familyasında *Maculavirus* cinsinde Asma flek virüs (*Grapevine fleck virus*, GFkV) ile ilişkilendirilmiştir (Martelli ve ark., 2002) ve genellikle *Vitis vinifera* üzerinde latent bulunmaktadır (Sabanadzovic ve ark., 1996). Bu virüsler serolojik olarak birbirinden farklıdır.

Sayırsız arkeolojik bulgular ve araştırmalar Anadolu ve havzasındaki yerleşim bölgelerinin asmanın anavatanı olduğu ve *V. vinifera* L: 'nın gen kaynağını işaret etmektedir (Vouillamoz ve ark., 2006). Türkiye'de bağlarda asma virüslerinin bulunma düzeyleri hakkında yapılan çalışmalarda, aşılı ve aşısız bağlarda virüslerin neden olduğu gövde simptomları hakkında bilgi yer almazken, birçoğunda virüslerin kaynaklarda belirtilen spesifik simptomları dahi kaydedilmemiştir. Belirti taşımayan bulaşık materyallerin üreticiler arasında değışiminden ve birçok alanda aşısız materyallerin kendi kökleri üzerinde yetiştirilmesinden dolayı kompleks hastalıkla ilişkilendirilmiş bazı virüsler (GVA, GVB ve GRSPaV) geniş alanlara kolaylıkla ve hızlıca yayılmıştır (Çiğşar ve ark., 2002a; Akbaş ve ark., 2007; Buzkan ve ark., 2010, 2012, 2015. Türkiye'de bağ alanlarında *Vitivirus* cinsi içerisinde GVD hakkında bir çalışma yapılmamış olup, araştırma projesi aşısız eski bağlardan alınmış otokton (yerli) asma çeşitlerinde, virüsün bulunma düzeyinin belirlenmesi ve izolatlarının populasyon yapısı hakkında ön bilgi elde etmek amacıyla hazırlanmıştır.

Çizelge 1.1. Asmada hastalık yapan virüsler ve taksonomik ilişkileri (Martelli, 2014).

Familya	Cins	Tür
Tek zincirli genoma sahip DNA virüsü		
<i>GEMINIVIRIDAE</i>	Belirlenmemiş	<i>Grapevine Cabernet franc-associated virus</i> (GCFaV)
Çift zincirli genoma sahip DNA virüsü		
<i>CAULIMOVIRIDAE</i>	<i>Badnavirus</i>	<i>Grapevine vein clearing virus</i> (GVCV)
Çift zincirli genoma sahip RNA virüsleri		
<i>REOVIRIDAE</i>	<i>Oryzavirus</i>	İsmlendirilmemiş Virüs
<i>ENDORNAVIRIDAE</i>	<i>Endornavirus</i>	İsmlendirilmemiş Virüs
<i>PARTITIVIRIDAE</i>	<i>Alphacryptovirus</i>	<i>Raphanus sativus cryptic virus 3</i> (RsCV-3)
Tek zincirli negatif duyarlı RNA virüsleri		
<i>BUNYAVIRIDAE</i>	<i>Tospovirus</i>	<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)
Tek zincirli pozitif duyarlı RNA virüsleri (iplik şeklinde)		
<i>CLOSTEROVIRIDAE</i>	<i>Closterovirus</i>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 2</i> (GLRaV-2)
	<i>Ampelovirus</i>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 1</i> (GLRaV-1)
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i> (GLRaV-3)
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 4</i> (GLRaV-4)
		GLRaV-4 strain 5
		GLRaV-4 strain 6
		GLRaV-4 strain 9
		GLRaV-4 Pr
	<i>Velarivirus</i>	<i>Grapevine leafroll-associated virus 7</i> (GLRaV-7)
<i>ALPHAFLEXIVIRIDAE</i>	<i>Potexvirus</i>	<i>Potato virus X</i> (PVX)

Çizelge 1.1. 'nin devamı

Familya	Cins	Tür
BETAFLEXIVIRIDAE	<i>Foveavirus</i>	<i>Grapevine rupestris stem pitting-associated-virus</i> (GRSPaV)
	<i>Trichovirus</i>	<i>Grapevine berry inner necrosis virus</i> (GINV)
		<i>Grapevine Pinot gris virus</i> (GPGV)
	<i>Vitivirus</i>	<i>Grapevine virus A</i> (GVA)
		<i>Grapevine virus B</i> (GVB)
		<i>Grapevine virus D</i> (GVD)
		<i>Grapevine virus E</i> (GVE)
<i>Grapevine virus F</i> (GVF)		
POTYVIRIDAE	<i>Potyvirus</i>	<i>Bean common mosaic virus</i> (BCMV), peanut strain
Tek zincirli pozitif duyarlı RNA virüsler (Çubuk şeklinde)		
VIRGAVIRIDAE	<i>Tobamovirus</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)
		<i>Tomato mosaic virus</i> (ToMV)
SECOVIRIDAE	<i>Fabavirus</i>	<i>Broadbean wilt virus</i> (BBWV)
	<i>Nepovirus</i>	<i>Artichoke italian latent virus</i> (AILV)
		<i>Arabis mosaic virus</i> (ArMV)
		<i>Blueberry leaf mottle virus</i> (BBLMV)
		<i>Cherry leafroll virus</i> (CLRV)
		<i>Grapevine Bulgarian latent virus</i> (GBLV)
		<i>Grapevine Anatolian ringspot virus</i> (GARSV)
		<i>Grapevine deformation virus</i> (GDefV)
		<i>Grapevine chrome mosaic virus</i> (GCMV)
		<i>Grapevine fanleaf virus</i> (GFLV)
		<i>Grapevine Tunisian ringspot virus</i> (GTRV)
		<i>Peach rosette mosaic virus</i> (PRMV)
		<i>Raspberry ringspot virus</i> (RpRSV)
		<i>Tobacco ringspot virus</i> (TRSV)
<i>Tomato ringspot virus</i> (ToRSV)		
<i>Tomato blackring virus</i> (TBRV)		

Çizelge 1.1. 'nin devamı

Familyası belirtilmemiş	<i>Sadwavirus</i>	<i>Strawberry latent ringspot virus (SLRSV)</i>
<i>BROMOVIRIDAE</i>	<i>Alfamovirus</i>	<i>Alfalfa mosaic virus (AMV)</i>
	<i>Cucumovirus</i>	<i>Cucumber mosaic virus (CMV)</i>
	<i>Ilarvirus</i>	<i>Grapevine line pattern virus (GLPV)</i> <i>Grapevine angular mosaic virus (GAMoV)</i>
<i>TOMBUSVIRIDAE</i>	<i>Carmovirus</i>	<i>Carnation mottle virus (CarMV)</i>
	<i>Necrovirus</i>	<i>Tobacco necrosis virus D (TNV-D)</i>
	<i>Tombusvirus</i>	<i>Grapevine algerian latent virus (GALV)</i> <i>Petunia asteroid mosaic virus (PAMV)</i>
<i>TYMOVIRIDAE</i>	<i>Marafivirus</i>	<i>Grapevine asteroid mosaic-associated virus (GAMaV)</i>
		<i>Grapevine redglobe virus (GRGV)</i>
		<i>Grapevine Syrah virus 1 (GSV-1)</i>
		<i>Blackberry virus S (BIVS)</i>
	Unnamed putative marafivirus-like virus	
	<i>Maculavirus</i>	<i>Grapevine fleck virus (GFkV)</i>
<i>Grapevine rupestris vein feathering virus (GRVFV)</i>		
Familyası verilmemiş virüsler		
	<i>Idaeovirus</i>	<i>Raspberry bushy dwarf virus (RBDV)</i>
	<i>Sobemovirus</i>	<i>Sowbane mosaic virus (SoMV)</i>
Taksonomisi belirlenmemiş virüsler		
		Unnamed filamentous virus
		<i>Grapevine Ajinashika virus (GAgV)</i>
		<i>Grapevine stunt virus (GSV)</i>
		<i>Grapevine labile rod-shaped virus (GLRSV)</i>
		<i>Southern tomato virus (STV)</i>

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Mantarimsı Odun (Rugose wood, RW) Sendromlarıyla İlişkilendirilmiş Virüsler ile İlgili Yurt Dışında Yapılmış Çalışmalar

Mantarimsı odun (Rugose wood, RW) kompleks hastalığı dört sendromu içermektedir: Asma rupestris gövde yivleşmesi, asma Kober gövde oluğu, asma mantarimsı kabuk ve asma LN33 gövde oluğu. Bu hastalıklar aşısız *Vitis vinifera* üzerinde latent haldedirler, ancak Amerikan *Vitis* türleri ve anaç hibritleri ile aşılandıklarında simptom oluştururlar. RW ilk kez 1960'lı yıllarda Güney İtalya'da aşıyla taşınabilen hastalık olarak kayıtlara geçmiştir (Graniti ve Martelli, 1965). Başlangıçta lokal bir hastalık gibi düşünüldüyse bile daha sonraları Macaristan'da, ardından dünya'nın birçok yerinde tanılanmıştır. RW kompleks hastalıklarına neden olan etmenler *Vitivirus* ve *Foveavirus* cinsinde yer almaktadır. *Flexiviridae* familyası olarak belirlenen familya ismi daha sonra *Alpha-* ve *Betaflexiviridae* (*Tymovirales* takımı) olarak tekrar düzenlenmiştir. *Betaflexiviridae* familyasına *Viti-* ve *Foveavirus* cinslerinin yanı sıra RW hastalık kompleksiyle ilgili olmayan *Trichovirus*, *Carlavirus*, *Capillovirus* ve *Citrivirus* cinsleri de yerleştirilmiştir (King ve ark., 2011). *Vitivirus* cinsinde üç (GVA, GVB; GVD) ve *Foveavirus* cinsinde bir virüs (GRSPaV) RW hastalık kompleksiyle ilişkilendirilmiştir (Martelli, 2014). *Vitivirus* cinsi GVE, gövde yivleşmesi taşıyan asmadan izole edilmesine karşın hastalıkla doğrudan ilişkilendirmesi yapılmamıştır.

Çizelge 2.1. RW hastalık sendromları ve biyolojik indekslemede kullanılan indikatör bitkiler (Lázár, 2003).

İndikatör	Tanılanan hastalık
Kober 5BB (<i>Vitis berlandieri</i> × <i>Vitis riparia</i>)	Kober gövde oluklaşma (Kober stem grooving)
LN 33 (Couderce 1613 x <i>Vitis berlandieri</i>)	Mantarimsı kabuk (Corky Bark)
LN 33	LN33 gövde oluğu (LN 33 stem grooving)
<i>Vitis rupestris</i> cv. St. George	Rupestris gövde çukurlaşması (Rupestris stem pitting)

GVA ve GVB bitkinin floeminde lokalize olan, 800 nm uzunluğunda ipliksi partiküllere sahiptir (Roscligione ve ark., 1983; Tanne ve ark., 1989). GVA'nın farklı moleküler varyantlarını belirlemek amacıyla biyolojik ve moleküler çalışmalar yürütülmüştür. Virüsün 3 farklı moleküler gruba (Grup I, II, III) ayrıldığını ve gruplar içinde %78.0-89.3 nt, gruplar arasında %78.0-89.3 nt benzerliği olduğu bilinmektedir (Goszczyński ve Jooste, 2003). Güney Afrika'daki bağlarda yaygın bulunan Shiraz hastalığının GVA ile yakından ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Goszczyński, 2007).

GVB'nin genomu 7600 nükleotidden oluşan, beş açık okuma bölgesi (Open Reading Frame, ORF) tarafından kodlanmaktadır. (Boscia ve ark., 1993). GVB'nin dünya izolatlarıyla yapılan ORF1, ORF4, IR (intergenic region, genler arası bölge) ve ORF5 bölgelerinin nükleotid dizin karşılaştırması sonucuna göre 2 grup oluştuğu belirtilmektedir (Shi ve ark., 2004).

GVA ve GVB bitkisel materyallerle, aşı ve vektörlerle asmadan asmaya ve otsu konukçulara (*Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *Gomphrena globosa*) taşınmaktadır. GVA vektörleri *Planococcus citri*, *Pl. ficus*, *Pseudococcus longispinus*, *Ps. affinis*, *Heliococcus bohemicus* ve koşnil olan *Neopulvinaria innumerabilis*, GVB vektörleri ise *Pl. ficus*, *Ps. affinis*, *Ps. longispinus*'dir. Her iki virüs vektörleri ile yarı perzistent olarak taşınmaktadır (La Notte ve ark., 1997; Goszczyński ve Jooste 2003; Zorloni ve ark., 2006).

GVA ve GVB enfekteli aşı gözleri duyarlı indikatör bitkilere aşılandıklarında, asmaların aşı bölgesinde şişkinliğe ve aşı uyuşmazlığına neden olmuştur (Martelli ve Boudon-Padieu, 2006).

GVB izolatlarının biyolojik karakterizasyonu için *N. occidentalis* ve *N. cavicola* bitkilerine mekanik inokülasyonu yapıldığında indikatör bitkilerde klorotik beneklenme, damar bantlaşması, sarılık ve kıvrılmayı takip eden nekrotik lokal lezyonlar meydana gelmiştir (Voncina ve ark., 2011).

GRSPaV enfeksiyonunun patolojik özelliği bilinmemekle birlikte, RW hastalık kompleksinde "rupestris gövde yivleşmesiyle" yakın ilişkili olduğu kabul edilmektedir (Martelli, 1993c; Zhang ve ark., 1998; Meng ve ark., 1999; Nolasco ve ark., 2000; Nakaune ve ark., 2008b). Araştırmalardan elde edilen bulgular GRSPaV'un "damar nekrozu" (Bouyahia ve ark., 2005; Morelli ve ark., 2011) ve "Syrah decline" (Habibi ve ark., 2006; Lima ve ark., 2006; Al Rwahnih ve ark., 2009) hastalıklarına neden olduğunu göstermiştir.

'Syrah decline' hastalığı ABD, Avustralya ve Fransa'da yeni kurulan bağlarda erken ölümlere yol açmıştır. GRSPaV asmanın en önemli virüsleri arasında yer almaktadır (Meng ve ark., 2006; Nolasco ve ark., 2006; Alabi ve ark., 2010; Terlizzi ve ark., 2010). Virüs partikülleri 730 nm uzunluğundadır ve elektron mikroskopunda izlenmesi zordur. Viral genom anlamlı, tek iplikli RNA ve yaklaşık 8726 nt'den medyana gelmiştir. Moleküler ağırlığı 3.05×10^6 kDa, 5 veya 6 ORF'ye sahiptir. GRSPaV geniş genetik çeşitliliğe sahiptir. Enfekteli asmalardan elde edilen viral dizinlerin filogenetik analizi farklı varyantlarının olabileceğini göstermiştir (Terlizzi ve ark., 2010). Varyantlar dört ana gruba ayrılmıştır. Bunlar; grup I (SY), grup II 2 alt grup IIa (SG1, MG) ve alt grup-IIb (-1) olarak ikiye ayrılırken grup 3 (BS, PN) ve grup IV (LSL) olarak belirlenmiştir (Hu ve ark., 2015). Farklı varyantların farklı hastalıklara neden olabileceği düşünülmektedir. GRSPaV-1 damar nekrozuyla yakından ilişkilidir (Borgo ve ark., 2009), bunun yanı sıra -BS ise gövde yivleşmesine neden olmaktadır. Benzer şekilde GRSPaV-1 ve -SG1, St. George üzerine aşılı asmalarda simptome neden olmamakta ya da hafif şiddette simptom vermektedir (Meng ve ark., 2005).

GRSPaV-SY ise Syrah decline ile yakın ilişkilidir (Habibi ve ark., 2006; Lima ve ark., 2006; Al Rwahnih ve ark., 2009). Damar nekrozu sendromu virüs-benzeri etmen olarak ilk kez Legin ve Vuittenez (1973) tarafından Fransa'dan rapor edilmiştir. Daha sonra Türkiye'deki bağlar (Gürsoy, 1988) dahil olmak üzere Avrupa'da birçok ülkede ve ABD'de bildirilmiştir (Milkus ve ark., 1978; Martelli ve ark., 1978, 1992; Lehoczky ve ark., 1986; Rumbos, 1989; Golino, 1993; Kuhn, 1994). Damar nekrozu Avrupa asma varyetelerinde, birçok amerikan *Vitis* türleri ve hibritlerinde latent olurken, sadece 110R (*V. berlandieri* x *V. rupestris*) üzerinde simptom vermektedir. Virüs mekanik olarak ve vektörle taşınmaz, tohumla taşınma olasılığının üzerinde durulmakla birlikte kesinleşmiş bilgi bulunmamaktadır (Hu ve ark., 2015).

GVD İtalya'da "mantarimsı kabuk" simptomsu taşıyan cv. Primus çeşidinden izole edilmiştir (Bonavia ve ark., 1996). Virüsün gen kaynaklarında bulunma düzeyini araştırmak üzere yapılan çalışmalara RT-PCR yöntemiyle testlenen 218 asma örneğinin %4'ünde enfeksiyon yaptığı tespit edilmiştir. GVD'nin RW ile olan ilişkisini değerlendirmek için yapılan testlemelerde, hastalık sendromu taşımayan örneklerin hiçbirinde virüsün tanılanmamış olması, GVD'nin diğer vitivirüsler gibi hastalık etiolojisiyle ilişkili olabileceği ihtimalini ortaya koymuştur (Martelli ve ark., 1993b;

Abou-Ghanem ve ark., 1997). GVD genomu yaklaşık olarak 7600 baz çifti büyüklüğündedir.

Diğer *Vitivirus* cinsinin tipik üyeleri gibi 5 tane Açık okuma bölgesine (Open reading frame, ORF) sahiptir. Blastx ve blastp programları kullanılarak analiz yapıldığında, ORF2 haricinde diğer ORF bölgeleri, GVA ve GVB ile büyük ölçüde benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 2.2) (Abou-Ghanem ve ark., 1997).

Çizelge 2.2. GVA, GVB ve GVD Açık okuma bölgeleri arasındaki aminoasit dizi benzerlik oranı (Abou- Ghanem ve ark., 1997).

Protein	GVA/GVD	GVB/GVD	GVA/GVB
RdRp	% 42.20	% 38.30	% 47.30
ORF2	% 18	% 16.40	% 9.90
MP	% 48.20	% 28.30	% 24.60
CP	% 68.20	% 58.40	% 55.10
ORF5	% 53.80	% 16.70	% 9.80

Vitivirus'lerin serolojik ilişkileri incelendiğinde GVA için üretilmiş poliklonal antiserumun ELISA, IEM (immün elektron mikroskop), Western blot yöntemlerinde GVB ve GVD antijenleriyle çapraz reaksiyon göstermiştir. GVA monoklonal antiserumlarından bir tanesi (Mab PA3.B9), GVB ve GVD'nin ELISA ile tanınmasında kullanılmış, antiserumun GVD antijeniyle çapraz reaksiyon gösterdiği ancak GVB antijeniyle çapraz reaksiyon göstermediği belirlenmiştir. Buna göre üç virüsün serolojik olarak birbirleriyle ilişkili olabileceği, GVA ve GVD' nin tek antijenik belirleyicisi olan kriptotopunun ortak olduğu rapor edilmiştir (Chouieri ve ark., 1997).

Boscia ve ark. (2001)'nin GVD için ürettikleri Mab, ELISA testinde *Nicotiana occidentalis* bitki ekstraktları veya olgun asma çubuklarından alınan kortikal kazıntılarında virüsü tanılamıştır. Açık araziden alınan asma örneklerinde GVD'nin tanınmasında başarılı sonuçlar elde edilmiştir. ELISA kitinin güvenilirliği, *in vitro*'da geliştirilmiş GVD eksplantlarından otsu indikatör bitkilere taşınmış inokulumun testlenmesiyle incelenmiştir. RW sendromlarından bir veya daha fazlasıyla bulaşık toplam 223 asma örneği GVA, GVB ve GVD için ELISA, GRSPaV için Western blot ile testlenmiştir.

Denemede GVA'nın kober gövde oluk, GVB'nin mantarimsı kabuk, GRSPaV rupsetris gövde oluk sendromlarıyla ilişkili oldukları konfirme edilirken, GVD'nin dört

sendromdan hiçbirleriyle ilişkisi belirlenememiştir. Ayrıca yapılan saha çalışmasında testlenen 676 asma örneğinde GVD'nin bulunma düzeyi %31 düzeyinde bulunmuştur.

Closterovirus, *Vitivirus* ve *Trichovirus* cinslerinde bulunan virüs türlerinin dejenere primerlerle RT-PCR ile tanınmasını yapmak için closterovirüslerin genomlarında HSP70 protein gen bölgesinden, viti- ve trichovirüslerin RdRp bölgesinden iki set primer dizisi hazırlanmıştır. Enfekteli asma örneklerinden izole edilen toplam nükleik asit ve dsRNA ekstraktları virüs tanınmasından kullanılmıştır. Çoğaltılan cDNA'lar klonlanmış, nükleotid dizinleri çıkartılarak filogenetik olarak incelenmiştir. Analiz sonunda GVA, GVB, GVD ve *Heracleum latent virus* (HLV) *Vitivirus* türleriyle aynı grupta yer almışlar, yaprak kıvrıcılık virüsleri *Closterovirus* cinsi türleriyle ayrı bir grup oluşturmuştur (Saldarelli ve ark., 1998).

GVA, GVB ve GVD'nin kantitatif multipleks RT-PCR ve konvansiyonel multipleks RT-PCR yöntemleriyle çoklu olarak tanınmasında hassasiyetlerini incelemiştir. Kantitatif PCR yöntemi için üç farklı florasan işaretleyici ile işaretlenmiş primer dizinleri hazırlanmış ve testlemelerde tekli veya çoklu uygulama arasında hassasiyet bakımından farklılık olmadığı görülmüştür. Bunun yanısıra kantitatif PCR ile konvansiyonel PCR yöntemleri karşılaştırmasında, virüslerin tanınma düzeylerinin kantitatif multipleks PCR'da daha yüksek düzeyde olduğu bildirilmiştir (Osman ve ark., 2013).

GVD yakın zamanda Tunus'ta RT-PCR yöntemi kullanılarak CP7V/CP471C primerleriyle (Abou-Ghanem ve ark., 1997) bağcılığın önemli olduğu alanlardan alınan örneklerin %41,42'sinde rapor edilmiştir. örnek alınan bütün bölgelerde ve asma çeşitlerinde bulunmuştur. Virüsün cv. Red Globe çeşidinde bulunma düzeyi %11,7, Muscat RafRaf çeşidinde %88,8 düzeyindedir. Tanısı yapılan GVD izolatları gen bankasında kayıtlı GVA (JF754577) izolatıyla %72-73, GVB (NC003602.1) izolatıyla %60-62, GVE (JX402759.1) izolatıyla %53-55 benzerlik göstermiştir (Mahfoudhi ve ark., 2014).

2.2. Mantarimsı Odun (Rugose wood, RW) Sendromlarıyla İlişkilendirilmiş Virüsler ile İlgili Türkiye'de Yapılmış Çalışmalar

Özaslan ve Yılmaz (1995)'ın Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi bağlarında biyolojik ve serolojik yöntemleri kullanarak yaptıkları survey çalışmasında toplanan örneklerde GFLV (%24)'nin en yaygın virüs olduğunu ve bunu Asma yaprak kıvrıcılık

virüsü-3 (GLRaV-3) (%17.5), GLRaV-1 (%12.5), GFkV (%7.5) ve ArMV (%6.5) virüslerinin takip ettiğini ortaya koymuşlardır. Yılmaz ve ark., (1997)'nin Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden topladıkları toplam 84 örnekte ELISA testiyle GLRaV-1, GLRaV-3 ve GLRaV-7 nin varlığını ve yaygınlığını saptamışlardır. Hatay yöresi bağlarında yapılan bir çalışmada bağlarda en yaygın virüs hastalığı etmeninin GVA olduğu ve genellikle etmenin yaprak kıvrıcıklığı ile karışık enfeksiyonlar yaptığı rapor edilmiştir (Çağlayan, 1997).

Köklü (1998) enfekteli *Nicotiana benthamiana* yaprağı ve bağ floem dokularını kullanarak iki GLRaV-2 antiserumu üretilmesi üzerine çalışmış ve virüsün saptanmasında daha güvenilir sonuçlar DAS-ELISA'ya kıyasla DASI-ELISA'dan elde edilmiştir. Çalışmada sonuç olarak GVA, GVB, GFkV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6, GLRaV-7 ve GFLV ve bunlara ek olarak 2 örnekte ise CMV belirlenmiş ve bu virüsle ilgili daha sonra çalışmalar yapmışlardır (Köklü ve ark., 1999). Köklü ve ark. (1999)'nin 1997 yılının yaz sonu-sonbahar başında yaptıkları survey çalışmasında virüslerin saptanması amacıyla mekanik inokulasyonlar ve serolojik testler gerçekleştirilmiştir. Test edilen 165 örnekten 153'ü (%92.7) en az bir virüs ile enfekteli bulunmuş, iki veya daha fazla virüs ile enfeksiyon yaygın durumda belirlenmiştir (%75). Clostero- ve vitivirüsler tüm test edilen alanlarda belirlenmiştir. GVA en yaygın virus (%52.1) olarak belirlenmiş, Şarköy'de %68.1 oranlarında ve en fazla Cardinal (%100) ve Yapıncak (%88.2) çeşitlerinde belirlenmiştir. Bölgede GFLV, GVA, GVB, GFkV, GLRaV-1 GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-6, ve GLRaV-7 durumu ortaya konulmuştur.

Bağ virüsleri için son yıllarda ülkemizde yapılan en geniş survey çalışmasında, tamamen eski ve lokal çeşitlerin yetiştirildiği, yabancı asma materyallerinin hiç girmediği yörelerdeki bağlarımızda dahi değişik virüs hastalıkları bulunmuştur.

Digiario ve ark., (2000)'nin Güneydoğu Anadolu ve Orta Anadolu'nun başlıca bağ alanlarında yaptığı araştırmada, GVA' nin en yaygın virüs olduğunu ve bunu GLRaV-1, GFLV ve GFkV'nin takip ettiğini ortaya koymuştur.

Bunun yanısıra GLRaV-2, -3 ve -6' nın da enfeksiyonlarının diğerlerine kıyasla az olmakla birlikte mevcut olduğu tespit edilmiştir. Araştırmalar yaprak kıvrıcıklığı belirtilerinin çoğunlukla Şanlıurfa, Adıyaman, Elazığ bağlarında Amerikan asma anaçları üzerine aşılı kırmızı çeşitlerde (Antep Karası, Hönesü, Köhnü, ve Siyah Kabarcık) ve Nevşehir'deki bağlarda yaygın olduğunu göstermektedir. Asma mantarimsı odun

hastalığı simptomları Adıyaman'daki aşılı bağlarda yaygın olarak gözlenirken Kapadokya'daki aşısız bağlarda bulunmamıştır (Çiğsar, 2002b). Sonuç olarak, *Closterovirus* ve *Vitivirus*'lerin *Vitis vinifera* ile yakından ilişkili olduğu ve bitkinin orijininden birlikte taşındığı söylenebilir (Martelli ve ark., 1997).

Asma ve böcek örneklerinde GVA, GLRAV-1, GLRAV-3 ve GLRAV-5 enfeksiyonları RT-PCR yöntemiyle tanılanmıştır. Test edilen örneklerde GVB tespit edilmemiştir. GVA, GLRAV-1, GLRAV-3 ve GLRAV -5 enfeksiyonları tespit edilmek için RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Test edilen örneklerde *Planococcus ficus* (Signoret)'un ise örnek alınan bölgeler içinde yaygın olan tek unlu bit türü olduğu belirtilmiştir (Buzkan ve ark., 2012).

Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde otokton asma varyetleriyle, eski bağcılığın yapıldığı alanlardan alınan asma örnekleri, RT-PCR ile GRSPaV için testlendiğinde virüsün bulunma düzeyinin yaklaşık %34 düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Her iki bölge bağlarından alınan asma örneklerinde virüs tanısı yapılırken, Türk GRSPaV izolatlarının gen bankasında kayıtlı virüsün izolatlarıyla benzerlik düzeyi %87-96 düzeyinde belirlenmiştir. Türk izolatlarının bazıları SG1 (*Vitis rupestris* cv. Saint George) (Meng ve ark., 2005) ve MG (*V. vinifera* cv. Moscato Giallo) (Morelli ve ark., 2011) streynleri ile aynı grupta yer almıştır, Bazı izolatlar ise GRSPaV'ün RSPV-1 (Meng ve ark., 1998), GRSPV ve GRSPaV-BS (Fransız-Amerikan hibridi, Bertille Seyve 5568) sterynleri ile benzerlik göstermiştir (Buzkan ve ark., 2015).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Araştırma materyali olarak Doğu Akdeniz (Adana, Mersin, Hatay) ve Güneydoğu Anadolu (Adıyaman, Gaziantep, Kilis, Şanlıurfa) Bölgelerinden yerli asma çeşitlerinden toplanmış örnekler kullanılmıştır. Yaz döneminde alınmış yeşil yaprak ve sürgün örnekleri, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Avşar Yerleşkesinde Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Laboratuvarı'nda bulunan buzdolaplarında (+4 ve -80°C) saklanmıştır. Sonbahar döneminde alınmış çelikler köklendirilmiş ve bireysel olarak saksılara aktararak Ziraat Fakültesi cam serasında muhafaza edilmiştir.

Mekanik inokulasyon denemelerinde tütün bitkileri (*Nicotiana occidentalis*, *N. benthamiana*) kullanılmıştır.

3.2. Metot

Doğu Akdeniz (Adana, Mersin, Hatay) ve Güneydoğu Anadolu (Gaziantep, Kilis, Şanlıurfa, Adıyaman) Bölgelerinde otokton asma çeşitlerinden alınan çelikler (30-40 cm), perlit bulunan kasalarda köklendirilmiştir. Köklenenen çelikler 1:1 oranında torf:perlit karışımı saksılara aktarılmıştır.

3.2.1. Asma Yapraklarından Toplam Nükleik Asit (TNA) İzolasyonu

Bitkisel örneklerden Silika (silicone dioxide) yakalama yöntemi kullanılarak, Foissac ve ark. (2005)'nin belirlediği protokol değiştirilerek kullanılmıştır.

Yaprak örnekleri (0.1 g) porselen havan içerisinde 1:10 (ağırlık/hacim) oranında ezme tampon (4.0 M guanidin tiyosiyanat, 0.2 M Sodyum asetat pH:5.2, 25 mM EDTA, 1.0 M Potasyum asetat ve % 2.5 Polyvinylpyrrolidone 40) %1 (hacim/hacim) mercaptoethanol eklenerek ezilmiştir. Ezilen örnekler mikrosatirifüj tüpüne aktarılıp üzerine 100 µl %10'luk sodium lauryl sarcosine eklenmiştir. Karışım 70°C'de 10 dk süreyle inkübe edilmiştir. Tüpler buz dolu kaplarda 5 dk bekletildikten sonra 13.000 devir/dk' da 5 dk santrifüj edilmiştir.

Üstte kalan sıvı kısımdan 300 µl alınarak yeni tüplere aktarılmıştır. Örnekler üzerine 150 µl %96'lık Etil alkol, 300 µl 6M Sodyum iyodür, %1.87'lik Sodyum sülfid ile hazırlanmış 700 µl 6 M Sodyum iyodür ve steril suda hazırlanmış 25 µl Silika (Silicone

dioxide) ilave edilip, karışım oda sıcaklığında aralıklı olarak karıştırılarak 10 dk bekletilmiştir. Tüpler 10.000 devir/dk'da 2 dk santrifüj edilmiştir. Üstte kalan sıvı kısım atılmış, çökelti üzerine 500 µl yıkama tamponu (10 mM Tris pH: 7.5, 0.5 mM EDTA, 50 mM Sodyum klorür, %50 Etil alkol) eklenerek karıştırılmıştır. Daha sonra 10.000 devir/dk'da 2 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem 2 defa tekrarlanmıştır. Üstte kalan sıvı kısım atılmış, çökelti üzerine 50 µl steril saf su eklenerek homojenize edilmiştir. Karışım 70 °C'de 4 dk bekletilip, 14.000 devir/dk'da 3 dk santrifüj edildikten sonra sıvı kısmın tamamı yeni tüplere aktarılmış ve -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

TNA içerisinde bulunan RNA'nın saflığı ve konsantrasyonu spektrofotometrik (SmartSpec Plus Spectrometer, BioRad, ABD) okuması (A_{260}/A_{280}) yapılarak kontrol edilmiştir. Moleküler testleme için 40 ng/µl RNA kalıbı kullanılmıştır.

3.2.2. Tersine transkripsiyon (Reverse Transcription, RT) ve cDNA sentezi

Asma örneklerinden izole edilen RNA'nın tersine transkripsiyonu için 40 ng/ µl RNA, 2 µl hexanucleotide random hexamer (0.3 µg/µl) (Thermo Scientific, ABD) ile 95 °C'de 5 dk bekletilip daha sonra 5 dk buz dolu kap içerisinde bekletilmiştir

Karışım üzerine 10 µl 5X first strand buffer, 2 µl 10 mM dNTP, 0.8 µl 200 U/µl Maloney-Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) (Thermo Scientific, ABD) içeren karışım eklenmiştir. Sentez reaksiyonu 42°C'de 1 saat 15 dk da gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon, 70°C'de 10 dk bekletilerek sonlandırılmıştır.

3.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Sentezlenen cDNA'ların PCR analizi 50 µl reaksiyon karışımı içinde yapılmıştır. Karışım reaksiyonu 5 µl cDNA, 1X PCR termofilik tampon, 1.5-mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, homolog ve heterolog primeler (CP7V/471C) (Abou-Ghanem ve ark., 1997) (Çizelge 3.1) ve 5U *Taq* DNA polimerase (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak hazırlanmıştır.

Reaksiyon profili 94 °C'de 45 sn (ilk denatürasyon), 94 °C'de 45 sn (denatürasyon), 56 °C'de 1 dk (hibridizasyon), 72 °C'de 1 dk (uzama) ve son uzama aşaması 72 °C'de 7 dk olarak belirlenmiş ve 40 döngüde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. GVD (*Vitivirus*) tanılaması için PCR’ da kullanılan primer dizinleri (Abou-Ghanem ve ark. 1997).

Virüs	Primer	Dizin (5’- 3’)	DNA (bç)	Kaynak
GVD	CP 7V	CTTAGGACGCTCTTCGGGTACA	474	(Abou-Ghanem ve ark., 1997)
	CP471C	CTGCTCTCCAACCGACGACT		

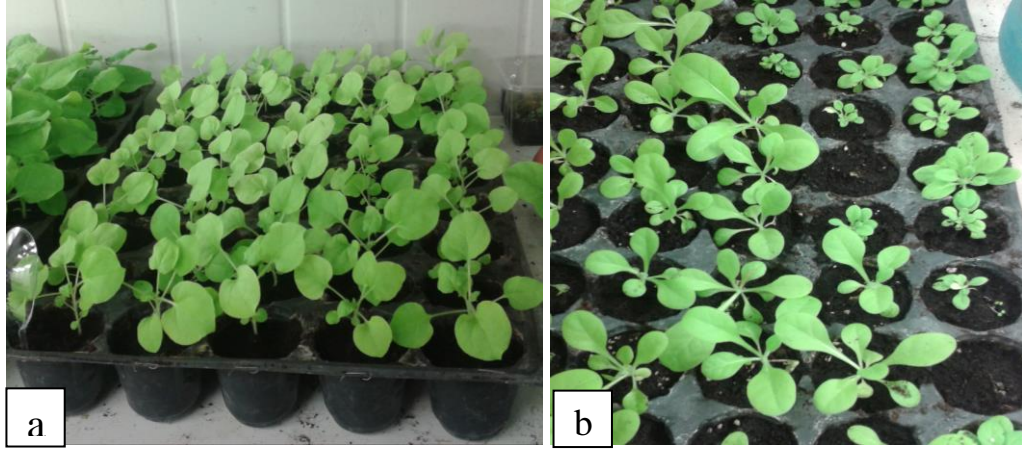
cDNA’ların PCR analizlerinde elde edilen DNA ürünlerinin elektroforetik analizleri % 1.5’luk agaroz jel üzerinde, 1X TAE (0.04 M Tris-asetat, 1 mM EDTA, pH 8.0) tamponu kullanılarak yapılmıştır. Agaroz jel etidium bromid boyaması yapıldıktan sonra UV transilluminator üzerinde gözlenmiş, jel fotoğrafları “GelDoc-It imaging system” ile çekilmiştir.

3.2.3. PCR DNA’larının nükleotid dizi analizi

GVD CP7V/471C (Abou-Ghanem ve ark., (1997) primerleriyle tanı konulan izolatların PCR DNA'larının çift yönlü doğrudan nükleotid dizinleri, MEDSANTEK (Türkiye) firmasına yaptırılmıştır. Nükleotid dizin analizleri MEGA 6 yazılımında (Tamura ve ark., 2013) yapılarak, gen bankasında kayıtlı yüksek nükleotid dizin benzerliği gösteren diğer izolatlarla karşılaştırılmıştır. Filogenetik analiz Neighbor-joining (Saitou ve Nei, 1987) yöntemi kullanılarak yapılmıştır ve Filogenetik ağaç topolojisi kuvveti (bootstrap) 1,000 alınmıştır.

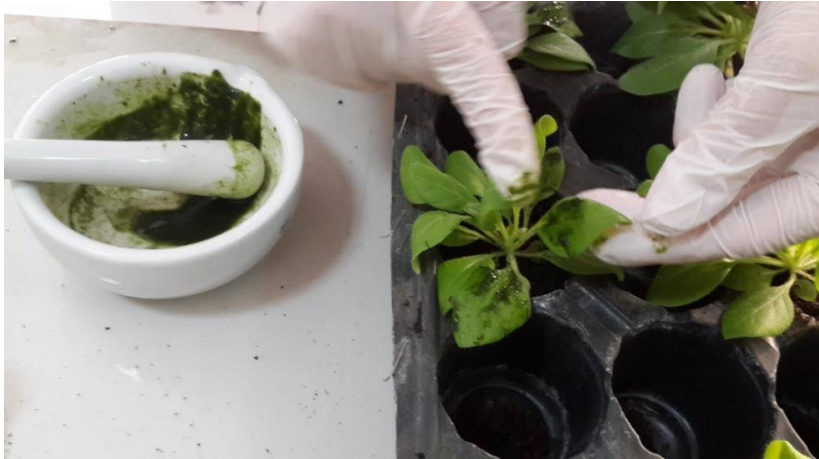
3.2.4. Mekanik inokulasyon

PCR analizinde pozitif sonuçlanan örneklerden virüsü taşınması, *Nicotiana occidentalis* ve *Nicotiana benthamiana* (Şekil 3.1) indikatör bitkileri üzerine mekanik olarak yapılmıştır. Mekanik inokulasyon için kullanılacak indikatör bitkilerin tohumları, torf bulunan fide kasalarına ekilmiştir. Fideler, 3-4 gerçek yapraklı dönemlerine geldiklerinde virüs mekanik inokulasyonu yapılmıştır.



Şekil 3.1. İnokulasyon işleminde kullanılan tütün bitkileri (a) *Nicotiana benthamiana*, (b) *Nicotiana occidentalis*

Sera koşullarında sürdürülmüş asmaların yaprakları (0.1 g), 1:10 hacminde 0.01 M fosfat tamponu (PO_4^-) (pH 7.0) kullanılarak soğutulmuş porselen havan içerisinde ezilmiştir. Bitki özsuvarı, yaprak yüzeyi celite ile kaplanmış indikatör bitkilerin karşılıklı, iki yaprağı üzerine sürülmüştür (Şekil 3.2). Negatif kontroller, indikatör bitkiler üzerine sadece fosfat tamponuyla yapılan inokulasyon ile hazırlanmıştır. İnokulasyonu tamamlanan indikatör bitkilerin yaprakları, kontaminasyon riskine karşı musluk suyu altında yıkanmıştır. Bitkiler virüs çoğalması için ışık ve sıcaklık kontrollü iklim odasında ($25^\circ\text{C}\pm 1$, 16 saat fotoperiyot) bekletilmiştir. Bitkiler üzerinde simptom gözlemleri günlük olarak yapılmıştır.



Şekil 3.2. Hazırlanan inokulum ve tütün yapraklarına GVD'nin mekanik inokulasyonu.

Virüs benzeri belirti taşıyan indikatör bitkilerde virüs türünün belirlenmesi için analizler RT-PCR ile yapılmıştır. Bitkilerden TNA izolasyonu bölüm 3.2.1., RT-PCR testi 3.2.2. ve nükleotid dizi analizleri de 3.2.3.'te belirtildiği şekliyle yapılmıştır.

3.2.5. Nested-RT-PCR

GVD enfekteli asmalardan virüsün indikatör bitkilere mekanik olarak taşınması denemelerinde, virüs-benzeri belirti taşıyan bitkilerin testlenmesi RT-PCR ve nested-RT-PCR ile yapılmıştır. Belirti taşıyan bitkilerden TNA izolasyonu, cDNA sentezi ve PCR aşamaları bölüm 3.2.1.ve 3.2.2.' de belirtildiği şekilde yapılmıştır.

Nested-RT-PCR testinde *Vitivirus* ve *Foveavirus* cinsi virüs türlerinin tanılanmasında etkili dejenere primer çiftleri (Çizelge 3.2) (Dovas ve Katis, 2003) kullanılmıştır. Nested-PCR, çoğaltılması hedeflenen DNA kalıbının dış ve iç kısımlarından hazırlanan iki çift primer diziniyle yapılmıştır. Testin ilk aşaması, çoğaltılacak gen parçasının dış kısmından hazırlanan primerlerden (dRW up1/dRWup2) 1 µM ve bölüm 3.2.3'te belirtilen PCR reaksiyon karışımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon 94°C'de 4 dk (ilk denatürasyon), 95°C'de 30 sn (denatürasyon), 42°C'de 30 sn (hibridizasyon), 72°C'de 15 sn (uzatma) ve 72°C'de 2 dk (son uzatma) olacak şekilde 40 döngüde yapılmıştır. PCR DNA'larının analizi %1.5'luk agaroz jel üzerinde 1X TAE tamponu kullanılarak yapılmıştır. DNA bandı (363 bp) gözlenen örnekler, nested-PCR ile testlenmek üzere dRWnest1/dRWnest2 primer dizinleriyle tekrar reaksiyonda kullanılmıştır.

Nested PCR testi, birinci tur PCR testinde pozitif sonuçlanmış DNA'lardan 2 µl, 1 µM dRWnest1 ve 1.5 µM dRWnest2 primerleri kullanılarak bir döngü 95°C'de 3 dk, 49°C'de 10 sn ve 72°C'de 10 sn, daha sonra 39 döngü 95°C'de 20 sn, 54°C'de 20 sn, 72°C'de 10 sn olacak şekilde, son uzatma 72°C'de 2 dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Dovas ve Katis, 2003). PCR DNA'larının 1XTAE tamponu içerisinde %1.5'luk agaroz jel ile yapılan elektoroforetik analizinde bant veren örneklerin nükleotid dizin analizi bölüm 3.2.3' te belirtildiği şekilde yapılmıştır.

Çizelge 3.2. *Vitivirus* ve *Foveavirus* cinsinde, virüs türlerinin Nested-PCR ile tanılanmasında kullanılan dejenere primer dizinleri ve çoğalttıkları DNA parçalarının büyüklükleri.

Primer	Dizin (5'- 3')	DNA ölçüsü (bç)	Dejenerasyon
dRW up1	WG CIAARGCIGGICARAC	(konvansiyonel PCR) 363	8
dRW do2	RMYTCIC CISWRAAICKCAT		128
dRW nest1	GGGGCARACIHTIGCITGYTT	(nested PCR)	12
dRW nest2	AAIGCYTCRTARTCIGAITCNGT	198	32

W=A+T; R=A+G; M=A+C; Y=C+T; S=G+C; K=G+T; H=A+T+C; N=A+T+C+G; I=Inosine.

4. BULGULAR

4.1. Arazi Surveyi

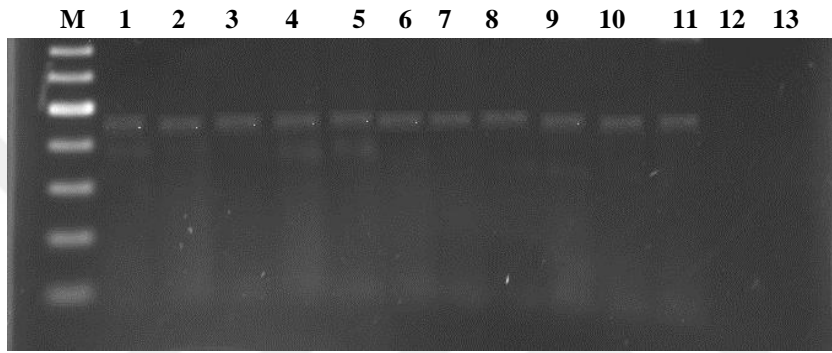
Araştırmada Doğu Akdeniz (Adana, Mersin, Hatay) ve GÜneydoğu Anadolu (Adıyaman, Gaziantep, Kilis, şanlıurfa) Bölgeleri'ndeki 19 bağdan, 32 otokton asma varyetesinden alınmış 175 asma bitkisi kullanılmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. GVD tanısı için kullanılan otokton asma varyeteleri ve alındıkları lokasyonlar.

Bölge	Lokasyon		Otokton varyete
Doğu Akdeniz	Mersin	Tarsus	Yalova incisi, Tarsus beyazı, Ergin çekirdeksiz, Trakya ilkeren, Tuzlukçu, Dimrit, Çavuş, Kişniş, Takkare, Dilmit, Recep, Adana, Topakkara, Bohça karası, Cevizi üzümü, Yerli çekirdeksiz, Kadın parmağı, Göğ üzümü
		GÜlnar	
		Mut	
		Silifke	
		Akdeniz	
		Çamlıyayla	
	Adana	Ceyhan	Yalova incisi, Trakya ilkeren, Dokuztekne karası
Hatay	Merkez	Hönüsü	
	Hassa		
GÜneydoğu Anadolu	Gaziantep	İşlahiye	Hatun parmağı, Horoz karası
		şehitkamil	
		şahinbey	
	şanlıurfa	Merkez	Çiloreş, Azezi, Küllahi, Çilorut, Sergi karası, (sinonim. Cibine)
		Hilvan	
		Bozova	
	Adıyaman	Merkez	Besni, Tahannebi, Peygamber üzümü
		Besni	
		Gölbaşı	
	Kilis	Merkez	Rumi, Sultani çekirdeksiz, Horoz karası
Musabeyli			

4.2. PCR Analizi

GVD'nin otokton asma varyetelerinde bulunma durumunu belirlemek için yapılan PCR testinde, testlenen 175 asma bitkisinin 13 tanesinde GVD'nini protein kılıf bölgesinin bir bölümünü temsil eden 474 bp büyüklüğünde DNA parçası çoğaltılmıştır (Şekil 4.1.). Testlemelerde GVD tanısı yapılan örnekler her iki bölge bağlarından alınmış olan TR73 ve TR74 Hönüsü (Hatay), TR78 ve TR80 Horoz Karası (Gaziantep), TR104 Rumi, TR125 Horoz Karası (Kilis), TR188-1 Antep Karası (Şanlıurfa), TR205, 213, 215 ve 230 Besni (Adıyaman) çeşitleridir.



Şekil 4.1. GVD enfeksiyonunu gösteren 474 bp büyüklüğündeki DNA bantları. M: 100 bp DNA standartı (Fermentas), çukur (1-2): TR73, 74 (Hatay); çukur (3-4): TR78, 80 (Gaziantep), çukur (5-6): TR104, 125 (Kilis); çukur (7): TR188-1 (Şanlıurfa); çukur.

Çizelge 4.2. Survey alanlarından alınan toplam ve GVD ile enfekteli olduğu saptanan örnek sayısı

Bölge	İl	Pozitif testlenmiş Çeşitler	Toplam örnek sayısı/Pozitif örnek sayısı
Doğu Akdeniz Bölgesi	Adana	-	0/10
	Mersin	-	0/28
	Hatay	Hönüsü	2/8
Güneydoğu Anadolu Bölgesi	Gaziantep	Horoz karası	2/24
	Şanlıurfa	Sergi karası	1/15
	Adıyaman	Besni	6/45
	Kilis	Rumi, Horoz karası	2/45
Toplam			13/175

Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'ndeki 7 ilde bulunan bağlardan toplanan 175 adet asma örneği testlenmiştir. GVD tanısı için Doğu Akdeniz Bölgesinden toplanan 46, Güneydoğu Anadolu Bölgesinde 129 örnek testlenmiştir.

Hatay ilinden toplanan 8 örnekten 2'sinde (Hönüsü) virüs tanılanırken, Gaziantep'ten toplanan 24 örnekten 2'si (Horoz Karası), Kilis'ten toplanan 45 örnekten 2'si, (Horoz Karası), Şanlıurfa'dan toplanan 15 örnekten 1 tanesinde (Sergi Karası) ve Adıyaman'dan toplanan 45 adet örneğin 6'sında (Besni) GVD tanılanmıştır.

4.3. Mekanik İnokulasyon sonrası virüs-benzeri belirtiler ve PCR analiz değerlendirmesi

Asma bitkilerinden *N. occidentalis* ve *N. benthamiana* indikatör bitkilerine yapılan mekanik inokulasyonu takiben ortalama 7 hafta sonra, *N. occidentalis* bitkileri üzerinde virüs-benzeri belirtiler izlenmiştir (Şekil 4.2). Yapraklar üzerinde damar klorozu belirtileri (Şekil 4.2.) kaydedilirken, negatif kontrollerde virüs-benzeri belirtiler meydana gelmemiştir.



Ana ve ikincil damarlarda kloroz belirtisi

Şekil 4.2. *Nicotiana occidentalis* bitkileri üzerinde GVD-pozitif tanılanan asma örnekleriyle yapılan mekanik inokülasyon sonrası meydana gelen damar klorozu belirtileri.

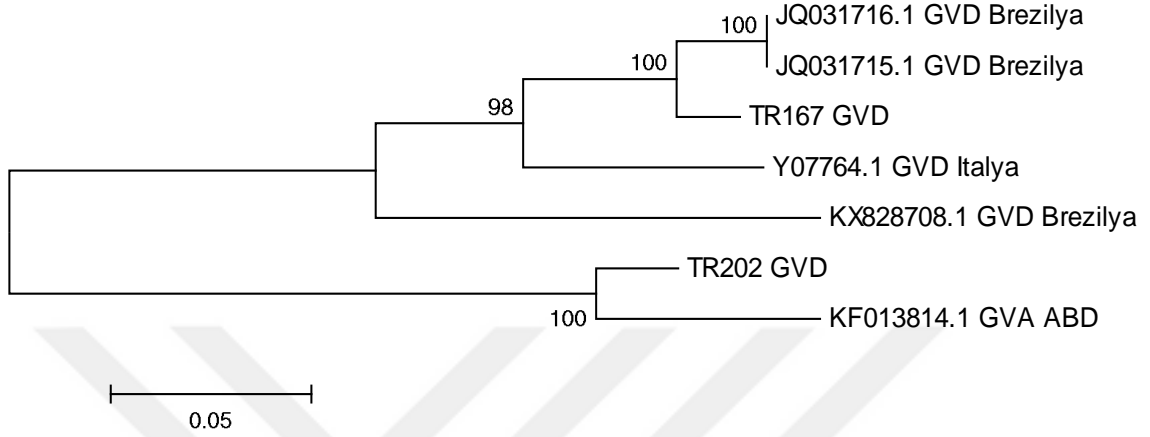
Virüs-benzeri belirti taşıyan *N. occidentalis* bitkilerinden GVD tanılması, bitkilerden izole edilen TNA'ların nested-RT-PCR testinde analiz edilmesiyle yapılmıştır. Dış bölge primerleriyle yapılan ilk PCR reaksiyonunda çoğaltılan cDNA'ların elektroforetik analizinde 363 bp büyüklüğünde DNA bantları gözlenmiştir (Şekil 4.3). Aynı örneklerin iç bölge primerleriyle nested-PCR testinde, DNA'lardan elektroforez analizi sonrası etidium bromid boyamasında 198 bp'ne yakın, ancak çok parlak olmayan bantlar elde edildiği gözlenmiştir (Şekil 4.4). PCR DNA'larının Blastn analizinde gen bankasında kayıtlı GVD izolatları ile homoloji göstermemiştir. GVD mekanik olarak taşınmamıştır.

4.4. Asma GVD izolatlarının Filogenetik Analizi

GVD tanılmasında kullanılan CP7V/CP471 C primerleriyle, 13 asma örneğinde RT-PCR testinde 474 bp büyüklüğünde DNA bandı elde edilmiş, ancak bunlardan sadece iki tanesinin nükleotid dizinleri çıkartılmıştır. Nükleotid dizinlerin Blastn analizinde, gen bankasında kayıtlı GVD ve GVA izolatlarının kılıf proteinini kodlayan gen bölgesinin nükleotid dizinleriyle benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Besni çeşidinde izole edilmiş TR167 izolatının Brezilya (Fajardo ve ark., 2012) ve İtalya (Abou-Ghanem ve ark., 1997)'da izole edilmiş GVD izolatlarıyla nükleotid dizin homolojisinin %83-96 düzeyinde olduğu görülmüştür. Besni çeşidinden izole edilen TR 202 izolatı ise ABD (Alabi ve ark., 2014)'de izole edilen GVA izolatıyla %93 nükleotid dizin benzerliğine sahip olduğu görülmüştür. MEGA 6.0 yazılımıyla, neighbor-joining (NJ) metoduyla türk ve yabancı izolatların filogenetik ağacı oluşturulduğunda, filogenetik ağaçta iki grubun olduğu ve Türk GVD izolatlarının farklı grupta yer aldığı gözlenmiştir.

TR167 GVD izolatu Brezilya'da izole edilen GVD izolatlarıyla (JQ31716.1, JD31715.1) aynı grup içinde yakın pozisyonda yer alırken, İtalya'da ilk izole edilen GVD izolatu (Y07764.1) ve Brezilya GVD izolatıyla (KX828708.1) aynı grupta, ancak daha uzak pozisyonda yer almıştır (Şekil 4.4.).



Şekil 4.5. TR GVD izolatlarının 474 bp büyüklüğündeki ORF4 bölgesi nükleotid dizinlerine göre neighbor-joining (NJ) metoduyla gen bankasından kayıtlı, izolatlarla hazırlanmış filogenetik ağacı. Ağaç topolojisi kuvveti 1,000 bootstrap olarak alınmıştır.

Çizelge 4.3. Türk ve NCBI’da kayıtlı GVD ve GVA izolatlarının nükleotid dizini karşılaştırması

TR-GVD167	CCTCTTAGGACCCCTCTTCGGGTACATAGCTCTGGTTGGCCTAGTAAGAAGGCGCATCATTATGGGGAAG
TR-GVD202	CCTCTTAGGACGCTCTTCGGGTACATCGCCTTGGTGGTACAAAGCAAAAAGGCGGTTACATATGGAGAGG
JQ031716.1	TACCTTAGGACGCTCTTCGGGTACATAGCTCTGGTGGTACTAGTAAGAAGGCGCAGCATTATGGGGAAG
JQ031715.1	TACCTTAGGACGCTCTTCGGGTACATAGCTCTGGTGGTACTAGTAAGAAGGCGCAGCATTATGGGGAAG
Y07764.1	TACCTTAGGACGCTCTTCGGGTACATAGCCTGGTTGGCACCAGCAGGAAGGCGCAGCATTATGGGGTAG
KX828708.1	TATCTGAGGACCCGTTCGGATACATAGCACTGGTTCGGCACAAGCAAGAAAAGCAGTGCAGTATGGAGTGG
KF013814.1	-----TCTTTGGGTACATCGCCTTGGTGGTACAAAGCAAAAAGGCGGTTACATATGGAGAGG
	80 90 100 110 120 130 140
TR-GVD167	TTGATGTCATAGGACCAAAGGC---TAATAGGAATAATGTAGACTCTAGAGGTAGAATAAACATAAGCGA
TR-GVD202	TAGATATAGTAGGACCTAAGGCAAGCAAGAAAGACCGGTATAGACCCAGAGGAAAAGATAGTCATATCTGA
JQ031716.1	TTGATATCATAGGACCAAAGGC---TAATAGGATTAATGTAGACTCTAGAGGTAGAATAAACATAAGCGA
JQ031715.1	TTGATATCATAGGACCAAAGGC---TAATAGGATTAATGTAGACTCTAGAGGTAGAATAAACATAAGCGA
Y07764.1	TGGATGTAATAGGGCCTAAGTC---TAATAGGAGTAATGTAGATTCTAGGGGTAAAAATAAACATAAGCGA
KX828708.1	TGGATGTGATAGGGCCTAAAAGC---CACTAGGGCTAACCTAGATTCTAGGGGAAAAATAAATATAGCTGA
KF013814.1	TAGATATAGTAGGACCTAAGGCAAGCAAAAAGACTGGGATAGACCCGAGGGGAAAAGATAGTCATATCTGA
	150 160 170 180 190 200 210
TR-GVD167	GAAGGTGGCGAGTATAATGGCTCTCAGTAGGGCAGTGAGTGAGGGACCGTTGGTGGGAGCAACTCTGAGG
TR-GVD202	AATGGTTCGGCAGGATGCGCACTCTGAGCGTGGCGGTAAGCGAGGGCCCTGTTAAGGGAGCAACACTTAGG
JQ031716.1	GAAGGTGGCGAGTATAATGGCTCTCAGCAGGGCAGTGAGCGAGGGACCGTTGGTGGGAGCAACTCTGAGG
JQ031715.1	GAAGGTGGCGAGTATAATGGCTCTCAGCAGGGCAGTGAGCGAGGGACCGTTGGTGGGAGCAACTCTGAGG
Y07764.1	GAAGGTGGCGAGTATGATGGCTCTTAGCAGAGCAGTGAGTGAAGGACCGTTGGTGGGAGCAACTCTGAGG
KX828708.1	GAAGGTTCTTAGCATGATGGCTCTTAGTCGCGCCGTGAGTGAAGGACCGTTGGTAGGAGCAACTCTGAGG
KF013814.1	ACTGGTTCGGCAGGATGCGTACGCTGAGTGTGGCGGTAAGCGAGGGCCCTGTTAAGGGAGCAACACTTAGG
	220 230 240 250 260 270 280
TR-GVD167	CAGGTGTGTGAACCATTTCGCACAGGAAGCTTACGAGATGCTGGCTAAGATGGCTGAGATGGGACTGTATT
TR-GVD202	CAAATGTGCGAACCATTTCGCACAGAATGCTTATGATTTCTCGTATTGATGGCTGAGATGGGACGTA
JQ031716.1	CAGGTGTGTGAACCATTTCGCACAGGAAGCTTACGAGATGCTGGCTAAGATGGCTGAAATGGGACTGTACT
JQ031715.1	CAGGTGTGTGAACCATTTCGCACAGGAAGCTTACGAGATGCTGGCTAAGATGGCTGAAATGGGACTGTACT
Y07764.1	CAAATGTGCGAACCATTTCGCACAGGAAGCTTATGAGATGTTGGCCAAGATGGCAGAGATGGGGCTTACT
KX828708.1	CAGATGTGCGAACCATTTTCGCACAAGAAGCCTACGAGATGCTGGCCAAGATGGCAGATATGGGTCTGTATT
KF013814.1	CAGATGTGCGAACCATTTTCGCACAAGAAGCCTACGATTTCTCGTGTGATGGCTGAGATGGGACGTA
	290 300 310 320 330 340 350
TR-GVD167	CTCAATTGGCGCGTAAGATGGCGAGGCTTGGTAACAAGGAACCTCAAGTGATGTTTGACTTTGCATCCGG
TR-GVD202	CACAGTTGGCAACAAAGATGACAAGGTCAGGCTTTAAGGAGCCACAGGTTATGTTTCGACTTTGCGTCCGG
JQ031716.1	CTCAATTGGCTCGTAAGATGGCGAGGCTTGGCAACAAGGAACCTCAAGTGATGTTTGACTTTGCGTCCGG
JQ031715.1	CTCAATTGGCTCGTAAGATGGCGAGGCTTGGCAACAAGGAACCTCAAGTGATGTTTGACTTTGCGTCCGG
Y07764.1	CTCAGCTGGCGCGTAAGATGGCAAGGCTCGGTAACAAGGAACCTCAAGTGATGTTTCGACTTTCGCATCCGG
KX828708.1	CGCAACTAGCAAGGAAGATGGCGAGGCTTGGAAACAAGGAACCAAGTGATGTTTGACTTTGCTGTCTGG
KF013814.1	CACAGTTGGCAACCAAGATGACTAGGTCAGGCTTTAAGGAGCCACAGGTTATGTTTCGACTTTGCGTCCGG
	360 370 380 390 400 410 420
TR-GVD167	TCTGGATATAAGTCGTTTGACATTGCAAGAGGCTACTGTTATTCAGGCTATGCATTCTCGCCTCTTTTCGT
TR-GVD202	CTTAGATCTGAAAGCACTGACACTACAAGAAGCCACTGTGATACAGGCTATGCACTCGCGGCTCTTTTCGA
JQ031716.1	TCTGGATATAAGTCGTTTGACATTGCAAGAGGCAACTGTTATTCAGGCTATGCATTCTCGCCTCTTTTCGT
JQ031715.1	TCTGGATATAAGTCGTTTGACATTGCAAGAGGCAACTGTTATTCAGGCTATGCATTCTCGCCTCTTTTCGT
Y07764.1	TTTGGATATCAGTCGTTTGACATTGCAAGAGGCTACTGTTATACAGGCTATGCATTCTCGCCTCTTTTCGC
KX828708.1	TCTTGACCTAAGCAGGTTGACATTGCAAGAGGCTACTGTTATCCAGGCTATGCATTCTCGCCTCTTTTCGT
KF013814.1	CTTAGATCTGAAAGCACTGACACTACAAGAAGCCACTGTGATACAGGCTATGCACTCCCGCTCTTTTCGT
	430 440 450 460 474
TR-GVD167	ACTGAAGGTGCTAAAGGAGTATTCAACGCCAGTCGTCGGTTGGAGAGCAGA
TR-GVD202	ACAGAGGGTGCAAAGGGGTATTCAACGCCAGTCGTCGGTTGGAGAGCAGA
JQ031716.1	ACTGAAGGTGCTAAAGGAGTATTCAACGCCAATCGTCGGTTGGAGAGCAGG
JQ031715.1	ACTGAAGGTGCTAAAGGAGTATTCAACGCCAATCGTCGGTTGGAGAGCAGG
Y07764.1	ACTGAAGGTGCTAAAGGTGTATTCAACGCCAGTCGTCGGTTGGAGAGCAGG
KX828708.1	ACTGAAGGTGCTAAAGGTGTATTCAACGCCAGTCTTCAATTGGAGAGCAGG
KF013814.1	ACGGAAGGCGCAAAGGGTGTGTTCAACGCTCAATCATCAGTCGGTGAGCAG-

Türk izolatlarıyla (167 ve 202) NCBI'da kayıtlı İtalya (Y07764.1), Brezilya (JQ031716.1, JQ031715.1 ve KX828708.1) izolatlarının amino asit dizin karşılaştırılması gerçekleştirilerek akrabalık ilişkileri incelenmiştir.

TR 167 izolatının nükleotid dizisininin 55, 56 ve 57. pozisyonunda "CAT", *Histidin* (H); TR 200'de aynı pozisyonunda "GTT" *Valin* (V) kodlamıştır. TR 167'nin 76, 77 ve 78. pozisyonunda "GTC" *Valin* (V); TR 202'de aynı pozisyonunda "ATA", *İzolösin* (I) kodlamıştır.

TR 167'nin 79, 80 ve 81. pozisyonunda "ATA" *İzolösin* (I); TR 202'de aynı pozisyonunda "GTA" yer alması *Valin* (V); TR 167'nin 100, 101 ve 102. pozisyonunda "AGG", *Arjinin* (R); TR 202'de aynı pozisyonunda "AAG", *Lizin* (K) kodlamıştır.

TR 167'nin 106, 107 ve 108. Pozisyonundaki "AAT", *Asparajin* (N); TR 202'de aynı pozisyonundaki "GGT", *Glisin* (G); TR 167'nin 109, 110 ve 111. pozisyonunda "GTA", *Valin* (V); TR 202 izolatında aynı pozisyonunda bulunan "ATA", *İzolösin* (I) kodlamıştır.

TR 167'nin 115, 116 ve 117. pozisyonunda yer alan "TCT", *Serin* (S); TR 202'de aynı pozisyonunda bulunan "CCC", *Prolin* (P) kodlamıştır. TR 167 izolatında 124, 125 ve 126. pozisyonunda yer alan "AGA", *Arjinin* (R); TR 202 izolatında aynı pozisyonunda bulunan "AAG", *Lizin* (K) kodlamıştır. TR 167'nin 124, 125 ve 126. pozisyonunda yer alan "AGA", *Arjinin* (R), TR 202'de aynı pozisyonunda bulunan "AAG" ise *Lizin* (K) kodlamıştır.

TR 167'nin 130, 131 ve 132. pozisyonunda yer alan "AAC", *Asparajin* (N), TR 202 aynı pozisyonunda bulunan "GTC", *Valin* (V) kodlamıştır. TR 167'nin 142, 143 ve 144. pozisyonunda yer alan "AAG", *Lizin* (K); TR 202 aynı pozisyonunda bulunan "ATG" *Metiyonin* (M) kodlamıştır. TR 167'nin 148, 149 ve 150. pozisyonunda yer alan "GCG", *Alanin* (A), TR 202 izolatında aynı pozisyonunda bulunan "GGC", *Glisin* (G) kodlamıştır.

TR 167'nin 151, 152 ve 153. pozisyonunda yer alan "AGT" *Serin* (S); TR 202'de aynı pozisyonunda bulunan "AGG", *Arjinin* (R) kodlamıştır. TR 167 izolatının 154, 155 ve 156. pozisyonunda yer alan "ATA", *İzolösin* (I); TR 202'de aynı pozisyonunda bulunan "AAG", *Metiyonin* (M) kodlamıştır. TR 167'nin 157, 158 ve 159. pozisyonunda yer alan "ATG", *Metiyonin* (M); TR 202 aynı pozisyonunda bulunan "CGC", *Arjinin* (R) kodlamıştır.

TR 202 izolatında 160, 161 ve 162. pozisyonunda "ACT", *İzolösin* (I); TR 167, JQ031716.1, JQ031715.1, KX828708.1 ve Y07764.1 izolatlarının aynı pozisyonunda bulunan "GCT", *Metiyonin* (M) kodlamıştır. TR 167 izolatında 169, 170 ve 171. pozisyonunda "AGG", *Arjinin* (R); TR 202'nin 169, 170 ve 171. pozisyonunda bulunan "GTG", *Valin* (V) kodlamıştır. TR 167'nin 193, 194 ve 195. pozisyonunda "GTG", *Valin* (V), TR 202 izolatının da aynı pozisyonunda bulunan "AAG", *Lizin* (K) kodlamıştır. TR 167 izolatının 235, 236 ve 237. pozisyonunda "GAA", *Glutamat* (E); TR 202'de de aynı pozisyon bulunan "AAT", *Asparajin* (N) kodlamıştır.

TR 167'nin 244, 245 ve 246. pozisyonunda "GAG", *Glutamat* (E); TR 202'de aynı pozisyonda bulunan "GAT", *Aspartat* (D) kodlamıştır. TR 202'nin 247, 248 ve 249. pozisyonunda "TTC", *Phenylalanine* (F); 253, 254 ve 255. pozisyonda "GTA", *Valine* (V); 256, 257 ve 258. pozisyonda "TTG", *Leucine* (L); 274, 275 ve 276. pozisyonda "ACG" *Threonine* (T); 307, 308 ve 309. pozisyonda "TCA", *Leucine* (L) yerine *Serine* (S); 313, 314 ve 315. pozisyonda "TTT", *Phenylalanine* (F); 361, 362 ve 363. pozisyonda "AAA", *Lysine* (K); 364, 365 ve 366. pozisyonda "GCA", *Alanine* (A) kodlamıştır.

Türk izolatlarıyla (167 ve 202) NCBI'da kayıtlı İtalya (Y07764.1), Brezilya (JQ031716.1, JQ031715.1 ve KX828708.1) izolatlarının amino asit dizinleri karşılaştırıldığında, TR 167 izolatı ile İtalya (Y07764.1) ve Brezilya (JQ031716.1, JQ031715.1 ve KX828708.1) izolatları arasında %90-98, TR 202 izolatı ile % 80 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.4. GVD izolatlarının amino asit dizinlerinin karşılaştırması

TR GVD 167	PLR T LF G Y I AL V GT S KK A HH Y GE V DV I G P K-- N R N N V D S R G R I N I S E K V A S I M A L S R A V S E G P L V G A T L R
TR GVD 202V.IV.A S K K T G I. P K . V M . G R M R T V K.
JQ031716.1	Y Q I--. I
JQ031715.1	Y Q I--. I
Y07764.1	Y R . Q V--. S M
KX828708.1	Y V Q V-- T . A . L A L . M
TRGVD167	Q V C E P F A Q E A Y E M L A K M A E M G L Y S Q L A R K M A R L G N K E P Q V M E D F A S G L D I S R L T L Q E A T V I Q A M H S R L F R
TRGVD202 N . D F . V L T T . T . S . F L K A
JQ031716.1
JQ031715.1	. M
Y07764.1	. M
KX828708.1	. M D A
TR GVD 167	T E G A K G V F N A Q S S V G E Q
TR GVD 202
JQ031716.1
JQ031715.1
Y07764.1
KX828708.1 I

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

GVD, RW taşıyan asmalardan izole edilmiş bir *Vitivirus* cinsi olmasına karşın, bağıcılığın önemli olduğu ülkelerde aynı cinste yer alan GVA ve GVB veya hastalıkla ilişkili bir foveavirüs olan GRSPaV kadar sıklıkla araştırılmış bir virüs değildir. Ancak virüsün az çalışılıyor olması, onun diğerlerinden daha az öneme sahip olduğu göstermemektedir. Hastalık etiyojisinin ve virüsün yayılmasında etkili vektörünün hala bilinmiyor olması aslında GVD'nin asma üzerindeki tehlike riskini azaltmayıp daha da artmasına neden olmaktadır.

Bu tez çalışmasında, GVD Türkiye’de bağıcılığın önemli olduğu Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerindeki bağlardaki aşısız otokton asma çeşitlerindeki bulunma durumu PCR yöntemiyle araştırılmıştır. GVD her iki bölgenin bağlarından alınan örneklerde PCR yöntemiyle tanılanmış ve tanılama yönteminin güvenilirliği nükleotid dizileme ve gen bankasında kayıtlı virüsü izolatları arasındaki benzerlik düzeyleri incelenerek kontrol edilmiştir. GVD Türkiye'deki asmalarda ilk kez bu çalışmayla tanıldığı için ilk kayıt niteliği taşımaktadır.

Virüs için ticari poliklonal antiserum bulunmadığı için seçilen PCR yöntemi, GVD'nin asma ve otsu indikatör bitkilerinde tanılanmasında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Abou-Ghanem ve ark., 1997). PCR yöntemiyle GVD'nin asma örneklerinde tanılanmasında virüsün bulunma durumu çok yüksek (%7,43) düzeylerde bulunmazken, araştırmada kullanılan materyallerin aşısız bağlardan seçilmiş olmasının bunda etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Virüsün aşı materyalleriyle taşınma potansiyelinin yüksek olması değerlendirildiğinde, araştırmanın aynı zamanda aşılınmış bağlardan temin edilecek asmalarda yapılması durumunda bu oranın artabileceği düşünülmektedir. Mahfoudhi ve ark., (2014)'nın Tunus'taki bütün bağ alanlarında yerli ve yabancı asmalarda GVD tanılamasını yaptığında virüsün bulunma durumu %41.42 düzeyinde bulunmuştur.

TNA'ların odunsu yapıdaki bitkisel materyalden izolasyonunda, asmadaki fenolik bileşiklerin varlığı ve virüslerin dokuda homojen dağılmaması nedeniyle, PCR testlerinde tekrarlamalı sonuçlar alınamamasına neden olmuştur. Test materyallerinin yeşil dokulardan temin edilmesi virüs titrasyonunun bir miktar artmasında etkili olmuştur. Virüsün tanılamasında kullanılan primer dizinlerinin, çeşitlilik düzeyi fazla izolatların belirlenmesinde güçlük yaratacağı sonucuna varılmıştır.

Bu yüzden mekanik inokülasyon çalışmalarında virüs-benzeri belirti taşıyan *N. occidentalis* bitkilerinden izole edilen TNA'lardan virüsü tanılaması dejenere yapıda, tanılama kapasitesi daha yüksek ve RW ile ilişkilendirilmiş vitivirüs ve foveavirüslerin olası karışık enfeksiyonlarının belirlenmesi için her iki cins için hazırlanmış dejenere primerler kullanılmıştır. (Dovas ve Katis, 2003). RW hastalık kompleksiyle ilişkilendirilmiş virüslerin (GVA, GVB, GRSPaV) ve GVD'nin çoklu enfeksiyonlarının tanısında kantitatif PCR yönteminin konvansiyonel PCR yönteminden daha duyarlı ve etkili olduğu Osman ve ark., (2013) tarafından bildirilmiştir. Vitivirüs ve foveavirüslerin tek enfeksiyon kaynağından multipleks kantitatif PCR ile tanılama başarısı %95 olurken, multipleks konvansiyonel PCR ile bu başarı %77 civarında olmuştur.

Yanlış tarımsal uygulamaların, özellikle sağlık durumu bilinmeden yetiştiriciler arasında aşı materyallerinin değiştirilmesi virüslerin geniş alanlara yayılmasında en önemli faktördür. Araştırmada kullanılan asma materyallerinin temin edildikleri yıl ve lokasyon bilgilerinin yanısıra, taşıdıkları belirtiler hakkında tutulmuş kayıtlar değerlendirildiğinde hiçbirinde RW hastalık kompleksiyle ilgili gövde symptomunun olmadığı bilgisine rastlanmıştır. Hastalık etiolojisinin belirlenmesi, GVD'nin tekli enfeksiyonlarını taşıyan asmalardan odunsu indikatör bitkilere aşıyla taşınması ve bitkilerde meydana getireceği belirtilerin izlenmesiyle mümkün olacaktır.

CP7V/CP471C (Abou-Ghanem ve ark., 1997) primerleriyle tanılanan iki izolattan elde edilen 474 bp büyüklüğündeki DNA parçasının nükleotid dizileri, gen bankasında Brezilya ve İtalya'dan izole edilen GVD izolatlarıyla %83-90 düzeyinde benzerlik taşıırken, bir izolat (TR167) Slovakya'da izole edilen GVA izolatıyla %77 benzerlik taşımaktadır. İzolatlar arasındaki farklılıklar, bazı nükleotidlerin delesyon ve değişmesi nedeniyle meydana gelmiştir. Nükleotid dizilerindeki değişiklikler kodlamış oldukları aminoasit dizinlerinde de bazı değişmelere neden olmuştur. Mevcut bulgular, izolatların genomlarının küçük bir parçasına göre çeşitliliğini belirlemek için ön bilgi niteliğinde olup, izolat kaynağının belirlenmesi (coğrafi orjin), moleküler karakterizasyonunun yapılabilmesi için tüm genom dizisinin incelenmesini gerektirmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abou-Ghanem, N., Saldarelli, P., Minafra, A., Buzkan, N., Castellano, M.A. and Martelli, G.P., 1997. Properties of grapevine virus D, a novel putative trichovirus. *Journal of Plant Pathology*, Vol. 79, No. 1 (March 1997), pp. 15-25.
- Akbaş, B., Kunter, B., and İlhan, D., 2007. Occurrence and distribution of Grapevine Leafroll Associated Viruses 1,2,3, and 7 in Turkey. *J. Phytopathol.* 155:122-124.
- Al Rwahnih, M., Daubert, S., Golino, D., Rowhani, A., 2009. Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. *Virology*, 387, 395-401.
- Alabi, O.J., Al Rwahnih, M., Mekuria, T.A., Rowhani, A., and Naidu, R.A., 2014. Genetically diverse isolates of Grapevine virus A are present in Washington and California vineyards. Department of Plant Pathology, Washington State University, Irrigated Agriculture Research and Extension Center, 24106 N. Bunn Rd., Prosser, WA 99350, USA.
- Alabi, O.J., Martin, R.R., Naidu, R.A., 2010. Sequence diversity, population genetics and potential recombination events in grapevine rupestris stem pitting associated virus in Pacific North-West vineyards. *J. Gen. Virol.* 91, 265–276.
- Andret-Link, P., Laporte, C., Valat, L., Ritzenthaler, C., Demangeat, G., Vigne, E., Laval, V., Pfeiffer, P., Stussi-Garaud, C., Fuchs, M., 2004. Invited review: Grapevine fanleaf virus: still a major threat to the grapevine industry. *J. Plant Pathol.* 86, 183–195.
- Bonavia, M., Digiario, M., Boscia, D., Boari, A., Bottalico, G., Savino, V., Martelli, G. P., 1996. Studies on corky rugose wood of grapevine and on the diagnosis of grapevine virus B. *Vitis* 35, 53-58.
- Borgo, M., Bertazzon, N., Anaclerio, F., Angelini, E., 2009. Different variants of GRSPaV are associated to diverse diseases in grapevine. In: *Extended Abstracts of the 16th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine*, August 31–September 4, 2009. Dijon, France, pp. 327–328 .
- Boscia, D., Digiario, M., Safi, M., Garau, R., Zhou, Z., Minafra, A., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Bottalico, G., Potere, O., 2001. Production of monoclonal antibodies to Grapevine virus D and contribution to the study of its aetiological role in grapevine diseases. *Vitis* 40 (2), 69-74.
- Boscia, D., Savino, V., Minafra, A., Namba, S., Elicio, V., Castellano, M.A., Gonsalves, D., Martelli, G.P., 1993. Properties of a filamentous virus isolated from grapevines affected by corky bark. *Archives of Virology* 130:109-120.
- Bouyahia, H., Boscia, D., Savino, V., La Notte, P., Pirolo, C., Castellano, M.A., Minafra, A., Martelli, G.P., 2005. Grapevine rupestris stem pitting-associated virus is linked with grapevine vein necrosis. *Vitis* 44, 133–137.

- Bouyahia, H., Della Bartola M., Materazzi, A., Triolo, E., 2009. Molecular characterization of biologically divergent strains of GRSPaV. In: Extended Abstracts of the 16th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Viruslike Diseases of the Grapevine, August 31–September 4, 2009, Dijon, France, pp. 329–330.
- Bovey, R., Martelli, G. P., 1992. Directory of major virus and virus-like diseases of grapevine. Mediterranean Fruit Crop Improvement Council (MFCIC) and International Council for the study of viruses and virus diseases of the grapevine (ICVG), Bari, Italy.
- Buzkan, N., Karadağ, S., Öztekin, V., Kaya, A., Minafra, A. and Ben-Dov, Y., 2010. First report of the occurrence of Grapevine Leafroll Associated Virus-5 in Turkish vineyards. *J. Phytopathol.* 158: 448-449.
- Buzkan, N., Karadağ, S., Kaya, A., Baloglu, S., Minafra, A. and 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.
- Buzkan, N., La Notte, P., Karadağ, S., Aktan, A., Saldarelli, P. and Minafra, A., 2015. Detection of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus in autochthonous grapevine cultivars in Turkey. *J. Plant Pathol.* 97: 387-389.
- Cabaleiro, C. and Segura A. 2006. Temporal analysis of grapevine leafroll associated virus 3 epidemics. *European Journal of Plant Pathology*, 114 (4): 441-446.
- Cabaleiro, C., Couceiro, C., Pereira, S., Cid, M., Barrasa, M., Segura, A. 2008. Spatial analysis of epidemics of Grapevine leafroll associated virus-3. *European Journal of Plant Pathology*. 121 121–130.
- Carstens, E. B. 2010. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Archives of Virology*, 155, 133–146.
- Chevalier, S., Grief, C., Clauzel, J., Walter, B. and Fritsch, C. 1995. Use of an immunocapture-polymerase chain reaction procedure for the detection of Grapevine virus A in kober stem grooving-infected grapevines. *Journal of Phytopathology* 143, 369–373.
- Choueiri, E., Abou-Ghanem, N., Boscia, D., 1997. Grapevine virus A and grapevine virus D are serologically distantly related. *Vitis* 36 (1), 39-41.
- Çağlayan, K., 1997. Incidence of Grapevine Leafroll, Grapevine Virüs A and Tomato Black Ring Virüs in the Vineyards of Hatay Province. *J.Turk., Phytopath.,* .26 (2-3): 121-128.
- Çiğşar, İ., Martelli, G.P., Digiario, M., 2002a. Sanitary Statüs of Grapevines in South-eastern and Central Anatolia (Turkey). *OEPP/EPPO Bulletin* 32:471-475.

- Çiğşar, İ., 2002b. Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Nevşehir İllerinde Bağlarda Zararlı Virüs ve Virüs Benzeri Hastalıkların Biyolojik ve Serolojik Yöntemlerle Saptanması ve İki Yeni Nepovirusün Karakterizasyonu. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 111 s.
- Digiario M., Martelli G.P., Savino V., 2000. Phloem-limited viruses of the grapevine in the Mediterranean and Near East. Proc. 13th Meeting of ICGV, Adelaide, 7 pp: 5-76.
- Dovas, C. I., Katis, N. I. 2003. A spot multiplex nested RT-PCR for the simultaneous and generic detection of viruses involved in the aetiology of grapevine leafroll and rugose wood of grapevine. *Journal of Virological Methods* 109(2): 217-226.
- Fajardo, T.V.M., Dubiela,C.R., Eiras,M., Souto,E.R. and Nickel, O. 2012. Detection and molecular characterization of the Grapevine virus D. *Laboratorio de Virologia, Embrapa Uva e vinho - Embrapa - Brazil, Rua Livramento, 515, Bento Goncalves, RS5700-000, Brazil.*
- Foissac, X., Svanella-Dumas, L., Gentit, P., Dulucq M.J., Marais, A. and Candresse C., 2005. Polyvalent degenerate oligonucleotides reverse transcription-polymerase chain reaction: a polyvalent detection and characterization tool for Trichoviruses, Capilloviruses, and Foveaviruses. *Phytopathology* 95 (6), 617-625.
- Garau, R., Padilla, V., Rumbos, I., Walter, B. & Savino, V., 1997. Indexing for the identification of virus and virus-like diseases of the grapevine. In: INRA, Paris (ed). *Les Colloques*, n86. Sanitary selection of the grapevine, October 1997, Colmar, France. pp. 96 – 117.
- Goheen, A.C., Cook, J.A., 1959. Leafroll (red-leaf or rougeau)and its effects on vine growth, fruit quality, and yields. *American Journal of Enology and Viticulture* 10: 173-181.
- Goheen, A.C., 1988. Fanleaf degeneration. In: Pearson, R.C. Goheen, R.C. (eds.). *Compendium of grape diseases*. APS Press, St. Paul. p. 48.
- Golino, D. A., 1993. Potential interactions between rootstocks and grapevine latent viruses. *Am. J. Enol. Vitic.* 44, 148-152.
- Goszczynski, D.E., Jooste, A.E., 2003. Identification of divergent variants of Grapevine virus A. *European Journal of Plant Pathology* 109, 397–403.
- Goszczynski, D. E., 2007. Single-strand conformation polymorphism (SSCP), cloning and sequencing reveal a close association between related molecular variants of Grapevine virus A (GVA) and Shiraz disease in South Africa. *Plant Pathol.* 56: 755-762.
- Graniti, A., Martelli, G.P., 1965. Further observations on legno riccio rugose wood, a graft transmissible stem pitting of grapevine. *Proc. Int. Conf: Virus Vector Perennial Hosts and Vitis*, 1965, p. 168-179.
- Gursoy, Y. Z.; 1988. Vein necrosis: New virus-like disease in Turkish vineyards. *J. Turkish Phytopathol.* 17, 43-45.

- Habili, N., Farrokhi N., Lima, M.F., Nicholas, P., Randles, J.W., 2006. Distribution of Rupestris stem pitting-associated virus variants in two Australian vineyards showing different symptoms', *Ann. Appl. Biol.*, 148, 91-96.
- Hu, G. J., Dong, Y. F., Zhu, H. J., Zhang, Z. P., Fan, X. D., Ren, F. and Zhou, J. 2015. Molecular characterizations of two grapevine rupestris stem pitting-associated virus isolates from China. *Arch. Virol.* 160:2641-2645.
- King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. Lefkowitz, E.J., *Virus Taxonomy*. 2011. 9th Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, Academic Press, Amsterdam, The Netherlands.
- Köklü, G., and Baloğlu, S., 1999. 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.
- Kuhn, G.B., 1994. Vein necrosis, a disease that is latent in most grapevine cultivars in the state of Rio Grande do Sul. *Fitopatol. Brasil.* 19, 79-83.
- La Notte, P., Buzkan N., Choueiri E., Minafra A., Martelli G.P., 1997. Acquisition and transmission of Grapevine virus A by the mealybug *Pseudococcus longispinus*. *Journal of Plant Pathology*, 78, 79-85.
- Lázár, J. 2003. Sanitary Aspects and Results of the Hungarian Grape Breeding. Proc. VIIIth IC on Grape Eds: E. Hadju&É. Borbás *Acta Hort* 603, ISHS 2003, page 755-762.
- Legin, R. and Vuittenez, A. 1973. Comparaison des symptômes et transmission par greffage d'une mosaïque nervaire de *Vitis vinifera*, de la marbrure de *V. rupestris* et d'une affection necrotique de l'hybride Rup-Ber 110 R. *Rile. Patol. Veg.*, 9(suppl.): 57-63
- Lehoczky, J., Farkas, G., Lazar, J. 1986: Detection of vein necrosis virus (GVNV) in the vines of cultivated grape varieties. *Kertgazdasag* 18, 59-65 (in Hungarian).
- Lima, M.F., Alkowni, R., Uyemoto, J.K., Golino, D., Osman, F., Rowhani, A., 2006. Molecular analysis of a California strain of Rupestris stem pitting-associated virus isolated from declining Syrah grapevines. *Arch. Virol.*, 151, 1889-1894.
- Mahfoudhi, N., Soltani, I., Digiario, M., 2014. Occurrence and widespread distribution of *Grapevine virus D* in Tunisian Grapevines. *Journal of Plant Pathology*. 2014, 96 (2), 431-439.
- Martelli, G. P. Savino, V., Abracheva, P. Rosciglione, B. 1978. Necrosi delle nervature della vite in Italia e in Bulgaria. *Inf. Fitopatol.* 10, 3-5.
- Martelli, G. P. Galea, Souchet., H. Boscia, D., Savino, V., 1992. Viruses of grapevine in Malta. *Bull. EPPO* 22, 607-612.

- Martelli, G.P. 1993a. Grapevine degeneration-fanleaf. In: Martelli G.P. (ed.). Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis, pp. 9-18. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Martelli, G.P. 1993b. Rugose wood complex. In: Martelli., G.P. (Ed.), Grafttransmissible Diseases of Grapevines: Handbook for Detection and Diagnosis. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp. 45–54.
- Martelli, G.P., 1993c. Graft-transmissible Diseases of Grapevines. Handbook for Detection and Diagnosis. ICVG, FAO, Rome, p. 263.
- Martelli, G.P., 1996. Studies on corky rugose wood of grapevine and on the diagnosis of grapevine virus B. *Vitis* 35, 53-58.
- Martelli, G.P., Saldarelli, P., Boscia, D., 1997. Filamentous viruses of the grapevine: Closterovirus. In: Monette P.L. (ed.). Filamentous Viruses of Woody Plants, pp. 1-9. Research Signpost, Trivandrum, India.
- Martelli, G. P., Sabanadzovic, S., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Edwards, M. C. and Dreher, T., 2002. The family Tymoviridae. *Archives of Virology*. 147, pp. 1837–46.
- Martelli, G. P., and Boudon-Padieu, E. (Eds.) 2006. Directory of infectious diseases of grapevines and viroses and viruslike diseases of grapevine: Bibliographic report 1998–2004. *Options méditerranéennes. Série B, 55: Studies and Research*. Bari, Italy: CIEHAM-IAMB, 279p.
- Martelli, G. P., 2010. "Virus diseases of grapevine". *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*, Wiley, Ltd: Chichester. pp. 183–195
- Martelli, G. P., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Agranovsky, A. A., Al Rwahnih, M., Dolja, V. V., Dovas, C. I., 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. *J. Plant Pathol.* 94 7–19.
- Martelli, G.P., 2014. Directory Of Virus And Virus-Like Diseases Of The Grapevine and Their Agents. *Journal of Plant Pathology* 2014. Vol. 96 No. 1, Suppl.pp. 1-136.2.
- Meng B., Pang S.Z., Forsline P., McFerson J.R., Gonsalves, D., 1998. Nucleotide sequence and genome structure of grapevine rupestris stem pitting associated virus-1 reveal similarities to apple stem pitting virus. *J. Gen. Virol.*, 79, 2059-2069. Methods in South-East of Turkey. 13th Meeting of the ICVG, In press, Adelaide, Australia.
- Meng, B., Johnson, R., Peressini, S., Forsline, P.L., Gonsalves, D., 1999. RSPaV-1 is consistently detected in rupestris stem pitting-infected grapevines. *Eur. J. Plant Pathol.* 105, 191–199.
- Meng, B., Li, C., Wang, W., Goszczynski, D., Gonsalves, D., 2005. Complete genome sequences of two new variants of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus and comparative analyses. *Journal of General Virology*. 86, 1555–1560.

- Meng, B., Rebelo, A.R., Fisher, H., 2006. Genetic diversity analyses of grapevine Rupestris stem pitting-associated virus reveal distinct population structures in scion versus rootstock varieties. *J. Gen. Virol.* 87, 1725–1733.
- Milkus, B. N., Schteremberg, M. P., Berezowskaja, E. A. 1978. Some new virus and rickettsia-like diseases of grapevine found in Ukraine. Proc. 6th Meeting of ICVG, Cordoba 1976. *Monografias INIA* 18, 31-36.
- Minafra A, Saldarelli P, Martelli GP, 1997. Grapevine virus A: nucleotide sequence, genome organization, and relationship in the Trichovirus genus. *Archives of Virology* 142, 417–23.
- Morelli, M., Minafra, A., Boscia, D., Martelli, GP., 2011. Complete nucleotide sequence of a new variant of grapevine rupestris stem pitting-associated virus from southern Italy. *Archives of Virology*; 156:543–546.
- Nakaune, R., Inoue, K., Nasu, H., Kakogawa, K., Nitta, H., Imada, J., Nakano, M., 2008a. Detection of viruses associated with rugose wood in Japanese grapevines and analysis of genomic variability of Rupestris stem pitting-associated virus. *J. Gen. Plant Pathol.* 74, 156–163.
- Nakaune, R., Toda, S., Mochizuki, M., Nakano, M. 2008b. Identification and characterization of a new vitivirus from grapevine. *Arch. Virol.* 153, 1827-1832.
- Nolasco, G., Mansinho, A., Teixeira Santos, M., Soares, C., Sequeira, Z., Sequeira, C., Correia, P.K., Sequeira, O.A., 2000. Large scale evaluation of primers for diagnosis of rupestris stem pitting associated virus-1. *Eur. J. Plant Pathol.* 106, 311–318.
- Nolasco, G., Santos, C., Petrovic, N., Teixeira Santos, M., Cortez, I., Fonseca, F., Boben, J., Nazare Pereira, A.M., Sequeira, O., 2006. Rupestris stem pitting associated virus (RSPaV) isolates are composed by mixtures of genomic variants which share a highly conserved coat protein. *Arch. Virol.* 151, 83–96.
- Osman, F., Hodzic, E., Omanska-Klusek, A., Olineka, T., Rowhani, A., 2013. Development and validation of a multiplex quantitative PCR assay for the rapid detection of Grapevine virus A, B and D. *Journal of Virological Methods* 194 (2013) 138–145
- Özaslan, M., Yılmaz M.A., 1995. Adana, Tarsus, Şanlıurfa ve Adıyaman bölgelerinde yetiştirilen bağlara zarar veren virüs hastalıkları. Türkiye VII. Fitopatoloji Kongresi, Adana, pp: 306-312.
- Rosciglione, B., Castellano, M.A., Martelli, G.P., Savino, V., Cannizzaro, G., 1983. Mealybug transmission of grapevine virus A. *Vitis* 22, 331–347.
- Rumbos, I. C. 1989. Vein necrosis, fleck and leafroll in *Vitis vinifera* and grapevine rootstocks in Central Greece. *Phytoparasitica* 17, 61.
- Sabanadzovic, S., Saldarelli, P., Savino, V., 1996. Molecular diagnosis of grapevine fleck virüs. *Vitis* 35 (3), 137-140 (1996).

- Saitou N., Nei M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-25.
- Saldarelli, P., Rowhani, A., Routh, G., Minafra, A. and Digiario., M. 1998. Use of degenerate primers in a RT-PCR assay for the identification and analysis of some filamentous viruses, with special reference to clostero- and vitiviruses of the grapevine. *Eur. J. Plant Pathol.*, 104: 945-950.
- Shi, B.J., Habili, N., Gafny, R., Symons, R. H. 2004. Extensive variation of sequence within isolates of Grapevine virus B. *Virus Genes* 29: 279–285.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*:30 2725-2729.
- Tanne, E., Ben-Dov, Y., Raccach, B., 1989. Transmission of the corky-bark disease by the mealy bug *Planococcus ficus*. *Phytoparasitica* 17, 55.
- Terlizzi, F., Ratti, C., Filippini, G., Pisi, A., Credi, R., 2010. Detection and molecular characterization of Italian Grapevine rupestris stem pitting-associated virus isolates. *Plant Pathol.* 59, 48–58.
- Uzun, I.H. and Bayır., A., 2010. Distribution of wild and cultivated grapes in Turkey. *Notulae Scientia. Biologicae* 2(4):83-87. 1.
- Voncina, D., Simon S., Dermic E., Cvjetkovic B, Pejic I., Maletic E. and Kontic J.K., 2011. Differential Properties Of Grapevine Virus B Isolates From Croatian Autochthonous Grapevine Cultivars. *Journal of Plant Pathology* , 93 (2), 283-289.
- Vouillamoz, J. F. McGovern, P. E. Ergul, A. Soylemezoglu, G., Tevzade, G., Meredith, C. P. Grando, M. S. 2006: Genetic characterization and relationships of traditional grape cultivars from Transcaucasia and Anatolia. *Plant Genet. Res.* 4, 144–158.
- Woodrum, R.C., Antcliff, A.J., Krake, L.R., Taylor, R.H. 1984. Yield differences between Sultana clones related to virus status and genetic factors. *Vitis* 23: 73-83.
- Yilmaz, M.A., Yurtmen M.İ., Çiğsar İ. and Özaslan M. 1997. A Survey of grapevine viruses in Turkey. 12th Meeting of the ICVG. Extended Abstracts, Lisbon, Portugal, 113.
- Zhang, Y., Uyemoto, J.K., Golino, D., Rowhani, A., 1998. Nucleotide sequence and RT-PCR detection of a virus associated with grapevine rupestris stem-pitting disease. *Phytopathology* 88, 1231–1237.
- Zorloni, A., Prati, S., Bianco, P.A., Belli, G., 2006. Transmission of Grapevine Virus A And Grapevine Leafroll-Associated Virus 3 by *Helicoccus bohemicus*. *Journal of Plant Pathology*, 88 (3), 325-328.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : Mustafa Kemal ÖZTIRAK
Uyruğu : T.C
Doğum tarihi ve yeri : 01.09.1992 Reyhanlı/Hatay
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0534 333 81 86
e-posta : mustafakemaloztirak@gmail.com

Eğitim

<u>Derece</u>	<u>Eğitim Birimi</u>	<u>Mezuniyet tarihi</u>
Yüksek lisans	KSÜ / Bitki Koruma Bölümü	2017
Lisans	KSÜ / Bitki Koruma Bölümü	2014
Lise	Tayfur Sökmen Anadolu Lisesi	2010

Yabancı Dil

İngilizce