

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**EGE BÖLGESİ BAĞLARINDA
ASMA YAPRAK KIVRILMA HASTALIĞI
İLE İLİŞKİLİ VİRÜSLERİN
TANILANMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Serkan ÖNDER

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 20.01.2016

**Bornova-İZMİR
2016**

Serkan ÖNDER tarafından Doktora tezi olarak sunulan “Ege Bölgesi Bağlarında Asma Yaprak Kıvrılma Hastalığı ile İlişkili Virüslerin Tanılanması ve Karakterizasyonu” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 20.01.2016 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ	
Raportör Üye	: Prof. Dr. Semih ERKAN	
Üye	: Prof. Dr. Savaş KORKMAZ	
Üye	: Prof. Dr. Çiğdem ULUBAŞ SERÇE	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. İsmail CAN PAYLAN	

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**Ege Bölgesi Bağlarında Asma Yaprak Kıvrılma Hastalığı ile İlişkili Virüslerin Tanılanması ve Karakterizasyonu**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

.... / 02 / 2016

Serkan ÖNDER

ÖZET**EGE BÖLGESİ BAĞLARINDA ASMA YAPRAK KIVRILMA
HASTALIĞI İLE İLİŞKİLİ VİRÜSLERİN TANILANMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

ÖNDER, Serkan

Doktora Tezi, Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ

Ocak 2016, 153 sayfa

Bu çalışma 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, seçilen bazı örneklerin biyolojik indeksleme ile otsu ve odunsu indikatörlerde oluşturduğu semptomların belirlenmesi ve elde edilen DNA dizileme verileriyle yerel izolatların birbirleriyle ve dünya izolatlarıyla olan filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. 2011 ve 2012 yıllarında Manisa, Denizli, İzmir, Aydın 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 olduğu, enfeksiyon oranlarının Denizli ilinde %34,1; Manisa ilinde %32,2; İzmir ilinde %26,7; Uşak ilinde %20 ve Aydın ilinde ise %18,2 olduğu saptanmıştır. Karışık enfeksiyonlar dikkate alınmadan genel bir değerlendirme yapıldığında GLRaV-Pr'nin %16,8'lik bulunma durumuyla en yaygın virüs olduğu, 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 belirtilen oranlarda izlediği; GLRaV-6 açısından ise enfekteli örneğin tespit edilemediği belirlenmiştir. Testlenen 424 örneğin %22,2'sinin bir, %9,2'sinin ise birden fazla virüsle enfekteli olduğu saptanmıştır. Otsu indikatörlerden sadece U-5 numaralı izolatın inokule edildiği *Nicotiana benthamiana*'da semptom oluşumu gözlenirken odunsu indikatörlerle yapılan biyolojik indeksleme çalışmalarında ise seçilen tüm izolatların Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon ve Pinot Noir indikatörlerinin en az birinde değişen şiddetlerde semptom oluşturduğu tespit edilmiştir. GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-Pr ve

GLRaV-De virüslerine ait dizileme verisi elde edilen yerel izolatların NCBI gen bankasından elde edilen referans izolatlarla genel olarak nükleotit ve amino asit düzeyinde yüksek oranda benzerlik gösterdiği belirlenmiş olup yerel izolatlara ait elde edilen 23 dizileme verisi NCBI gen bankasına kayıt edilerek erişim numaraları alınmıştır. Gerçekleştirilen bu çalışma ile ülkemiz bağlarında GLRaV-9, GLRaV-Pr ve GLRaV-De virüslerinin varlığı ilk kez saptanmıştır.

Anahtar sözcükler: Asma, DAS-ELISA, Real-time PCR, GLRaVs, biyolojik indeksleme, dizi analizi.

ABSTRACT**DETECTION AND CHARACTERIZATION OF
Grapevine leafroll-associated viruses (GLRaVs)
IN AEGEAN VINEYARDS**

ÖNDER, Serkan

Ph. D. Thesis in Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ

January 2016, 153 pages

This study was carried out main viticulture production areas of Aegean Region from 2011 to 2015. The aim of this study, was to determine presence and prevalence of Grapevine leafroll-associated viruses (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-6, GLRaV-7, GLRaV-9, GLRaV-Pr and GLRaV-De) via serological (DAS-ELISA) and molecular (Real-time RT-PCR) methods; to indicate symptoms development for some isolates of selected samples on herbaceous and woody indicator plants with biological indexing and to examine the isolates of selected samples phylogenetic relationship with each other's and reported world isolates too. Between 2011-2012, samples which collected from Manisa, Denizli, İzmir, Aydın and Uşak provinces were performed DAS-ELISA and Real-time RT-PCR analyses for detection GLRaVs. At the end of DAS-ELISA and Real-time PCR assays 133 out of 424 samples were found infected at least one GLRaVs and the infection rates were 34,1%, 32,2%, 26,7%, 20% and 18,2% for Denizli, Manisa, İzmir, Uşak and Aydın provinces, respectively. Regardless the mixed infections, GLRaV-Pr was found to be the most widespread virus with 12% infection rate that followed by 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%) and GLRaV-7 (0,2%) respectively. In addition GLRaV-6 was not detected within the collected samples. 133 out of 424 tested samples were found infected by one (22,2%) or more (9,2%) GLRaVs. In biological indexing assays on herbaceous indicators only the isolate of U-5 was indicated symptoms on *Nicotiana benthamiana*. On the contrary biological indexing on herbaceous indicators, the isolates were indicated various severity GLRaVs like symptoms on at least one woody indicators (Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon and Pinot Noir). Phylogenetic analyses were indicated that obtained sequences belong to native virus isolates show high identity at nucleotide and amino acid levels with selected reference isolates. In addition 23 native virus

partial genome sequences were recorded to NCBI genbank. GLRaV-9, GLRaV-Pr and GLRaV-De were firstly reported for viticulture areas in Turkey with this study.

Key words: Grapevine, DAS-ELISA, Real-time PCR, GLRaVs, biological indexing, sequencing.

TEŞEKKÜR

Doktora tezi çalışmamın yürütülmesi ve tamamlanması aşamalarında deneyimleriyle bana yol gösteren ve desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Mustafa GÜMÜŞ'e teşekkür ederim. Araştırmamın başından itibaren tez izleme komitesi üyeleri olarak çalışma sırasında karşılaştığım sorunların çözümü noktasında sağladıkları katkılar, verdikleri destekler ve yapıcı eleştirilerinden dolayı sayın hocalarım Prof. Dr. Semih ERKAN ve Prof. Dr. Savaş KORKMAZ'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamı TAGEM–BS–11/04-01/02-08 numaralı proje ile finansal olarak destekleyen T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğüne ve çalışmamı yürüttüğüm kurumun imkanlarından sonuna kadar yararlanmamı sağlayıp desteğini esirgemeyen Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürü Sayın Akay ÜNAL'a teşekkür ederim.

Projemin sörvey ve laboratuvar çalışmaları sırasında katkı sağlayan Yrd. Doç. Dr. D. Soner AKGÜL, Dr. Simin ULAŞ, Arzu GÖÇMEZ, Turcan TEKER ve Bilgehan KARAHAN'a; genomik ve filogenetik analizlerle ilgili bana yol gösteren Prof. Dr. Bayram ÇEVİK, Prof. Dr. Bahattin TANYOLAÇ, Betül KAYA, Bengi TOPKAYA KÜTÜK ve Yrd. Doç. Dr. Eminur ELÇİ'ye; tezimi sabırla okuyup redakte eden Adnan ERDEM'e ve koordinatörü olduğu proje ile çalışmama yaptığı maddi katkılardan dolayı Dr. Selçuk KARABAT'a gönülden teşekkür ederim.

Doktora çalışmam sırasında manevi destekleriyle yanımda olan canım annem ve aileme de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLERSayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxvi
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
2.1 Hastalığa ve Hastalıkla İlişkili Virüslere Ait Genel Bilgiler.....	7
2.2 Simptomatolojiye Dayalı Çalışmalar	10
2.3 Biyolojik İndeksleme Çalışmaları	12
2.4 Sörvey ve Yaygınlık Oranı ile İlgili Çalışmalar	17
2.5 Tanı Yöntemlerinin Duyarlılıkları ile İlgili Çalışmalar	24
2.6 Genomik ve Filogenetik Analiz Çalışmaları	26
3. MATERYAL VE YÖNTEM	33
3.1 Materyal	33
3.1.1 Çalışmanın konusunu oluşturan bitki örnekleri.....	33

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.1.2 Serolojik çalışmalarda kullanılan materyal	33
3.1.3 Moleküler çalışmalarda kullanılan materyal	33
3.1.4 Biyolojik indeksleme çalışmalarında kullanılan materyal	34
3.1.5 DNA dizileme, genomik ve filogenetik analiz çalışmalarında kullanılan materyal.....	35
3.2 Yöntem.....	35
3.2.1 Sörvey ve örnek toplama çalışmaları	35
3.2.2 Serolojik test yöntemi (DAS-ELISA)	39
3.2.3 Moleküler yöntemler	39
3.2.4 Biyolojik indeksleme çalışmaları.....	43
3.2.5 DNA dizileme, genomik ve filogenetik analizler	47
4. BULGULAR	48
4.1 Sörvey Çalışmaları Sırasında Bitkilerde Gözlenen Simptomlar	48
4.2 Serolojik (DAS-ELISA) Testlerin Sonuçları	50
4.3 Moleküler (Real-time RT-PCR) Testlerin Sonuçları.....	53
4.4 Biyolojik Testlerin Sonuçları	72
4.4.1 Otsu bitkilere yapılan mekanik inokulasyon sonuçları	72

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4.4.2 Odunsu bitkilere yapılan biyolojik indekslemelerin sonuçları	74
4.5 DNA Dizileme, Genomik ve Filogenetik Analiz Sonuçları.....	80
4.5.1 GLRaV-1 ile ilgili sonuçlar	82
4.5.2 GLRaV-2 ile ilgili sonuçlar	83
4.5.3 GLRaV-3 ile ilgili sonuçlar	87
4.5.4 GLRaV-4 ile ilgili sonuçlar	92
4.5.5 GLRaV-5 ile ilgili sonuçlar	96
4.5.6 GLRaV-Pr ile ilgili sonuçlar.....	98
4.5.7 GLRaV-De ile ilgili sonuçlar	101
5. TARTIŞMA.....	105
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	136
KAYNAKLAR DİZİNİ	140
ÖZGEÇMİŞ	153
EKLER.....	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 <i>V. vinifera</i> L. türünün dünya üzerindeki yetişme alanları (Cooke, 2015)	2
1.2 Türkiye’de bölgelere göre üzüm üretim oranları (TÜİK, 2013)	3
3.1 Amplifikasyon sırasında SYBR Green I’ın ışıma modeli.....	42
3.2 Otsu indikatörlerin gelişme sürecine ait görünüm a) Çimlenen otsu indikatörler b) Şaşırtılmaya hazır hale gelen otsu indikatörler c) Otsu indikatörlerin saksılara şşırtma işlemi d) Saksılara şşırtılmış otsu indikatörler.....	44
3.3 Mekanik inokulasyon çalışmalarına ait görünüm a) Örneklerin soğuk ortamda homojenize edilmesi b) İndikatörlere celite uygulaması c) <i>N. benthamiana</i> ’ya mekanik inokulasyon uygulaması d) <i>N. occidentalis</i> ’e mekanik inokulasyon uygulaması e) <i>N. clevelandii</i> ’ye mekanik inokulasyon uygulaması f) <i>C. quinoa</i> ’ya mekanik inokulasyon uygulaması g) <i>C. amaranticolor</i> ’a mekanik inokulasyon uygulaması h) İnokulasyondan sonra yaprakların suyla yıkanması.....	45
3.4 Odunsu indikatörlere omega aşısı ile biyolojik indeksleme uygulamalarına ait görünüm a) İndikatörlere ait kalemler ile enfekteli bitkilere ait aşısı gözleri b) İndikatörlere omega aşısı ile enfekteli bitkilere ait gözlerin aşılama c) Omega aşısı uygulanan indikatörler d) Aşılama indikatörlerinin aşısı kaynaştırma odasında kallus oluşumu için kasalarda bekletilmesi e) Aşısı kaynaştırma odasından çıkan dikime hazır indikatörler	46
3.5 Odunsu indikatörlerin dikim ve gelişim süreçlerine ait görünüm a) İndikatörlerin tüplere dikimi b) Dikimden sonra iklim odasına yerleştirilen indikatörler c) İklim odasında sürgün gelişimi başlayan indikatörler	47

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.1 Beyaz üzüm çeşitlerinin yapraklarında görülen belirtiler a) Sultani Çekirdeksiz’de genel sararma b) Sultani Çekirdeksiz’de uçlardan merkeze doğru sararma c) Sultani Çekirdeksiz’de klorotik renk açılması ve beneklenme d) Sultani Çekirdeksiz’de mozaik renk açılması e) Sultani Çekirdeksiz’de damar bantlaşması f) Sultani Çekirdeksiz’de benek oluşumu g) Razakı’da düzensiz klorotik lekeler ve damar bantlaşması h) Sultani Çekirdeksiz’de yaprakta şekil bozukluğu, damar bantlaşması ve mozaik renk açılması. 49
- 4.2 Renkli üzüm çeşitlerinin yapraklarında görülen belirtiler a) Cabernet Sauvignon’da ana damarlar haricinde ayada kızarıklık b) Kalecik Karası’nda genel kızarıklık c) Alphonse Lavallée’de ayada damarlarla sınırlanmış kısmi kızarıklık d) Alphonse Lavallée’de ana damarlarda ve ayada parçalı kızarıklık e) Ekse Karası’nda kırmızı ve açık yeşil mozaik renk oluşumları f) Syrah’da içi yeşil dışı kırmızı hale oluşumları g) Alphonse Lavallée’de yaprak uçlarında kısmi kızarıklık ve klorotik renk açılması h) Alicante Bouschet’de içe doğru şiddetli kıvrılma ve ana damarlar haricinde şiddetli kızarıklık. 49
- 4.3 DAS-ELISA testleri sonucu enfekteli olduğu belirlenen bazı örneklerle ait yaprak belirtileri a) GLRaV-1+3 ve 2 (Alicante Bouschet) b) GLRaV-1+3 ve GLRaV-4-9 (Sultani Çekirdeksiz) c) GLRaV-4-9 (Sultani Çekirdeksiz) d) GLRaV-2 (Alphonse Lavallée) e) GLRaV-1+3 (Sultani Çekirdeksiz) f) GLRaV-1+3 (Syrah) g) GLRaV-4-9 (Sultani Çekirdeksiz) h) GLRaV-1+3 (Çal Karası)..... 53
- 4.4 GLRaV-1 ve GLRaV-3’e ait melting analizi grafikleri a) GLRaV-1’in melting analizi grafiği b) GLRaV-3’ün melting analizi grafiği 54
- 4.5 GLRaV-2’nin melting analizi grafiği 56
- 4.6 GLRaV-4 ve GLRaV-5’e ait melting analizi grafikleri a) GLRaV-4’ün melting analizi grafiği b) GLRaV-5’in melting analizi grafiği 58

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.7 GLRaV-6 ve GLRaV-7'e ait melting analizi grafikleri a) GLRaV-6'ün melting analizi grafiği b) GLRaV-7'in melting analizi grafiği.	59
4.8 GLRaV-9'un melting analizi grafiği.	59
4.9 GLRaV-Pr ve GLRaV-De'ye ait melting analizi grafikleri a) GLRaV-Pr'nin melting analizi grafiği b) GLRaV-De'nin melting analizi grafiği. ..	62
4.10 GLRaV-8 primeriyle gerçekleştirilen Real-time PCR çalışmasına ait melting analizi grafiği.....	63
4.11 Real-time PCR yöntemi genel sonuçları.....	65
4.12 İllere göre toplanan örneklerdeki GLRaVs enfeksiyon sayıları.....	66
4.13 Tekli ve ikili enfeksiyonlara neden olan asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler a) Tekli enfeksiyonlara neden olan virüsler b) İkili enfeksiyonlara neden olan virüsler	71
4.14 Üçlü enfeksiyonlara neden olan asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler	71
4.15 U-5 numaralı izolat ve negatif kontrolün mekanik inokulasyon sonuçları a), b), c) U-5 numaralı izolatın <i>N. benthamiana</i> otsu indikatörünün yapraklarında neden olduğu klorotik halkalı leke belirtileri d) Fosfat tampon çözeltisi uygulanan sağlıklı <i>N. benthamiana</i>	73
4.16 U-5 numaralı izolatın inokule edildiği <i>N. benthamiana</i> 'da gerçekleştirilen Real-time PCR'a ait melting analizi grafikleri a) GLRaV-8'in melting analizi grafiği b) GLRaV-De'nin melting analizi grafiği	73
4.17 Odunsu indikatörlerde gözlenen belirtilerin 0-3 skalasına göre değerlendirilmesi a) 0-Yok b) 1-Zayıf c) 2-Orta d) 3-Şiddetli	75

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.18 Odunsu indikatörlerde izolatların oluşturduğu simptomlar a) İ-23/C. Sauvignon b) İ-23/ P. Noir c) B-21/C. Sauvignon d) B-21/P. Noir e) C-29/C. Sauvignon f) R-75/C. Sauvignon g) R-75/ P. Noir h) U-5/C. Sauvignon.....	78
4.19 Odunsu indikatörlerde izolatların oluşturduğu simptomlar a) B-23/C. Franc b) B-23/C. Sauvignon c) B-23/P. Noir d) İ-9/C. Sauvignon e) R-10/C. Franc f) R-10/C. Sauvignon g) R-10/P. Noir h) D-11/C. Sauvignon i) M-21/ C. Franc J) M-21/C. Sauvignon k) M-21/P. Noir l) L-6/C. Sauvignon.....	79
4.20 GLRaV-8 primeri ile pozitif sonuç veren P-3 numaralı izolatın odunsu indikatörlerde oluşturduğu simptomlar a) P-3/C. Sauvignon b) P-3/P. Noir	80
4.21 Dünyadaki GLRaV-1 izolatları ile R-49 numaralı izolatın HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.....	82
4.22 Dünyadaki GLRaV-1 izolatları ile R-49 numaralı izolatın HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı.....	83
4.23 Yerel GLRaV-2 izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.....	84
4.24 Yerel GLRaV-2 izolatlarının HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı.....	84
4.25 Dünyadaki GLRaV-2 izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.....	86
4.26 Dünyadaki GLRaV-2 izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı	87

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.27 Yerel GLRaV-3 izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.....	88
4.28 Yerel GLRaV-3 izolatlarının HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı.....	88
4.29 Dünyadaki GLRaV-3 izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.....	91
4.30 Dünyadaki GLRaV-3 izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı	92
4.31 Yerel GLRaV-4 izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.....	93
4.32 Yerel GLRaV-4 izolatlarının HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı.....	93
4.33 Dünyadaki GLRaV-4 izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.....	95
4.34 Dünyadaki GLRaV-4 izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı	95
4.35 Dünyadaki GLRaV-5 izolatları ile P-4 numaralı izolatın HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.....	97
4.36 Dünyadaki GLRaV-5 izolatları ile P-4 numaralı izolatın HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı.....	97
4.37 Yerel GLRaV-Pr izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.....	99

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.38 Yerel GLRaV-Pr izolatlarının HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı.....	99
4.39 Dünyadaki GLRaV-Pr izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.....	100
4.40 Dünyadaki GLRaV-Pr izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı	101
4.41 Yerel GLRaV-De izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.....	102
4.42 Yerel GLRaV-De izolatlarının HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı.....	102
4.43 Dünyadaki GLRaV-De izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.....	103
4.44 Dünyadaki GLRaV-De izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı	104

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Dünya üzüm üretimi ve bağ alanlarının ülkeler bazında sıralaması (FAOSAT, 2013).....	3
1.2 Ege Bölgesi'nde üzüm üretimi ve bağ alanlarının iller bazında sıralaması (TÜİK, 2013).....	4
1.3 Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin cins, vektör ve ilk kayıtlarına ilişkin bilgiler (Martelli et al., 2012' den revize edilmiştir)	6
3.1 Bir bağdan alınabilecek en fazla örnek sayısına ait bilgiler.....	35
3.2 2011 yılında gerçekleştirilen sörvey çalışmalarına ait bilgiler	36
3.3 2012 yılında gerçekleştirilen sörvey çalışmalarına ait bilgiler	37
3.4 2011 ve 2012 yıllarında gerçekleştirilen sörvey çalışmalarına ait bilgiler ..	37
3.5 Sörvey çalışmaları sırasında toplanan örneklere ait çeşit bilgileri	38
3.6 DAS-ELISA kitleri ile testlenen virüslere ait bilgiler	39
3.7 Real-time PCR testlerinde kullanılan primerler ve döngülere ait bilgiler ..	41
3.8 İndikatör bitkilere verilen bitki besin maddeleri karışımına ait bilgiler (Murashige and Skoog, 1962)	44
4.1 Toplanan örneklerin DAS-ELISA testi sonuçları	50
4.2 DAS-ELISA testi sonucu saptanan karışık enfeksiyonlara ait bilgiler	52
4.3 DAS-ELISA ile GLRaV-1+3 açısından enfekteli olduğu belirlenen örneklere ait Real-time PCR sonuçları	55

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.4 DAS-ELISA ile GLRaV-1+3 açısından negatif olarak tespit edilen bazı örneklerin Real-time PCR sonuçları.....	55
4.5 DAS-ELISA ile GLRaV-2 açısından negatif olarak tespit edilen bazı örneklerin Real-time PCR sonuçları.....	57
4.6 DAS-ELISA ile GLRaV-4-9 açısından enfekteli olduğu belirlenen örneklerle ait Real-time PCR sonuçları	60
4.7 DAS-ELISA ile GLRaV-4-9 açısından negatif olarak tespit edilen bazı örneklerin Real-time PCR sonuçları.....	61
4.8 GLRaV-Pr ve GLRaV-De virüslerine ait Real-time PCR sonuçları	62
4.9 Manisa ilinde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin Real-time PCR yöntemine göre bulunma durumu.....	66
4.10 Denizli ilinde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin Real-time PCR yöntemine göre bulunma durumu.....	67
4.11 İzmir ilinde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin Real-time PCR yöntemine göre bulunma durumu	68
4.12 Uşak ilinde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin Real-time PCR yöntemine göre bulunma durumu	69
4.13 Aydın ilinde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin Real-time PCR yöntemine göre bulunma durumu.....	69
4.14 Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler tarafından oluşturulan tekli ve çoklu enfeksiyon sayıları	70
4.15 Mekanik inokulasyon amacıyla seçilen izolatlarla ait bilgiler	72

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.16 Biyolojik indeksleme amacıyla seçilen izolatlara ait bilgiler	74
4.17 Odunsu indikatörlerde oluşan belirtilerin değerlendirilmesinde kullanılan 0-3 skolası	75
4.18 İzolatların odunsu indikatörlerde belirtil oluşturma dereceleri.....	76
4.19 Odunsu indikatörlerde oluşan belirtilerin derecelerine göre dağılımı....	77
4.20 DNA dizilemesi yaptırılan ve NCBI gen bankasına kayıt edilen izolatlara ait bilgiler	81
4.21 Dünyadaki GLRaV-1 izolatları ile R-49 numaralı izolatın HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları	82
4.22 Yerel GLRaV-2 izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları	83
4.23 Dünyadaki GLRaV-2 izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları.....	85
4.24 Yerel GLRaV-3 izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları	88
4.25 Dünyadaki GLRaV-3 izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları.....	89
4.26 Yerel GLRaV-4 izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları	93
4.27 Dünyadaki GLRaV-4 izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları.....	94

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.28 Dünyadaki GLRaV-5 izolatları ile P-4 numaralı izolatın HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları	96
4.29 Yerel GLRaV-Pr izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları	98
4.30 Dünyadaki GLRaV-Pr izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları.....	100
4.31 Yerel GLRaV-De izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları	101
4.32 Dünyadaki GLRaV-De izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları.....	103

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
μl	Mikrolitre
μM	Mikromolar
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
A	Adenin
ArMV	<i>Arabidopsis mosaic virus</i>
bp	Base pair
BLASTn	Standard Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool
C	Sitozin
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Kalsiyum klorid
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
CEVd	<i>Citrus exocortis viroid</i>
CP	Coat protein
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Bakır sülfat
DAS-ELISA	Double-antibody sandwich – ELISA
dk.	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DNase	Deoksiribonükleaz
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
dsRNA	Double stranded ribonükleik asit
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FAOSAT	Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division
FeSO ₄ · 7H ₂ O	Demir sülfat
G	Guanin
<i>g</i>	G-force (Relative Centrifugal Force)
GCBaV	<i>Grapevine corky bark-associated virus</i>
GFkV	<i>Grapevine fleck virus</i>
GFLV	<i>Grapevine fanleaf nepovirus</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-5	<i>Grapevine leafroll-associated virus-5</i>

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
GLRaV-6	<i>Grapevine leafroll-associated virus-6</i>
GLRaV-7	<i>Grapevine leafroll-associated virus-7</i>
GLRaV-8	<i>Grapevine leafroll-associated virus-8</i>
GLRaV-9	<i>Grapevine leafroll-associated virus-9</i>
GLRaV-Pr	<i>Grapevine leafroll-associated virus-Pr</i>
GLRaV-De	<i>Grapevine leafroll-associated virus-De</i>
GLRaV-Car	<i>Grapevine leafroll-associated virus-Car</i>
GLRaVs	<i>Grapevine leafroll-associated viruses</i>
GRBaV	<i>Grapevine red blotch-associated virus</i>
GRSPaV	<i>Grapevine rupestris stem pitting-associated virus</i>
GRVfV	<i>Grapevine rupestris vein feathering virus</i>
GVA	<i>Grapevine virus A</i>
GVB	<i>Grapevine virus B</i>
GVCV	<i>Grapevine vein clearing virus</i>
GVD	<i>Grapevine virus D</i>
GYSVd-1	<i>Grapevine yellow speckle viroid-1</i>
H ₃ BO ₃	Borik asit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
HRM	High resolution melting
HSP70	Heat-shock protein-70
HSP70h	Heat-shock protein-70 homolog
kbp	Kilobase pair
kDa	Kilodalton (Atomik kütle birimi)
KH_2PO_4	Potasyum dihidrojen fosfat
KI	Potasyum iodin
KNO_3	Potasyum nitrat
M	Molar
mg	Miligram
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Magnezyum sülfat
ml	Mililitre
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Magnezyum sülfat
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sodyum molibdat
NaOH	Sodyum hidroksit
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	New Generation Sequencing

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
NH_4NO_3	Amonyum nitrat
nm	Nanometre
L	Litre
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Power of Hydrogen
RNA	Ribonükleik asit
RNase	Ribonükleaz
RpRSV	<i>Raspberry ringspot virus</i>
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SLRSV	<i>Strawberry latent ringspot virüs</i>
sn.	Saniye
T	Timin
TBRV	<i>Tomato black ring virus</i>
TRSV	<i>Tobacco ringspot virus</i>
ToRSV	<i>Tomato ringspot virus</i>
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Çinko sülfat

1. GİRİŞ

Dünyada çok geniş bir alanda yetiştiriciliği yapılan asma bitkisi, ana ürünü olan üzüm ve üzümden elde edilen ürünlerin çeşit ve zenginliği ile ekonomik anlamda yüksek getiri sağlayan tarım ürünleri arasında oldukça önemli bir yere sahiptir. Ülkemizde en çok tüketilen meyve olan üzüm, ekonomik açıdan olduğu kadar beslenme ve sağlık açısından da son derece önemli bir üründür (Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2006).

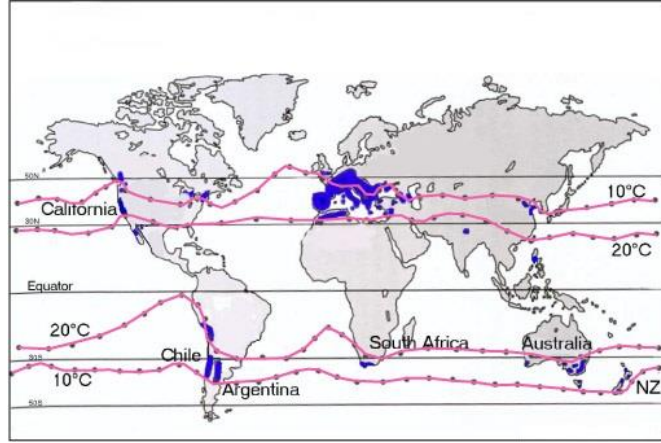
Asma çok büyük bir tür zenginliği göstermekte olup anavatanı olarak Kafkasya, Hazar Denizi'nin güneyi ve Kuzeydoğu Anadolu bölgeleri gösterilmektedir. Bu konuda yapılan jeolojik ve arkeolojik araştırmalar, asmanın dünyanın birçok bölgesinde günümüzden yaklaşık 60 milyon yıl öncesinde bile yetişmekte olduğunu ortaya çıkarmıştır (Gollmick et al., 1970).

Dünyada yetiştiriciliği yapılan kültür asması (*Vitis vinifera* L.), yüzbinlerce yıl süren doğal ve planlı bir seleksiyon ile büyük bir tip zenginliği gösteren ve 30 formu tanımlanan yabani asmadan (*Vitis silvestris* Gmel.) meydana gelmiştir (Ağaoğlu, 1999).

Asmalar ticari olarak meyve üretiminde kullanılan türler, anaç olarak kullanılan türler ve süs bitkisi olarak kullanılan türler olmak üzere 3 ana gruba ayrılmaktadır. Meyve üretiminde kullanılan türler içerisinde dünyada en çok üzüm çeşidi içeren tür *Vitis vinifera* L. ssp. *sativa* D.C.'dir. Bu tür içerisinde tespit edilen çeşit sayısı 10.000'in üzerinde olup dünyadaki üretimin %90'ından fazlasını oluşturmaktadır. (Winkler et al., 1974; Ağaoğlu, 1999).

Bağcılıkta anaç olarak kullanılan türler, filokseranın 1863 yılında Avrupa bağlarında ortaya çıkmasıyla birlikte bu böceğe karşı çözüm yolunun Amerikan asma anaçları üzerine *V. vinifera* çeşitlerinin aşılınması olduğunun anlaşılmasından sonra büyük önem kazanmıştır. Amerikan asma türlerinin büyük bir bölümü filoksera ve kök ur nematodlarına karşı dayanıklı olmalarından dolayı anaç olarak kullanılmaktadırlar. Filoksera ve nematodlara dayanıklılık özellikleri dışında kuraklığa, tuzluluğa, kirece, ağır topraklara, demir klorozuna, meşe kök mantarı, pamuk kök çürüklüğü (*Phymatotrichum omnivorum*), *Grapevine fanleaf nepovirus* (GFLV), *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine corky bark-associated virus* (GCBaV) ve *Tomato ringspot virus* (ToRSV)'e dayanıklı değişik anaçlar da bulunmaktadır (Ağaoğlu, 1999).

Günümüzde yetiştiriciliği yapılan kültür asmaı (*Vitis vinifera* L.) bir ılıman iklim kuşağı bitkisi olup dünya üzerinde 30° ile 40° kuzey ve güney enlem dereceleri arasında kendisi için en ideal yetiştirme alanlarını bulmuştur. Ancak bağcılık günümüzde dünyanın kuzey yarımküresinde 11° ile 53°, güney yarımkürede ise 20° ile 40° enlem dereceleri arasında yer alan toplam 93 ülkede yaklaşık olarak 7,16 milyon ha alanda yapılmaktadır (Şekil 1.1). Sıcaklık, bağcılığın dünyada bu enlem dereceleri dışına doğru yayılmasını önleyen en önemli faktördür (Oraman, 1972).



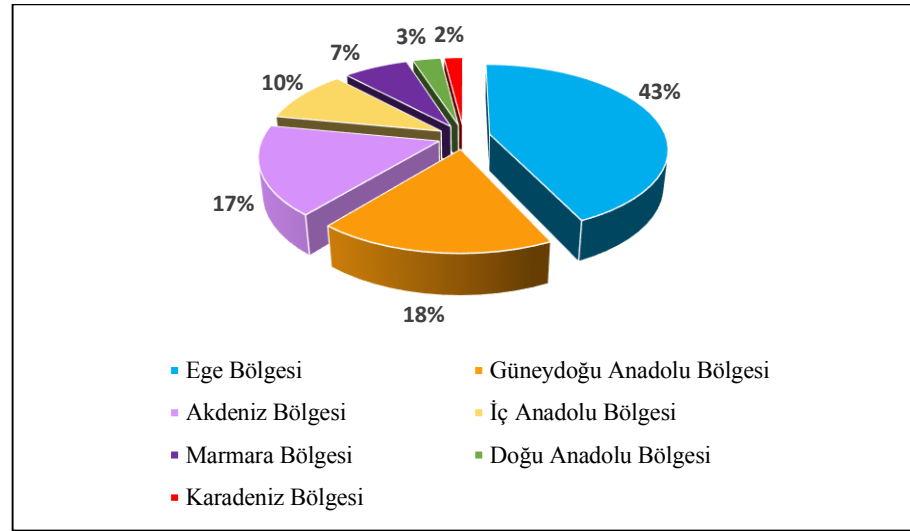
Şekil 1.1. *V. vinifera* L. türünün dünya üzerindeki yetiştirme alanları (Cooke, 2015).

Dünyada bağcılık yapan ülkeler arasında yıllık üzüm üretimi 2,5 milyon ton ve üzerinde olan 8 ülke bulunmaktadır. 2013 yılı istatistiklerine göre yaklaşık 77,2 milyon ton olan dünya üzüm üretiminin %15'ini Çin karşılarken bunu İtalya, ABD, İspanya, Fransa, Türkiye, Şili ve Arjantin izlemektedir. Dünya bağ alanları açısından bir değerlendirme yapıldığında ise 7,16 milyon hektarlık bağ alanlarının %13,2'sini İspanya oluştururken bunu Fransa, Çin, İtalya, Türkiye, ABD, Arjantin ve Şili izlemektedir (FAOSTAT, 2013). Türkiye, bağcılık yapan ülkeler içerisinde üzüm üretimi açısından 4.011.409 ton ile 6. sırada, bağ alanı açısından ise 468.792 ha ile 5. sırada yer almaktadır (Çizelge 1.1).

2013 yılı istatistiklerine göre Türkiye'nin 7 coğrafik bölgesinde toplam 468.792 ha alanda bağcılık yapılmakta olup ülkemiz toplam üzüm üretimi olan 4.011.409 tonun, %43'ü Ege, %18'i Güneydoğu Anadolu, %17'si Akdeniz, %10'u İç Anadolu, %7'si Marmara, %3'ü Doğu Anadolu ve %2'si ise Karadeniz Bölgesi'nden sağlanmaktadır (Şekil 1.2). Ülkemiz bağ alanlarının yaklaşık olarak 1/3'ü, üzüm üretimimizin ise 1/2'si Ege Bölgesi'ne aittir (TÜİK, 2013).

Çizelge 1.1 Dünya üzüm üretimi ve bağ alanlarının ülkeler bazında sıralaması (FAOSAT, 2013).

Ülkeler	Üzüm Üretimi (Ton)	Üretimdeki Payı	Ülkeler	Bağ Alanı (ha)	Üretim Alanındaki Payı
Çin	11.550.024	%15	İspanya	944.200	%13,2
İtalya	8.010.364	%10,4	Fransa	760.615	%10,6
ABD	7.744.997	%10	Çin	730.000	%10,2
İspanya	7.480.000	%9,7	İtalya	702.100	%9,8
Fransa	5.518.371	%7,1	Türkiye	468.792	%6,6
Türkiye	4.011.409	%5,2	ABD	394.848	%5,5
Şili	3.297.981	%4,3	Arjantin	233.721	%3,3
Arjantin	2.881.346	%3,7	Şili	219.651	%3,1
Diğer Ülkeler	26.686.630	%34,6	Diğer Ülkeler	2.701.260	%37,8
Toplam	77.181.122	%100	Toplam	7.155.187	%100



Şekil 1.2 Türkiye’de bölgelere göre üzüm üretim oranları (TÜİK, 2013).

Ülkemiz toplam üzüm üretiminin %43’ünün gerçekleştiği Ege Bölgesi’nde yıllık 20.000 ton ve üzeri üretim değerleriyle Manisa, Denizli, İzmir, Uşak ve Aydın illeri ön plana çıkmaktadır (Çizelge 1.2).

Ege Bölgesi’nin toplam üzüm üretimi olan 1.738.714 tonun %67’si Manisa, %22’si Denizli, %7’si İzmir, %2’si Uşak, %1’i Aydın ve geriye kalan %1’lik kısmı ise bölgenin diğer illerinde gerçekleştirilmektedir (TÜİK, 2013). Manisa üzüm üretiminde lider il olmasının yanı sıra dünya çekirdeksiz kuru üzüm üretiminin %20-25’ini, Türkiye üretiminin ise %75-80’ini sağlamakta olup dünyada çekirdeksiz kuru üzümün başkenti olarak bilinmektedir. Ülkemizin geri kalan %20-25’lik kuru üzüm üretimi ise bölgedeki Denizli ve İzmir illeri tarafından sağlamaktadır. Üretilen çekirdeksiz kuru üzümün yaklaşık %90’ı ihraç edilerek

yılda 500 milyon doların üzerinde gelir elde edilmektedir. ABD başta olmak üzere, ılıman iklim kuşağı üzerinde yer alan pek çok ülkede olduğu gibi ülkemizde de üzüm, en değerli meyve olarak görülmektedir (Çelik, 2013).

Çizelge 1.2 Ege Bölgesi'nde üzüm üretimi ve bağ alanlarının iller bazında sıralaması (TÜİK, 2013).

İller	Üzüm Üretimi (Ton)	Bağ Alanı (ha)
Manisa	1.163.899	75.401
Denizli	376.253	42.610
Izmir	121.467	13.450
Uşak	38.330	4.654
Aydın	20.197	1.926
Afyon	8.762	1.413
Muğla	7.307	808
Kütahya	2.499	337
Toplam	1.738.714	140.598

Ülkemizde ve özellikle de bölgemizde entansif olarak yapılan bağcılığın yüksek getirisi yanında birçok problemi de bulunmaktadır. Ülkemiz bağcılığında karşılaşılan sorunların başında olumsuz iklim koşulları (geç donlar, dolu, kuraklık), asma üzerinde aşırı ürün yükü bırakılması, aşırı su ve gübre kullanımı, yaz budamalarına önem verilmemesi, aşısız fidan kullanımının devam etmesi, AB normlarına uygun sertifikalı fidan üretim altyapısının tamamlanmamış olması, hastalıklar ve zararlılar ile mücadele ve kalıntı problemi gelmektedir (Çelik, 2013). Söz konusu bu faktörler üzümde verim ve kalite parametrelerini olumsuz olarak etkilemekte, karlılığı azaltmakta ve ihracatta sorunlar yaşanmasına neden olmaktadır.

Bağcılıkta üretimi ve karlılığı sınırlayan faktörlerin içerisinde hastalıkların ve zararlıların payı önemli bir yer tutmaktadır. Hastalıklar ve zararlılar içerisinde ise virüs ve virüs benzeri etmenler verim ve kalite kayıpları açısından önemli bir yere sahiptir. Yetiştiriciliği yapılan hemen her kültür bitkisinde olduğu gibi asma bitkisi de virüs ve virüs benzeri hastalıkların baskısı altındadır. Yapılan son çalışmalarla birlikte günümüzde asma bitkisinin 65'ten fazla virüs ve virüs benzeri hastalığa konukçuluk ettiği bilinmektedir. Bu viral kökenli etmenlerin bazıları asma üzerinde ekonomik bir kayba neden olmazken bazıları çeşitli kalite parametrelerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Bazıları ise kalite parametrelerindeki olumsuz etkiyle birlikte ciddi ekonomik kayıplara da yol açmaktadır (Martelli, 2014).

Bağlarda görülen viral etmenler içerisinde *Grapevine leafroll-associated viruses* (GLRaVs), dünya bağ üretim alanlarında oldukça fazla yaygınlık göstermesi ve ekonomik anlamda ciddi verim ve kalite kayıplarına neden olmasından dolayı önemli bir yer tutmaktadır (Martelli, 2014).

GLRaVs, asmada meyvelerin düzensiz ve geç olgunlaşmasına, kuru maddenin %43'e varan oranda azalmasına, asmanın beslenme ve sürgünlerde lignifikasyonun gecikmesi dolayısıyla aşı potansiyelinin olumsuz olarak etkilenmesine, anacın dolayısıyla da asmanın gücünün azalmasına ve üzüm veriminin %14-40 oranında düşmesine neden olarak önemli derecede verim kayıplarına yol açmaktadır (Gohen and Cook, 1959; Woodham et al., 1984; Wolpert and Vilas, 1992; Endeshaw et al., 2014). Verim kaybının şiddeti; anaç-çeşit kombinasyonuna, asmanın yaşına, enfeksiyon zamanına, enfekte eden virüse, virüs sayısına ve çevre koşullarına göre değişkenlik gösterebilmektedir (Kovacs et al., 2001; Basso et al., 2010; Komar et al., 2010). Ayrıca enfekteli asmalarda fotosentez seviyesi ve potasyum birikimi azalmakta, protein bileşimi, peroxidase ve polyphenoloxidase izoenzimlerinin dengesi değişmekte, üzüm suyundaki aromatik profil ve bileşenler gibi asma içerisindeki fizyolojik parametrelerden birçoğu olumsuz olarak etkilenmektedir (Martelli and Boudon-Padieu, 2006; Endeshaw et al., 2014).

Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler dünyada bağcılığın yapıldığı ülkelerin tamamında saptanmıştır. Bugüne kadar hastalıkla ilişkili 12 farklı virüs rapor edilmiş, *Grapevine leafroll-associated virus-1* (GLRaV-1)'den *Grapevine leafroll-associated virus-9* (GLRaV-9)'a ve *Grapevine leafroll-associated virus-Pr* (GLRaV-Pr), *Grapevine leafroll-associated virus-De* (GLRaV-De) ve *Grapevine leafroll-associated virus-Car* (GLRaV-Car) olarak isimlendirilmiş ve *Closteroviridae* familyası içine dahil edilmiştir (Martelli et al., 2012). Bu virüslere ait 2011 yılında yapılan sınıflandırma ve bazı önemli bilgiler Çizelge 1.3'te yer almaktadır. Çizelge incelendiğinde, asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerle ilgili ilk kaydın 1984 yılında GLRaV-1 virüsüne ait olduğu, en son olarak da 2010 yılında GLRaV-Car virüsüne ait kaydın yapıldığı anlaşılmaktadır.

Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerden GLRaV-1, *Grapevine leafroll-associated virus-2* (GLRaV-2), *Grapevine leafroll-associated virus-3* (GLRaV-3), *Grapevine leafroll-associated virus-4* (GLRaV-4), *Grapevine leafroll-associated virus-5* (GLRaV-5), *Grapevine leafroll-associated virus-6* (GLRaV-6),

Grapevine leafroll-associated virus-7 (GLRaV-7) ve GLRaV-9'un tanısı serolojik olarak yapılabilirken GLRaV-Pr, GLRaV-De ve GLRaV-Car virüslerinin tanıları ise antiserumları üretilmediği için moleküler yöntemlerle yapılabilir.

Çizelge 1.3 Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin cins, vektör ve ilk kayıtlarına ilişkin bilgiler (Martelli et al., 2012' den revize edilmiştir).

Virüs	Cinsi	Vektörü	İlk kayıt
GLRaV-1	<i>Ampelovirus</i>	<i>Pseudococcidae</i> ve <i>Coccidae</i> familyasına ait bazı türler, *** <i>Cuscuta</i> spp.	Gugerli et al.'a (1984) atfen Martelli (2014)
GLRaV-2	<i>Closterovirus</i>	Bilinmiyor	Zimmermann et al. (1990)
GLRaV-3	<i>Ampelovirus</i>	<i>Pseudococcidae</i> ve <i>Coccidae</i> familyasına ait bazı türler, *** <i>Cuscuta</i> spp.	Zee et al.'a (1987) atfen Martelli (2014)
GLRaV-4	<i>Ampelovirus</i>	<i>Pseudococcidae</i> familyasına ait bazı türler, *** <i>Cuscuta</i> spp.	Hu et al.'a (1990a) atfen Martelli (2014)
GLRaV-5	<i>Ampelovirus</i>		Walter and Zimmermann'a (1991) atfen Martelli (2014)
GLRaV-6	<i>Ampelovirus</i>		Gugerli et al.'a (1997) atfen Martelli (2014)
GLRaV-7*	<i>Velarivirus</i>	Bilinmiyor	Choueiri et al. (1996)
GLRaV-8**	<i>Ampelovirus</i>	Bilinmiyor	Monis (2000)
GLRaV-9	<i>Ampelovirus</i>	<i>Pseudococcidae</i> familyasına ait bazı türler, *** <i>Cuscuta</i> spp.	Alkowni et al. (2004)
GLRaV-Pr	<i>Ampelovirus</i>		Maliogka et al. (2008a)
GLRaV-De	<i>Ampelovirus</i>		Maliogka et al. (2008a)
GLRaV-Car	<i>Ampelovirus</i>	Bilinmiyor	Abou Ghanem-Sabanadzovic et al. (2010)

* GLRaV-7'nin cinsi Martelli'ye (2014) göre belirlenmiştir.

** 9. ICTV raporuna istinaden iptal edilmiştir (Martelli et al., 2012).

*** *Cuscuta* spp. ile taşınma sadece asmadan asmaya rapor edilmiştir.

Ülkemizde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerle yapılan çalışmalarla bugüne kadar GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-6 ve GLRaV-7'nin ülkemiz bağlarındaki mevcut durumları belirlenmeye çalışılmıştır. Dünyada yapılan moleküler karakterizasyon çalışmalarının aksine ülkemizde, Köklü (1999) ve Elçi et al. (2015) tarafından yapılan çalışmalar haricinde hastalığa neden olan virüslerle ilgili herhangi bir karakterizasyon çalışması yapılmamıştır.

Bu çalışma ile Ege Bölgesi'nde bağcılığın yoğun olarak yapıldığı illerde (Manisa, Denizli, İzmir, Aydın ve Uşak) asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin (GLRaV-Car hariç) serolojik yöntemlerden DAS-ELISA ve moleküler yöntemlerden Real-time RT-PCR kullanılarak tanılanması, tanılama sonucunda hastalıkla ilişkili farklı virüsleri içeren örneklerin seçilerek biyolojik indeksleme yöntemlerinden mekanik inokulasyon ve odunsu bitkilere aşılama ile indikatör bitkiler üzerinde oluşturduğu semptomların belirlenmesi, seçilen izolatların genomik analizlerinin yapılması, yerel izolatların kendi içlerinde ve dünya izolatlarıyla olan filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi ile dizi analizi sonucu elde edilen verilerin NCBI Gen Bankası veri tabanına girilerek dünyadaki tüm araştırmacıların kullanımına sunulması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1 Hastalığa ve Hastalıkla İlişkili Virüslere Ait Genel Bilgiler

Dünyada bağ virüs ve virüs benzeri hastalık etmenleri ile ilgili çalışmalar 1960'lı yıllardan sonra hız kazanmaya başlamış olup yalnızca iki tane olan viral etmenlerin sayısı 1997'de 43'e 1998'de 46'ya çıkmıştır. Ülkemizde ise bağ virüsleri ile ilgili çalışmalar 1950'li yıllarda başlamıştır (Martelli and Boudon-Padieu, 2006).

Günümüzde 65'i virüs, beşi viroid, 8'i fitoplazma ve biri de vektör böceklerle taşınan ve ksilemde bulunan bir bakteri olmak üzere 70'den fazla etmenin bağlarda kayıt altına alındığı bilinmektedir. Bu durum oldukça fazla sayıda hücre içi patojenin tek bir üründe bulunduğunu göstermekte olup asma dışında bu kadar çok sayıda etmene konukçuluk yapan başka bir kültür bitkisi daha bulunmamaktadır (Martelli, 2014).

Asma yaprak kıvrılma virüs hastalığı, kırmızı üzüm çeşitlerinde iklim ve coğrafi bölgeye göre değişmekle birlikte ilkbahar veya yazın sonlarına doğru alt yapraklarda kırmızımsı benek oluşumuna neden olmaktadır. Bu benekler zamanla genişlemekte ve birbirleriyle birleşmektedir; sonbaharda yaprak yüzeyinin büyük bir kısmı kırmızı hale gelmektedir ve bu kırmızı alan genellikle birinci ve ikinci damarlar boyunca oluşan dar bir yeşil bant ile birbirinden ayrılmaktadır. Çok şiddetli enfeksiyonlarda ise yaprak yüzeyi koyu mor bir renk almaktadır. Meyvelerin verim ve kalitesi düşük olup genellikle geç ve düzensiz bir şekilde olgunlaşmakta ve şeker içerikleri düşmektedir. Beyaz üzüm çeşitlerinde de ortaya çıkan belirtiler benzerdir; fakat yapraklar kırmızımsı yerine klorotik sarımtıraktır. Enfekteli asmalar birçok tipte, oldukça farklı görünümde yaprak kıvrılma belirtisi oluşturabilmektedir. Enfekteli bitkilerde gelişmiş yapraklar kalın, kırılabilir bir hal almakta ve aşağı doğru kıvrılmaktadır. Bu belirtiler, gövdenin ucuna doğru sezon ilerledikçe gelişim göstermektedir (Martelli ve Boudon-Padieu, 2006).

Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili olan virüslerin tümü asmaların floem dokularında bulunmakta ve bu virüslerin uzak alanlara yayılması öncelikli olarak üretim materyalleri ile gerçekleşmektedir. GLRaV-2, GLRaV-7 ve GLRaV-Car haricindeki asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin belirli bir alan

içerisinde yayımları ise *Pseudococcidae* ve *Coccidae* familyasına ait bazı türler ile kısmen de *Cuscuta* spp. aracılığıyla olmaktadır (Martelli, 2014).

Bağların en önemli virüs hastalıklarından birisi olarak kabul edilen ve üzüm verimini %14-40 oranında azaltan, asmanın beslenme, aşı potansiyeli ve gücünü olumsuz olarak etkileyen asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili farklı virüsler dünyada bağcılık yapan tüm ülkelerden bildirilmiştir (Martelli, 2014). Günümüze kadar rapor edilen asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin sayısı (Bkz. Çizelge 1.3) göz önünde bulundurulduğunda odunsu bitkiler içerisinde bugüne kadar aynı tipte ancak farklı virüsler tarafından neden olunan bir hastalık ile karşılaşılmamıştır (Martelli et al., 2012).

Günümüze kadar dünyada rapor edilen asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin bulunuşlarıyla ilgili olarak yapılan çalışmalar incelendiğinde ilk çalışmanın 1984 yılında İsviçre’de yapıldığı, bu çalışma ile yaprak kıvrılma hastalığı görülen asma yapraklarından 2200 nm (Tip 1) ve 1800 nm (Tip 2) uzunluğunda *Closterovirus* benzeri partiküllerin elde edildiği ve ELISA çalışmalarında kullanılmak üzere poliklonal antiserum üretilerek GLRaV-1’in asma örneklerinde tespit edildiği bildirilmiştir (Gugerli et al., 1984; Martelli’den, 2014).

GLRaV-2 ile ilgili olarak gerçekleştirilen çalışmada ise etmenin örtü proteininin moleküler ağırlığının 26 kDa olduğu ve elde edilen antiserum ile asma örneklerinde GLRaV-2’nin saptandığı bildirilmiştir (Zimmermann et al., 1990). Asma yaprak kıvrılma hastalığının sitopatolojisi üzerine yapılan bir çalışmada ise serolojik çalışmalarla ilişkili *Closterovirus* benzeri partiküllerin elde edildiği rapor edilmiştir. Ayrıca araştırmacılar New York izolatına karşı elde ettikleri antiserumun asma örneklerinde GLRaV-3’e karşı da reaksiyon verdiğini tespit etmişler ve GLRaV-3’ü asma örneklerinde saptamışlardır (Zee et al., 1987; Martelli’den, 2014).

Monoklonal antibodyler kullanılarak yapılan bir çalışmada ise asmalarda yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili *Closterovirus* benzeri partiküllerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiş ve GLRaV-4 rapor edilmiştir (Hu et al., 1990a; Martelli’den, 2014).

Fransa’da gerçekleştirilen bir çalışmada ise asma yaprak kıvrılma virüs hastalığı ile ilişkili Closterovirüslerin ileri karakterizasyonu yapılmış ve GLRaV-5

bildirilmiştir. Araştırmacılar ayrıca asmalarda GLRaV-1, -2, -3'ün yaygın olarak görüldüğünü ancak GLRaV-5'in yoğunluğunun düşük olduğunu, bazı asmaların indekisleme sonuçlarının pozitif olmasına karşın hiçbir antiseruma karşı reaksiyon göstermediklerini, bu durumun hastalıkla ilişkili başka virüslerin de olabileceğinin bir göstergesi olduğunu belirtmişlerdir (Walter and Zimmermann, 1991; Martelli'den 2014).

GLRaV-6 ile ilgili olarak ise etmenin serolojik karakterizasyonunu yapılmış ve GLRaV-6'nın tanısı için monoklonal antibody üretimi gerçekleştirip GLRaV-6 asma örneklerinde belirlenmiştir (Gugerli et al., 1997; Martelli'den 2014).

Yapılan başka bir çalışmada ise asmada mekanik olarak taşınmayan GLRaV-7 saptanmıştır. Araştırmacılar, bu virüsün diğer *Closterovirus*'lerin antiserumlarıyla reaksiyona girmediğini, virüsün kapsid protein alt ünite moleküler ağırlığının yaklaşık olarak 37 kDa, dsRNA bantlarının ise 19,5 kbp olduğunu bildirmişlerdir (Choueiri et al., 1996).

Grapevine leafroll-associated virus-8 (GLRaV-8) ile ilgili olarak ise Monis (2000), yaptığı bir çalışmayla 37-kDa büyüklüğünde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili yeni bir virüs proteini bulunduğunu bu yeni virüse ait kılıf proteininin GLRaV-8'e ait olduğunu bildirmiştir.

Alkowni et al. (2004), asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin tanısı için uygulanan RT-PCR ve DAS-ELISA testleri ile saptanamayan yeni bir virüse ait elde ettikleri dsRNA profilleri ve HSP70h genine ait gerçekleştirdikleri genomik ve filogenetik karakterizasyonlar sonucunda bu yeni virüsün *Ampelovirus* cinsine ait olan GLRaV-9 olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca tasarladıkları spesifik primerleri kullanarak RT-PCR yöntemiyle virüsü asma örneklerinde saptamışlardır.

Yunanistan'da gerçekleştirilen bir çalışmada ise Maliogka et al. (2008a), gerçekleştirdikleri genomik ve filogenetik analizler sonucunda *Ampelovirus* cinsi içerisinde yer alan asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili diğer virüslerin farklı gen bölgelerine ait amino asit dizilerinden %10'un üzerinde farklılık gösterdiğini belirledikleri GLRaV-Pr ve GLRaV-De virüslerini rapor etmişlerdir.

Hastalıkla ilişkili son bildirilen virüs etmeni olan GLRaV-Car ise Kaliforniya'dan rapor edilmiş olup *Ampelovirus* cinsinden amino asit düzeyinde %30 farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 2010).

2.2 Simptomatolojiye Dayalı Çalışmalar

Simptomatoloji, hastalık etmenlerinin tanılanmasında ve karakterizasyonunda önemli bir yere sahip olup özellikle tanı yöntemlerinin kullanılacağı zaman ve doku seçiminin belirlenmesi gibi konularda önemli ipuçları sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar, asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin genel olarak enfekte ettikleri asmalarda tipik birçok symptom göstermelerine rağmen grup içindeki bazı virüslere ve enfekte ettikleri bazı çeşitlere göre değişmekle birlikte latent enfeksiyonlara da neden olduğunu göstermektedir.

Asma yaprak kıvrılma virüs hastalığı symptomlarına çok benzeyen ve “rougeau” olarak adlandırılan bağ hastalığı ilk kez Fransa’da Ravaz and Roos (1905) tarafından bildirilmiştir. Daha sonra “rougeau” olarak adlandırılan bu hastalığın etmeninin GLRaVs olduğu belirlenmiştir.

Ülkemiz bağlarında simptomatolojik gözlemlere dayanan bir çalışmada Martelli (1987), GLRaVs, GFLV, rugose wood ve *Grapevine fleck virus* (GFkV) etmenlerinin varlığını ortaya koymuştur.

İzmir, Manisa ve Tekirdağ bağ alanlarında yürütülen bir çalışmada Azeri (1990), simptomatolojik gözlemler ve biyolojik indeksleme çalışmaları sonucunda başta Gamay olmak üzere Emperor, Tokay, Alphonse, Papaz karası, Semillion gibi yerli ve yabancı çeşitlerde GLRaVs’in %45-85 arasında değişen oranlarda yaygın olduğunu, meyve verim ve kalitesi üzerine olumsuz yönde etki gösterdiğini, çekirdeksiz üzüm ve Amerikan anaçlarında asma yaprak kıvrılma virüs hastalığının tipik belirtilerine rastlanılmamasına rağmen virüsün bu çeşitlerde de bulunduğunu biyolojik indeksleme testleriyle tespit ettiğini bildirmiştir.

Asma yaprak kıvrılma virüs hastalığının Emperor çeşidinde gösterdiği belirtiler üzerine gerçekleştirilen bir çalışmada Krake (1993), enfekteli omcaların sağlıklılara göre meyvelerdeki şeker içeriğinin ciddi bir şekilde düştüğünü, meyve olgunlaşmasının geciktiğini ve meyve renginin tam olarak oluşmadığını bildirmiştir. Ayrıca asma yaprak kıvrılma virüs hastalığının yapraklarda kırmızı ve/veya yeşil damar oluşumu ile damarlar arasında nekroz oluşumu gibi çeşide, enfekte eden virüse ve bunların kombinasyonlarına göre farklı belirtiler gösterebileceğini belirtmiştir.

Karaman, Konya ve Nevşehir illeri bağ alanlarında yapılan bir çalışmada Akbaş ve Erdiller (1998), ilkbahar sonlarında asma yapraklarında aşağı doğru kıvrılmalar ile renk değişiklikleri gördüklerini, eylül ayı başından itibaren ise renkli üzüm çeşitlerinde yaprak damarları arasında kırmızımsı renk oluşumları gözlemlediklerini, ancak yaprak damarlarının yeşil olarak kaldığını ve yaprakların aşağıya doğru kıvrıldığını bildirmişlerdir. Beyaz üzüm çeşitlerinde ise yapraklarda beyazımsı sarı renk değişimi ile birlikte aşağı doğru kıvrılmaların daha şiddetli olduğunu bu belirtileri gösteren asmalarda gelişme geriliği de tespit ettiklerini, bu semptomlara Avrupa Nepovirüslerinin ve asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin neden olabileceğini belirtmişlerdir.

Asma yaprak kıvrılma virüs hastalığının bazı şaraplık çeşitlerde oluşturduğu belirtiler üzerine yapılan bir çalışmada ise Naidu et al. (2008), *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir, *Vitis vinifera* cv. Cabernet Franc gibi bazı kırmızı ve Chardonnay gibi bazı beyaz üzüm çeşitlerinde hasat döneminde yapraklarda tipik bir şekilde aşağı doğru kıvrılma belirtisi görüldüğünü, diğer bazı çeşitlerde ise bu belirtilerin çok belirgin olarak görülmediğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, asma yaprak kıvrılma virüs hastalığı semptomlarının çeşitlerde, hatta aynı çeşit içerisinde bile yüksek derecede farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir. Nitekim asma yaprak kıvrılma virüs hastalığının semptomlarını taşıyan kırmızı üzüm çeşitlerinde gerçekleştirilen başka bir çalışmada Al Rwahnih et al. (2015), söz konusu belirtilerin görüldüğü asmalarda GRSPaV enfeksiyonunun oldukça yüksek oranda (%89) tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Asma yaprak kıvrılma virüs hastalığı ve *Grapevine red blotch-associated virus* (GRBaV)'ün asmalarda gösterdiği belirtiler üzerine yapılan bir çalışmada ise Naidu et al. (2015a), asma yaprak kıvrılma virüs hastalığının kırmızı üzüm çeşitlerinde yapraklardaki tipik belirtilerinin yaprak damarlarının yeşil olarak kalması, damarlar arasının kızarması ve yaprağın aşağı doğru kıvrılması şeklinde olduğunu; GRBaV için ise ana damarların kızarması ve yaprak ayasında düzensiz kırmızı lekeler şeklinde olduğunu belirtmişlerdir. Ancak hastalıklara ait farklı tipte olan bu belirtilere karşın enfekteli beyaz üzüm çeşitlerinin hiçbirinde ve birçok kırmızı üzüm çeşidinde bu belirtilere rastlamadıklarını dolayısıyla bu virüslerin teşhisinin sadece semptomatolojiye dayalı olarak yapmanın zor olduğunu vurgulamışlardır.

GLRaV-2 ile enfekteli Gamay çeşidinde yürütülen bir çalışmada Gugerli and Ramel (1993), yapraklarda ortaya çıkan kızarıklığın GLRaV-1 ve GLRaV-3'ten

farklı olarak tüm yaprak ayasını kapladığını bildirmişlerdir. İtalya'dan elde edilen farklı GLRaV-2 izolatlarıyla gerçekleştirilen bir çalışmada Bertazzon et al. (2010), GLRaV-2 BD izolatının arazideki hastalık simptomlarını değerlendirdiklerinde ABD'den elde edilen GLRaV-2 PN ve Kaliforniya'dan elde edilen GLRaV-2 RG izolatlarından farklı olarak aşı uyumsuzluğuna neden olmadığını ve nadiren asma yaprak kıvrılma virüs hastalığı simptomlarını gösterdiğini dolayısıyla GLRaV-2 BD izolatının GLRaV-2'nin ılımlı bir strain'i olabileceğini belirtmişlerdir.

ABD'de şaraplık bir çeşit olarak kullanılan Sangiovese çeşidinden elde edilen farklı GLRaV-2 izolatlarıyla yapılan başka bir çalışmada ise Poojari et al. (2013), GLRaV-2'nin strain'i olan GLRaV-2-SG'nin bu çeşide ait enfekteli asmalarda belirti göstermediğini dolayısıyla enfeksiyonun meyve verim ve kalitesi üzerinde önemli bir etkisinin olmayacağını bildirmişlerdir. Ayrıca asma yaprak kıvrılma virüs hastalığının arazide tanısı için görsel simptomların tek başına yeterli olmayacağını, GLRaV-2 SG'nin belirti göstermemesinden dolayı üretim materyalleriyle kolaylıkla yayılabileceğini, bunun önüne geçebilmek için üretim yapılan fidanlıkların özenle test edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır. Benzer bir şekilde ABD'de yerel çeşitlerden Muscadine ve Summer'da gerçekleştirilen bir çalışmada ise Abou Ghanem-Sabanadzovic and Sabanadzovic (2015), GLRaV-2 ile enfekteli olarak tespit ettikleri örneklerin asma yaprak kıvrılma virüs hastalığı simptomlarını göstermediğini bildirmişlerdir.

2.3 Biyolojik İndeksleme Çalışmaları

Biyolojik indeksleme virüs hastalıklarının tanısında kullanılan en eski ve en temel yöntemlerden birisi olup virüslerle ilgili epidemiyolojik çalışmalar açısından büyük önem taşımaktadır. Günümüzde daha çok yeni ortaya çıkan virüslerin temel özelliklerini belirleyebilmek, taşınma durumlarını ortaya çıkarabilmek ve ileri düzey çalışmalar için virüsü saf ve yüksek konsantrasyonlarda çoğaltıp geri kazanabilmek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır.

Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin tümü aşı ile taşınabilmekte ve söz konusu virüslerin çoğu Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Pinot Noir, Merlot, LN 33 gibi indikatörler üzerinde genel olarak hastalığın tipik simptomlarını göstermektedir (Martelli, 1993; Krake et al., 1999; Martelli, 2014). İndeksleme çalışmaları enfekteli kaynaklardaki virüslerin sayısı ve serotipi hakkında bilgi vermemekte, sadece sağlıklı ve hastalıklı materyallerin ayırt edilmesine yardımcı olmaktadır (Martelli, 1993, 2014).

Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler içerisinde GLRaV-2 şimdiye kadar mekanik inokulasyon yoluyla otsu bitkilere taşınabilen tek Closterovirüs'tür (Rosciiglione and Gugerli, 1989; Monette and Godkin, 1993; Boscia et al., 1995; Castellano et al., 1995; Goszczynski et al., 1996; Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 1997; Martelli, 2014). Yunanistan'dan rapor edilen GLRaV-De ve GLRAV-Pr virüslerinin ise otsu indikatörlere taşınma ve odunsu indikatörlerde simptom oluşturma durumları bilinmemektedir.

Asma yaprak kıvrılma virüs hastalığı ile enfekteli omcalarda farklı otsu indikatörler kullanılarak gerçekleştirilen mekanik inokulasyon çalışmasında Monette et al. (1990), topladıkları örnekleri *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana glutinosa*, *Gomphrena globosa*, *Chenopodium amanticolor* ve *Chenopodium quinoa*'ya inokule etmişlerdir. İndikatörlerden sadece *N. benthamiana*'da yaprak damarlarında renk açılması ve küçülme, yaprak yüzeyinde damarlar arası alanda sararma ve damar bantlaşması belirtilerini gözlemlemişlerdir. İnokulasyonu beş kez tekrarlamışlar; 1. ve 2. inokulasyonda iki bitkide, 3. ve 4. inokulasyonda bir bitkide belirti ortaya çıkarken 5. inokulasyonda ise hiçbir bitkide belirti görmediklerini bildirmişlerdir.

Grapevine virus A (GVA), GLRaV-3, GLRaV-1, GLRaV-2, *Grapevine virus B* (GVB) ve GFkV virüsleri ile enfekteli asma örneklerinde gerçekleştirilen bir mekanik inokulasyon çalışmasında ise Ahmed et al. (2004), 300 asma örneğini *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *Cucumis sativus*, *N. benthamiana*, *Nicotiana cavicola*, *N. clevelandii* ve *Nicotiana occidentalis*'e inokule etmişler ancak indikatör bitkilerin hiçbirinde belirti tespit edemediklerini bildirmişlerdir.

GVA, GLRaV-1, GFkV, GLRaV-3, GLRaV-2, GFLV ve *Arabis mosaic virus* (ArMV) ile enfekteli asma örnekleri kullanılarak gerçekleştirilen başka bir mekanik inokulasyon çalışmasında Mslmanieh et al. (2006), enfekteli asma örneklerini *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *C. sativus*, *N. benthamiana*, *N. cavicola*, *N. clevelandii*, *N. occidentalis*, *Nicotiana tabacum*'a inokule etmişlerdir. İnokulasyon sonucunda *N. benthamiana*, *N. occidentalis* ve *C. quinoa*'da belirti gördüklerini ancak bu indikatörlerde gerçekleştirdikleri DAS-ELISA testleri sonucunda sadece GFLV, ArMV ve GVA virüslerini tespit ettiklerini belirtmişlerdir.

GLRaV-2'nin otsu indikatörlere mekanik inokulasyonuyla ilgili gerçekleştirilen bir çalışmada Hu et al. (1990b), GLRaV-2'nin *N. occidentalis* ve *N. benthamiana*'ya mekanik olarak taşındığını, *N. occidentalis*'in inokule edilen

yapraklarında nekrotik lokal lezyonlar ve kıvrılmalar, yeni oluşan genç yapraklarda ise sararma ve mozaik belirtilerin görüldüğünü; *N. benthamiana*'da ise yapraklarda hafif şiddette sararma belirtilerinin ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Ayrıca *Vinca rosea*, *Datura stramonium*, *G. globosa*, *Cucurbita maxima* ve *C. sativus* indikatörlerinde ise semptom göremediklerini belirtmişlerdir.

Kuzey Amerika'da GLRaV-2 varyantları ile yapılan bir çalışmada Abou Ghanem-Sabanadzovic et al. (2000), *Vitis rupestris*'den elde ettikleri GLRaV-2'nin H4 varyantı (GLRaV-2-H4) ile Semillion izolatını (GLRaV-2-Sem) mekanik inokulasyon ile *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. occidentalis*, *N. tabacum*, *C. amanticolor* ve *C. quinoa* indikatörlerine inokule etmişlerdir. GLRaV-2-Sem izolatının sadece *N. benthamiana*'da sistemik damar açılması ve yapraklarda kıvrılma belirtisi gösterirken GLRaV-2-H4'ün bunun yanında *N. occidentalis*'te yapraklarda klorotik, nekrotik lokal lezyonlar ve şiddetli damar açılması, apikal nekrozlar ve bitkinin ölümüne neden olduğunu; *N. clevelandii*'de ise yapraklarda lokal nekrotik lezyonlara yol açtığını bildirmişlerdir. Ayrıca enfekteli *N. clevelandii*'den *N. benthamiana*'ya yaptıkları geri inokulasyon sonucunda latent sistemik enfeksiyon oluşumunu tespit etmişlerdir.

GLRaV-2'nin otsu indikatörlerden *N. benthamiana*'ya mekanik inokulasyonuyla ilgili gerçekleştirilen diğer çalışmalarda ise Castellano et al. (1995), yapraklarda damar açılması belirtilerini gözlemlediklerini, Goszcynski et al. (1996) ise damar açılması semptomlarıyla birlikte yapraklarda nekrotik lekelerin de oluştuğunu bildirirken Voncina et al. (2010) ise inokulasyonunu gerçekleştirdikleri 16 izolatta herhangi bir semptomun ortaya çıkmadığını belirtmişlerdir.

Asmalarda yaprak kıvrılma virüs hastalığının odunsu indikatörler kullanılarak biyolojik indekslenmesi üzerine ülkemizde yapılan ilk çalışmada Tekinel vd. (1971), Kilis bağlarında Alicante Bouschet çeşidinde yaprak kıvrılması ve damar bantlaşması semptomlarını rapor etmişlerdir. İzmir ve Manisa bağ alanlarında gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise Azeri and Fidan (1988), GLRaVs ve GFLV virüslerinin varlığını ortaya koymuşlardır.

Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü damızlık çeşit ve anaç parsellerinde gerçekleştirilen bir çalışmada ise Azeri ve Çiçek (1995), asma yaprak kıvrılma virüs hastalığının ve GFLV'nin varlığını bildirmişlerdir.

Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin odunsu indikatörler üzerinde gösterdiği belirtilerle ilgili yapılan çalışmalarda Teliz et al. (1987) ve Martelli (1993), hastalığın karakteristik belirtileri olan yapraklarda geriye doğru kıvrılmalar ve kızarmaların farklı yoğunluklarda ve şiddette ortaya çıktığını bildirmişlerdir.

Farklı odunsu indikatörler kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda Kim et. al. (2002), GLRaV-3 ve GFLV izolatlarını LN33, *Vitis rupestris* St. George, Kober 5BB, Cabernet Franc, 110R, ve *V. riparia* Gloire indikatörlerine göz aşısıyla inokule etmişlerdir. GLRaV-3 için belirtilerin inokulasyondan 2 ay sonra ortaya çıkmaya başladığını ancak tipik belirtilerin genç ve yaşlı yapraklarda bir sonraki yıl görüldüğünü bildirmişlerdir. Yapraklarda kızarma ve kıvrılma belirtilerinin ağustos ayında alt yapraklarda görülmeye başladığını sonra yoğunlaşarak üst yapraklara doğru ilerlediğini belirtmişlerdir. GLRaV-3 inokulasyonu sonucunda Cabernet Franc, 110 R ve St. George indikatörlerinde simptom tespit edemediklerini; LN33 indikatöründe, yapraklarda kıvrılma ve kızarma; Kober 5BB indikatöründe ise yapraklarda mozaik belirtiler tespit ettiklerini en şiddetli belirtilerin LN33 indikatöründe gözlemlediklerini vurgulamışlardır. Buna karşın GLRaV-3'ün biyolojik indekslemesiyle ilgili yapılan başka bir çalışmada Pathirana and McKenzie (2005), GLRaV-3 için Cabernet Sauvignon'un LN33'den daha duyarlı bir indikatör olduğunu bildirmişlerdir.

Karaman, Konya ve Nevşehir illeri bağ alanlarında asma yaprak kıvrılma virüs hastalığının tanısı amacıyla Cabernet Franc ve Cabernet Sauvignon indikatörleri kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada Akbaş ve Erdiller (1998), indikatörlerde yaprak damar aralarında kırmızı renk değişimi ile birlikte yapraklarda aşağı doğru kıvrılmaların aşılamaadan 50-75 gün sonra görülmeye başladığını, aşılamanın ilerleyen günlerinde bu belirtilerin daha şiddetli ortaya çıktığını bildirmişlerdir.

Cabernet Franc ve Cabernet Sauvignon indikatörleri kullanılarak gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise Rowhani et al. (2005), GLRaV-2 ile serolojik olarak ilişkili olan RG varyantının standart indikatörlerde herhangi bir belirti göstermediğini, bu belirtileri asma anaçlarında gösterdiğini, buna karşın GLRaV-2'nin ise bu iki standart indikatörde belirti gösterdiğini ancak anaçlarda latent halde bulunduğunu bildirmişlerdir.

İsviçre bağ alanlarında gerçekleştirilen bir çalışmada Reynard et al. (2015), GLRaV-4'ün farklı bir strain'i olan GLRaV-4 Ob'nin Gamay indikatörü üzerinde asma yaprak kıvrılma virüs hastalığının tipik semptomlarına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Cabernet Franc indikatörü kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda Rowhani et al. (1997), GLRaV-1, 2, 3 ve 4 ile enfekteli asmalardan alınan örneklerin indikatörler üzerinde oluşturduğu belirtileri DAS-ELISA testleri ile doğrulamışlardır. ELISA testi ile biyolojik indeksleme sonuçları arasında yüksek bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir.

GLRaV-9 ile ilgili yapılan bir çalışmada Alkowni et al. (2004), virüsün indikatör üzerinde asma yaprak kıvrılma virüs hastalığının tipik semptomları olan yaprak ayasında damarlar arası bölgenin kızarması şeklinde belirtiler oluşturduğunu bildirmişlerdir. Naidu et al. (2014) ise bu indikatörün asma yaprak kıvrılma virüs hastalığının indekslenmesinde en çok kullanılan odunsu indikatör olduğunu ve indikatörlerde gözlemledikleri hastalık semptomlarının yaprak ayası üzerinde damarlar arasındaki alanların kızarması, ana damarların yeşil olarak kalması ve yaprakların aşağı doğru kıvrılması şeklinde görüldüğünü belirtmişlerdir. Ayrıca GLRaV-2'nin bazı strain'lerinin ve GLRaV-7'nin belirti göstermemesinin biyolojik indekslemenin güvenilirliğini sınırladığını bildirmişlerdir.

Gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise Al Rwahnih et al. (2012), GLRaV-7'nin asmalarda semptom göstermediğini yaptığı indekslemelerle doğrulamışlar ve belirti göstermeyen indikatörler üzerinde GLRaV-7'yi RT-PCR ile başarılı bir şekilde tespit ettiklerini bildirmişlerdir. GLRaV-7'nin asmalarda semptom göstermemesinden dolayı şaraplık, kurutmalık ve sofralık üzüm plantasyonlarında bulunma ihtimalinin yüksek olabileceğini belirtmişlerdir. Kaliforniya'da gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise Abou Ghanem-Sabanadzovic et al. (2010), *Vitis vinifera* cv. Canelian'dan elde ettikleri asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili yeni bir virüsün (GLRaV-Car) indikatörler üzerinde hafif şiddette belirtilere neden olduğunu bildirmişlerdir.

Pinot Noir indikatörü kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda Zimmermann et al. (1990), GLRaV-1, -2, -3 ve 4 antiserumlarıyla yaptıkları ELISA testleri sonucunda asma yaprak kıvrılma virüs hastalığının tipik belirtilerini gösteren indikatörlerin %95'ini asma yaprak kıvrılma virüs hastalığı ile enfekteli olarak bulduklarını; enfeksiyonların %70'inin tek virüs, %24'ünün iki virüs ve %2,5'unun

ise üç virüs tarafından meydana geldiğini bildirmişlerdir. İndikatör bitkiler üzerinde belirti veren ancak ELISA testleri sonucunda pozitif sonuç elde edemedikleri indikatörleri elektron mikroskobu çalışmalarına almışlar ve bu bitkilerin üç tanesinde *Closterovirus* benzeri partikülleri tespit etmişlerdir. Yürütülen başka bir çalışmada ise Akbaş and Erdiller (1993), asma yaprak kıvrılma virüs hastalığının inokulasyonundan sonra yaprakların kızardığını ve kıvrıldığını ancak ana damarların yeşil olarak kaldığını bildirmişlerdir.

2.4 Sörvey ve Yaygınlık Oranı ile İlgili Çalışmalar

Bağcılık yapılan ülkelerin çoğunda bağ virüsleriyle ilgili oldukça fazla sayıda sörvey çalışması gerçekleştirilmiştir. Dünyada bağcılık yapılan farklı ülkelere yürütülen çalışmalarda asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin ve diğer bağ virüslerinin değişen oranlarda saptandığı bildirilmiş olup genel olarak asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin yaygınlık oranının oldukça yüksek olduğu göze çarpmaktadır.

Ülkemizde ise asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler açısından yapılan çalışmalar incelendiğinde araştırmaların farklı coğrafi bölgelerde yer alan; Edirne, Tekirdağ, Çanakkale, Yalova, İzmir, Manisa, Denizli, Isparta, Ankara, Konya, Karaman, Aksaray, Kırşehir, Nevşehir, Çorum, Yozgat, Adana, Kahramanmaraş, Gaziantep, Adıyaman, Elazığ, Şanlıurfa, Diyarbakır ve Mardin illeri bağ alanlarında yoğunlaştığı görülmektedir. Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerden GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-6 ve GLRaV-7'nin illere göre değişmekle birlikte farklı yaygınlık oranlarıyla ülkemiz bağlarında bulunduğu farklı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir. Ülkemizde rapor edilen söz konusu virüsler içerisinde, GLRaV-1 ve GLRaV-3 Avrupa ve Akdeniz'e kıyasla olan birçok ülkede de yaygın bir şekilde tespit edilmiştir (Martelli, 1986). Ülkemizde, yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili GLRaV-9, GLRaV-Pr, GLRaV-De ve GLRaV-Car virüsleri açısından ise günümüze kadar herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

Tekirdağ, Yalova ve Manisa bağ alanlarında gerçekleştirilen bir çalışmada Gürsoy (1991), DAS-ELISA testi ile GLRaV-1 ve GLRaV-3'ü klon adaylarının bazı omcalarında belirlediğini bildirmiştir.

Kahramanmaraş bağ alanlarında gerçekleştirilen bir çalışmada Özaslan vd. (1991), 70 asma örneğine uyguladıkları DAS-ELISA testleri sonucunda GLRaV-3

(%31), GLRaV-1 (%28,6), çeşitli nepovirüsler (%25), GFLV (%18,6) ve GFkV (%7,1)'yi belirtilen oranlarda tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi bağ alanlarında yürütülen bir çalışmada ise Özaslan ve Yılmaz (1995), biyolojik ve serolojik yöntemleri kullanarak yaptıkları testler sonucunda GFLV (%24)'nin en yaygın virüs olduğunu ve bunu sırasıyla GLRaV-3 (%17,5), GLRaV-1 (%12,5), GFkV (%7,5) ve ArMV (%6,5) virüslerinin izlediğini bildirmişlerdir.

Çukuruva bölgesi bağ alanlarında gerçekleştirilen bir çalışmada Özaslan (1998), topladıkları 60 asma örneğinden dördünün GVA, 15'inin ise GLRaV-3 ile enfekteli olduğunu bildirmiştir. Yaptığı çalışmayla belirtilen virüslerin ortalama olarak %37,88 civarında verim kaybına neden olduğu tespit etmiştir. Ayrıca eski çeşitlerde verim kaybının yeni çeşitlere oranla daha az olduğu, buna karşın virüsle enfekteli yerel çeşitlerde tane tutumunun bölgeye yeni getirilen çeşitlere oranla daha az olduğunu bildirmiştir. Ayrıca Gaziantep ve Kilis bağ alanlarında daha önce yapılan çalışmalarda *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV), GFLV, GLRaV-1 ve GLRaV-3, ArMV ve GFkV'nin serolojik ve biyolojik indekslemelerle saptandığını belirtmiştir.

Türkiye'nin çeşitli bölgelerine ait bağ alanlarında gerçekleştirilen bir çalışmada ise Yılmaz et al. (1997), topladıkları 84 asma örneğine uyguladıkları ELISA testleri sonucunda GLRaV-1 (%40), GLRaV-3 (%21) ve GLRaV-7 (%6)'yi belirtilen oranlarda saptadıklarını bildirmişlerdir.

Karaman, Konya ve Nevşehir bağ alanlarında Akbaş ve Erdiller (1998), topladıkları 344 asma örneğinde gerçekleştirdikleri DAS-ELISA testleri sonucunda örneklerin 247 (%71,2)'sinin enfekteli olduğunu belirlemişlerdir. GFLV (%39,5)'nin en yaygın virüs olduğunu, bunu *Tomato black ring virus* (TBRV) (%37), GLRaVs (%33), ArMV (%24,4), SLRSV (%15) ve %4'lük bulunma durumu ile *Raspberry ringspot virus* (RpRSV)'ün izlediğini bildirmişlerdir.

İç Anadolu Bölgesi bağ alanlarında gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise Akbaş et al. (2007), DAS-ELISA ile 41 çeşitten 21'ini ve 622 örnekten 95'ini en az bir virüsle enfekteli olarak bulmuşlardır. GLRaV-1 (%8,36)'in en yaygın virüs olduğunu bunu GLRaV-3 (%5,78), GLRaV-7 (%3,86) ve GLRaV-2 (%2,41)'nin izlediğini bildirmişlerdir.

Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nin bağ alanlarını oluşturan Şanlıurfa, Mardin, Diyarbakır, Adıyaman ve Elazığ illerinde yürütülen bir çalışmada Çığır ve Yılmaz (1998), topladıkları asma örneklerine uyguladıkları DAS-ELISA testleri sonucunda GLRaV-1 (%30,7)'in en yaygın virüs hastalığı olduğunu, bunu sırasıyla GVA (%18,5), ArMV (%7,7), GLRaV-3 (%7), GFLV (%7) ve GFkV (%6,1)'nin izlediğini, GLRaV-2'yi ise tespit edemediklerini bildirmişlerdir.

Adıyaman, Diyarbakır, Elazığ, Mardin, Şanlıurfa ve Nevşehir bağ alanlarında gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise Çığır (2002), asma örneklerine uygulanan DAS-ELISA testleri sonucunda en yaygın virüsün GVA (%41,2) olduğunu, bunu GLRaV-1 (%38,1), GFLV (%8,1) ve GFkV (%5,4)'nin izlediğini bildirmiştir. Gaziantep bağ alanlarında Sarpkaya (2003), tarafından yürütülen başka bir çalışmada ise DAS-ELISA ile asma örneklerinde GLRaV-3 (%30) en yaygın virüs olarak tespit edilmiş, bunu GFLV (%24), ArMV (%15), GLRaV-1 (%10)'in belirtilen oranlarda izlediği bildirilmiştir.

Güneydoğu Anadolu ve Orta Anadolu'nun başlıca bağ alanlarında gerçekleştirilen başka bir çalışmada Digiaro et al. (2000), DAS-ELISA ile GVA'nın en yaygın virüs olduğunu ve bunu GLRaV-1, GFLV ve GFkV'nin takip ettiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca GLRaV-2, GLRaV-3 ve GLRaV-6 enfeksiyonlarının da diğerlerine göre az olmakla birlikte mevcut olduğunu belirtmişlerdir. Buzkan et al. (2010b) ise Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde bulunan Adıyaman, Gaziantep, Şanlıurfa ve Diyarbakır illeri bağ alanlarından topladıkları 31 asma ve 19 unlubit (*Planococcus ficus*) örneğini RT-PCR ile GLRaV-5 açısından testlemişlerdir. Test sonucunda beş unlubit ve beş asma örneğinde GLRaV-5'i saptadıklarını ve GLRaV-5'in Türkiye için ilk kayıt niteliğinde olduğunu bildirmişlerdir.

Trakya bölgesi bağ alanlarında Köklü (1999), topladığı 421 asma örneğinde GLRaV-1'i en yaygın virüs (%37,05) olarak saptamış, bunu GLRaV-3 (%33,01), GLRaV-2 (%7,83) ve GLRaV-7 (%4,03)'nin izlediğini; GVA, ArMV, GFkV ve GFLV virüslerini de belirlediğini bildirmiştir. Ayrıca GLRaV-2'nin örtü proteininin alt ünite moleküler ağırlığını 21,5-22 kDa arasında, GVA'nın alt ünite moleküler ağırlığını ise 22 kDa olarak bulmuştur. Elektron mikroskobu çalışmaları sonucunda GLRaV-3 ve GVA'nın partikül uzunluklarını sırasıyla 1800-2100 nm arasında ve 800 nm olarak tespit etmiştir. Ayrıca GLRaV-3 virüsü ile ilgili Köklü ve Baloğlu (2001a ve 2001b), bitki dokusundan virüsü saflaştırarak antiserum üretme çalışmaları yapmışlar ve GLRaV-3 için dsRNA analiz çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. ELISA ve *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon kullanılarak

gerçekleştirdikleri biyolojik indeksleme sonuçlarının birbirleriyle uyumlu olduğunu ve test edilen 30 bitkide en yaygın virüsün GLRaV-3 olduğunu bildirmişlerdir.

Mısır'ın bağ alanlarında gerçekleştirdikleri çalışmada Ahmed et al. (2004), 664'ü çeşit, 116'sı anaç olmak üzere toplam 780 asma örneğini DAS-ELISA ile GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GVB, GFkV ve GFLV etmenleri açısından test etmişlerdir. Çeşitlerden alınan 664 örneğin %29'unu bir; %49'unu ise birden fazla virüsle enfekteli olarak bulmuşlardır. ELISA testi sonucunda çeşitlerde GVA (%67,9), GLRaV-3 (%55,9), GLRaV-1 (%1,8), GLRaV-2 (%1,4), GVB (%0,6), GFkV (%0,2), anaçlarda ise GLRaV-3 (%5,2), GVA (%5,2) ve GVB (% 0,9) virüslerini belirtilen oranlarda tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

İran bağ alanlarında yürütülen bir çalışmada Rakhshandehroo et al. (2005), 1552 asma örneğini DAS-ELISA ile GFLV, GFkV, GVA, ArMV, GLRaV-3, RpRSV ve *Tobacco ringspot virus* (TRSV)'ün varlığı açısından test etmişlerdir. DAS-ELISA testi sonucunda, GFLV (%11,1), GFkV (%8,6), GVA (%8,4), ArMV (%6,6), GLRaV-3 (%6,4), RpRSV (%2,8) ve TRSV (%0,35) virüslerini belirtilen oranlarda bulmuşlardır. GFLV ve GVA dışındaki virüslerin İran için ilk kayıt niteliğinde olduğunu bildirmişlerdir.

Suriye bağ alanlarında gerçekleştirilen bir çalışmada ise Mslmanieh et al. (2006), 835 asma örneğini GFLV, ArMV, GVA, GVB, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3 ve GFkV virüsleri için DAS-ELISA ile test etmişlerdir. Test sonucunda GVA (%54,7), GLRaV-1 (%47,3), GFkV (%29,8), GLRaV-3 (%23,9), GLRaV-2 (%9), GFLV (%0,8), ArMV (%0,1) virüslerini belirtilen oranlarda tespit etmişlerdir.

Şili bağ alanlarında gerçekleştirilen bir çalışmada Fiore et al. (2008), 2535 asma örneğini GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-7, GFkV, GVA, GVB, SLRSV, ToRSV ve ArMV için DAS-ELISA yöntemi ile GLRaV-2'nin RG varyantı, GRSPaV ve negatif ELISA sonuçlarını ise RT-PCR yöntemi ile test etmişlerdir. Test sonucunda GRSPaV (%24,15), GLRaV-2 (%16,05), GFkV (%14,99), GLRaV-2-RG (%11,1), GLRaV-3 (%6,41), GFLV (%6,36), GVA (%5,57), GLRaV-1 (%4,67), GVB (%0,78), GLRaV-7 (%0,26) virüslerini belirtilen oranlarda tespit etmişlerdir. Ayrıca GVB, GFkV, GRSPaV, GLRaV-2 RG ve GLRaV-7'nin Şili için ilk kayıt olduğunu bildirmişlerdir.

Hırvatistan bağ alanlarında yürütülen bir çalışmada ise Voncina et al. (2010), 1100 asma örneğini GLRaV-2 için ELISA yöntemiyle test etmişler ve 45 örneğin (%4,1) GLRaV-2 ile enfekteli olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları bu çalışma ile Hırvatistan'da GLRaV-2'yi ilk kez tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Kaliforniya bağ alanlarında yürütülen çalışmada Baraff (2011), asma yaprak kıvrılma virüs hastalığı belirtisi gösteren 548 asma örneğini GLRaV-1, -2, -3, -4, -5, -7 ve -9 açısından multiplex RT-PCR ile test etmiştir. Örneklerin %46'sının en az bir virüsle enfekteli olduğunu, karışık enfeksiyon oranının %5'in altında olduğunu, testlediği örneklerde GLRaV-3 (%46), GLRaV-2 (%34), GLRaV-1 (%11), GLRaV-9 (%2) 'u belirtilen oranlarda; GLRaV-7'yi ise sadece bir örnekte belirlediğini bildirmiştir. Kaliforniya'da yürütülen başka bir çalışmada Al Rwahnih et al. (2015), genetik koleksiyon parselinde testlemiş olduğu 70 asmanın 33'ünün GRSPaV (%41,4), GLRaV-1 (%37,1), GLRaV-2 ve GLRaV-3 (%32,9), GVA (%27,1), GLRaV-4 (%17,1), *Grapevine virus D* (GVD) (%14,3), GVB (%12,9), GFLV ve GFkV (%11,4), GLRaV-7 (%5,7), ToRSV (%1,4) etmenlerinden en az biri ile belirtilen oranlarda enfekteli olduğunu; enfekteli olduğu belirlenen örneklerde tekli (%6,1), ikili (%9,1), dörtlü (%6,1), beşli (%24,2), altılı (%21,2), yedili (%24,2) ve sekizli (%9,1) enfeksiyonların belirtilen oranlarda görüldüğünü bildirmiştir.

Washington bağ alanlarında gerçekleştirilen çalışmada ise Naidu et al. (2015a), GLRaV-3 ve GRBaV benzeri belirti gösteren asmalardan topladıkları toplam 546 örneği RT-PCR ile test etmişlerdir. Örneklerin %71'inin GLRaV-3, %29'unun GRBaV virüsü ile enfekteli olduğunu karışık enfeksiyon oranının ise %18 olduğunu bildirmişlerdir.

Virjinya bağ alanlarında gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise Jones et al. (2015), 415 asma örneğini GLRaV-2, GLRaV-3 ve GFkV virüsleri açısından RT-PCR ile test etmişlerdir. Test sonucunda GLRaV-2 (%8), GLRaV-3 (%25) ve GFkV (%1) virüslerini belirtilen oranlarda tespit etmişlerdir. Sörvey çalışmasını gerçekleştirdikleri 77 bağdan %64'ünün en az bir, %18'inin iki, %3'ünün ise üç virüsle de enfekteli olduğunu ve GLRaVs'in vektörleri olan *Pseudococcus maritimus* ve *Ferrisia gilli*'yi enfekteli bağlarda yoğun olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Batı Avustralya bağ alanlarında yürütülen bir çalışmada Peake et al. (2004), Cabernet Franc parselinden aldıkları on asma örneğinde gerçekleştirdikleri RT-

PCR çalışmaları sonucunda bir örnekte GLRaV-9'u saptadıklarını bildirmişlerdir. İtalya bağ alanlarında gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise Giampetruzzi et al. (2011), dokuz asma örneğinde gerçekleştirdikleri deep sequencing analizleri ile bazı örneklerle ait dizileme verileri içerisinde GLRaV-9 genomunu tespit etmişlerdir. Ayrıca spesifik primerler kullanarak gerçekleştirdikleri RT-PCR çalışmaları sonucunda da 9 örneğin beşinde GLRaV-9'u saptamışlardır.

İspanya bağ alanlarında gerçekleştirilen bir çalışmada ise Padilla et al. (2013), GLRaV-4-9 DAS-ELISA kiti ile enfekteli olarak belirledikleri örneklerde gerçekleştirdikleri Real-time RT-PCR çalışmaları ile GLRaV-9'u saptamışlardır. Araştırmacılar, her üç çalışmada da GLRaV-9'u belirtilen ülkeler için ilk kayıt olarak rapor etmişlerdir.

İspanya'nın Valencia bağ alanlarında yürüttükleri çalışmada Fiore et al. (2012), 127 asma örneğini GFLV, GLRaV-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, GVA, GVB, GVD, GFkV, GRSPaV, *Grapevine rupestris vein feathering virus* (GRVfV), ArMV, *Grapevine vein clearing virus* (GVCV), *Citrus exocortis viroid* (CEVd) ve *Grapevine yellow speckle viroid-1* (GYSVd-1) açısından RT-PCR ile test etmişlerdir. Örneklerin %69,3'ünü bir ya da birden fazla etmenle enfekteli olarak saptadıklarını, GRSPaV'nin %48,8 ile en yaygın virüs olduğunu; bunu GLRaV-2 (%15), GFkV (%10,2), GLRaV-3 (%8,7), GFLV (%7,9), GRVfV (%7,1), GYSVd-1 (%6,3), GLRaV-5 (%3,2), GVA (%3,2) ve GLRaV-4 (%0,8)'ün izlediğini bildirmişlerdir. Ayrıca GLRaV-4 ve GLRaV-5'i Valencia bölgesinde ilk defa tespit ettiklerini ve test ettikleri örneklerde tekli enfeksiyon oranının %37,8 olduğunu bunu sırasıyla ikili (% 20,5), üçlü (%7,9) dördü (%0,8) ve beşli (%0,8) enfeksiyonların izlediğini belirtmişlerdir.

İsviçre bağ alanlarında gerçekleştirilen bir çalışmada ise Reynard and Gugerli (2012b), 1800 asma örneğini GLRaV-1, 2, 3, 4, GFLV, ArMV, GFkV virüslerinin varlığı açısından DAS-ELISA ile GLRaV-7, GVA, GVB ve GRSPaV virüslerinin varlığı açısından ise RT-PCR ile test etmişlerdir. Lokasyon bazında virüslerin enfeksiyon oranlarını; GRSPaV (%100), GFkV (%97), GLRaV-2 (%72), GLRaV-3 (%67), GFLV (%57), GLRaV-1 (%37), GVB (%36), GLRaV-4 (%20), ArMV (%13), olarak tespit ettiklerini, GLRaV-7 ve GVA etmenlerine ise rastlamadıklarını bildirmişlerdir.

Ege Bölgesi'nde Manisa, Denizli ve İzmir illeri bağ alanlarında gerçekleştirilen bir çalışmada Buzkan vd. (2010a), topladıkları 146 asma örneği ile

unlubitt (*Planococcus ficus*)’lerde gerçekleştirdikleri RT-PCR çalışmalarıyla Manisa’da yedi, İzmir’de sekiz ve Denizli’de iki asma örneğinde ve unlubitlerde GLRaV-5’i saptadıklarını; GLRaV-5’in tespit edildiği bağların aynı zamanda unlubit istilasını altında olan bağlar olduğunu bildirmişlerdir. Manisa ve İzmir bağ alanlarında yürütülen başka bir çalışmada ise Kaya et al. (2012), asma örneklerinde GLRaV-4-9 DAS-ELISA kiti ile pozitif sonuç veren sekiz örneği, RT-PCR yöntemi ile GLRaV-4’e ait spesifik primerler kullanarak tanılamışlar ve bu örneklerin GLRaV-4 ile enfekteli olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar elde ettikleri bulgulara göre GLRaV-4’ün Türkiye için ilk kayıt olduğunu bildirmişlerdir.

Manisa, İzmir, Denizli ve Çanakkale bağ alanlarında gerçekleştirilen bir çalışmada ise Kaya ve Erilmez (2014), sonbahar döneminde topladıkları 366 örnekte GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4-9, GLRaV-6 ve GLRaV-7 DAS-ELISA kitleri kullanarak testlemeler yapmışlardır. DAS-ELISA sonuçlarına göre topladıkları örneklerin 18’inin GLRaV-1, 11’inin GLRaV-2, 143’ünün GLRaV-3, sekizinin GLRaV-4-9, dördünün GLRaV-1, -3, 14’ünün GLRaV-2, -3 ve dördünün ise GLRaV-1, -2, -3 ile enfekteli olduğunu 164 örnekte ise söz konusu virüsleri tespit edemediklerini bildirmişlerdir. GLRaV-4-9 antiserumu ile pozitif reaksiyon veren sekiz örnekte GLRaV-4 ve GLRaV-9’a ait spesifik primerler kullanarak gerçekleştirdikleri PCR analizleri sonucunda örneklerin GLRaV-4 ile enfekteli olduğunu GLRaV-9 ile enfekteli örneğe ise rastlayamadıklarını bildirmişlerdir.

Ege, İç Anadolu, Doğu ve Batı Anadolu bağ alanlarında ise Ertunc and Turkmen (2015), topladıkları 213 örneği GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4-9, GLRaV-6 ve GLRaV-7 DAS ELISA kitleri ile test etmişlerdir. 213 örneğin 143 (%67,14)’ünün en az bir virüsle enfekteli olduğunu belirtmişlerdir. Test sonucunda GLRaV-4-9 (%81,12), GLRaV-3 (%50,35), GLRaV-7 (%48,95), GLRaV-1 (%75), GLRaV-2 (%62) ve GLRaV-6 (%5) enfeksiyonlarını belirtilen oranlarda saptadıklarını bildirmişlerdir. Ayrıca Marmara Bölgesi bağ alanlarında GLRaV-1 (%69,23), GLRaV-2 (%53,85) ve GLRaV-3 (%57,69); Doğu Anadolu Bölgesi’nde GLRaV-4-9 (%100) enfeksiyonlarını belirtilen oranlarda; Ege Bölgesi’nde ise GLRaV-7’nin baskın olduğunu GLRaV-6’nın ise nadiren saptandığını bildirmişlerdir. Ayrıca GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4-9 ve GLRaV-7’nin neden olduğu karışık enfeksiyonların sayılarının oldukça fazla olduğunu belirtmişlerdir. Enfeksiyonların yerel çeşitlerden ziyade şaraplık çeşitlerde yaygın olduğunu bununla beraber yerel çeşitlerden Tahannebi, Öküzgözü ve Boğazkere çeşitlerinde de enfeksiyon tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Hindistan bağ alanlarında Rai et al. (2015), asma yaprak kıvrılma virüs hastalığının belirtisini gösteren asmalardan topladıkları örnekleri GLRaV-4-9 DAS-ELISA kiti ile test etmişlerdir. Enfekteli olarak tespit ettikleri 23 örneği GLRaV-4, -5, -6 ve 9'un ayırımı için RT-PCR ile test etmişlerdir. RT-PCR sonucunda test ettikleri örneklerde sadece GLRaV-4'ü tespit edebildiklerini bildirmişlerdir.

2.5 Tanı Yöntemlerinin Duyarlılıkları ile İlgili Çalışmalar

Günümüzde bitki virüslerinin tanılanmasında serolojik yöntemlerden DAS-ELISA, moleküler yöntemlerden ise RT-PCR başlıca kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır. Serolojik tanı yöntemlerinden DAS-ELISA günümüzde rutin laboratuvar örneklerinin testlenmesi amacıyla standart test protokolü olarak kullanılmakta ancak floemde lokalize olan ve düşük virüs konsantrasyonuna sahip örneklerde ve/veya kullanılan antiserumun akraba virüslerle çapraz reaksiyon göstermesi gibi bazı durumlarda zaman zaman güvenilir olmayan sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Borja and Ponz, 1992; Golino et al., 1992; Rowhani et al., 1992). Zaman zaman yaşanan bu olumsuzluklar testlerin tekrarlanması ve/veya sonuçların daha duyarlı bir yöntemle teyid edilmesini zorunlu kılmaktadır.

Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler enfekteli asma dokularında çok düşük konsantrasyonlarda bulunmakta olup elde edilmeleri ve saflaştırılmaları oldukça zordur (Ling et al., 2007). Bu amaçla moleküler yöntemlerden konvansiyonel veya Real-time RT-PCR yöntemi birçok laboratuvarında oldukça spesifik bir yöntem olarak bu amaç için kullanılmaktadır. Konuyla ilgili yapılan çalışmalarda asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin bitki içinde dağılımları ve konsantrasyonları ile DAS-ELISA, konvansiyonel RT-PCR ve Real-time RT-PCR'ın asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsleri tanılamadaki hassasiyetleri üzerine yoğunlaşmıştır.

Hatay bağ alanlarında yürütülen bir çalışmada Pekekti vd. (2001), GLRV-1 ve GLRV-3'ün fenolojik dönemlere ve organlara göre dağılımı DAS-ELISA testi ile belirlemişlerdir. En uygun örnekleme dönemlerinin Ağustos, Eylül ve Ekim ayları olduğunu, en uygun organların ise kök, yaşlı ve genç yaprak, koruk, olgun meyve ve kabuk dokusu olduğunu, dormant dönemde virüsü sadece kabuk dokusundan saptayabilirken ilkbahar döneminde ise sadece çiçek salkımında saptayabildiklerini bildirmişlerdir.

Örnekleme zamanıyla ilgili yapılan başka bir çalışmada ise Osman et al. (2012), GLRaV-1, -2, -3, -4, -5, -7, -9, GRSPaV, GVA, GVB, GFLV, GFkV, ve ToRSV ile enfekteli asmalardan Mayıs ayından itibaren iki yıl boyunca üç ayda bir örnek almış ve konvansiyonel RT-PCR ve Real-time RT-PCR yöntemi ile testlemişlerdir. Floemle sınırlı virüsler için en uygun örnekleme zamanının Kasım-Şubat ayları olduğunu, floem dokularının virüs testleri için en uygun materyal olduğunu, örneklerdeki virüs yoğunluklarının çok düşük konsantrasyonlarda olduğu dönemlerde bile Real-time RT-PCR'in virüsleri tanılamada son derece hızlı, duyarlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin diğer virüslere göre doku içerisinde oldukça düzensiz bir şekilde dağıldığını, dağılımın mevsimsel değişkenlik gösterdiğini ve bu durumun moleküler tabanlı hızlı teşhis protokollerinin sertifikasyon ve karantina gibi rutin örnek testlenen laboratuvarlarda standart olarak oturtulmasında en büyük engel oluşturduğunu vurgulamışlardır. Buna karşın floemle sınırlı virüslerle gerçekleştirilen başka bir çalışmada Rakhshandehroo et al. (2005), GLRaV-3, GVA ve GFkV virüsleri için dormant dönemde alınan sürgünlerdeki virüs konsantrasyonunun bahar döneminde alınan yapraklarla karşılaştırıldığında daha düşük yoğunlukta olduğunu ve söz konusu virüslerin sezona bağlı olarak konsantrasyonlarının değişkenlik gösterdiğini belirtmişlerdir.

Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin DAS-ELISA ile tanınmasıyla ilgili yürütülen bir çalışmada Dovas and Katis (2003), bitki içerisinde düzensiz dağılan, düşük ve mevsimsel olarak değişken konsantrasyona sahip olan bu virüslerin belirlenmesinde materyal olarak kabuk doku kullanımı gerektiği için söz konusu metodun kullanımının zor ve hassasiyetinin düşük olmasından dolayı güvenilir olmadığını bildirmişlerdir.

DAS-ELISA'nın hassasiyeti ile ilgili gerçekleştirilen başka bir çalışmada Bertazzon and Angelini (2004), asma örneklerini GLRaV-2 ve GLRaV-2'nin RG ve BD varyantları için serolojik olarak üç farklı DAS-ELISA kiti ve moleküler olarak ise RT-PCR ile 19 farklı primer çifti kullanarak test etmişlerdir. Bioreba 1999 antiserumunun tanılamada çok düşük düzeyde kaldığını, Bioreba 2003 ve Agritest kitlerinin daha iyi sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. RT-PCR çalışmaları sonucunda ise tasarladıkları V2dCPf2/V2CPr1 primer çiftinin GLRaV-2 ve GLRaV-2'nin RG ve BD varyantlarının tümünde pozitif sonuç verdiğini belirtmişlerdir. RT-PCR ile enfekteli olarak tespit ettikleri örneklerin yaklaşık olarak %10'unu DAS-ELISA sonucunda negatif olarak tespit ettiklerini; buna karşın ELISA ile enfekteli tespit ettikleri bazı örneklerde ise RT-PCR sonucunda

pozitif sonuç elde edemediklerini bildirmişlerdir. Karşılaşılan bu durumun izolatların nükleotit farklılıklarının PCR'ı etkilediğini ancak bu farklılığın antijenik varyasyonla ilgili olmadığı şeklinde yorumlamışlardır. Sonuç olarak GLRAV-2'nin tanısında DAS-ELISA'dan ziyade RT-PCR kullanımının çok daha etkin olduğunu vurgulamışlardır. Buna karşın Kaya ve Erilmez (2014), GLRaV-1, -2, -3, -4 ve GFkV virüsleri açısından DAS-ELISA sonucu enfekteli olarak tespit ettikleri örnekleri RT-PCR ile test etmiş ve DAS-ELISA ile paralel sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Klasik RT-PCR ile SYBR Green Real-time PCR'ın duyarlılıkları üzerine yapılan bir çalışmada Beuve et al. (2007), GLRaV-2'de görülen yüksek derecedeki genetik farklılıkların moleküler tanılama araçlarının geliştirilmesinde problemlere yol açtığını; bazı durumlarda GLRaV-2 ile enfekteli bağların biyolojik indeksleme, serolojik ve moleküler yöntemlerde hatalı negatif sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Bu amaçla GLRaV-2'nin farklı strain'lerine ait sekans verileri ile tasarladıkları primerleri kullanarak klasik RT-PCR ve SYBR Green Real-time RT-PCR çalışmaları yapmışlardır. SYBR Green Real-time RT-PCR'ın 125.000 kat sulandırılmış RNA örneklerinde bile pozitif sonuç verdiğini bu değer için klasik RT-PCR için en fazla 1000 kat olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuç olarak asma materyali için SYBR Green Real-time RT-PCR'ın klasik RT-PCR'dan 125 kat daha hassas bir tanı yöntemi olduğunu vurgulamışlardır.

GLRaV-1, -5 ve -9 virüslerinin tanılanmasıyla ilgili gerçekleştirilen bir çalışmada Osman et al. (2007), hedef virüs popülasyonlarında görülen genetik varyasyonun RT-PCR testlerinin spesifikliğini ve güvenilirliğini etkileyebileceğini ve bu durumun yanlış negatif sonuçlara yol açabileceğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, PCR'ın güvenilirliği arttırmak için primerleri ve problemleri hedef virüslere ait genomların korunmuş bölgelerinden tasarladıklarını belirtmişlerdir. Tanılamada kullanılan yöntemlerin hassasiyeti üzerine yapılan diğer bir çalışmada ise Al Rwahnih et al. (2013), GLRaV-7'nin tanısı için HSP70h geni kullanılarak tasarlanan primerlerin ve Real-time PCR yönteminin, CP geni kullanılarak tasarlanan primerlere ve konvansiyonel RT-PCR yöntemine göre tanıda oldukça duyarlı olduğunu bildirmişlerdir.

2.6 Genomik ve Filogenetik Analiz Çalışmaları

Teknolojinin hızlı bir şekilde gelişmesi ve maliyetlerin düşmesiyle birlikte önceleri sadece tıp bilminde kullanılabilen sekanslama yöntem ve teknolojileri

özellikle 2000 yılından sonra bitki virolojisinde de genom karakterizasyonu ve filogenetik ilişkilerin belirlenmesi amacıyla yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır. Son yıllarda asma yaprak kıvrılma virüs hastalığı ile ilgili yapılan uluslararası literatür incelendiğinde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin kısmi veya tam genomlarına ait dizi analizlerinin yapıldığı, elde edilen verilerin NCBI gen bankasına girilerek diğer araştırmacılarla paylaşıldığı ve filogenetik ilişkilerin belirlendiği görülmektedir.

Filogenetik analizlerin virüslerin sınıflandırmasında önemli katkısının olmasının yanı sıra GLRaV-Pr, GLRaV-De, GLRaV-Car gibi asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerden nükleotit ve aminoasit içeriği açısından farklılık gösteren virüslerin ve/veya GRBaV gibi tamamen farklı özellikteki yeni virüslerin ortaya çıkmasına da hizmet etmektedir. Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerle yapılan filogenetik çalışmalar incelendiğinde genellikle GLRaV-2, GLRaV-3 ve GLRaV-4'ün en çok çalışılan virüsler olduğu görülmektedir. 2015 yılı itibarıyla asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin farklı bölgelerinin kısmi ve tüm genomuna ait dizi analizi kayıtlarından NCBI gen bankasına girilmiş toplam 1054 kayıt bulunmaktadır (NCBI, 2015). NCBI gen bankasında bu çalışma kapsamında yapılan kayıtların haricinde Akbaş ve Değirmenci tarafından 2010 yılı içerisinde GLRaV-3 için Ege Bölgesi'nden girilen iki kayıt dışında hastalıkla ilişkili virüsler açısından rapor edilen herhangi bir kayıt ve bölge bağlarında yapılmış herhangi bir moleküler karakterizasyon çalışması bulunmamaktadır.

GLRaV-1'in genetik çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde Çin'de yürütülen çalışmada Fan et al. (2015), 43 izolatın filogenetik analizini gerçekleştirmişlerdir. İzolatların, örtü proteinlerinin analizi sonucunda sekiz gruba dağıldığını, diğer izolatlardan farklı olarak üç izolatın ise hiçbir gruba dahil olmadığını bildirmişlerdir.

Türkiye'nin farklı bölgelerinde üç nar ve dokuz asma örneğinde gerçekleştirilen bir çalışmada ise Elçi et al. (2015), elde ettikleri örneklerin örtü proteinlerinin kısmi dizi analizi verileri ile filogenetik analizini gerçekleştirmişlerdir. Nardan elde edilen GLRaV-1 izolatlarının, asmalardan elde edilen izolatlarla nükleotit düzeyinde en az %91 oranında benzerlik gösterdiğini; en yüksek benzerliği ise %94 ile Kaliforniya izolatı ile gösterdiğini bildirmişlerdir. İzolatların farklı lokasyonlardan toplanmış olmalarına rağmen filogenetik analiz sonucunda bölge ve izolatlarla ilgili bir korelasyonun ortaya çıkmadığını, asma ve

narlardan elde edilen izolatların örtü proteinlerinin yüksek oranda farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir.

GLRaV-2'nin genetik çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde karakterizasyonla ilgili yapılan bir çalışmada Abou Ghanem-Sabanadzovic et al. (1997), etmenin fizikokimyasal ve moleküler karakterizasyonunu yaparak virüsün genomik özelliklerini *Beet yellow virus* (BYV) ile karşılaştırmışlar ve etmenin bir *Closterovirus* olduğunu bildirmişlerdir.

İtalya bağ alanlarında yapılan bir çalışmada Bertazzon et al. (2010), GLRaV-2'ye ait elde ettikleri BD izolatının örtü proteinine ait sekans verisini ABD'den elde edilen PN ve Kaliforniya'dan elde edilen RG izolatlarıyla karşılaştırmışlardır. BD izolatının diğer izolatlardan nükleotit düzeyinde %25 oranında farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir.

Hırvatistan'da yürütülen bir çalışmada Voncina et al. (2010), enfekteli yerel çeşitlerden elde ettikleri GLRaV-2 izolatlarının örtü proteinlerinin dizi analizlerini yapmışlardır. İzolatların örtü proteinlerini kodlayan genin nükleotit düzeyinde %97,9-%99,6 oranında, amino asit düzeyinde ise %100 benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir.

ABD'de gerçekleştirilen bir çalışmada ise Abou Ghanem-Sabanadzovic and Sabanadzovic (2015), yerel çeşitler olan Muscadine ve Summer'dan elde ettikleri yerel GLRaV-2 izolatları olan GSM-1 ve MS-07'nin kendi aralarında %75 nükleotit, %82 amino asit benzerliği gösterdiğini, GSM-1 izolatının NCBI Gen bankasında kayıtlı olan RG (AF314061) izolatıyla nükleotit düzeyinde %87 amino asit düzeyinde ise %95'lik bir benzerlik gösterdiğini, MS-07 izolatının ise 93/955 (NC_007448.1) izolatıyla nükleotit düzeyinde %96, amino asit düzeyinde ise %97'lik benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

GLRaV-3'ün genetik çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde Yeni Zelanda bağlarından elde edilen izolatlarla yapılan bir çalışmada Chooi et al. (2013), elde edilen iki farklı varyantın diğer izolatlarından farklılık gösterdiğini, bu izolatların ticari olarak üretilen antbodyler ile çok düşük düzeyde reaksiyon göstermesinin örtü proteinine ait amino asit dizilimindeki modifikasyonla ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir.

Kaliforniya’da gerçekleştirilen bir çalışmada Baraff (2011), GLRaV-3’e ait farklı strain’leri belirlemek amacı ile 24 bağa ait 45 örneğin filogenetik analizini gerçekleştirmiştir. Filogenetik analiz sonucunda, 3g olarak belirttiği izolatların bir bağda spesifik olarak görüldüğünü ancak 3a, 3b ve 3c’nin ise farklı bağlarda görüldüğünü bildirmiştir. Sonuç olarak etmenin strain’leri açısından yüksek derecede bir genetik farklılığın görüldüğünü bu durumun hali hazırda kullanılan primerlerin sertifikasyon amaçlı testlerde etmeni tanılamada başarısız olabileceğini belirtmiştir.

Güney Afrika bağ alanlarında gerçekleştirilen çalışmada Jooste et al. (2015), 315 asma örneğinde Real-time PCR yöntemi ile yaptıkları High resolution melting (HRM) analizleri sonucunda GLRaV-3’e ait 4 farklı varyantı (I, II, III ve VI) tespit etmişlerdir. En yaygın olarak görülen varyantların II ve VI olduğunu bunun yanında örneklerin %56,25’inin birden fazla varyantla enfekteli olduğunu bildirmişlerdir.

Güney Afrika’da gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise Maree et al. (2015), New Generation Sequencing (NGS) yöntemi ile GLRaV-3’e ait tüm genomunu elde ettikleri GH24 izolatını 13’ü tüm genom sekansı olmak üzere 819 kayıtlı karşılaştırmışlardır. Tüm genomlar arasında yaptıkları analizlerde GH24 izolatının, etmenin bilinen strain’leriyle nükleotit düzeyinde %66’dan daha az bir benzerlik gösterdiğini ve bu izolatın etmenin oldukça yüksek düzeyde farklılık gösteren bir varyantı olduğunu bildirmişlerdir. ABD, İtalya ve Güney Afrika’dan toplanan izolatlara ait kısmi sekansları kullanarak yaptıkları analizler sonucunda ise GH24’ün yüksek derecede benzerlik gösterdiğini dolayısıyla bu varyantın tüm dünyada bulunabileceğini belirtmişlerdir.

GLRaV-4’ün genetik çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde Türkiye (Y253-TK) ve İsrail (Y252-IL) izolatlarıyla gerçekleştirilen bir çalışmada Saldarelli et al. (2006), asma yaprak kıvrılma virüs hastalığına benzer belirtiler gösteren, mekanik olarak taşınmayan, hastalıkla ilişkili virüsler açısından DAS-ELISA ve RT-PCR ile pozitif sonuç vermeyen ve Closterovirus benzeri partiküllere sahip olan virüsleri araştırmışlardır. Dejenere primerler kullanarak Y253-TK izolatının HSP70h geninin bir kısmını çoğaltmışlar ve elde ettikleri fragmentin GLRaV-4 (%95), GLRaV-5 (%91), GLRaV-6 (%84), GLRaV-9 (%90) ve diğer asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler (%33-35) ile nükleotit düzeyinde belirtilen oranlarda benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca Y253-TK ve Y252-IL’nin HSP70h genlerinin amino asit düzeyinde %99, bu iki virüsün referans GLRaV-4 ile %95 oranında yüksek bir

benzerlik gösterdiğini ve bu virüslerin GLRaV-4'ün varyantları olabileceğini bildirmişlerdir.

İsviçre bağ alanlarında gerçekleştirilen bir çalışmada Reynard and Gugerli (2012a), GLRaV-4'e ait saptadıkları yeni bir varyantın *Ampelovirus* cinsi içerisinde yer alan GLRaV-4, 5, 6, 9, Car, De ve Pr virüsleriyle olan akrabalık ilişkilerini incelemişlerdir. Yeni varyantın, HSP70 amino asit benzerlik oranlarına göre söz konusu virüslerle %63-66 oranında düşük bir benzerlik gösterdiğini dolayısıyla GLRaV-4 grubu ile yüksek oranda bir genetik farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir.

Hindistan bağ alanlarında gerçekleştirilen bir çalışmada Rai et al. (2015), elde ettikleri dokuz adet GLRaV-4 izolatının filogenetik analizleri sonucunda nükleotit düzeyinde %98 - %100, amino asit düzeyinde ise %97 - %100 benzerlik gösterdiğini; LR106 (FJ467503.1) numaralı ABD izolatıyla ise nükleotit düzeyinde %99, amino asit düzeyinde ise %97 - %98 benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

İsviçre bağ alanlarında gerçekleştirilen bir çalışmada ise Reynard et al. (2015), nükleotit ve amino asit düzeyinde yüksek derecede farklılık gösteren GLRaV-4'ün Ob strain'inin tüm genom sekansını elde etmişlerdir. Ob'nin *Ampelovirus* cinsi içerisinde ikinci alt grupta yer aldığını, genom büyüklüğünün ve yapısının *Ampelovirus* cinsi ile benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca Ob'nin örtü proteininin daha küçük olması, amino asit benzerlik oranlarının düşük olması ve sahip olduğu farklı serolojik özellikleri nedeniyle GLRaV-4'ün farklı bir strain'i olduğunu belirtmişlerdir.

GLRaV-7'nin genetik çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde 1967 yılında Rusya'dan Japonya'ya getirilip dikilen asma çeşitlerinde gerçekleştirilen bir çalışmada Ito et al. (2012), etmenlere ait elde ettikleri sekans verileriyle yaptıkları genomik analizler sonucunda GLRaV-4 ve GLRaV-7'nin varyantlarını tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

GLRaV-7'nin sınıflandırılmasıyla ilgili yapılan bir çalışmada Martelli (2014), *Closteroviridae* familyası içerisinde cins düzeyinde sınıflandırması yapılmamış etmenin diğer asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslere göre genom yapısındaki bazı temel farklılıklarla birlikte hafif şiddette simptom göstermesi ve belirti göstermeyen bazı asmalarda da tespit edilmesinden dolayı yeni bir cins olan *Velarivirus* cinsi içerisinde sınıflandırıldığını bildirmiştir.

GLRaV-7 ile ilgili yürütülen başka bir çalışmada ise Reynard et al. (2015), NCBI gen bankasına NC_016436 erişim numarası ile GLRaV-7 olarak kayıt edilen AA42 izolatıyla ilgili moleküler ve serolojik veriler incelendiğinde ilgili izolatın aslında GLRaV-4'ün Ob strain'i ve GLRaV-7 ile enfekteli olduğunun açıkça görüldüğünü, bu durumun GLRaV-7'nin asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili bir virüs etmeni olması durumunun yeniden değerlendirilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

GLRaV-8' ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde virüsün ortaya çıkışıyla ilgili yapılan bir çalışmada Monis (2000), karışık bir virüs enfeksiyonu içinden Western blot analiziyle asma yaprak kıvrılma virüs hastalığı ile ilişkili 37-kDa ağırlığına sahip yeni bir virüs proteini bulunduğunu, bu yeni virüse karşı monoklonal antibody geliştirdiğini, bu viral proteine ait kısmi nükleotit ve amino asit dizilimini elde ettiklerini, amino asit diziliminin *Closterovirus*'lere ait olduğunu elde ettikleri 37 kDa'lık proteinin ise yeni bulduğu GLRaV-8 virüsü ile ilgili olduğunu bildirmiştir. Buna karşın yapılan başka bir çalışmada Bertsch et al. (2009), Monis (2000) tarafından rapor edilen ve NCBI gen bankasına örtü proteinine ait 273 nükleotitlik kısmi dizi analizi verisi kayıt edilen GLRaV-8'in viral orijinli olmadığını, söz konusu etmene ait olduğu iddia edilen genomun asma genomuyla yüksek oranda bir benzerlik göstermesinden dolayı asma genomunun bir parçası olduğunu bildirmişlerdir. Elde edilen bulgular sonucunda Martelli, et al. (2012), GLRaV-8'e ait olduğu öne sürülen genomun viral orijinli olmayıp asma genomunun bir parçası olmasından dolayı GLRaV-8'in üyesi bulunduğu *Ampelovirus* cinsinden kaldırıldığını, böylece asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin sayısının 11'e düştüğünü bildirmişlerdir.

GLRaV-9'un genetik çeşitliliğinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada Padilla et al. (2013), İspanya bağ alanlarından elde ettikleri GLRaV-9 izolatlarının filogenetik analizleri sonucunda referans izolatlarla nükleotit düzeyinde (%96,1-%97,2), amino asit düzeyinde ise (%95,7-%97,2) oranlarında benzerlik elde ettiklerini bildirmişlerdir.

GLRaV-Pr, GLRaV-De ve GLRaV-Car virüslerinin ortaya çıkışı ve genetik çeşitliliklerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar incelendiğinde ise GLRaV-Pr ve GLRaV-De virüsleriyle ilgili yapılan bir çalışmada Maliogka et al. (2008a), GLRaV-Pr izolatının HSP70 proteinini kodlayan geninin kısmi sekansının Güney Afrika'dan elde edilen WC-HSP-16 izolatıyla amino asit düzeyinde yüksek oranda (%93-%94) benzerlik gösterdiğini; GLRaV-De izolatının ise amino asit

düzeyinde GLRaV-5 ile %86-%89, GLRaV-9 ile %87-%89 oranında benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak GLRaV-Pr ve GLRaV-De izolatlarının *Ampelovirus* cinsinin üyelerinden amino asit bakımından %10'un üzerinde bir farklılığa sahip olduğunu, bu yeni iki virüsün GLRaV-1 ve GLRaV-3'ün yer aldığı ikinci alt grup'dan açık bir şekilde ayrılarak birinci alt grupta yer aldığını bildirmişlerdir.

GLRaV-Pr ile ilgili yapılan bir başka çalışmada ise Maliogka et al. (2009), Yunanistan'da rapor edilen GLRaV-Pr izolatının tüm genomunun dizi analizini yapmışlardır. Bu yeni virüsü, GLRaV-4, 5, 6 ve 9'u içinde bulunduran *Ampelovirus* cinsine dahil etmişlerdir. Virüsün örtü proteininin genetik olarak GLRaV-4, 5, 6 ve 9'dan farklı olduğunu bildirmişlerdir.

GLRaV-Car ile ilgili yapılan bir çalışmada ise Abou Ghanem-Sabanadzovic et al. (2010), Kaliforniya'da *Vitis vinifera* cv. Canelian üzerinde asma yaprak kıvrılma virüs hastalığının hafif şiddette semptomlarını gösteren yeni bir virüs tespit edip karakterizasyonunu yapmışlardır. Virüs genomunun 13.625 nükleotit içerdiğini; genetik olarak GLRaV-4,5,6,9 ve GLRaV-Pr ve GLRaV-De'nin de içinde bulunduğu *Ampelovirus* cinsinden amino asit düzeyinde %30 farklılık gösterdiğini, dolayısıyla *Closteroviridae* familyasının yeni bir üyesi olabileceğini öngördüklerini bildirmişlerdir.

Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerle ilgili son yapılan taksonomik çalışmaların değerlendirildiği bir çalışmada ise Naidu et al. (2015b), söz konusu virüslerin *Closteroviridae* familyasına bağlı üç cins içerisinde yer aldığını bildirmişlerdir. GLRaV-1, -3, ve -4'ün *Ampelovirus*; GLRaV-2'nin *Closterovirus* ve GLRaV-7'nin ise *Velarivirus* cinsi içinde yer aldığını; yakın zamanda yapılan revizyonlarla GLRaV-5, -6, -9, -Pr, -De ve -Car'ın genom yapısı, serolojik ve biyolojik karakteristiklerindeki benzerliklerinden dolayı GLRaV-4'ün farklı strain'leri olarak *Ampelovirus* cinsi içinde sınıflandırıldığını belirtmişlerdir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmanın konusunu oluşturan bitki örnekleri

Ege Bölgesi'nde bağcılığın yoğun olarak yapıldığı Manisa, Denizli, İzmir, Uşak ve Aydın illeri ve bu illere bağlı ilçelerin bağ alanlarında asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler açısından belirti görülen asmalardan güdümlü, belirti görülmeyen asmalardan ise tesadüfi olarak alınan yaprak ve sürgün örnekleri çalışmanın bitkisel materyalini oluşturmuştur.

3.1.2 Serolojik çalışmalarda kullanılan materyal

Serolojik çalışmalarda, Bioreba AG (İsviçre) firmasından temin edilen antiserumlar, pozitif ve negatif kontroller, ekstraksiyon, kaplama, substrat ve yıkama tamponları ile Nunc F96 Maxisorp marka 96 çukurlu ELISA plakalarını içeren GLRaV-1+3, GLRaV-2, GLRaV-4-9, GLRaV-6 ve GLRaV-7 ticari DAS-ELISA komple kitleri kullanılmıştır. Ayrıca Bioreba marka el tipi homojenizatör (İsviçre), Memmert marka IPP 500 model soğutmalı inkübatör (Almanya), otomatik pipetler, pipet uçları, saf su, homojenizasyon poşetleri ve eldivenler de serolojik çalışmalarda kullanılan diğer materyalleri oluşturmuştur. Test sonuçlarının spektrofotometrik olarak değerlendirilmesinde ise 405 nm dalga boyunda okuma yapan Titertek marka Multiskan Plus MK II model ELISA okuyucusu (Almanya) kullanılmıştır.

3.1.3 Moleküler çalışmalarda kullanılan materyal

3.1.3.1 Total RNA ekstraksiyonu aşamasında kullanılan materyal

Total RNA ekstraksiyonunda Zymo (ABD) firmasından temin edilen filtreler, koleksiyon tüpleri, DNase/RNase ari su, lysis, yıkama ve RNA hazırlama tamponlarını içeren Zymo ZR Plant RNA MiniPrep (R2024) ekstraksiyon kiti kullanılmıştır. Bunun yanında %96'lık Ethanol, otomatik pipetler, pipet uçları, homojenizasyon poşetleri, eldivenler, steril mikrosantrifüj tüpleri, Bioreba marka el tipi homojenizatör (İsviçre), Hettich marka 320R model soğutmalı santrifüj (Almanya), Scotsman marka AF 80 model buz makinesi (İngiltere) ve New

Brunswick marka U410 model -80 °C derin dondurucu (Almanya) da total RNA ekstraksiyonu aşamasında kullanılan diğer materyalleri oluşturmuştur.

3.1.3.2 Komplementer DNA (cDNA) sentezinde kullanılan materyal

cDNA sentezinde Roche firmasından (Almanya) temin edilen enzim, reaksiyon buffer, RNase inhibitör, dNTP mix, DTT, DNase/RNase ari su, Random hexamer ve Oligo(Dt)₁₈ primerleri içeren Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kiti kullanılmıştır. Bunun yanında otomatik pipetler, pipet uçları, steril PCR tüpleri, eldiven, Bionieer Exispin vortex santrifüj (Kore), Roche LightCycler® Nano Real-Time PCR sistemi (Almanya) ve soğutucu rack da cDNA sentezinde kullanılan diğer materyalleri oluşturmuştur.

3.1.3.3 Real-time PCR çalışmalarında kullanılan materyal

Real-time PCR çalışmalarında Roche firmasından (Almanya) temin edilen SYBR Green I içeren FastStart Essential DNA Green Master Mix ile LightCycler® Nano Real-time PCR sistemi (Almanya) kullanılmıştır. Bunun yanında asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslere ait primerler, DNase/RNase ari su, otomatik pipetler, pipet uçları, steril PCR tüpleri, eldiven, Bionieer Exispin vortex santrifüj (Kore) ve soğutucu blok Real-time PCR çalışmasında kullanılan diğer materyalleri oluşturmuştur.

3.1.3.4 Coğaltılmış PCR ürünlerinin analizinde kullanılan materyal

Real-time PCR çalışmaları sonucunda çoğaltılan PCR ürünlerinin analizinde Roche firmasından (Almanya) temin edilen LightCycler® Nano V1.1.0 programında bulunan otomatik kantitasyon ve melting (erime noktası) analizi uygulamaları kullanılmıştır.

3.1.4 Biyolojik indeksleme çalışmalarında kullanılan materyal

Biyolojik indeksleme çalışmalarında *N. occidentalis* Weel., *N. benthamiana* Domin., *N. clevelandii*, *C. quinoa* ve *C. amaranticolor*'un tohumları otsu indikatörleri; Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon ve Pinot Noir kalemeleri ise odunsu indikatörleri oluşturmuştur. Bunun yanında bitki yetiştirme harçları, saksılar, fidan poşetleri, fosfat tampon çözeltisi, celite, eldiven, pamuklu çubuk, İka marka T25 model çubuk homojenizatör (Almanya), Scotsman marka AF 80 model

buz makinesi (İngiltere) de biyolojik indeksleme çalışmasında kullanılan diğer materyalleri oluşturmuştur.

3.1.5 DNA dizileme, genomik ve filogenetik analiz çalışmalarında kullanılan materyal

PCR ürünleri, PCR ürünlerine ait dizi analizi verileri, NCBI BLASTn veritabanı, ChromasPro 1.7.6, Bioedit 7.2.5, Clustal Omega ve Mega 6 programları DNA dizileme, genomik ve filogenetik analiz çalışmalarında kullanılan materyalleri oluşturmuştur.

3.2 Yöntem

3.2.1 Sörvey ve örnek toplama çalışmaları

Sörvey ve örnek toplama çalışmaları Ege Bölgesi'nin önemli bağ üretim merkezleri olan Manisa, İzmir, Denizli, Aydın ve Uşak illerinden asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler için asmalarda belirtilerin görülmeye başladığı dönem olarak bilinen Ağustos ayı sonu ile Eylül ve Ekim aylarında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın il ve ilçe müdürlüklerinin ilgili şubeleri ile görüşülmüş; öncelikle viral belirtilerin görüldüğü, 5-20 yaşları arasında olan ve en az 2 da alan üzerine tesis edilmiş bağlardan yapraklarda sararma, mozaik lekeler, damarlar arasında renk açılmaları, damar bantlaşması, kızarmalar, klorotik beneklenmeler, kıvrılmalar ve gelişme geriliği görülen omcalardan güdümlü olarak yapılmıştır. Özellikle beyaz ve yerel üzüm çeşitlerinde hastalığın zaman zaman symptom göstermemesi ve symptomlarının ne şekilde oluştuğunun tam olarak bilinmemesi nedeniyle symptom göstermeyen asmalardan da tesadüfi örneklemeler gerçekleştirilmiştir.

Her bir bağdan bağın büyüklüğü göz önünde bulundurularak alınabilecek en fazla örnek sayısı ise Bora ve Karaca (1970)'dan modifiye edilerek oluşturulmuştur (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Bir bağdan alınabilecek en fazla örnek sayısına ait bilgiler.

Bağ Alanı	Bir Bağdan Alınacak En Fazla Örnek Sayısı
5 dekara kadar	5
5-10 dekara kadar	7
10-15 dekara kadar	9
20 dekardan büyük	11

İzolât çeşitliliğini sağlamak amacıyla bağların büyüklükleri göz önüne alınarak her bir bağdan alınabilecek en fazla örnek sayısı bağ büyüklükleri göz önüne alınarak sınırlandırılmıştır (Bkz. Çizelge 3.1). Ayrıca örnek alımı illerin bağ yetiştiriciliği yapan mevcut ilçelerini de temsil edecek şekilde gerçekleştirilmiştir.

Sörvey ve örnek toplama çalışmaları, yukarıda belirtilen hastalık belirtileri ve örnek sayılarına uygun olarak 2011 ve 2012 yıllarında gerçekleştirilmiştir. 2011 yılında gerçekleştirilen sörvey çalışmalarına ait bilgiler Çizelge 3.2’de, 2012 yılında gerçekleştirilen sörvey çalışmalarına ait bilgiler ise Çizelge 3.3’te yer almaktadır.

Çizelge 3.2 2011 yılında gerçekleştirilen sörvey çalışmalarına ait bilgiler.

İl	İlçe	İncelenen Bağ Sayısı	İncelenen Bağ Alanı (da)	Toplanan Örnek Sayısı
İzmir	Kemalpaşa	11	135	15
	Torbalı	2	30	3
	Menderes	6	90	7
	Urla	4	35	4
	Çeşme	1	10	2
	Seferihisar	3	60	5
	Menemen	6	190	8
	Selçuk	1	40	1
	Toplam	34	590	45
Aydın	Kuşadası	7	70	8
	Sultanhisar	3	15	3
	Toplam	10	85	11
Manisa	Merkez	26	480	36
Uşak	Eşme	8	104	9
	Ulubey	1	5	1
	Karahallı	5	40	5
	Toplam	14	149	15
Genel Toplam		84	1.304	107

2011 yılında 1.304 da alana sahip 84 bağda gerçekleştirilen sörvey çalışmaları sonucunda İzmir’den 45, Aydın’dan 11, Manisa il merkezinden 36 ve Uşak’tan 15 olmak üzere toplam 107 örnek toplanmıştır (Çizelge 3.2).

2012 yılında ise 3.355 da alana sahip 155 bağda gerçekleştirilen sörvey çalışmaları sonucunda Manisa’dan 191 ve Denizli’den 126 olmak üzere toplam 317 örnek toplanmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 2012 yılında gerçekleştirilen sörvey çalışmalarına ait bilgiler.

İl	İlçe	İncelenen Bağ Sayısı	İncelenen Bağ Alanı (da)	Toplanan Örnek Sayısı
Manisa	Saruhanlı	16	431	27
	Turgutlu	21	513	32
	Salihli	22	519	36
	Alaşehir	34	815	68
	Sarıgöl	14	280	28
	Toplam	107	2.558	191
Denizli	Buldan	6	80	12
	Güney	5	115	12
	Bekilli	5	95	12
	Tavas	6	55	13
	Çal	26	452	77
	Toplam	48	797	126
Genel Toplam		155	3.355	317

Gerçekleştirilen sörvey çalışmaları kapsamında 2011 ve 2012 yıllarında iller bazında toplanan toplam örnek sayılarına ilişkin bilgiler ise Çizelge 3.4'te yer almaktadır.

Çizelge 3.4 2011 ve 2012 yıllarında gerçekleştirilen sörvey çalışmalarına ait bilgiler.

İl	İncelenen Bağ Sayısı	İncelenen Bağ Alanı (da)	Toplanan Örnek Sayısı
Manisa	133	3.038	227
Denizli	48	797	126
İzmir	34	590	45
Uşak	14	149	15
Aydın	10	85	11
Toplam	239	4.659	424

2011 ve 2012 yıllarında 4.659 da alana sahip 239 bağda gerçekleştirilen sörvey çalışmaları sonucunda Manisa'dan 227, Denizli'den 126, İzmir'den 45, Uşak'tan 15 ve Aydın'dan 11 olmak üzere toplam 424 örnek toplanmıştır (Çizelge 3.4).

Sörvey çalışmaları sırasında toplanan örneklerin çeşitlere göre dağılımı ise Çizelge 3.5'te yer almaktadır.

Çizelge 3.5 Sörvey çalışmaları sırasında toplanan örneklerle ait çeşit bilgileri.

Çeşit Adı	Toplanan Örnek Sayısı
Sultani Çekirdeksiz	286
Çal Karası	27
Alphonse Lavallée	21
Alicante Bouschet	14
Razakı	14
Cabernet Sauvignon	11
Merlot	10
Mevlana	8
Osmanca	8
Ekse Karası	5
Syrah	4
Boğazkere	2
Red Globe	2
Superior Seedless	2
Cardinal	1
Fantasy Seedless	1
Foça Karası	1
Kalecik Karası	1
Macabeu	1
Michele Palieri	1
Pembe Salman	1
Pinot Noir	1
Royal	1
Sauvignon Blanc	1
Toplam	424

Çizelge 3.5 incelendiğinde toplanan örneklerin %67,45'ini Sultani Çekirdeksiz, %6,37'sini Çal Karası, %4,95'ini Alphonse Lavallée, %3,3'ünü Alicante Bouschet, %3,3'ünü Razakı, %2,6'sını Cabernet Sauvignon, %2,36'sını Merlot ve geriye kalan %9,67'sini ise diğer çeşitlerin oluşturduğu görülmektedir.

Sörvey çalışmaları sırasında örnek toplama işlemleri asmaların farklı yöneylerinde bulunan bir yaşlı sürgünlerden genç yaprakları da içerecek şekilde yapılmıştır. Örneklerin alındığı bağların koordinatları, gerçekleştirilecek olan biyolojik indeksleme çalışmalarında enfekteli asmaların bulunabilmesi amacıyla GPS cihazına kaydedilip, örneklerin alındığı omcalar ise spreay boya ile işaretlenerek bağ içerisinde asmanın yeri kayıt altına alınmıştır. Ayrıca izolatlara özgün simptomatolojik bilgileri oluşturmak amacıyla da örnek toplama çalışmaları sırasında gözlenen simptomlar fotoğraflanmıştır. Örnek numarası, çeşit bilgisi, simptomlar ve bağ ile ilgili bilgiler de kayıt altına alındıktan sonra toplanan bitki örnekleri, polietilen torbalara konularak buz kutusu içine yerleştirilmiş ve laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen örnekler analizler yapılmaya kadar buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.2.2 Serolojik test yöntemi (DAS-ELISA)

Laboratuvara getirilen 424 örneğin tümü Bioreba (İsviçre) firmasından temin edilen GLRaV-1+3, GLRaV-2, GLRaV-4-9, GLRaV-6 ve GLRaV-7 DAS-ELISA komple kitleri ile serolojik bir tanı yöntemi olan DAS-ELISA ile test edilmiştir. Kullanılan ticari DAS-ELISA kitleri ile asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili hangi virüs ya da virüslerin testlendiğine ilişkin bilgiler Çizelge 3.6’da yer almaktadır.

Çizelge 3.6 DAS-ELISA kitleri ile testlenen virüslere ait bilgiler.

Ticari Kit Adı	Antibody Tipi	Testlenen Virüsler
GLRaV-1+3	Poliklonal / Monoklonal	GLRaV-1 ve GLRaV-3 virüslerinden en az biri
GLRaV-2	Monoklonal	GLRaV-2
GLRaV-4-9	Monoklonal	GLRaV-4, -5, -6, -7 ve GLRaV-9 virüslerinden en az biri
GLRaV-6	Poliklonal	GLRaV-6
GLRaV-7	Monoklonal	GLRaV-7

DAS-ELISA yöntemi çalışmada kullanılan ELISA tanı kitlerinin sağlandığı Bioreba (İsviçre) firmasının önerdiği protokol uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Son aşamada ise ELISA plakalarındaki her bir çukura 50 µl 3 M NaOH eklenerek reaksiyon durdurulup sonuçlar çıplak gözle kontrol edilmiş ve 405 nm dalga boyunda Titertek marka Multiskan Plus MK II model ELISA Reader kullanılarak 405 nm dalga boyundaki absorbands değerleri ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucunda negatif kontrol absorbands değerinin iki katı ve üzerine ulaşan örnekler söz konusu etmenler açısından enfekteli olarak değerlendirilmiştir (Clark and Adams, 1977).

3.2.3 Moleküler yöntemler

3.2.3.1 Total RNA ekstraksiyonu

Laboratuvara getirilen 424 örneğin tümüne uygulanan total RNA ekstraksiyonu, Zymo (ABD) firmasından temin edilen Zymo ZR Plant RNA MiniPrep (R2024) ekstraksiyon kiti ile firma önerilerine ek olarak yapılan küçük modifikasyonlarla aşağıdaki protokol uygulanarak gerçekleştirilmiş olup ekstraksiyon protokolü içinde yer alan santrifüj işlemlerinin tümü +4°C’ye ayarlı soğutmalı santrifüj kullanılarak yapılmıştır.

Ufak parçalara ayrılmış yaprak damarlarını da içeren 150 mg yaprak dokusu homojenizasyon poşetleri içerisine konulmuş ve üzerine 800 µl lysis buffer eklenerek el tipi homojenizatör yardımıyla homojenize edilmiştir. Homojenize olmuş örnek 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüpleri içerisine aktarılmış ve bu tüpler 12.000 *g*'de iki dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından mikro santrifüj tüpleri içinden alınan 400 µl süpernatant, koleksiyon tüpü üzerine yerleştirilmiş Zymo spin IIC filtresine pipetle aktarılmış ve 8.000 *g*'de bir dk. santrifüj edilerek sıvının koleksiyon tüpüne geçmesi sağlanmıştır. Santrifüjden sonra filtreden koleksiyon tüpüne geçen sıvıya 320 µl %96'lık etil alkol eklenerek karıştırılmış ve bu karışım pipet yardımıyla, yeni bir koleksiyon tüpüne yerleştirilmiş Zymo IIC filtresine aktarılmıştır. Aktarımdan sonra tüpler 12.000 *g*'de bir dk. santrifüj edilerek koleksiyon tüpüne geçen sıvı kısım dökülmüş ve koleksiyon tüpüne yerleştirilmiş Zymo IIC filtresi üzerine 400 µl RNA preb buffer eklenmiştir. Tüpler 12.000 *g*'de 1,5 dk. santrifüj edilmiş; ardından koleksiyon tüpüne geçen sıvı dökülerek koleksiyon tüpüne yerleştirilmiş Zymo IIC filtresi üzerine 800 µl RNA yıkama tamponu eklenmiş ve bu tüpler 12.000 *g*'de bir dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından koleksiyon tüpüne geçen sıvı tekrar dökülerek koleksiyon tüpüne yerleştirilmiş Zymo IIC filtresi üzerine 400 µl RNA yıkama tamponu eklenmiş ve bu tüpler önce 12.000 *g*'de bir dk. ardından 12.000 *g*'de 2,5 dk. santrifüj edilmiş ve koleksiyon tüpü içerisindeki sıvı ile birlikte atılmıştır. Zymo IIC filtresi 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüpü içerisine yerleştirilmiş ve filtre üzerine 35 µl DNase/RNase ari su eklenerek bir dk. bekletilmiştir. Son olarak bu tüpler 10.000 *g*'de bir dk. santrifüj edildikten sonra Zymo IIC filtresi atılmış ve mikro santrifüj tüpleri içerisine geçen total RNA'lar bir sonraki aşama için kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.3.2 Komplementer DNA (cDNA) sentezi

Total RNA ekstraksiyonu yapılan örnekler kullanılarak komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için Roche firmasından temin edilen Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kiti kullanılmış ve firma önerileri doğrultusunda aşağıdaki protokol uygulanarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

Öncelikle -80 °C'de saklanan total RNA'lar ve -20 °C'de saklanan cDNA kiti içerisindeki tüm reaktifler çözündürülmüş, 1000 *g*'de kısa bir santrifüjün ardından buz üzerine alınarak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Steril PCR tüpleri içerisine 1 µl Oligo(Dt)₁₈ ve örneğe ait 9,4 µl total RNA eklenerek Roche LightCycler® Nano Real-Time PCR cihazında 65 °C'de on dk. inkübe edilmiş ve inkübasyon süresi bitiminde reaksiyonu durdurmak için tüpler -20 °C'deki soğuk rack üzerinde bir

dk. bekletilmiştir. Bu işlemin ardından tüplerin içine 4 µl reaksiyon buffer, 0,5 µl RNase inhibitör, 2 µl dNTP mix, 1 µl DTT ve 1,1 µl enzim eklenerek karıştırılmış ardından kısa süreli santrifüj yapılmış ve tekrar PCR cihazına yerleştirilerek 55 °C’de 30 dk. ve ardından 85 °C’de beş dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyonun tamamlanmasının ardından PCR tüpleri –20 °C’deki soğuk rack üzerine alınmış ve ardından -20 °C’ye ayarlı derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Yapılan cDNA sentezi sonucunda Real-time PCR çalışmalarında kullanılmak üzere toplam 20 µl ürün elde edilmiştir.

3.2.3.3 Real-time PCR yöntemi

Laboratuvara getirilen bitki örneklerinin tümü serolojik tanı kiti bulunmayan GLRaV-Pr ve GLRaV-De virüsleri ile GLRaV-1+3 ve GLRaV-4-9 DAS-ELISA kitleri (Bkz. Çizelge 3.6) ile yapılan testler sonucu enfekteli olduğu tespit edilen örneklerdeki virüslerin ayırımı amacıyla Çizelge 3.7’de yer alan spesifik primerler ve döngü programları kullanılarak Real-time PCR yöntemi ile test edilmiştir.

Çizelge 3.7 Real-time PCR testlerinde kullanılan primerler ve döngülere ait bilgiler.

Primer Adı	Primer Dizisi (5’ 3’) ve Referans	Ürün Büyüklüğü	Real-time PCR Döngüleri
GLRaV-1_417F GLRaV-1_737R	GAGCGACTTGCGACTTATCGA GGTAAACGGGTGTTCTTCAATTCT (Osman et al., 2007)	320 bp	1 X (95°C 10 dk.) 45 X (95°C 10 sn./60°C 15 sn./72°C 32 sn.)
GLRaV-2_L2/F GLRaV-2_U2/R	ATAATTGCGCGTACATCCCCACTT GCCCTCCGCGCAACTAATGACAG (Osman et al., 2007)	331 bp	1 X (95°C 10 dk.) 45 X (95°C 10 sn./64°C 15 sn./72°C 33 sn.)
GLRaV-3_LC1/F GLRaV-3_LC2/R	CGCTAGGGCTGTGGAAGTATT GTTGTCCCGGTACCAGATAT (Osman and Rowhani, 2006)	546 bp	1 X (95 °C 10 dk.) 45 X (95°C 10 sn./59°C 15 sn./72°C 55 sn.)
GLRaV-4_HSPV/F GLRaV-4_HSPC/R	ACATTCTCCACTTGTGCTTTT CATACAAGCGAGTGCAATTACA (Osman et al., 2007)	319 bp	1 X (95°C 10 dk.) 45 X (95°C 10 sn./58°C 15 sn./72°C 32 sn.)
GLRaV-5_HSPV/F GLRaV-5_HSPC/R	AACACTCTGCTTTTCTGCTGGCA TCTCCAGAAGACGGACCAATGTAA (Osman et al., 2007)	272 bp	1 X (95°C 10 dk.) 45 X (95°C 10 sn./63°C 15 sn./72°C 27 sn.)
GLRaV-6_LR6up GLRaV-6_LR6do	CGATAGGTTTGGGGGCACT GGCACAGAACACACCGACAAAAC (Maliogka et al., 2008b)	283 bp	1 X (95°C 10 dk.) 45 X (95°C 10 sn./61°C 15 sn./72°C 28 sn.)
GLRaV-7_LR7/F GLRaV-7_LR7/R	TATATCCCAACGGAGATGGC ATGTTCTCCACCAAAATCG (Engel et al., 2008)	502 bp	1 X (95°C 10 dk.) 45 X (95°C 10 sn./58°C 15 sn./72°C 50 sn.)
GLRaV-8_F GLRaV-8_R	AGAAGAGAGGGATTGGATTGGAAT AGTCTTCTCGGTGGCTTAAATTC (Matus et al., 2008)	172 bp	1 X (95°C 10 dk.) 45 X (95°C 10 sn./59°C 15 sn./72°C 17 sn.)
GLRaV-9_LR9/F GLRaV-9_LR9/R	CGGCATAAGAAAAGATGGCAC TCATTCACTGCTTGAAC (Alkowni et al., 2004)	393 bp	1 X (95°C 10 dk.) 45 X (95°C 10 sn./56°C 15 sn./72°C 39 sn.)
GLRaV-Pr_LRPrup GLRaV-Pr_LRPrdo	TCTTGTGTACAGGGATATAAACG GAGCAAACGGAAAGAGACACTTG (Maliogka et al., 2008b)	243 bp	1 X (95°C 10 dk.) 45 X (95°C 10 sn./56°C 15 sn./72°C 24 sn.)
GLRaV-De_LRDeup GLRaV-De_LRDeDo	GCTGGGAGAGGCGTTGAA GCACAGAACAAACAGACAGAGTG (Maliogka et al., 2008b)	370 bp	1 X (95°C 10 dk.) 45 X (95°C 10 sn./59°C 15 sn./72°C 37 sn.)

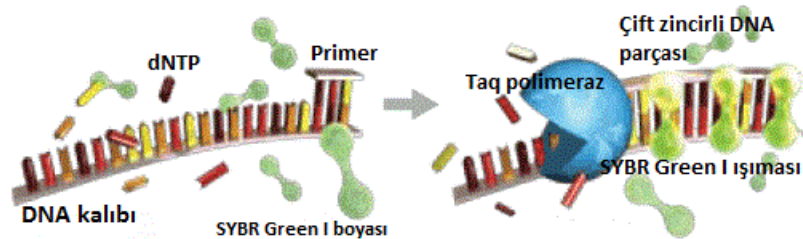
Ayrıca DAS-ELISA testleri sonucunda enfekteli olduğu tespit edilen tüm örneklerle ve absorbans değerleri negatif kontrolün 1,5-2 katı arasında olan örneklerle de Real-time PCR yöntemi uygulanmıştır. Bunlara ek olarak tüm örnekler GLRaV-8 primeri (Bkz. Çizelge 3.7) kullanılarak da test edilmiştir.

Real-time PCR çalışmaları Roche LightCycler® Nano Real-time PCR sistemi ve SYBR Green I floresan boyası içeren Roche FastStart Essential DNA Green Master Mix kullanılarak firma önerileri doğrultusunda aşağıdaki protokole göre gerçekleştirilmiştir.

Steril PCR tüpleri içerisine 0,3 µl 20 µM forward primer, 0,3 µl 20 µM reverse primer, 1 µl cDNA ve 10 µl 2x FastStart Essential DNA Green Master Mix eklenerek DNase/RNase ari su ile son hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır. Her koşulunda 1 tüp olası kontaminasyon riskine karşı örnek eklenmeden negatif kontrol olarak çalışmaya eklenmiştir. Tüpler Roche LightCycler® Nano Real-time PCR cihazına yerleştirildikten sonra etmenler için spesifik döngü programları uygulanmıştır (Bkz. Çizelge 3.7).

3.2.3.4 Melting (Erime noktası) analizi

Real-time PCR çalışmalarında kullanılan Roche FastStart Essential DNA Green Master Mix, SYBR Green I floresan boyası içermekte ve PCR sonucunda amplifikasyonun gerçekleşme durumu bu boyanın verdiği ışığa sayesinde belirlenmektedir (Şekil 3.1). Ancak SYBR Green I kimyasal özelliği gereği PCR sırasında gerçekleşen amplifikasyonların hedef ürüne ait olup olmadığına bakmaksızın oluşan her çift zincirli DNA parçasının arasına girerek sinyal oluşumuna sebep olmaktadır. Spesifik olmayan ürünlere ait sinyallerle hedef ürüne ait olan sinyalleri ayırt edebilmek için Real-time PCR'ın son döngüsünden sonra melting analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1 Amplifikasyon sırasında SYBR Green I'in ışımaya modeli.

Real-time PCR sonuçlarının yorumlanması PCR işleminden sonra Roche LightCycler® Nano Real-time PCR sistemiyle gerçekleştirilen melting analizine göre yapılmıştır (Chou et al., 1992; Zipper et al., 2004). Gerçekleştirilen melting analizi ile çoğaltılan DNA örneğinin sıcaklığını yavaş yavaş artırılarak floresan sinyalin sıcaklığa bağlı değişimini gösteren bir grafik elde edilmiş ve floresan sinyalin ani düşüşünden kaynaklanan pikler aracılığıyla DNA iplikçiklerinin birbirlerinden ayrıldıkları sıcaklık değerleri tespit edilmiştir. Analiz sonucunda primer dimerleri gibi spesifik olmayan ürünlerin yanlış pozitif verme durumları bertaraf edilmiş ve Real-time PCR işlemi sonucunda çoğaltılan DNA'nın hedef bölge olup olmadığı belirlenmiştir.

Real-time PCR çalışmalarında kullanılan Roche FastStart Essential DNA Green Master Mix protokolünde belirtildiği üzere çoğaltılan PCR ürünü, 65 °C'den 95 °C'ye kadar saniyede 0,1 °C'lik artışlarla ısıtılmıştır. Böylece PCR ürünündeki çift zincirli DNA parçacıklarının %50'sinin hangi sıcaklık derecesinde denatürasyona uğradığı, denatürasyona uğrayan DNA zincirleri arasından açığa çıkan SYBR Green I floresan boyanın verdiği ışımaya sonucunda tespit edilmiştir. Melting analizi sonucunda ilgili etmenler açısından belirlenen erime sıcaklığı altında kalan örnekler sağlıklı, üzerinde kalan örnekler ise enfekteli olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4 Biyolojik indeksleme çalışmaları

Uygulanan serolojik ve moleküler tanı yöntemleri sonucunda, asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili farklı virüs ve/veya virüslerle enfekteli olduğu tespit edilen örnekler arasından GLRaV-2, GLRaV-Pr, GLRaV-De virüslerini içeren örnekler ile GLRaV-8 primeriyle pozitif sonuç veren örneklerden seçilenler otsu indikatör bitkilerden *N. occidentalis*, *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *C. quinoa* ve *C. amaranticolor*'a mekanik inokulasyon ile inokule edilmiştir.

Otsu indikatör olarak kullanılacak bitkilere ait tohumların yetiştirme ortamı olarak, steril edilmiş toprak, torf ve perlit, 1:1:1 oranında karıştırılarak kullanılmıştır. İndikatör bitki tohumları derinliği 10 cm olan 45 x 33 cm ebatlarında plastik tavalara ekilmiş olup 2-3 yapraklı döneme ulaşmalarıyla birlikte 400 ml'lik plastik saksılara şaşırtılmıştır (Şekil 3.2). Ekim yapılan plastik tavalarda ve şaşırtılan saksılar hızlı bir şekilde gelişmeleri amacıyla 23 °C sıcaklık, 4000 lüks aydınlatma ve % 60-70 nisbi neme ayarlı cam seraya konulmuş ve şaşırtmadan 3-4 gün sonra inokulasyon işlemine geçilmiştir (Martelli, 1993).



Şekil 3.2 Otsu indikatörlerin gelişme sürecine ait görünüm a) Çimlenen otsu indikatörler b) Şaşırtılmaya hazır hale gelen otsu indikatörler c) Otsu indikatörlerin saksılara şaşırtma işlemi d) Saksılara şaşırtılmış otsu indikatörler.

İndikatör bitkilerin besin maddesi içeriklerinin karşılanması amacıyla 15 günde bir sulama sularına Çizelge 3.8’de yer alan bitki besin maddeleri eklenerek verilmiştir.

Çizelge 3.8 İndikatör bitkilere verilen bitki besin maddeleri karışımına ait bilgiler (Murashige and Skoog., 1962).

Bitki Besin Maddesi Adı	Formülü	Miktarı (mg/L)
Amonyum nitrat	NH_4NO_3	1,65
Borik asit	H_3BO_3	6,2
Kalsiyum klorid	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
Magnezyum sülfat	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
Bakır sülfat	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
Potasyum fosfat	KH_2PO_4	170
Demir sülfat	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
Potasyum nitrat	KNO_3	1,90
Magnezyum sülfat	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
Potasyum iodin	KI	0,83
Sodyum molibdat	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
Çinko sülfat	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6

Otsu indikatörlere uygulanan mekanik inokulasyon yönteminde enfekteli örnekler ait yapraklar, yaprak sapları ve floem kazıntıları inokulum kaynağı olarak kullanılmıştır. Mekanik inokulasyon uygulanması amacıyla seçilmiş her bir izolat için otsu indikatörlerin her birinden dörder adet bitki kullanılmış olup yine aynı sayıda bitki kontrol olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Mekanik inokulasyon çalışmaları indikatör bitkilerin gelişme durumları dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Mekanik inokulasyon amacıyla seçilen örneklerin her birinden 1'er gram doku tartılarak üzerlerine %2 nicotin içeren 10 ml 0,01 M Fosfat tamponu

(pH:7,5) eklenmiş ve örnekler çubuk homojenizatör yardımıyla soğuk ortamda homojenize edilmiştir (Cadman et al., 1960; Rowhani et al., 2005). Homojenize edilen örnekler, indikatör bitki yaprakları üzerine yaprak yüzeyini aşındırıcı olarak celite uygulandıktan sonra pamuklu çubuk yardımıyla inokule edilmiş ve inokulasyona ait kalıntılar saf su ile yıkanarak yapraklardan uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 Mekanik inokulasyon çalışmalarına ait görünüm a) Örneklerin soğuk ortamda homojenize edilmesi b) İndikatörlere celite uygulaması c) *N. benthamiana*'ya mekanik inokulasyon uygulaması d) *N. occidentalis*'e mekanik inokulasyon uygulaması e) *N. clevelandii*'ye mekanik inokulasyon uygulaması f) *C. quinoa*'ya mekanik inokulasyon uygulaması g) *C. amaranticolor*'a mekanik inokulasyon uygulaması h) İnokulasyondan sonra yaprakların suyla yıkanması.

Mekanik inokulasyonun ardından serada muhafaza edilen bitkiler symptom gelişimleri açısından takip edilmiş, oluşan symptom tipleri fotoğraflanarak kayıt altına alınmış ve değerlendirilmiştir.

Mekanik inokulasyon çalışmaları gerçekleştirilen virüsleri içeren örneklerin yanında asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili farklı virüslerle enfekteli olduğu belirlenen ve GLRaV-8 primeriyle pozitif sonuç veren örneklerden seçilenler odunsu indikatörlerden Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, ve Pinot Noir'e aşı ile inokule edilmiştir (Pearson and Goheen, 1988; Martelli, 1993; Krake et al., 1999).

Odunsu indikatörlerle gerçekleştirilen omega aşısı uygulamaları için öncelikle Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü indikatör parselinde bulunan Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon ve Pinot Noir çeşitlerinin her birinden 500 adet kalem alınmış ve 100'lük demetler halinde etiketlenmiştir. İnokulum kaynağı olarak seçilen enfekteli örnekler ait kalemler ise sörvey çalışması sırasında koordinatları belirlenen arazideki ana bitkilerden yine aynı tarihte alınmıştır. Alınan

tüm kalemler olası fungal bulaşmaları elemine etmek için koruyucu amaçla iki saat %50 iprodione aktif maddesi içeren %5'lik çözeltide bekletilmiştir. Çözeltiden çıkarılan kalemler fazla sularının süzülmesi amacıyla bir saat bekletildikten sonra indikatörlere ait kalemlerin üstten ve alttan 1-2 cm'lik kısımları kesilerek uzaklaştırılmış ve kalemler 30 cm olacak şekilde aşı için hazırlanmıştır. Enfekteli örneklerle ait kalemler ise birer göz içerecek şekilde 5 cm'lik parçalar halinde kesilmiştir. Seçilen her izolattan her bir odunsu indikatöre altı adet olmak üzere omega aşı makinesi ile aşılanmıştır. Kullanılan her bir odunsu indikatör çeşidinden altışar adet bitki de kendi çeşitlerine ait sağlıklı aşı gözleriyle aşılanarak çalışmaya kontrol grup olarak dahil edilmiştir. Aşılaması yapılan materyal etiketlenip, talaş içeren kasalara yerleştirildikten sonra aşı noktasında kallus tabakasının oluşması amacıyla üç hafta 26 °C sıcaklık ve %80 nispi neme ayarlı aşı kaynaştırma odasında muhafaza edilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Odunsu indikatörlere omega aşı ile biyolojik indeksleme uygulamalarına ait görünüm

- a) İndikatörlere ait kalemler ile enfekteli bitkilere ait aşı gözleri b) İndikatörlere omega aşı ile enfekteli bitkilere ait gözlerin aşılanması c) Omega aşı uygulanan indikatörler d) Aşılanan indikatörlerin aşı kaynaştırma odasında kallus oluşumu için kasalarda bekletilmesi e) Aşı kaynaştırma odasından çıkan dikime hazır indikatörler.

Aşı kaynaştırma odasından çıkarılan odunsu indikatörler talaş, torf, perlit, çam kabuğu, toprak ve çiftlik gübresini (2:1:1:1:1) belirtilen oranlarında içeren harç karışımını (İlgın vd., 1998) içeren tüplere dikilmiştir. Dikimi yapılan odunsu indikatör bitkiler etiklendikten sonra gelişimleri için 24°C sıcaklık ve %70 nispi neme ayarlı iklim odasına konulmuştur (Şekil 3.5).

Odunsu indikatörlerde gerçekleştirilen biyolojik indekslemenin ardından iklim odasında muhafaza edilen indikatör bitkiler simptom gelişimleri açısından takip edilmiş ve oluşan simptomlar fotoğraflanarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.5 Odunsu indikatörlerin dikim ve gelişim süreçlerine ait görünüm a) İndikatörlerin tüplere dikimi b) Dikimden sonra iklim odasına yerleştirilen indikatörler c) İklim odasında sürgün gelişimi başlayan indikatörler.

3.2.5 DNA dizileme, genomik ve filogenetik analizler

Real-time RT-PCR çalışmaları sonucunda asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili farklı virüsler ile enfekteli olarak tespit edilen bazı izolatlar, kendi aralarında ve NCBI gen bankasındaki referans izolatlarla ait kayıtlarla genomik ve filogenetik analizlerin yapılabilmesi amacıyla DNA dizileme çalışmalarına alınmıştır. Bu amaçla seçilen PCR ürünleri Macrogen (Kore) firmasının Amsterdam'daki laboratuvarına gönderilerek çift yönlü kısmi genom dizileme hizmeti alınmıştır.

Sekans verilerine ait kromotogram dosyaları, ChromasPro 1.7.6 kromotogram analiz programıyla analiz edilmiş ve forward - reverse primerlerle yapılan sekans verilerinin birleştirilmesiyle okumalara ait konsensüs diziler elde edilmiştir. Elde edilen konsensüs diziler NCBI gen bankası veri tabanında BLASTn analizleri ile karşılaştırılmış ve veri tabanında eşleşme gösteren kayıtlardan seçilen izolatlarla genomik ve filogenetik analiz aşamasına geçilmiştir. Karşılaştırması yapılacak olan kayıtlara ait diziler Bioedit 7.2.5 sekans hizalama programı ile hizalanmış ve Clustal Omega programı ile nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları belirlenmiştir. Ayrıca nükleotit ve amino asit dizilerinin Mega 6 programında Neighbour Joining istatistik metodu ve Kimura 2 modeli kullanılarak dendogramları çizilmiş, bootstrap analizleri ise 500 tekrarlı olarak yapılmıştır. Ayrıca yerel izolatlarla ait oluşturulan konsensüs diziler, NCBI gen bankası veri tabanına online olarak kayıt edilerek erişim numaraları alınmıştır.

4. BULGULAR

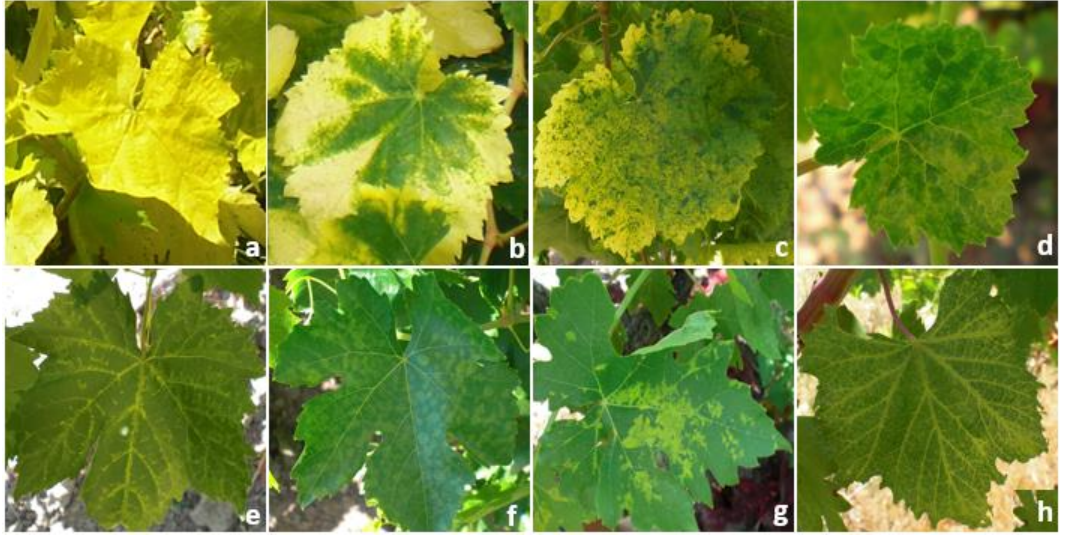
4.1 Sörvey Çalışmaları Sırasında Bitkilerde Gözlenen Simptomlar

2011 yılında İzmir, Aydın, Manisa Merkez ve Uşak illerinde, 2012 yılında ise Manisa'nın diğer ilçeleri ve Denizli ilinde gerçekleştirilen örnek toplama çalışmaları, öncelikle belirti gösteren asmalardan gerçekleştirilmiş olup herhangi bir belirtinin görülmediği bağlarda ise tesadüfi olarak yapılmıştır.

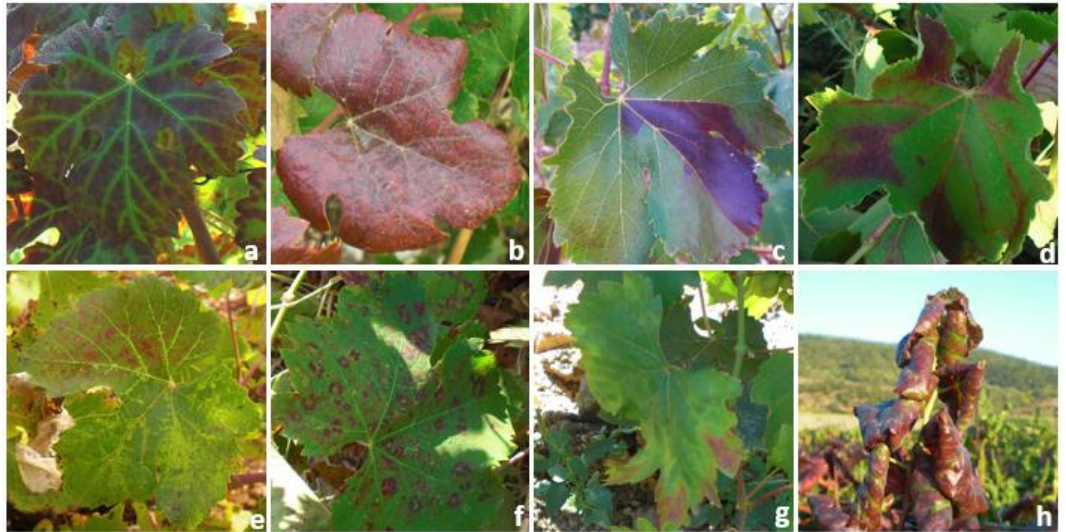
Sörvey çalışmaları sırasında ziyaret edilen 239 bağdan toplanan 424 örneğin 320'sini beyaz üzüm çeşitleri, 104'ünü ise renkli üzüm çeşitleri oluşturmuştur (Bkz. Çizelge 3.5). Sörvey çalışması sırasında beyaz üzüm çeşitlerinin yapraklarında damar bantlaşması, klorotik ve mozaik renk açılması, benek oluşumu, klorotik ve mozaik sararma, genel ve kısmi sararma, şekil bozukluğu, içe doğru kıvrılma, uç kısımlarda sararma görülürken bitki genelinde ise çalılışma tespit edilen belirtiler arasında yer almıştır. Renkli üzüm çeşitlerinde ise ana damar haricinde yaprak ayasında kızarıklık ve yapraklarda kıvrılmalar, yaprak genelinde kızarıklık, yaprak ayasında içi yeşil kırmızı haleler, yaprak ayasında kırmızı ve yeşil mozaik renk belirtileri ile karşılaşılmıştır.

Örnek toplama çalışmaları sırasında beyaz ve renkli üzüm çeşitlerinde karşılaşılan bazı önemli belirtilere ait fotoğraflar Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de yer almaktadır. Beyaz ve renkli üzüm çeşitlerinde görülen söz konusu belirtileri bağlarda görülen birçok farklı viral etmenin veya farklı etkenlerin de oluşturabileceği göz önünde bulundurulmuş ve sörvey çalışmalarında toplanan örnekleri bu belirtilerin görüldüğü asmalar oluşturmuştur.

Toplanan örneklerin 401'i söz konusu belirtilerden en az birine sahipken 23'ü ise semptom gözlenmeyen asmalardan alınmıştır. Ayrıca semptom gözlenmeyen asmalarda daha sonra gerçekleştirilen serolojik ve moleküler testler sonucunda bu tip örneklerin bir kısmının da asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler tarafından enfekteli olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.1 Beyaz üzüm çeşitlerinin yapraklarında görülen belirtiler a) Sultani Çekirdeksiz’de genel sararma b) Sultani Çekirdeksiz’de uçlardan merkeze doğru sararma c) Sultani Çekirdeksiz’de klorotik renk açılması ve beneklenme d) Sultani Çekirdeksiz’de mozaik renk açılması e) Sultani Çekirdeksiz’de damar bantlaşması f) Sultani Çekirdeksiz’de benek oluşumu g) Razakı’da düzensiz klorotik lekeler ve damar bantlaşması h) Sultani Çekirdeksiz’de yaprakta şekil bozukluğu, damar bantlaşması ve mozaik renk açılması.



Şekil 4.2 Renkli üzüm çeşitlerinin yapraklarında görülen belirtiler a) Cabernet Sauvignon’da ana damarlar haricinde ayda kızarıklık b) Kalecik Karası’nda genel kızarıklık c) Alphonse Lavallée’de ayda damarlarla sınırlanmış kısmi kızarıklık d) Alphonse Lavallée’de ana damarlarda ve ayda parçalı kızarıklık e) Ekse Karası’nda kırmızı ve açık yeşil mozaik renk oluşumları f) Syrah’da içi yeşil dışı kırmızı hale oluşumları g) Alphonse Lavallée’de yaprak uçlarında kısmi kızarıklık ve klorotik renk açılması h) Alicante Bouschet’de içe doğru şiddetli kıvrılma ve ana damarlar haricinde şiddetli kızarıklık.

4.2 Serolojik (DAS-ELISA) Testlerin Sonuçları

Sörvey çalışmaları sonucunda Manisa, Denizli, İzmir, Uşak ve Aydın illerinden toplanan 424 asma örneğinin tümü GLRaV-1+3, GLRaV-2, GLRaV-4-9, GLRaV-6 ve GLRaV-7 DAS-ELISA kitleri ile test edilmiş olup elde edilen DAS-ELISA sonuçları Çizelge 4.1’de yer almaktadır.

Çizelge 4.1 Toplanan örneklerin DAS-ELISA testi sonuçları.

İl	İlçe	Testlenen Örnek Sayısı	Enfekteli Örnek Sayısı	GLRaV-1+3	GLRaV-2	GLRaV-4-9	GLRaV-6	GLRaV-7
Manisa	Merkez	36	2	1	1	-	-	-
	Saruhanlı	27	1	-	-	1	-	-
	Turgutlu	32	3	3	-	-	-	-
	Salihli	36	6	5	-	1	-	-
	Alaşehir	68	4	3	-	1	-	-
	Sarıgöl	28	-	-	-	-	-	-
	Toplam	227	16	12	1	3	-	-
Denizli	Buldan	12	1	1	-	-	-	-
	Güney	12	-	-	-	-	-	-
	Bekilli	12	2	2	-	-	-	-
	Tavas	13	1	1	-	-	-	-
	Çal	77	9	6	-	3	-	-
	Toplam	126	13	10	-	3	-	-
İzmir	Kemalpaşa	15	4	2	1	1	-	-
	Torbalı	3	-	-	-	-	-	-
	Menderes	7	1	-	1	-	-	-
	Urla	4	-	-	-	-	-	-
	Çeşme	2	-	-	-	-	-	-
	Seferihisar	5	-	-	-	-	-	-
	Menemen	8	4	2	-	2	-	-
	Selçuk	1	-	-	-	-	-	-
	Toplam	45	9	4	2	3	-	-
Uşak	Eşme	9	1	1	-	-	-	-
	Ulubey	1	-	-	-	-	-	-
	Karahallı	5	-	-	-	-	-	-
	Toplam	15	1	1	-	-	-	-
Aydın	Kuşadası	8	-	-	-	-	-	-
	Sultanhisar	3	-	-	-	-	-	-
	Toplam	11	-	-	-	-	-	-
Genel Toplam		424	39	27	3	9	-	-

DAS-ELISA yöntemi kullanılarak yapılan testler sonucunda Manisa ilinden toplanan 227 örneğin 12 (%5,29)’sinin GLRaV-1+3; üç (%1,32)’ünün GLRaV-4-9 ve bir (%0,44)’inin ise GLRaV-2 ile enfekteli olduğu belirlenmiş olup GLRaV-6

ve GLRaV-7 virüsleri ise tespit edilememiştir. Manisa ilinde en fazla enfekteli örnek Salihli ilçesinde tespit edilmiş olup Sarıgöl ilçesinde ise enfekteli örnek tespit edilememiştir.

Denizli ilinden toplanan 126 örneğin ise on (%7,94)'unun GLRaV-1+3; üç (%2,38)'ünün ise GLRaV-4-9 ile enfekteli olduğu belirlenmiş olup GLRaV-2, GLRaV-6 ve GLRaV-7 virüsleri tespit edilememiştir. Denizli ilinde en fazla enfekteli örnek Çal ilçesinde tespit edilmiş olup Güney ilçesinde ise enfekteli örnek tespit edilememiştir.

İzmir ilinden toplanan 45 örneğin DAS-ELISA testi sonuçları incelendiğinde toplanan örneklerin dört (%8,89)'ünün GLRaV-1+3; üç (%6,67)'ünün GLRaV-4-9 ve iki (%4,44)'sinin ise GLRaV-2 ile enfekteli olduğu; GLRaV-6 ve GLRaV-7 virüsleri açısından ise enfekteli örnek tespit edilemediği görülmektedir. İzmir ilinde en fazla enfekteli örnek Kemalpaşa ve Menemen ilçelerinde tespit edilmiş olup Torbalı, Urla, Çeşme, Seferihisar ve Selçuk ilçelerinde ise enfekteli örnek tespit edilememiştir.

Uşak ilinde ise toplanan 15 örnekten sadece Eşme ilçesinden alınan bir örnek GLRaV-1+3 ile enfekteli olarak tespit edilmiştir.

Aydın ilinde ise toplanan 11 örneğin hiçbirisinde söz konusu virüsler açısından enfekteli örnek tespit edilememiştir.

Gerçekleştirilen DAS-ELISA testleri açısından genel bir değerlendirme yapıldığında ise test edilen 424 örneğin 39 (%9,20)'unun ilgili virüsler açısından enfekteli olarak tespit edildiği, GLRaV-1+3'ün (%6,37) en yoğun görülen virüs olduğu bunu GLRaV-4-9 (%2,12) ve GLRaV-2 (%0,71)'nin izlediği, GLRaV-6 ve GLRaV-7 virüslerinin ise bulunmadığı belirlenmiştir. Ayrıca DAS-ELISA testlerinde GLRaV-1+3 için 30, GLRaV-2 için 46, GLRaV-4-9 için 43 ve GLRaV-6 için ise iki örneğin 405 nm dalga boyundaki spektrofotometrik okuma sonuçlarında negatif kontrolün 1,5-2 katı arasında değerler elde edilmiş olup ilgili etmenler için söz konusu örnekler spesifik primerlerle hassas tanılama amacıyla Real-time RT-PCR çalışmalarına alınmıştır.

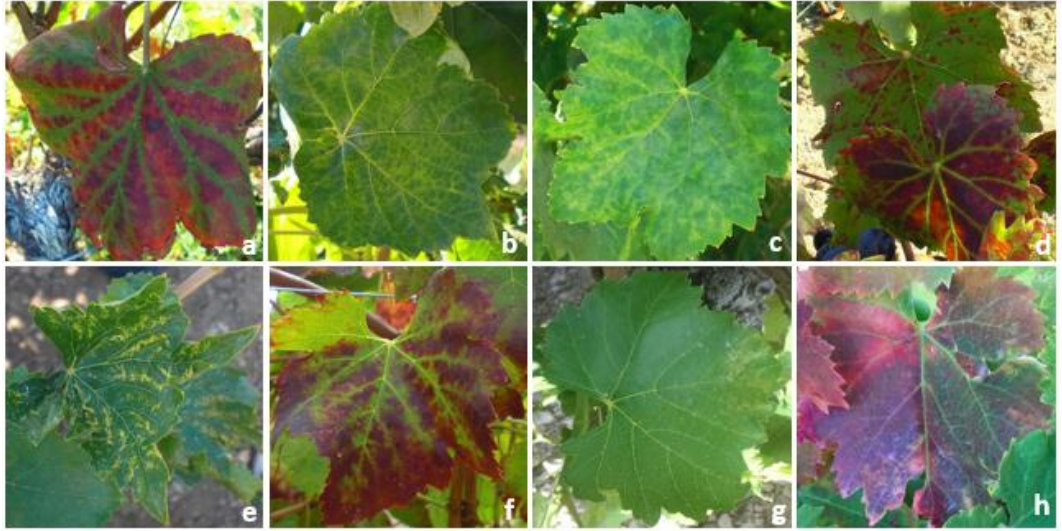
DAS-ELISA testleri sonucunda İzmir'den alınan iki örnekte ise karışık enfeksiyon tespit edilmiş olup karışık enfeksiyon saptanan örneklerle ve enfekte eden virüslere ait bilgiler Çizelge 4.2'de yer almaktadır.

Çizelge 4.2 DAS-ELISA testi sonucu saptanan karışık enfeksiyonlara ait bilgiler.

Örnek No	Alındığı İl / İlçe	Çeşit Adı	GLRaV-1+3 GLRaV-2	GLRaV-1+3 GLRaV-4-9
İ9	İzmir / Kemalpaşa	Alicante Bouschet	+	
İ37	İzmir / Menemen	Sultani Çekirdeksiz		+

GLRaV-1+3, GLRaV-2, GLRaV-4-9, GLRaV-6 ve GLRaV-7 DAS-ELISA kitleri kullanılarak gerçekleştirilen serolojik testler sonucunda enfekteli olarak tespit edilen bazı örneklerde görülen semptomlara ait fotoğraflar Şekil 4.3'te yer almaktadır.

Şekil 4.3 incelendiğinde GLRaV-1+3 ve GLRaV-2 ile enfekteli Alicante Bouschet çeşidinde ana damarlar haricinde yaprak ayasında kızarıklık (Şekil 4.3 a), GLRaV-1+3 ve GLRaV-4-9 ile enfekteli Sultani Çekirdeksiz çeşidinde yaprakta mozaik renk açılmaları (Şekil 4.3 b), GLRaV-4-9 ile enfekteli Sultani Çekirdeksiz çeşidinde yaprakta mozaik renk açılması (Şekil 4.3 c), GLRaV-2 ile enfekteli Alphonse Lavallée çeşidinde ana damarlar haricinde yaprak ayasında parçalı ve bütün kızarıklık (Şekil 4.3 d), GLRaV-1+3 ile enfekteli Sultani Çekirdeksiz çeşidinde yaprak damarları arasında düzensiz sararmalar (Şekil 4.3 e), GLRaV-1+3 ile enfekteli Syrah çeşidinde ana damarlar haricinde yaprak ayasında kızarıklık (Şekil 4.3 f), GLRaV-4-9 ile enfekteli Sultani Çekirdeksiz çeşidinde yaprak ucunda klorotik renk açılması (Şekil 4.3 g) ve GLRaV-1+3 ile enfekteli Çal Karası çeşidinde ana damarlar haricinde yaprak ayasında kızarıklık (Şekil 4.3 h) semptomları görülmektedir.



Şekil 4.3 DAS-ELISA testleri sonucu enfekteli olduğu belirlenen bazı örneklerle ait yaprak simptomları a) GLRaV-1+3 ve 2 (Alicante Bouschet) b) GLRaV-1+3 ve GLRaV-4-9 (Sultani Çekirdeksiz) c) GLRaV-4-9 (Sultani Çekirdeksiz) d) GLRaV-2 (Alphonse Lavallée) e) GLRaV-1+3 (Sultani Çekirdeksiz) f) GLRaV-1+3 (Syrah) g) GLRaV-4-9 (Sultani Çekirdeksiz) h) GLRaV-1+3 (Çal Karası).

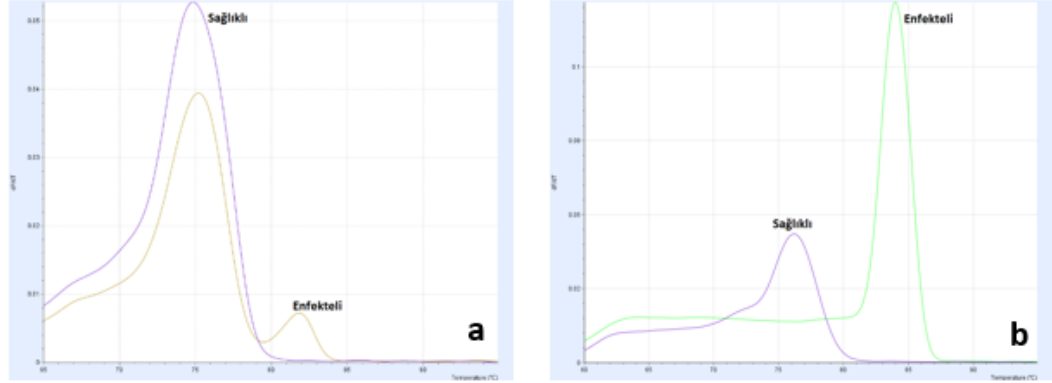
4.3 Moleküler (Real-time RT-PCR) Testlerin Sonuçları

Uygulanan DAS-ELISA testleri sonucunda enfekteli olduğu tespit edilen tüm örneklerle absorbands değerleri negatif kontrolün 1,5-2 katı arasında olan örnekler de spesifik primerler (Bkz. Çizelge 3.7) kullanılarak Real-time PCR ile test edilmiştir. Ayrıca serolojik tanı kiti bulunmayan GLRaV-Pr ve GLRaV-De virüslerinin tanısı da spesifik primerler kullanılarak Real-time PCR ile gerçekleştirilmiştir. Bunlara ek olarak tüm örnekler GLRaV-8 primeriyle de test edilmiştir.

GLRaV-1+3 DAS-ELISA kitiyle gerçekleştirilen testler sonucunda enfekteli olduğu belirlenen 27 örnek ile absorbands değerleri negatif kontrolün 1,5-2 katı arasında olan 30 örnek GLRaV-1 ve GLRaV-3 virüslerinin belirlenebilmesi amacıyla spesifik primerler (Bkz. Çizelge 3.7) kullanılarak Real-time PCR yöntemi ile test edilmiştir.

GLRaV-1 ve GLRaV-3 virüslerinin tanısı için Real-time PCR çalışmaları sırasında gerçekleştirilen melting analizi sonucunda GLRaV-1 etmeni açısından sağlıklı olduğu tespit edilen izolatların 75,5 °C’de denatüre olduğu enfekteli izolatlarda ise bu değerin 82 °C olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4 a). GLRaV-1 için

82 °C’de pik veren izolatlar enfekteli olarak değerlendirilirken bu değerin altında pik veren izolatlar ise sağlıklı olarak değerlendirilmiştir. GLRaV-3 etmeni açısından ise sağlıklı izolatların 76,5 °C’de denatüre olduğu enfekteli izolatlarda ise bu değerin 84 °C olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4 b).



Şekil 4.4 GLRaV-1 ve GLRaV-3’e ait melting analizi grafikleri a) GLRaV-1’in melting analizi grafiği b) GLRaV-3’ün melting analizi grafiği.

GLRaV-3 için 84 °C’de pik veren izolatlar enfekteli olarak değerlendirilirken bu değerin altında pik veren izolatlar ise sağlıklı olarak değerlendirilmiştir.

GLRaV-1+3 tanı kiti kullanılarak gerçekleştirilen DAS-ELISA testleri sonucunda enfekteli olarak tespit edilen örneklerin GLRaV-1 ve GLRaV-3 virüslerine ait Real-time PCR sonuçları Çizelge 4.3’te yer almaktadır.

GLRaV-1+3 DAS-ELISA tanı kiti ile enfekteli bulunan 27 örneğin 26’sının GLRaV-3 ile birinin ise hem GLRaV-1 hem de GLRaV-3 ile enfekteli olduğu belirlenmiş olup GLRaV-1 açısından tekli enfeksiyon ise tespit edilememiştir (Çizelge 4.3).

DAS-ELISA testleri sonucunda absorbans değerleri negatif kontrolün 1,5-2 katı arasında olan 30 örneğin GLRaV-1 ve GLRaV-3 için elde edilen Real-time PCR sonuçları ise Çizelge 4.4’te yer almaktadır.

Çizelge 4.3 DAS-ELISA ile GLRaV-1+3 açısından enfekteli olduğu belirlenen örneklerle ait Real-time PCR sonuçları.

İl	İlçe	Testlenen Örnek Sayısı	Enfekteli Örnek Sayısı	GLRaV-1	GLRaV-3	GLRaV-1 GLRaV-3
Manisa	Merkez	1	1	-	1	-
	Turgutlu	3	3	-	3	-
	Salihli	5	5	-	5	-
	Alaşehir	3	3	-	3	-
	Toplam	12	12	-	12	-
Denizli	Buldan	1	1	-	1	-
	Bekilli	2	2	-	2	-
	Tavas	1	1	-	1	-
	Çal	6	6	-	5	1
	Toplam	10	10	-	9	1
İzmir	Kemalpaşa	2	2	-	2	-
	Menemen	2	2	-	2	-
	Toplam	4	4	-	4	-
Uşak	Eşme	1	1	-	1	-
	Toplam	1	1	-	1	-
Genel Toplam		27	27	-	26	1

Çizelge 4.4 DAS-ELISA ile GLRaV-1+3 açısından negatif olarak tespit edilen bazı örneklerin Real-time PCR sonuçları.

İl	İlçe	Testlenen Örnek Sayısı	Enfekteli Örnek Sayısı	GLRaV-1	GLRaV-3
Manisa	Merkez	8	2	-	2
	Saruhanlı	1	1	-	1
	Alaşehir	3	2	-	2
	Toplam	12	5	-	5
Denizli	Tavas	2	-	-	-
	Çal	4	1	-	1
	Toplam	6	1	-	1
İzmir	Menderes	1	1	-	1
	Urla	2	-	-	-
	Seferihisar	2	-	-	-
	Menemen	2	1	-	1
	Toplam	7	2	-	2
Uşak	Eşme	3	-	-	-
	Toplam	3	-	-	-
Aydın	Kuşadası	2	2	1	1
	Toplam	2	2	1	1
Genel Toplam		30	10	1	9

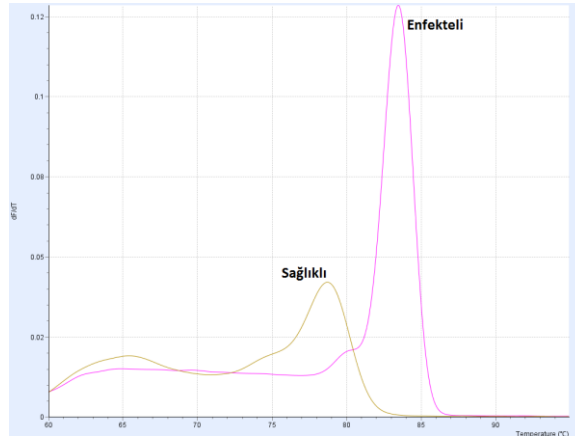
DAS-ELISA testleri sonucunda absorbands değerleri negatif kontrolün 1,5-2 katı arasında olan 30 örneğin dokuzunun GLRaV-3 ile birinin ise GLRaV-1 ile

enfekteli olduğu belirlenmiş olup söz konusu örneklerde GLRaV-1 ve GLRaV-3 açısından karışık enfeksiyon ise tespit edilememiştir (Bkz. Çizelge 4.4).

Genel bir değerlendirme yapıldığında ise GLRaV-1 ve GLRaV-3 etmenleri açısından yapılan Real-time PCR çalışmaları sonucunda testlenen 57 örneğin 35'inin GLRaV-3, 1'inin GLRaV-1, 1'inin ise GLRaV-1 ve GLRaV-3 ile enfekteli olduğu belirlenmiş olup 20 örnek ise GLRaV-1 ve GLRaV-3 virüsleri açısından sağlıklı olarak tespit edilmiştir.

GLRaV-2 DAS-ELISA tanı kiti ile enfekteli olduğu belirlenen 3 örnek ile absorbans değerleri negatif kontrolün 1,5-2 katı arasında olan 46 örnek GLRaV-2 için spesifik primerler (Bkz. Çizelge 3.7) kullanılarak Real-time PCR ile test edilmiştir.

GLRaV-2 virüsünün tanısı için Real-time PCR çalışmaları sırasında gerçekleştirilen melting analizi sonucunda sağlıklı izolatların 79 °C'de denatüre olduğu enfekteli izolatlarda ise bu değerin 84 °C olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 GLRaV-2'nin melting analizi grafiği.

GLRaV-2 için gerçekleştirilen melting analizi sonucunda 84 °C'de pik veren izolatlar enfekteli olarak değerlendirilirken bu değerin altında pik veren izolatlar ise sağlıklı olarak değerlendirilmiştir.

GLRaV-2 DAS-ELISA tanı kiti ile enfekteli olduğu belirlenen 3 örneğin tamamı Real-time PCR çalışmalarında da enfekteli olarak tespit edilmiştir. Absorbans değerleri negatif kontrolün 1,5-2 katı arasında olan 46 örneğin GLRaV-2 için elde edilen Real-time PCR sonuçları ise Çizelge 4.5'te yer almaktadır.

Çizelge 4.5 DAS-ELISA ile GLRaV-2 açısından negatif olarak tespit edilen bazı örneklerin Real-time PCR sonuçları.

İl	İlçe	Testlenen Örnek Sayısı	GLRaV-2	Sağlıklı Örnek Sayısı
Manisa	Merkez	1	-	1
	Saruhanlı	1	-	1
	Turgutlu	3	1	2
	Salihli	6	1	5
	Alaşehir	5	2	3
	Toplam	16	4	12
Denizli	Buldan	1	-	1
	Bekilli	2	-	2
	Tavas	3	-	3
	Çal	11	4	7
	Toplam	17	4	13
İzmir	Kemalpaşa	2	1	1
	Menderes	1	-	1
	Urla	1	-	1
	Menemen	5	-	5
	Toplam	9	1	8
Uşak	Eşme	4	-	4
	Toplam	4	-	4
Genel Toplam		46	9	37

DAS-ELISA testleri sonucunda absorbans değerleri negatif kontrolün 1,5-2 katı arasında olan 46 örneğin 9'unun GLRaV-2 ile enfekteli olduğu, 37 örneğin ise sağlıklı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.5).

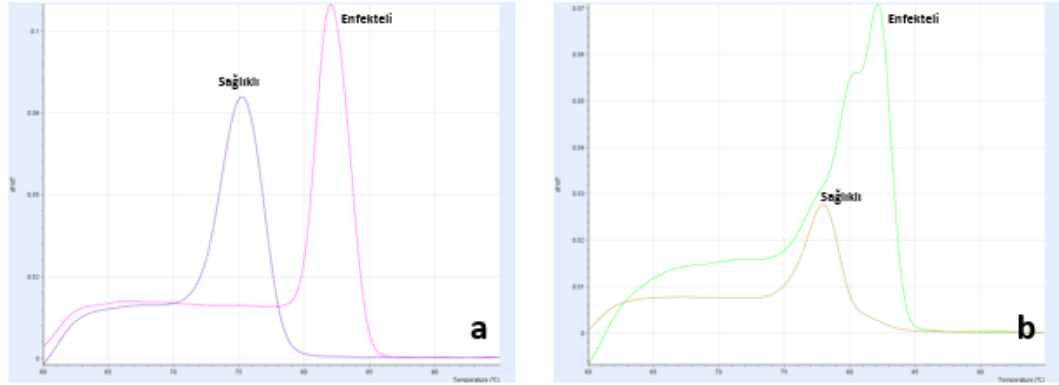
Genel bir değerlendirme yapıldığında ise GLRaV-2'nin Real-time PCR ile tanınması sonucunda testlenen 49 örneğin 12'sinin GLRaV-2 ile enfekteli olduğu, 37 örneğin ise sağlıklı olduğu belirlenmiştir.

GLRaV-4-9 DAS-ELISA kitiyle gerçekleştirilen testler sonucunda enfekteli olduğu belirlenen 9 örnek ile absorbans değerleri negatif kontrolün 1,5-2 katı arasında olan 43 örnek; GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-6, GLRaV-7 ve GLRaV-9 virüslerinin belirlenebilmesi amacıyla spesifik primerler (Bkz. Çizelge 3.7) kullanılarak Real-time PCR yöntemi ile test edilmiştir.

GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-6, GLRaV-7 ve GLRaV-9 virüslerinin tanısı için Real-time PCR çalışmaları sırasında gerçekleştirilen melting analizi sonucunda GLRaV-4 etmeni açısından sağlıklı olduğu tespit edilen izolatların 75 °C'de denatüre olduğu enfekteli izolatlarda ise bu değer 82 °C olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6 a). GLRaV-4 için 82 °C'de pik veren izolatlar enfekteli olarak

değerlendirilirken bu değerin altında pik veren izolatlar ise sağlıklı olarak değerlendirilmiştir.

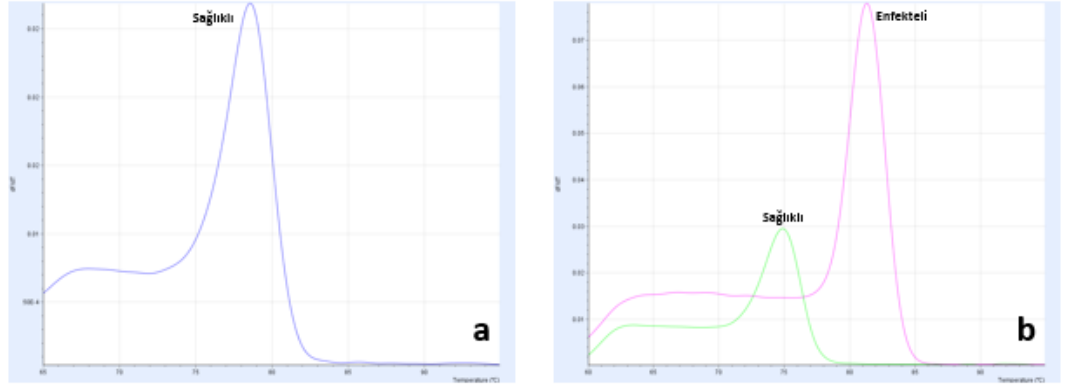
GLRaV-5 etmeni açısından ise sağlıklı izolatların 78 °C’de denatüre olduğu enfekteli izolatlarda ise bu değerin 82 °C olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6 b). GLRaV-5 için 82 °C’de pik veren izolatlar enfekteli olarak değerlendirilirken bu değerin altında pik veren izolatlar ise sağlıklı olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.6 GLRaV-4 ve GLRaV-5’e ait melting analizi grafikleri a) GLRaV-4’ün melting analizi grafiği b) GLRaV-5’in melting analizi grafiği.

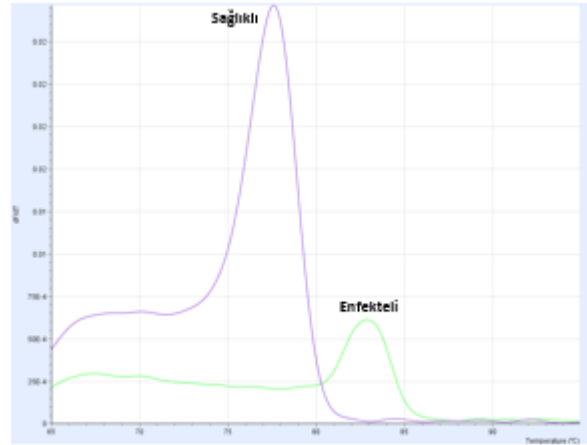
GLRaV-6 etmeni açısından sağlıklı olduğu tespit edilen izolatların 78 °C’de denatüre olduğu tespit edilmiş, GLRaV-6 ile enfekteli örnek ise tespit edilememiştir (Şekil 4.7 a).

GLRaV-7 etmeni açısından ise sağlıklı izolatların 75 °C’de denatüre olduğu enfekteli izolatlarda ise bu değerin 81,5 °C olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7 b). GLRaV-7 için 81,5 °C’de pik veren izolatlar enfekteli olarak değerlendirilirken bu değerin altında pik veren izolatlar ise sağlıklı olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.7 GLRaV-6 ve GLRaV-7'e ait melting analizi grafikleri a) GLRaV-6'ün melting analizi grafiği b) GLRaV-7'in melting analizi grafiği.

GLRaV-9 etmeni açısından ise sağlıklı izolatların 77,5 °C'de denatüre olduğu enfekteli izolatlarda ise bu değerin 83 °C olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 GLRaV-9'un melting analizi grafiği.

GLRaV-9 için 83 °C'de pik veren izolatlar enfekteli olarak değerlendirilirken bu değerin altında pik veren izolatlar ise sağlıklı olarak değerlendirilmiştir.

GLRaV-4-9 tanı kiti kullanılarak gerçekleştirilen DAS-ELISA testleri sonucunda enfekteli olarak tespit edilen örneklerin GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-6, GLRaV-7 ve GLRaV-9 virüslerine ait Real-time PCR sonuçları Çizelge 4.6'da yer almaktadır.

Çizelge 4.6 DAS-ELISA ile GLRaV-4-9 açısından enfekteli olduğu belirlenen örneklerle ait Real-time PCR sonuçları.

İl	İlçe	Testlenen Örnek Sayısı	Enfekteli Örnek Sayısı	GLRaV-4	GLRaV-5	GLRaV-6	GLRaV-7	GLRaV-9	GLRaV-4 GLRaV-9
Manisa	Saruhanlı	1	1	-	-	-	-	-	1
	Salihli	1	1	-	-	-	-	1	-
	Alaşehir	1	1	1	-	-	-	-	-
	Toplam	3	3	1	-	-	-	1	1
Denizli	Çal	3	3	3	-	-	-	-	-
	Toplam	3	3	3	-	-	-	-	-
İzmir	Kemalpaşa	1	1	1	-	-	-	-	-
	Menemen	2	2	2	-	-	-	-	-
	Toplam	3	3	3	-	-	-	-	-
Genel Toplam		9	9	7	-	-	-	1	1

GLRaV-4-9 DAS-ELISA tanı kiti ile enfekteli bulunan dokuz örneğin yedisinin GLRaV-4 ile birinin GLRaV-9 ile birinin ise hem GLRaV-4 hem de GLRaV-9 ile enfekteli olduğu belirlenmiş olup GLRaV-5, GLRaV-6 ve GLRaV-7 virüsleri ile enfekteli örnek tespit edilememiştir (Çizelge 4.6).

DAS-ELISA testleri sonucunda absorbans değerleri negatif kontrolün 1,5-2 katı arasında olan 43 örneğin GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-6, GLRaV-7 ve GLRaV-9 için elde edilen Real-time PCR sonuçları ise Çizelge 4.7’de yer almaktadır.

DAS-ELISA testleri sonucunda absorbans değerleri negatif kontrolün 1,5-2 katı arasında olan 43 örneğin ikisinin GLRaV-4, ikisinin GLRaV-9, birinin GLRaV-5 ve birinin GLRaV-7 ile enfekteli olduğu belirlenmiş olup söz konusu örneklerde GLRaV-6 ve karışık enfeksiyon tespit edilememiştir (Çizelge 4.7).

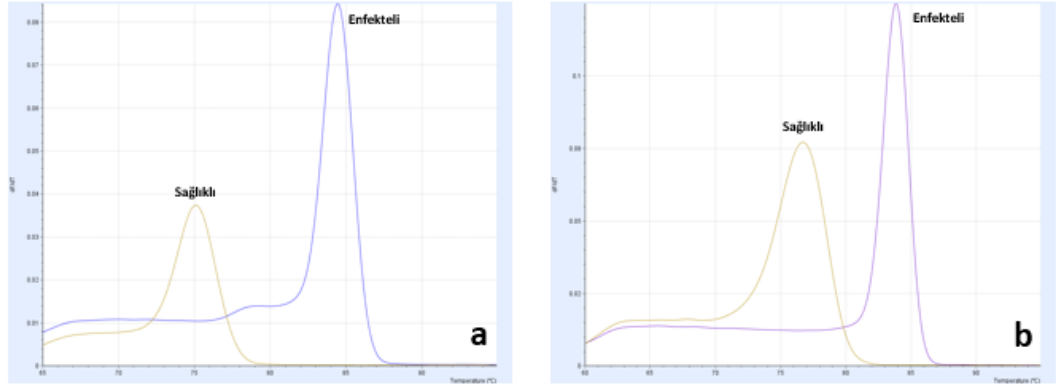
Genel bir değerlendirme yapıldığında ise GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-6, GLRaV-7 ve GLRaV-9 etmenleri açısından yapılan Real-time PCR çalışmaları sonucunda testlenen 52 örneğin dokuzunun GLRaV-4, üçünün GLRaV-9, birinin GLRaV-5; birinin GLRaV-7 ve birinin ise hem GLRaV-4 hem de GLRaV-9 ile enfekteli olduğu belirlenmiş olup GLRaV-6 açısından enfekteli örnek tespit edilememiştir. Real-time PCR çalışmaları sonucunda 37 örnek ise söz konusu virüsler açısından sağlıklı olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7 DAS-ELISA ile GLRaV-4-9 açısından negatif olarak tespit edilen bazı örneklerin Real-time PCR sonuçları.

İl	İlçe	Testlenen Örnek Sayısı	Enfekteli Örnek Sayısı	GLRaV-4	GLRaV-5	GLRaV-6	GLRaV-7	GLRaV-9
Manisa	Merkez	8	1	1	-	-	-	-
	Turgutlu	3	-	-	-	-	-	-
	Salihli	5	1	1	-	-	-	-
	Alaşehir	4	1	-	-	-	-	1
	Toplam	20	3	2	-	-	-	1
Denizli	Buldan	1	-	-	-	-	-	-
	Bekilli	2	-	-	-	-	-	-
	Tavas	3	1	-	1	-	-	-
	Çal	9	1	-	-	-	-	1
	Toplam	15	2	-	1	-	-	1
İzmir	Kemalpaşa	2	-	-	-	-	-	-
	Menderes	1	1	-	-	-	1	-
	Menemen	2	-	-	-	-	-	-
	Toplam	5	1	-	-	-	1	-
Uşak	Eşme	2	-	-	-	-	-	-
	Karahallı	1	-	-	-	-	-	-
	Toplam	3	-	-	-	-	-	-
Genel Toplam		43	6	2	1	-	1	2

Sörvey çalışması sonucunda toplanan tüm örnekler serolojik tanı kiti bulunmayan GLRaV-Pr ve GLRaV-De virüslerinin belirlenebilmesi amacıyla spesifik primerler (Bkz. Çizelge 3.7) kullanılarak Real-time PCR yöntemi ile test edilmiştir.

GLRaV-Pr ve GLRaV-De virüslerinin tanısı için Real-time PCR çalışmaları sırasında gerçekleştirilen melting analizi sonucunda GLRaV-Pr virüsünün tanısı için Real-time PCR çalışmaları sırasında gerçekleştirilen melting analizi sonucunda sağlıklı izolatların 75 °C’de denatüre olduğu enfekteli izolatlarda ise bu değerin 84,5 °C olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9 a). GLRaV-Pr için gerçekleştirilen melting analizi sonucunda 84,5 °C’de pik veren izolatlar enfekteli olarak değerlendirilirken bu değerin altında pik veren izolatlar ise sağlıklı olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.9 GLRaV-Pr ve GLRaV-De'ye ait melting analizi grafikleri a) GLRaV-Pr'nin melting analizi grafiği b) GLRaV-De'nin melting analizi grafiği.

GLRaV-De virüsünün tanısı için Real-time PCR çalışmaları sırasında gerçekleştirilen melting analizi sonucunda sağlıklı izolatların 77 °C'de denatüre olduğu enfekteli izolatlarda ise bu değer 84 °C olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9 b). GLRaV-De için gerçekleştirilen melting analizi sonucunda 84 °C'de pik veren izolatlar enfekteli olarak değerlendirilirken bu değer altında pik veren izolatlar ise sağlıklı olarak değerlendirilmiştir.

GLRaV-Pr ve GLRaV-De virüslerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen Real-time PCR testlerinin sonuçları Çizelge 4.8'de yer almaktadır. Çizelge 4.8 incelendiğinde gerçekleştirilen Real-time PCR çalışmaları sonucunda test edilen 424 örneğin 71'inin GLRaV-Pr, 51'inin ise GLRaV-De virüsleri ile enfekteli olduğu anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.8 GLRaV-Pr ve GLRaV-De virüslerine ait Real-time PCR sonuçları.

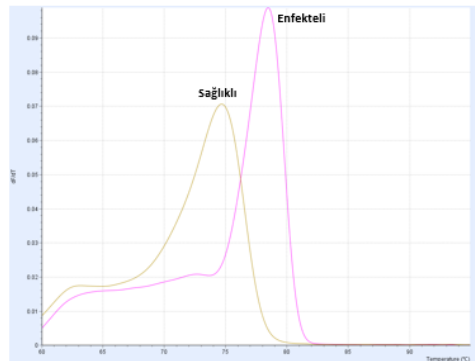
İl	İlçe	Testlenen Örnek Sayısı	GLRaV-Pr	GLRaV-De
Manisa	Merkez	36	3	1
	Saruhanlı	27	4	7
	Turgutlu	32	3	8
	Salihli	36	12	10
	Alaşehir	68	15	9
	Sarıgöl	28	2	1
	Toplam	227	39	36
Denizli	Buldan	12	3	-
	Güney	12	-	-
	Bekilli	12	5	-
	Tavas	13	1	-
	Çal	77	16	12
	Toplam	126	25	12

Çizelge 4.8 (devam)

İl	İlçe	Testlenen Örnek Sayısı	GLRaV-Pr	GLRaV-De
İzmir	Kemalpaşa	15	3	-
	Torbalı	3	-	-
	Menderes	7	1	-
	Urla	4	-	-
	Çeşme	2	-	-
	Seferihisar	5	1	-
	Menemen	8	1	1
	Selçuk	1	-	-
	Toplam	45	6	1
Uşak	Eşme	9	1	2
	Ulubey	1	-	-
	Karahallı	5	-	-
	Toplam	15	1	2
Aydın	Kuşadası	8	-	-
	Sultanhisar	3	-	-
	Toplam	11	-	-
Genel Toplam		424	71	51

Son yapılan taksonomik sınıflandırma sonucunda asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili olarak kabul edilen virüslerin yanında sörvey çalışması sonucunda toplanan tüm örnekler GLRaV-8 primeri (Bkz. Çizelge 3.7) kullanılarak da Real-time PCR yöntemi ile test edilmiştir.

GLRaV-8 primeri kullanılarak gerçekleştirilen Real-time PCR çalışmalarında GLRaV-8 primeriyle reaksiyon vermeyen örneklerin 74,5 °C’de denatüre olduğu GLRaV-8 primeriyle pozitif sonuç veren örneklerde ise bu değerin 78,5 °C olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.10). GLRaV-8 primeri kullanılarak gerçekleştirilen Real-time PCR çalışmaları sırasında gerçekleştirilen melting analizi sonucunda 78,5 °C’de pik veren izolatlar GLRaV-8 pozitif olarak değerlendirilirken bu değerin altında pik veren izolatlar ise GLRaV-8 negatif olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4.10 GLRaV-8 primeriyle gerçekleştirilen Real-time PCR çalışmasına ait melting analizi grafiği.

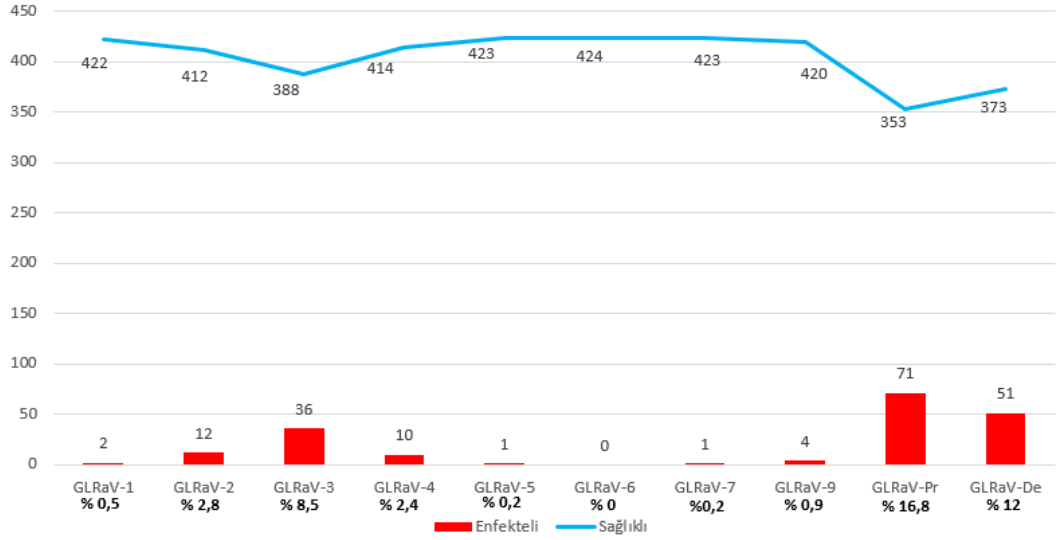
GLRaV-8 primeri kullanılarak gerçekleştirilen Real-time PCR çalışmaları sonucunda testlenen 424 örneğin 322'sinin GLRaV-8 primeri ile pozitif sonuç verdiği 102 örneğin ise söz konusu primerle negatif sonuç verdiği belirlenmiştir. Ayrıca GLRaV-8 primerinin pozitif sonuç verdiği asma örnekleri simptomatolojik açıdan değerlendirildiğinde simptom gözlenen asmaların yanında simptom gözlenmeyen 24 asma örneğinin 16'sında tek başına, üçünde GLRaV-De virüsüyle ikisinde ise GLRaV-Pr virüsü ile birlikte tespit edilmiştir. Pozitif sonuç veren örneklerde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler açısından karışık enfeksiyonların görülme durumu incelendiğinde ise söz konusu örneklerden 213 tanesinin sadece GLRaV-8 primeri ile pozitif sonuç verdiği, 109 örnekte ise asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerle tekli ve çoklu enfeksiyonların görüldüğü belirlenmiştir.

GLRaV-8 primeri ile pozitif bulunan örneklerin 42'sinde GLRaV-Pr, 33'ünde GLRaV-De, beşinde GLRaV-3, ikisinde GLRaV-4 ve birinde ise GLRaV-2 virüsleri saptanmıştır.

Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler tarafından oluşturulan çoklu enfeksiyonlarda GLRaV-8 primerinin pozitif sonuç verme durumu incelendiğinde ise ikili enfeksiyonlarda 11 örnekte GLRaV-Pr, -De; beş örnekte GLRaV-3, -Pr; iki örnekte GLRaV-2, -3 ve birer örnekte GLRaV-2, -Pr; GLRaV-3, -De ve GLRaV-9, -Pr virüsleri ile birlikte GLRaV-8 primeri ile de pozitif sonuç elde edilmiştir. Üçlü enfeksiyonlarda ise birer örnekte GLRaV-1, -3, -9; GLRaV-2, -3, -4; GLRaV-2, -3, -De; GLRaV-3, -4, -9 ve GLRaV-3, -4, -Pr virüsleri ile birlikte GLRaV-8 primerinin de pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir.

GLRaV-8 primeriyle pozitif olarak belirlenen örneklerin elde edildiği çeşitlerle ilgili bir değerlendirme yapıldığında ise sörvey çalışması sırasında 24 farklı çeşitten toplanan örneklerden (Bkz. Çizelge 3.5) Fantasy Seedless, Kalecik Karası, Macabeu, Pembe Salman ve Pinot Noir çeşitlerine ait hiçbir örneğin GLRaV-8 primeriyle pozitif sonuç vermediği, bunların dışındaki 19 farklı çeşitten alınan örneklerden Boğazkere, Superior Seedless, Cardinal, Foça Karası, Michele Palieri, Royal ve Sauvignon Blanc çeşitlerine ait örneklerin tamamının GLRaV-8 primeriyle pozitif sonuç verdiği, diğer 12 çeşide ait örneklerin ise bazılarının GLRaV-8 primeriyle pozitif sonuç verdiği, bazılarının ise GLRaV-8 primeriyle pozitif sonuç vermediği tespit edilmiştir.

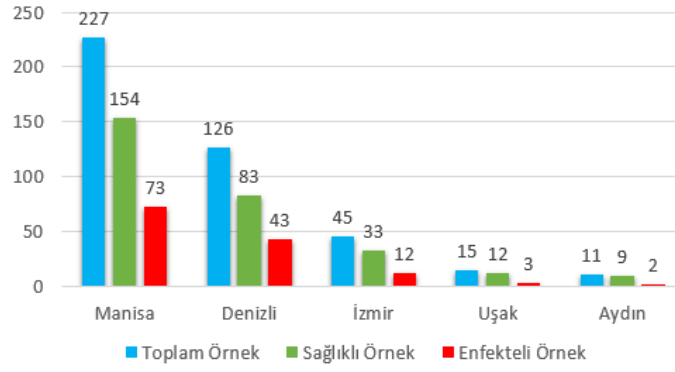
Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler açısından gerçekleştirilen Real-time PCR yöntemi sonuçlarına göre karışık enfeksiyonlar dikkate alınmadan genel bir değerlendirme yapıldığında GLRaV-Pr'nin %16,8'lik bulunma durumuyla en yaygın virüs olduğu belirlenmiştir. Bunu GLRaV-De (%12), GLRaV-3 (%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) belirtilen oranlarda izlemiş, GLRaV-6 açısından ise enfekteli örnek tespit edilememiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 Real-time PCR yöntemi genel sonuçları.

Real-time PCR yöntemi sonuçlarına göre testlenen 424 örneğin 133 (%31,4)'ünün asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerden en az biri ile enfekteli olduğu belirlenmiş olup 291 örnekte (%68,6) ise hastalıkla ilişkili virüslere rastlanılmamıştır. Bununla birlikte enfekteli olduğu saptanan 133 örneğin 109'unun semptomlu, altısının semptomsuz asmalardan olmak üzere 115'inin beyaz üzüm çeşitlerine, 18 semptomlu örneğin ise renkli üzüm çeşitlerine ait olduğu ve renkli üzüm çeşitlerine ait semptomsuz asmalarda hastalıkla ilişkili virüslerin saptanmadığı belirlenmiştir. Buna karşın hastalıkla ilişkili virüsler açısından sağlıklı olduğu belirlenen 291 örneğin 192'sinin semptomlu, 13'ünün semptomsuz asmalardan olmak üzere 205'inin beyaz üzüm çeşitlerine, 82'sinin semptomlu ve dördünün ise semptomsuz asmalardan olmak üzere 86'sının da renkli üzüm çeşitlerine ait olduğu tespit edilmiştir.

Manisa, Denizli, İzmir, Uşak ve Aydın illerinden toplanan örneklerin asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler açısından enfeksiyon durumları ise Şekil 4.12'de yer almaktadır.



Şekil 4.12 İllere göre toplanan örneklerdeki GLRaVs enfeksiyon sayıları.

Şekil 4.12 incelendiğinde Manisa'dan alınan 227 örneğin 73 (%32,2)'ünün, Denizli'den alınan 126 örneğin 43 (% 34,1)'ünün, İzmir'den alınan 45 örneğin 12 (%26,7)'sinin, Uşak'tan alınan 15 örneğin üç (%20)'ünün ve Aydın'dan alınan 11 örneğin iki (%18,2)'sinin asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerden en az biri ile enfekteli olduğu anlaşılmaktadır.

İllere göre asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler ve bu virüslerin bulunma durumları değerlendirildiğinde Manisa ilinin tüm ilçelerinde hastalıkla ilişkili virüslerin neden olduğu enfeksiyonların tespit edildiği görülmektedir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9 Manisa ilinde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin Real-time PCR yöntemine göre bulunma durumu.

İlçeler	Enfekteli / Testlenen Örnek Sayısı	Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler (GLRaVs)													
		-2	-3	-Pr	-De	-2, -3	-3, -Pr	-9, -Pr	-Pr, -De	-2, -3, -De	-3, -4, -9	-3, -4, -Pr	-3, -9, -Pr	-3, -4, -Pr, -De	-2, -3, -4, -Pr, -De
Merkez	5 / 36	1	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1	-
Saruhanlı	11 / 27	-	-	3	6	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-
Turgutlu	11 / 32	-	2	1	5	-	-	-	2	1	-	-	-	-	-
Salihli	21 / 36	-	2	5	6	1	1	1	4	-	-	1	-	-	-
Alaşehir	23 / 68	-	1	11	6	-	1	-	1	1	-	-	1	-	1
Sarıgöl	2 / 28	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Toplam	73 / 227	1	6	22	23	1	3	1	9	2	1	1	1	1	1

Ayrıca il genelinde hastalıkla ilişkili virüsler tarafından oluşturulan tekli enfeksiyonların yanında ikili, üçlü, dördü ve beşli enfeksiyonlar da belirlenmiştir. Manisa genelinde belirlenen virüs enfeksiyonları açısından bir değerlendirme

yapıldığında ise GLRaV-De'nin %10,1'lik enfeksiyon oranı ile en yaygın virüs olduğu bunu GLRaV-Pr (%9,7), GLRaV-Pr, -De (%4), GLRaV-3 (%2,6), GLRaV-3,-Pr (%1,3), GLRaV-2,-3,-De (%0,9) ve birer enfekteli örnekle diğer virüslerin neden olduğu tekli ve karışık enfeksiyonların izlediği anlaşılmaktadır (Bkz. Çizelge 4.9).

Manisa ilinde virüs enfeksiyonlarının bulunma durumları açısından ilçelere göre bir değerlendirme yapıldığında ise Alaşehir (%10,1)'in ilk sırada yer aldığı bunu Salihli (%9,3), Saruhanlı ve Turgutlu (%4,9), Merkez (%2,2) ve Sarıgöl (%0,9) ilçelerinin izlediği belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.9).

Manisa ilinde görülen karışık enfeksiyonlar açısından ilçelere göre bir değerlendirme yapıldığında ise Salihli (%38,1)'nin ilk sırada yer aldığı bunu Alaşehir (%23,8), Turgutlu (%14,3), Saruhanlı ve Merkez (%9,5) ile Sarıgöl (%4,8)'ün izlediği belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.9).

Denizli ilinde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen Real-time PCR yöntemi test sonuçları Çizelge 4.10'da yer almaktadır.

Çizelge 4.10 Denizli ilinde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin Real-time PCR yöntemine göre bulunma durumu.

İlçeler	Enfekteli / Testlenen Örnek Sayısı	Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler (GLRaVs)											
		-3	-4	-Pr	-De	-2,-3	-2,-Pr	-3,-5	-3,-Pr	-Pr,-De	-1,-3,-9	-2,-3,-4	-2,-3,-De
Buldan	3 / 12	-	-	2	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Güney	0 / 12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bekilli	6 / 12	1	-	4	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Tavas	2 / 13	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Çal	32 / 77	1	2	11	9	1	1	-	2	2	1	1	1
Toplam	43 / 126	2	2	18	9	1	1	1	4	2	1	1	1

Çizelge 4.10 incelendiğinde il genelinde hastalıkla ilişkili virüsler tarafından oluşturulan tekli enfeksiyonların yanında ikili ve üçlü enfeksiyonların da tespit edildiği görülmektedir. Denizli genelinde belirlenen virüs enfeksiyonları açısından bir değerlendirme yapıldığında ise GLRaV-Pr (%14,3) en yaygın virüs olarak belirlenmiş olup bunu %7,1 ile GLRaV-De, %3,2 ile GLRaV-3, -Pr, %1,6 ile GLRaV-3, GLRaV-4 ve GLRaV-Pr,-De ve birer enfekteli örnekle diğer virüslerin neden olduğu karışık enfeksiyonlar izlemiştir.

Denizli ilinde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüs enfeksiyonlarının bulunma durumları açısından ilçelere göre bir değerlendirme yapıldığında ise Çal (%25,4)'ın ilk sırada yer aldığı bunu Bekilli (%4,8), Buldan (%2,4) ve Tavas (%1,6) ilçelerinin izlediği belirlenmiştir. Güney ilçesinden toplanan örneklerde ise hastalıkla ilişkili virüsler açısından herhangi bir enfeksiyona rastlanılmamıştır (Bkz. Çizelge 4.10).

Denizli ilinde görülen karışık enfeksiyonlar açısından ilçelere göre bir değerlendirme yapıldığında ise Çal (%75)'in ilk sırada yer aldığı bunu %8,3 ile Buldan, Bekilli ve Tavas'ın izlediği belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.10).

İzmir ilinde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen Real-time PCR yöntemi test sonuçları Çizelge 4.11'de yer almaktadır.

Çizelge 4.11 İzmir ilinde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin Real-time PCR yöntemine göre bulunma durumu.

İlçeler	Enfekteli / Testlenen Örnek Sayısı	Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler (GLRaVs)						
		-3	-4	-Pr	-2, -3	-3, -4	-2, -3, -7	-3, -4, -Pr, -De
Kemalpaşa	6 / 15	-	1	3	2	-	-	-
Torbalı	0 / 3	-	-	-	-	-	-	-
Menderes	2 / 7	-	-	1	-	-	1	-
Urla	0 / 4	-	-	-	-	-	-	-
Çeşme	0 / 2	-	-	-	-	-	-	-
Seferihisar	1 / 5	-	-	1	-	-	-	-
Menemen	3 / 8	1	-	-	-	1	-	1
Selçuk	0 / 1	-	-	-	-	-	-	-
Toplam	12 / 45	1	1	5	2	1	1	1

Çizelge 4.11 incelendiğinde il genelinde hastalıkla ilişkili virüsler tarafından oluşturulan tekli enfeksiyonların yanında ikili, üçlü ve dörtlü enfeksiyonların da tespit edildiği görülmektedir. Test edilen örneklerde GLRaV-Pr (%11,1) il genelinde en yaygın görülen virüs olarak belirlenmiş olup bunu GLRaV-2, -3 (%4,4) ve birer enfekteli örnekle diğer virüslerin neden olduğu tekli ve karışık enfeksiyonlar izlemiştir.

İzmir ilinde hastalıkla ilişkili virüs enfeksiyonlarının bulunma durumları açısından ilçelere göre bir değerlendirme yapıldığında ise Kemalpaşa (%13,3)'nın

ilk sırada yer aldığı bunu Menemen (%6,7), Menderes (%4,4) ve Seferihisar (%2,2) ilçelerinin izlediği belirlenmiştir. Torbalı, Urla, Çeşme ve Selçuk ilçelerinden toplanan örneklerde ise hastalıkla ilişkili virüslerle ilgili herhangi bir enfeksiyona rastlanılmamıştır. İzmir ilinde görülen karışık enfeksiyonlar açısından ilçelere göre bir değerlendirme yapıldığında ise %40 ile Kemalpaşa ve Menemen'in ilk sırada yer aldığı bunu Menderes (%20)'in izlediği belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.11).

Uşak ilinde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen Real-time PCR yöntemi test sonuçları Çizelge 4.12'de yer almaktadır.

Çizelge 4.12 Uşak ilinde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin Real-time PCR yöntemine göre bulunma durumu.

İlçeler	Enfekteli / Testlenen Örnek Sayısı	Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler (GLRaVs)		
		-Pr	-De	-3, -De
Eşme	3 / 9	1	1	1
Ulubey	0 / 1	-	-	-
Karahallı	0 / 5	-	-	-
Toplam	3 / 15	1	1	1

Uşak ilinde hastalıkla ilişkili virüs enfeksiyonlarının bulunma durumları açısından ilçelere göre bir değerlendirme yapıldığında %20'lik enfeksiyon oranıyla Eşme, hastalıkla ilişkili virüslerin tespit edildiği tek ilçe olurken enfekteli olarak belirlenen üç örneğin ikisinde GLRaV-Pr ve GLRaV-De tarafından oluşturulan tekli enfeksiyonun, bir örnekte ise GLRaV-3, -De tarafından oluşturulan ikili enfeksiyonun saptandığı belirlenmiştir (Çizelge 4.12).

Aydın ilinde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen Real-time PCR yöntemi test sonuçları Çizelge 4.13'te yer almaktadır.

Çizelge 4.13 Aydın ilinde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin Real-time PCR yöntemine göre bulunma durumu.

İlçeler	Enfekteli / Testlenen Örnek Sayısı	Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler (GLRaVs)	
		-1	-3
Kuşadası	2 / 8	1	1
Sultanhisar	0 / 3	-	-
Toplam	2 / 11	1	1

Aydın ilinde hastalıkla ilişkili virüs enfeksiyonlarının bulunma durumları açısından ilçelere göre bir değerlendirme yapıldığında %18,2'lik enfeksiyon oranıyla Kuşadası, hastalıkla ilişkili virüslerin tespit edildiği tek ilçe olurken enfekteli olarak belirlenen iki örnekte GLRaV-1 ve GLRaV-3 tarafından oluşturulan tekli enfeksiyonun saptandığı belirlenmiş olup karışık enfeksiyona ise rastlanılmamıştır (Bkz. Çizelge 4.13).

Ege Bölgesi genelinde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler tarafından oluşturulan tekli ve karışık enfeksiyon sayılarıyla ilgili bir değerlendirme yapıldığında ise testlenen 424 örneğin 94 (%22,2)'ünün bir, 39 (%9,2)'unun ise birden fazla virüsle enfekteli olduğu belirlenmiştir. Karışık enfeksiyon tespit edilen 39 örnek içerisinde bir değerlendirme yapıldığında ise örneklerin 27 (%69,2)'sinin iki, dokuz (%23,1)'unun üç, iki (%5,1)'sinin dört ve bir (% 2,6)'inin ise hastalıkla ilişkili beş farklı virüsle enfekteli olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.14).

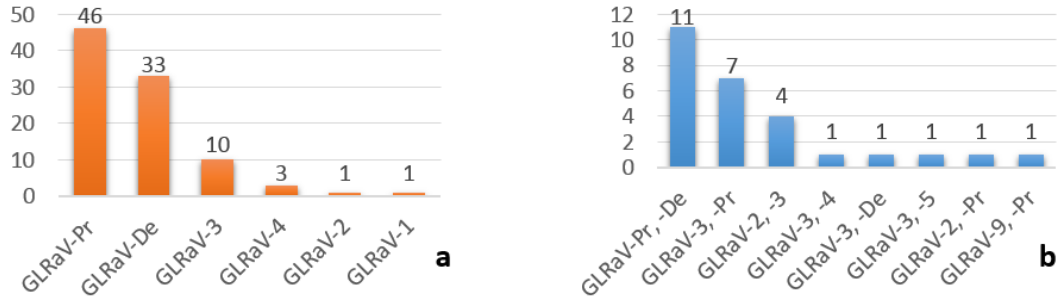
İllere göre testlenen toplam örnek sayıları içinde çoklu enfeksiyonlar değerlendirildiğinde ise İzmir (%11,1)'in ilk sırada yer aldığı bunu Denizli (%9,5), Manisa (%9,3) ve Uşak (%6,7)'in izlediği belirlenmiş olup Aydın ilinde ise karışık enfeksiyona rastlanılmamıştır (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14 Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler tarafından oluşturulan tekli ve çoklu enfeksiyon sayıları.

İlçe	Testlenen Örnek Sayısı	Enfekteli Örnek Sayısı	Enfeksiyon Sayısı				
			Tekli	İkili	Üçlü	Dörtlü	Beşli
Manisa	227	73	52	14	5	1	1
Denizli	126	43	31	9	3	-	-
İzmir	45	12	7	3	1	1	-
Uşak	15	3	2	1	-	-	-
Aydın	11	2	2	-	-	-	-
Toplam	424	133	94	27	9	2	1

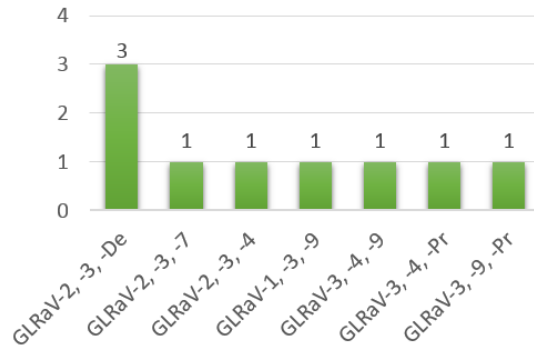
Bölge genelinde virüsler bazında oluşturulan enfeksiyonlar değerlendirildiğinde ise tekli enfeksiyonların altı farklı etmen tarafından gerçekleştirildiği ve GLRaV-Pr'nin 46 örnekte tekli enfeksiyona neden olarak ilk sırada yer aldığı, bunu GLRaV-De, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-2 ve GLRaV-1'in izlediği belirlenmiştir (Şekil 4.13 a).

İkili enfeksiyonların ise yedi farklı virüsün neden olduğu sekiz farklı kombinasyon tarafından gerçekleştirildiği ve bu kombinasyonlar arasında GLRaV-Pr, -De kombinasyonunun 11 örnekte ikili enfeksiyona neden olarak ilk sırada yer aldığı, bunu GLRaV-3, -Pr; GLRaV-2, -3; GLRaV-3, -4; GLRaV-3, -De; GLRaV-3, -5; GLRaV-2, -Pr ve GLRaV-9, -Pr virüslerinin izlediği tespit edilmiştir (Şekil 4.13 b).



Şekil 4.13 Tekli ve ikili enfeksiyonlara neden olan asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler
a) Tekli enfeksiyonlara neden olan virüsler b) İkili enfeksiyonlara neden olan virüsler.

Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler tarafından oluşturulan üçlü enfeksiyonların ise sekiz farklı virüsün neden olduğu yedi farklı kombinasyon tarafından gerçekleştirildiği tespit edilmiştir. Bu kombinasyonlar içerisinde GLRaV-2, -3, -De kombinasyonunun üç örnekte üçlü enfeksiyona neden olarak ilk sırada yer aldığı, bunu GLRaV-2, -3, -7; GLRaV-2, -3, -4; GLRaV-1, -3, -9; GLRaV-3, -4, -9; GLRaV-3, -4, -Pr ve GLRaV-3, -9, -Pr virüslerinin izlediği belirlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 Üçlü enfeksiyonlara neden olan asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler.

Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler tarafından iki örnekte ortaya çıkan dörtlü enfeksiyonun GLRaV-3, -4, -Pr, -De; bir örnekte görülen beşli

enfeksiyonun ise GLRaV-2, -3, -4, -Pr, -De virüsleri tarafından oluşturulduğu belirlenmiştir.

4.4 Biyolojik Testlerin Sonuçları

4.4.1 Otsu bitkilere yapılan mekanik inokulasyon sonuçları

Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen DAS-ELISA ve Real-time RT-PCR tanı yöntemleri sonucunda söz konusu virüslerle enfekteli olduğu tespit edilen örnekler arasından seçilen ve detayları Çizelge 4.15'te yer alan 13 izolat, otsu indikatörlerin gelişme durumları dikkate alınarak mekanik inokulasyon ile inokule edilmiştir.

Çizelge 4.15 Mekanik inokulasyon amacıyla seçilen izolatlara ait bilgiler.

İzolat No	Lokasyon İl / İlçe	Çeşit	Tespit Edilen Virüsler ve GLRaV-8 Primeriyle Reaksiyon Durumu
M-12	Manisa / Merkez	Alphonse Lavallée	GLRaV-2 / GLRaV-8 Pozitif
B-21	Manisa / Turgulu	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-2, -3, -De / GLRaV-8 Pozitif
C-31	Manisa / Salihli	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-3, -4, -Pr / GLRaV-8 Pozitif
D-12	Manisa / Alaşehir	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-3, -9, -Pr
D-24	Manisa / Alaşehir	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-2, -3, -4, -Pr, -De
O-8	Denizli / Bekilli	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-3, -Pr
R-10	Denizli / Çal	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-2, -3, -4 / GLRaV-8 Pozitif
R-23	Denizli / Çal	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-2, -Pr / GLRaV-8 Pozitif
R-75	Denizli / Çal	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-De / GLRaV-8 Pozitif
İ-9	İzmir / Kemalpaşa	Alicante Bouschet	GLRaV-2, -3 / GLRaV-8 Pozitif
İ-37	İzmir / Menemen	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-3, -4, -Pr, -De
U-5	Uşak / Eşme	Alphonse Lavallée	GLRaV-De / GLRaV-8 Pozitif
U-6	Uşak / Eşme	Syrah	GLRaV-3, -De / GLRaV-8 Pozitif

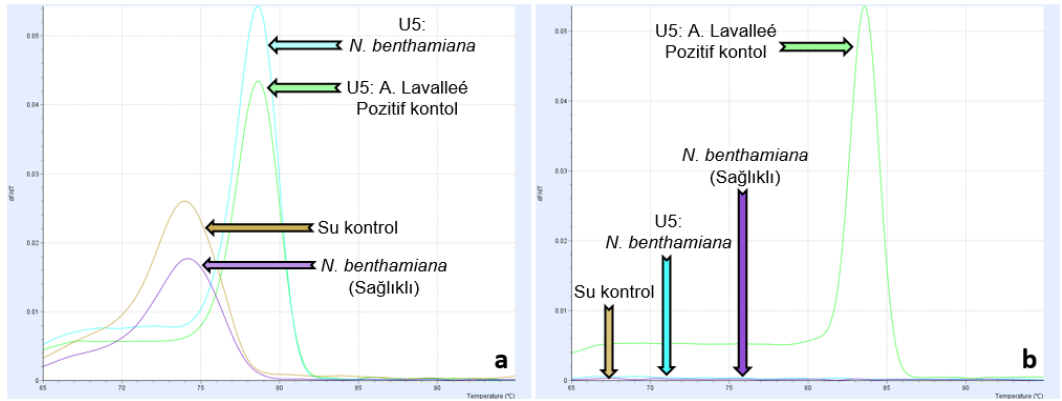
Mekanik inokulasyondan 13 gün sonra otsu indikatörlerde yapılan kontrollerde GLRaV-De virüsünü içeren ve GLRaV-8 primeriyle de pozitif sonuç veren U-5 numaralı izolatın inokule edildiği dört *N. benthamiana* indikatörünün üçünde klorotik halkalı leke belirtilerinin ortaya çıktığı gözlenmiştir (Şekil 4.15).

N. benthamiana indikatöründe U-5 numaralı izolat tarafından oluşturulan belirtilerin etmenini belirlemek amacıyla belirtil gözlenen *N. benthamiana* indikatörü ile sağlıklı *N. benthamiana*'dan alınan yaprak örneklerinden total RNA ve cDNA'lar elde edildikten sonra GLRaV-De virüsüne ait primerler ve GLRaV-8 primerleri (Bkz. Çizelge 3.7) kullanılarak Real-time PCR yöntemi ile test edilmiştir.



Şekil 4.15 U-5 numaralı izolat ve negatif kontrolün mekanik inokulasyon sonuçları a), b), c) U-5 numaralı izolatın *N. benthamiana* otsu indikatörünün yapraklarında neden olduğu klorotik halkalı leke belirtileri d) Fosfat tampon çözeltisi uygulanan sağlıklı *N. benthamiana*.

Real-time PCR testleri sonucunda gerçekleştirilen melting analizlerinde U-5 numaralı izolatın inokule edildiği *N. benthamiana* indikatörünün GLRaV-8 primeri ile pozitif sonuç verdiği tespit edilirken (Şekil 4.16 a), aynı örnekte GLRaV-De virüsü tespit edilememiştir (Şekil 4.16 b). Mekanik inokulasyon ve ardından gerçekleştirilen Real-time PCR çalışmaları sonucunda GLRaV-8 primeri ile hem inokulasyonda kullanılan ana bitkide (U-5: Alphonse Lavallée) hem de indikatör bitkide (*N. benthamiana*) GLRaV-8 primeriyle pozitif sonuç elde edildiği buna karşın negatif kontrol olarak kullanılan indikatör bitkide (*N. benthamiana*) GLRaV-8 primeriyle sonuç alınamadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.16 U-5 numaralı izolatın inokule edildiği *N. benthamiana*'da gerçekleştirilen Real-time PCR'a ait melting analizi grafikleri a) GLRaV-8'in melting analizi grafiği b) GLRaV-De'nin melting analizi grafiği.

Otsu indikatörlere gerçekleştirilen mekanik inokulasyonlar sonucunda U-5 numaralı izolatın diğer indikatör bitkilerinde ve inokulasyonu yapılan diğer 12 izolata ait indikatör bitkilerde ise herhangi bir symptom tespit edilememiştir.

Mekanik inokulasyon çalışmaları sonucunda GLRaV-De virüsünün asmadan *N. benthamiana*'ya taşınmadığı saptanmıştır.

4.4.2 Odunsu bitkilere yapılan biyolojik indekslemelerin sonuçları

Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen DAS-ELISA ve Real-time PCR tanı yöntemleri sonucunda söz konusu virüslerle enfekteli olduğu tespit edilen örnekler arasından seçilen ve detayları Çizelge 4.16'da yer alan 25 izolat, Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü indikatör parselinde bulunan odunsu indikatörler (Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon ve Pinot Noir)'den alınan kalemlere omega aşısı ile aşılanarak tüplü fidan olarak dikilmiştir.

Çizelge 4.16 Biyolojik indeksleme amacıyla seçilen izolatlara ait bilgiler.

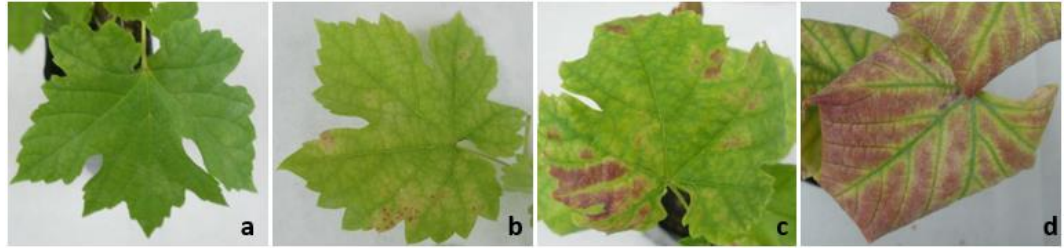
İzolat No	Lokasyon İl / İlçe	Çeşit	Tespit Edilen Virüsler ve GLRaV-8 Primeriyle Reaksiyon Durumu
M-12	Manisa / Merkez	Alphonse Lavallée	GLRaV-2 / GLRaV-8 Pozitif
M-21	Manisa / Merkez	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-3, -4, -Pr, -De
B-21	Manisa / Turgulu	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-2, -3, -De / GLRaV-8 Pozitif
B-23	Manisa / Turgulu	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-3
C-29	Manisa / Salihli	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-2, -3
C-31	Manisa / Salihli	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-3, -4, -Pr / GLRaV-8 Pozitif
D-11	Manisa / Alaşehir	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-3, -Pr / GLRaV-8 Pozitif
D-12	Manisa / Alaşehir	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-3, -9, -Pr
D-24	Manisa / Alaşehir	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-2, -3, -4, -Pr, -De
D-26	Manisa / Alaşehir	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-2, -3, -De
L-6	Denizli / Buldan	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-3, -Pr / GLRaV-8 Pozitif
O-8	Denizli / Bekilli	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-3, -Pr
P-3	Denizli / Tavas	Razakı	GLRaV-8 Pozitif
R-10	Denizli / Çal	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-2, -3, -4 / GLRaV-8 Pozitif
R-23	Denizli / Çal	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-2, -Pr / GLRaV-8 Pozitif
R-49	Denizli / Çal	Çal Karası	GLRaV-1, -3, -9 / GLRaV-8 Pozitif
R-52	Denizli / Çal	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-Pr / GLRaV-8 Pozitif
R-73	Denizli / Çal	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-4 / GLRaV-8 Pozitif
R-75	Denizli / Çal	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-De / GLRaV-8 Pozitif
İ-1	İzmir / Kemalpaşa	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-4
İ-9	İzmir / Kemalpaşa	Alicante Bouschet	GLRaV-2, -3 / GLRaV-8 Pozitif
İ-23	İzmir / Menderes	Razakı	GLRaV-2, -3, -7
İ-37	İzmir / Menemen	Sultani Çekirdeksiz	GLRaV-3, -4, -Pr, -De
U-5	Uşak / Eşme	Alphonse Lavallée	GLRaV-De / GLRaV-8 Pozitif
U-6	Uşak / Eşme	Syrah	GLRaV-3, -De / GLRaV-8 Pozitif

Biyolojik indeksleme çalışmalarının ardından 24°C sıcaklık ve %70 nispi neme ayarlı iklim odasında mufafaza edilen odunsu indikatörlerde semptomlar indekslemeden yaklaşık olarak on ay sonra ortaya çıkmaya başlamıştır. Odunsu indikatörlerde gözlenen semptom gelişimlerinin değerlendirilebilmesi için Bora ve

Karaca (1970)'dan modifiye edilen ve Çizelge 4.17'de detayları yer alan 0-3 skalası kullanılmıştır.

Çizelge 4.17 Odunsu indikatörlerde oluşan belirtilerin değerlendirilmesinde kullanılan 0-3 skalası.

Skala Değeri	Açıklama
0 - Yok	Hiç belirti yok (Şekil 4.17 a).
1 - Zayıf	Yaprak alanının %10'una kadar hafif beneklenme şeklinde kızarıklık (Şekil 4.17 b).
2 - Orta	Yaprak alanının %10-50'sini kaplayacak şekilde beneklenme ve kızarıklık (Şekil 4.17 c).
3 - Şiddetli	Yaprak alanının %50'sinden fazlasını kaplayacak şekilde kızarıklık veya yaprak alanının %50'sinden fazlasını kaplayacak şekilde kızarıklığa ek olarak yaprak uçlarında veya genelinde içe doğru kıvrılma. (Şekil 4.17 d).



Şekil 4.17 Odunsu indikatörlerde gözlenen belirtilerin 0-3 skalasına göre değerlendirilmesi a) 0-Yok b) 1-Zayıf c) 2-Orta d) 3-Şiddetli.

Biyolojik indeksleme çalışmaları sonucunda 25 izolatın tamamının odunsu indikatörlerin en az birinde belirtiler oluşumuna neden olduğu belirlenmiş olup izolatların, belirtiler oluşturduğu odunsu indikatörler ve skalaya göre değerlendirilen belirtiler şiddetleri Çizelge 4.18'de yer almaktadır.

Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, ve Pinot Noir üzerine indekslemesi yapılan izolatlar bazı indikatörler üzerinde zayıftan şiddetliye kadar değişen derecelerde belirtiler oluşumuna neden olurken bazı indikatörler üzerinde ise belirtiler gözlenmemiştir (Çizelge 4.18).

İzolatlardan M21, B23, D12 ve R10 üç odunsu indikatör üzerinde de değişen derecelerde belirtiler oluşumuna neden olurken dört izolat Cabernet Franc ve Cabernet Sauvignon, dokuz izolat Cabernet Sauvignon ve Pinot Noir, altı izolat sadece Cabernet Sauvignon, iki izolat ise sadece Pinot Noir indikatöründe belirtiler oluşturmuştur (Çizelge 4.18).

Çizelge 4.18 İzolatların odunsu indikatörlerde simptom oluşturma dereceleri.

İzolat No	Tespit Edilen Virüsler ve GLRaV-8 Primeriyle Reaksiyon Durumu	İndikatörlerdeki Simptom Derecesi		
		Cabernet Franc	Cabernet Sauvignon	Pinot Noir
M-12	GLRaV-2 / GLRaV-8 Pozitif	2	1	0
M-21	GLRaV-3, -4, -Pr, -De	1	1	1
B-21	GLRaV-2, -3, -De / GLRaV-8 Pozitif	0	3	3
B-23	GLRaV-3	1	3	2
C-29	GLRaV-2, -3	0	2	0
C-31	GLRaV-3, -4, -Pr / GLRaV-8 Pozitif	0	0	2
D-11	GLRaV-3, -Pr / GLRaV-8 Pozitif	0	1	0
D-12	GLRaV-3, -9, -Pr	1	2	1
D-24	GLRaV-2, -3, -4, -Pr, -De	0	1	3
D-26	GLRaV-2, -3, -De	0	3	2
L-6	GLRaV-3, -Pr / GLRaV-8 Pozitif	0	3	0
O-8	GLRaV-3, -Pr	2	1	0
P-3	GLRaV-8 Pozitif	0	1	2
R-10	GLRaV-2, -3, -4 / GLRaV-8 Pozitif	1	2	3
R-23	GLRaV-2, -Pr / GLRaV-8 Pozitif	0	2	3
R-49	GLRaV-1, -3, -9 / GLRaV-8 Pozitif	1	2	0
R-52	GLRaV-Pr / GLRaV-8 Pozitif	0	1	0
R-73	GLRaV-4 / GLRaV-8 Pozitif	1	2	0
R-75	GLRaV-De / GLRaV-8 Pozitif	0	2	3
İ-1	GLRaV-4	0	0	3
İ-9	GLRaV-2, -3 / GLRaV-8 Pozitif	0	3	0
İ-23	GLRaV-2, -3, -7	0	3	3
İ-37	GLRaV-3, -4, -Pr, -De	0	1	3
U-5	GLRaV-De / GLRaV-8 Pozitif	0	3	0
U-6	GLRaV-3, -De / GLRaV-8 Pozitif	0	1	3

Üç indikatörde de simptom oluşturan izolatlar arasında bir değerlendirme yapıldığında GLRaV-3'ü içeren B-23 numaralı izolatla GLRaV-2, -3, -4 virüslerini içeren ve GLRaV-8 primeri ile pozitif sonuç veren R-10 numaralı izolatın simptom değerlendirmesinde her üç indikatörde de alabildikleri en yüksek simptom derecelerini aldıkları görülmektedir. Buna karşın GLRaV-3, -4, -Pr, -De virüslerini içeren M-21 numaralı izolat ise tüm indikatörlerde bir ile en düşük simptom derecesini almıştır (Çizelge 4.18).

GLRaV-2, -3, -De virüslerini içeren ve GLRaV-8 primeriyle pozitif sonuç veren B-21 numaralı izolatla GLRaV-2, -3, -7 virüslerini içeren İ-23 numaralı izolat, Cabernet Sauvignon ve Pinot Noir üzerinde şiddetli simptom oluşumuna neden olurken Cabernet Franc'da simptom oluşturmamıştır. GLRaV-3, -Pr virüslerini içeren ve GLRaV-8 primeriyle pozitif sonuç veren D-11 ve L-6 numaralı izolatlar sadece Cabernet Sauvignon indikatörü üzerinde farklı derecelerde simptom oluşumuna neden olurken GLRaV-De virüsünü içeren ve GLRaV-8 primeriyle pozitif sonuç veren R-75 ve U-5 numaralı izolatlardan R-75 Cabernet Sauvignon ve Pinot Noir'da, U-5 ise sadece Cabernet Sauvignon'da simptom oluşturmıştır (Çizelge 4.18).

İndekslenmesi yapılan 25 izolatın simptom oluşturdıkları indikatör kombinasyonları göz önüne alınmadan tek olarak değerlendirildiğinde ise 23'ünün Cabernet Sauvignon, 15'inin Pinot Noir ve sekizinin ise Cabernet Franc üzerinde simptom oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir. Buna göre Cabernet Sauvignon en fazla simptom gözlenen indikatör olurken bunu Pinot Noir ve Cabernet Franc izlemiştir.

İndikatör bitkiler üzerinde gözlenen simptomların skala derecelerine göre dağılımı ise Çizelge 4.19'da yer almaktadır.

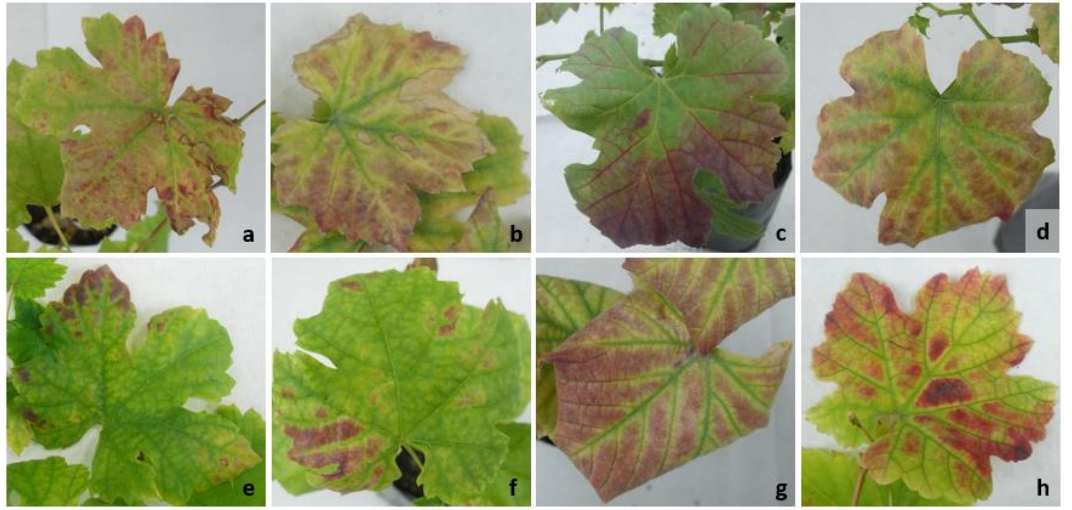
Çizelge 4.19 Odunsu indikatörlerde oluşan simptomların derecelerine göre dağılımı.

İndikatörler	Simptom Dereceleri			
	0 – Belirti Yok	1 - Hafif	2 - Orta	3 - Şiddetli
Cabernet Franc	17	6	2	-
Cabernet Sauvignon	2	9	7	7
Pinot Noir	10	2	4	9

Hafif şiddette simptomlar en fazla Cabernet Sauvignon indikatöründe görülürken bunu Cabernet Franc ve Pinot Noir indikatörleri izlemiştir. Orta şiddette belirtiler ise en çok Cabernet Sauvignon'da görülürken bunu Pinot Noir ve Cabernet Franc izlemiştir. Şiddetli simptomlar ise en çok Pinot Noir'da görülürken bunu Cabernet Sauvignon izlemiş; Cabernet Franc'da ise şiddetli simptom gözlenmemiştir (Çizelge 4.19).

Odunsu indikatörler üzerinde izolatların oluşturduğu simptomlardan bazıları Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da yer almaktadır. Şekil 4.18 incelendiğinde, İ-23 numaralı izolatın C. Sauvignon indikatörünün yaprağında oluşturduğu ana damarlar haricinde yaprak ayasının kızarması sonucunda ortaya çıkan şiddetli simptom (Şekil 4.18 a), İ-23 numaralı izolatın P. Noir indikatörünün yaprağında oluşturduğu ana damarlar haricinde yaprak ayasının kızarması sonucunda ortaya çıkan şiddetli simptom (Şekil 4.18 b), B-21 numaralı izolatın C. Sauvignon indikatörünün yaprağında oluşturduğu yaprak ayasının ve ana damarların kızarması sonucu meydana gelen şiddetli simptom (Şekil 4.18 c), B-21 numaralı izolatın P. Noir indikatörünün yaprağında oluşturduğu ana damarlar haricinde yaprak ayasının kızarması sonucu ortaya çıkan şiddetli simptom (Şekil 4.18 d), C-29 numaralı izolatın C. Sauvignon indikatörünün yaprağında oluşturduğu ana damarlar

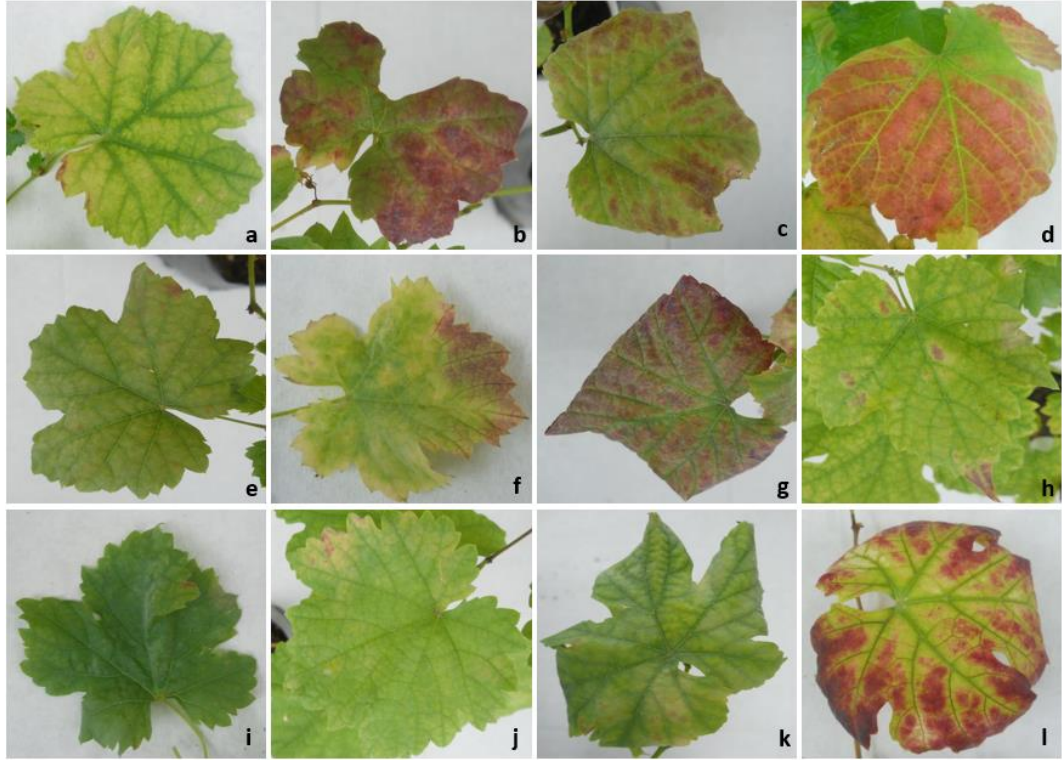
haricinde yaprak uçlarında yoğunlaşan kızarmaların neden olduğu orta şiddette symptom (Şekil 4.18 e), R-75 numaralı izolatin C. Sauvignon indikatörünün yaprağında oluşturduğu ana damarlar haricinde yaprak uçlarında yoğunlaşan kızarmaların neden olduğu orta şiddette symptom (Şekil 4.18 f), R-75 numaralı izolatin P. Noir indikatörünün yaprağında oluşturduğu ana damarlar haricinde yaprak ayasında kızarmaların ve yaprak uçlarında kıvrılmaların neden olduğu şiddetli symptom (Şekil 4.18 g) ve U-5 numaralı izolatin C. Sauvignon indikatörünün yaprağında oluşturduğu ana damarlar haricinde yaprak ayasında kızarmaların neden olduğu şiddetli symptom (Şekil 4.18 h) görülmektedir.



Şekil 4.18 Odunsu indikatörlerde izolatların oluşturduğu symptomlar a) İ-23/C. Sauvignon b) İ-23/P. Noir c) B-21/C. Sauvignon d) B-21/P. Noir e) C-29/C. Sauvignon f) R-75/C. Sauvignon g) R-75/ P. Noir h) U-5/C. Sauvignon.

Şekil 4.19 incelendiğinde ise B-23 numaralı izolatin C. Franc indikatörünün yaprağında oluşturduğu ana damarlar haricinde yaprak kenarında ortaya çıkan kızarmaların neden olduğu zayıf symptom (Şekil 4.19 a), B-23 numaralı izolatin C. Sauvignon indikatörünün yaprağında oluşturduğu yaprak ayasıyla birlikte kısmen ana damarların da kızarması sonucu ortaya çıkan şiddetli symptom (Şekil 4.19 b), B-23 numaralı izolatin P. Noir indikatörünün yaprağında oluşturduğu ana damarlar haricinde yaprak ayasının kızarması sonucu meydana gelen orta şiddette symptom (Şekil 4.19 c), İ-9 numaralı izolatin C. Sauvignon indikatörünün yaprağında oluşturduğu ana damarlar haricinde yaprak ayasının kızarması sonucu oluşan şiddetli symptom (Şekil 4.19 d), R-10 numaralı izolatin C. Franc indikatörünün yaprağında oluşturduğu ana damarlar haricinde yaprak kenarında beneklenme şeklinde kızarmaların neden olduğu zayıf symptom (Şekil 4.19 e), R-10 numaralı izolatin C. Sauvignon indikatörünün yaprağında oluşturduğu yaprak uçlarına doğru

yoğunlaşan ve kısmen de ana damarlarda görülen kızarmaların neden olduğu orta şiddette simptom (Şekil 4.19 f), R-10 numaralı izolatın P. Noir indikatörünün yaprağında oluşturduğu ana damarlar haricinde yaprak ayasının kızarması ve yaprak uçlarında kıvrılmaların neden olduğu şiddetli simptom (Şekil 4.19 g), D-11 numaralı izolatın C. Sauvignon indikatörünün yaprağında oluşturduğu ana damarlar haricinde yaprak ayasında ve yaprak ucunda beneklenme şeklinde ortaya çıkan kızarmaların neden olduğu zayıf simptom (Şekil 4.19 h) görülmektedir.



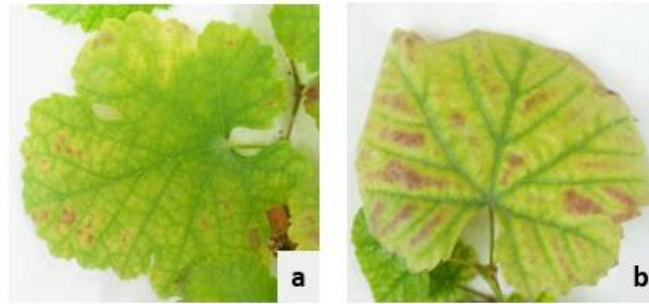
Şekil 4.19 Odunsu indikatörlerde izolatların oluşturduğu belirtiler a) B-23/C. Franc b) B-23/C. Sauvignon c) B-23/P. Noir d) İ-9/C. Sauvignon e) R-10/C. Franc f) R-10/C. Sauvignon g) R-10/P. Noir h) D-11/C. Sauvignon i) M-21/ C. Franc j) M-21/C. Sauvignon k) M-21/P. Noir l) L-6/C. Sauvignon.

M-21 numaralı izolatın C. Franc indikatörünün yaprağında oluşturduğu ana damarlar haricinde yaprak ucunda beneklenme şeklinde ortaya çıkan kızarmaların neden olduğu zayıf simptom Şekil 4.19 i’de, M-21 numaralı izolatın C. Sauvignon indikatörünün yaprağında oluşturduğu ana damarlar haricinde yaprak kenarında beneklenme şeklinde ortaya çıkan kızarmaların neden olduğu zayıf simptom Şekil 4.19 j’de, M-21 numaralı izolatın P. Noir indikatörünün yaprağında oluşturduğu ana damarlar haricinde yaprak kenarlarında beneklenme şeklinde ortaya çıkan kızarmaların neden olduğu zayıf simptom Şekil 4.19 k’da ve L-6 numaralı izolatın

C. Sauvignon indikatörünün yaprağında oluşturduğu ana damarlar haricinde yaprak ayasının kızarması sonucu oluşan şiddetli simptom ise Şekil 4.19 l’de yer almaktadır.

Şekil 4.18 ve Şekil 4.19’da görüldüğü üzere biyolojik indekslenmesi yapılan izolatlar odunsu indikatörlerde farklı tipte ve şiddette belirtilere neden olmuştur. Ancak odunsu indikatörlerde gözlenen simptomlarla izolatlar arasında bir ilişki kurulamamıştır. Gözlenen belirtiler izolatlarda tespit edilen virüs ve/veya virüslerin cinsine, yoğunluğuna ve mevsime göre değişkenlik gösterebilmektedir.

Odunsu indikatörlere biyolojik indekslemesi gerçekleştirilen izolatlar arasında sadece GLRaV-8 primeri ile pozitif sonuç verdiği tespit edilen P-3 (Razakı) numaralı izolatın indekslendiği C. Sauvignon ve P. Noir indikatörü üzerinde de asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin oluşturduklarına benzer simptomlar gözlenmiş olup sözkonusu simptomlar Şekil 4.20’de yer almaktadır. Şekil 4.20 incelendiğinde P-3 numaralı izolatın C. Sauvignon indikatörünün yaprak ayasında oluşturduğu hafif kırmızı beneklenme sonucunda ortaya çıkan zayıf simptom (Şekil 4.20 a) ve P. Noir indikatörünün yaprak ayasında ise damarlar arasının kızarması sonucunda meydana gelen orta şiddette simptom (Şekil 4.20 b) görülmektedir.



Şekil 4.20 GLRaV-8 primeri ile pozitif sonuç veren P-3 numaralı izolatın odunsu indikatörlerde oluşturduğu simptomlar a) P-3/C. Sauvignon b) P-3/P. Noir

4.5 DNA Dizileme, Genomik ve Filogenetik Analiz Sonuçları

Real-time RT-PCR analizleri sonucunda asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili farklı virüsler açısından enfekteli olarak saptanan örneklerden 27 izolat seçilerek PCR ürünlerinden çift yönlü kısmi DNA dizilemesi yaptırılmış ve 23 izolata ait farklı büyüklükte nükleotit dizileri elde edilmiştir (Çizelge 4.20). DNA dizilemesi sonucunda GLRaV-7 virüsüne ait İ-23 numaralı izolatla GLRaV-9

virüsüne ait C-26, D-12 ve R-49 numaralı izolatlara ait sekans verileri kromotogram dosyalarının kısmen bozuk olmasından dolayı elde edilememiştir. Yerel izolatlara ait elde edilen 23 sekans verisi NCBI gen bankasına kayıt edilerek erişim numaraları alınmıştır (Çizelge 4.20).

Çizelge 4.20 DNA dizilemesi yaptırılan ve NCBI gen bankasına kayıt edilen izolatlara ait bilgiler.

Virüs / İzolat No	İzolatuın Elde Edildiği Lokasyon İl / İlçe	İzolatuın Elde Edildiği Çeşit	Dizilenen Gen Bölgesi ve Büyüklüğü (bp)	NCBI Gen Bankası Erişim Numarası
GLRaV-1 / R-49	Denizli / Çal	Çal Karası	HSP70h / 257	KM034909
GLRaV-2 / M-12	Manisa / Merkez	Alphonse Lavallée	HSP70h / 270	KM210292
GLRaV-2 / B-21	Manisa / Turgutlu	Sultani Çekirdeksiz	HSP70h / 270	KM034910
GLRaV-2 / R-10	Denizli / Çal	Sultani Çekirdeksiz	HSP70h / 270	KP144363
GLRaV-2 / İ-9	İzmir / Kemalpaşa	Alicante Bouschet	HSP70h / 270	KM034908
GLRaV-3 / C-29	Manisa / Salihli	Sultani Çekirdeksiz	HSP70h / 489	KP144364
GLRaV-3 / O-8	Denizli / Bekeilli	Sultani Çekirdeksiz	HSP70h / 489	KP144367
GLRaV-3 / İ-9	İzmir / Kemalpaşa	Alicante Bouschet	HSP70h / 489	KP144365
GLRaV-3 / İ-23	İzmir / Menderes	Razakı	HSP70h / 489	KP144366
GLRaV-3 / U-6	Uşak / Eşme	Syrah	HSP70h / 489	KP144368
GLRaV-4 / C-31	Manisa / Salihli	Sultani Çekirdeksiz	HSP70h / 319	KP144369
GLRaV-4 / R-73	Denizli / Çal	Sultani Çekirdeksiz	HSP70h / 319	KP144371
GLRaV-4 / İ-1	İzmir / Kemalpaşa	Sultani Çekirdeksiz	HSP70h / 319	KP144370
GLRaV-5 / P-4	Denizli / Tavas	Razakı	HSP70h / 270	KP144372
*GLRaV-7 / İ-23	İzmir / Menderes	Razakı	---	---
*GLRaV-9 / C-26	Manisa / Salihli	Sultani Çekirdeksiz	---	---
*GLRaV-9 / D-12	Manisa / Alaşehir	Sultani Çekirdeksiz	---	---
*GLRaV-9 / R-49	Denizli / Çal	Çal Karası	---	---
GLRaV-Pr / C-31	Manisa / Salihli	Sultani Çekirdeksiz	HSP70h / 242	KP144373
GLRaV-Pr / D-12	Manisa / Alaşehir	Sultani Çekirdeksiz	HSP70h / 242	KP144374
GLRaV-Pr / O-8	Denizli / Bekeilli	Sultani Çekirdeksiz	HSP70h / 242	KP144376
GLRaV-Pr / R-23	Denizli / Çal	Sultani Çekirdeksiz	HSP70h / 242	KP144377
GLRaV-Pr / İ-37	İzmir / Menemen	Sultani Çekirdeksiz	HSP70h / 242	KP144375
GLRaV-De / B-21	Manisa / Turgutlu	Sultani Çekirdeksiz	HSP70h / 370	KP144378
GLRaV-De / D-24	Manisa / Alaşehir	Sultani Çekirdeksiz	HSP70h / 370	KP144379
GLRaV-De / R-75	Denizli / Çal	Sultani Çekirdeksiz	HSP70h / 370	KP144380
GLRaV-De / U-5	Uşak / Eşme	Alphonse Lavallée	HSP70h / 370	KP144381

* İlgili izolatlara ait sekans verileri elde edilememiştir.

Elde edilen nükleotit dizilerinin amino asit çevrimleri yapıldıktan sonra hem nükleotit düzeyinde hem de amino asit düzeyinde genomik ve filogenetik analizleri gerçekleştirilmiştir. Asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili her bir virüs açısından en az üç sekans verisi bulunan yerel izolatların önce kendi aralarında nükleotit ve amino asit düzeyindeki genomik ve filogenetik analizleri yapılmıştır. Ardından yerel izolatlara ait asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin sekans verileriyle NCBI gen bankasından seçilen farklı benzerlik oranları gösteren dünya izolatlarına ait sekans verileri kullanılarak genomik ve filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir.

4.5.1 GLRaV-1 ile ilgili sonuçlar

R-49 numaralı GLRaV-1 izolatıyla NCBI gen bankasından alınan dört referans izolatin HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerine ilişkin elde edilen benzerlik oranları Çizelge 4.21’de yer almaktadır.

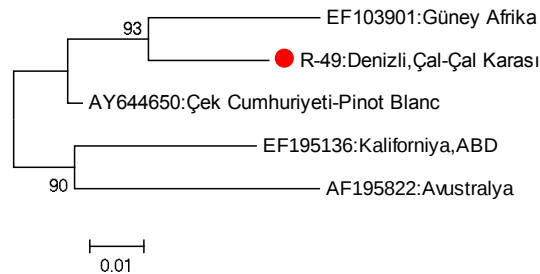
Çizelge 4.21 Dünyadaki GLRaV-1 izolatları ile R-49 numaralı izolatin HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları.

İzolat No: Lokasyon - Çeşit Adı	R-49:Denizli,Çal-Çal Karası	
	NT (%)	AA (%)
EF103901:Güney Afrika	94,16	96,47
EF195136:Kaliforniya, ABD	92,61	94,12
AF195822:Avustralya	91,05	95,29
AY644650:Çek Cumhuriyeti-Pinot Blanc	95,98	96,55

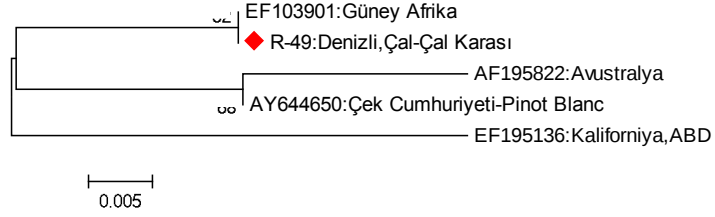
NT: Nükleotit AA: Amino asit

Çizelge 4.21 incelendiğinde genel olarak İzolatların nükleotit ve amino asit açısından %90’ın üzerinde yüksek bir benzerliğe sahip olduğu, R-49 numaralı izolatin nükleotit (%95,98) ve amino asit (%96,55) düzeyinde en yüksek benzerliği AY644650 (Çek Cumhuriyeti-Pinot Blanc) izolatıyla gösterdiği anlaşılmaktadır. Nükleotit düzeyinde en düşük benzerlik oranı (%91,05) AF195822 (Avustralya) ile elde edilirken amino asit düzeyinde en düşük benzerlik oranı (%94,12) ise EF195136 (Kaliforniya, ABD) izolatıyla elde edilmiştir.

R-49 numaralı GLRaV-1 izolatıyla NCBI gen bankasından alınan 4 referans izolatin HSP70h genine ait nükleotit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı Şekil 4.21’de amino asit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı ise Şekil 4.22’de yer almaktadır.



Şekil 4.21 Dünyadaki GLRaV-1 izolatları ile R-49 numaralı izolatin HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.



Şekil 4.22 Dünyadaki GLRaV-1 izolatları ile R-49 numaralı izolatın HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı.

Şekil 4.21 ve Şekil 4.22 incelendiğinde R-49 numaralı izolatın birinci grupta, EF103901 (Güney Afrika) izolatıyla aynı alt grupta yer aldığı görülmektedir.

4.5.2 GLRaV-2 ile ilgili sonuçlar

B-21, İ-9, M-12 ve R-10 numaralı yerel GLRaV-2 izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerine ilişkin elde edilen benzerlik oranları Çizelge 4.22’de yer almaktadır.

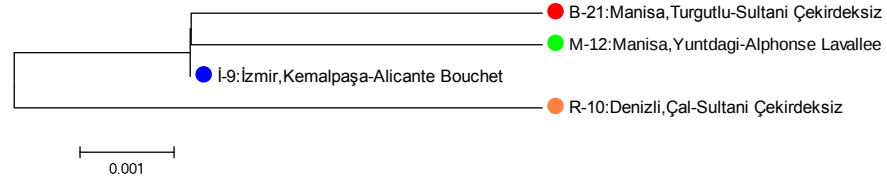
Çizelge 4.22 Yerel GLRaV-2 izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları.

İzolat No: Lokasyon - Çeşit Adı	B-21		İ-9		M-12	
	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)
B-21:Manisa,Turgutlu-S. Çekirdeksiz						
İ-9:İzmir,Kemalpaşa-A. Bouschet	99,63	98,89				
M-12:Manisa,Yuntdağı-A. Lavallée	99,26	98,89	99,63	100,00		
R-10:Denizli, Çal-S. Çekirdeksiz	98,89	97,78	99,26	97,78	98,89	97,78

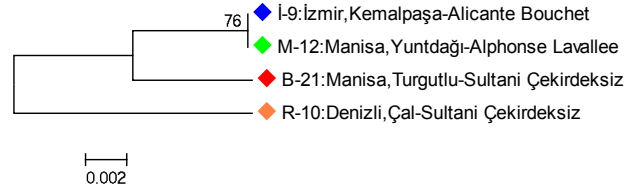
NT: Nükleotit AA: Amino asit

Çizelge 4.22 incelendiğinde genel olarak yerel izolatların nükleotit ve amino asit açısından %95’in üzerinde yüksek bir benzerliğe sahip olduğu görülmektedir. Nükleotit düzeyinde en yüksek benzerliği (%99,63) İ-9’un B-21 ve M-12 ile gösterdiği, amino asit düzeyinde ise en yüksek benzerliği (%100) İ-9’un M-12 numaralı izolatla gösterdiği anlaşılmaktadır. Nükleotit düzeyinde en düşük benzerlik oranı (%98,89) R-10 ile B-21 ve M-12 arasında, amino asit düzeyinde en düşük benzerlik oranı (%97,78) ise R-10 ile B-21, İ-9 ve M-12 numaralı izolatlar arasında elde edilmiştir.

Yerel GLRaV-2 izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı Şekil 4.23'te amino asit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı ise Şekil 4.24'te yer almaktadır.



Şekil 4.23 Yerel GLRaV-2 izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.



Şekil 4.24 Yerel GLRaV-2 izolatlarının HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı.

Şekil 4.23 ve Şekil 4.24 incelendiğinde B-21, M-12 ve İ-9 numaralı izolatların birinci grupta, R-10 numaralı izolatın ise ikinci grupta yer aldığı görülmektedir.

Yerel GLRaV-2 izolatlarıyla NCBI gen bankasından alınan 30 referans izolatın HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerine ilişkin elde edilen benzerlik oranları Çizelge 4.23'te yer almaktadır.

Çizelge 4.23 incelendiğinde genel olarak yerel GLRaV-2 izolatlarının dünya izolatlarıyla nükleotit düzeyinde %82,71 ile %100 arasında, amino asit düzeyinde ise %87,50 ile %100 arasında benzerlik gösterdiği görülmektedir. Nükleotit düzeyinde en yüksek benzerlik oranı (%100) İ-9 ile KF417616 (Virginia, ABD-C. Sauvignon), KF417612 (Teksas, ABD-Lenoir), JQ771955 (Oregon, ABD-P. Noir), GU457404 (ABD-P. Noir), GU457402 (ABD-P. Noir), EU760776 (ABD-C. Sauvignon), EF122997 (Fransa-Hamburg Misketi) ve Y14131 (İtalya) numaralı izolatlarla elde edilmiştir.

Çizelge 4.23 Dünyadaki GLRaV-2 izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları.

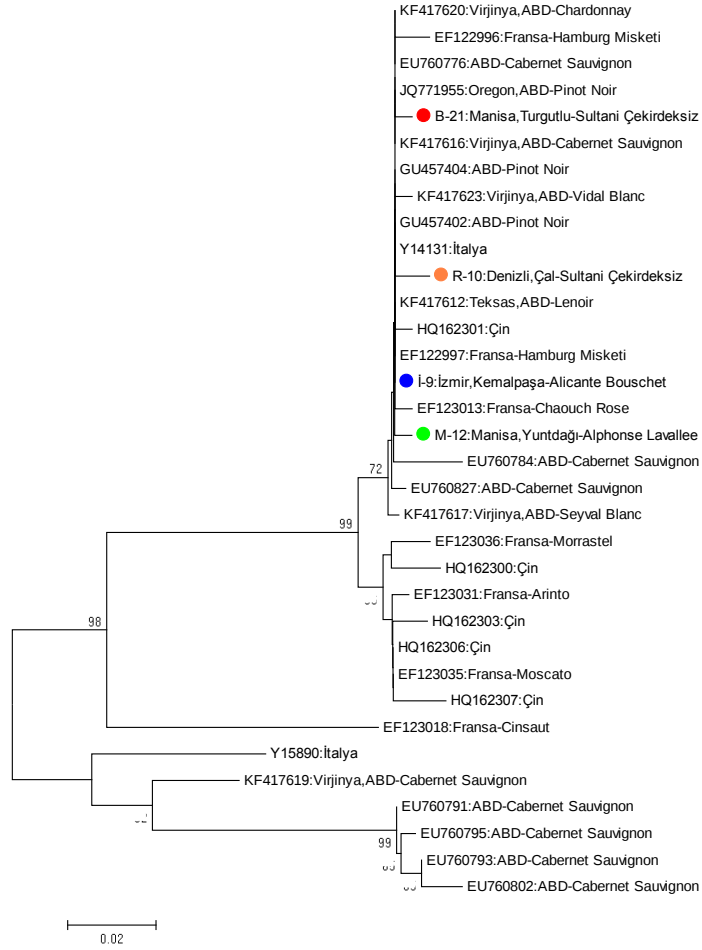
İzolat No: Lokasyon - Çeşit Adı	B-21 Manisa, Turgutlu S.Çekirdeksiz		İ-9 İzmir, Kemalpaşa A. Bouschet		M-12 Manisa, Yuntdağı A. Lavallée		R-10 Denizli, Çal S.Çekirdeksiz	
	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)
KF417616:Virjinya,ABD-C. Sauvignon	99,63	98,89	100,00	100,00	99,63	100,00	99,26	97,78
KF417612:Teksas,ABD-Lenoir	99,63	98,89	100,00	100,00	99,63	100,00	99,26	97,78
JQ771955:Oregon,ABD-P. Noir	99,63	98,89	100,00	100,00	99,63	100,00	99,26	97,78
GU457404:ABD-P. Noir	99,63	98,89	100,00	100,00	99,63	100,00	99,26	97,78
GU457402:ABD-P. Noir	99,63	98,89	100,00	100,00	99,63	100,00	99,26	97,78
EU760776:ABD-C. Sauvignon	99,63	98,89	100,00	100,00	99,63	100,00	99,26	97,78
EF122997:Fransa-H. Misketi	99,63	98,89	100,00	100,00	99,63	100,00	99,26	97,78
Y14131:İtalya	99,63	98,89	100,00	100,00	99,63	100,00	99,26	97,78
KF417620:Virjinya,ABD-Chardonnay	99,26	98,88	99,63	100,00	99,26	100,00	98,89	97,75
KF417623:Virjinya,ABD-Vidal Blanc	99,26	97,78	99,63	98,89	99,26	98,89	98,89	96,67
KF417617:Virjinya,ABD-Seyval Blanc	99,26	98,89	99,63	100,00	99,26	100,00	98,89	97,78
HQ162301:Çin	99,26	97,78	99,63	98,89	99,26	98,89	98,89	96,67
EU760827:ABD-C. Sauvignon	99,26	97,78	99,63	98,89	99,26	98,89	98,89	96,67
EF123013:Fransa-Chaouch Rose	99,26	98,89	99,63	100,00	99,26	100,00	98,89	97,78
EF122996:Fransa-H. Misketi	98,89	96,67	99,26	97,78	98,89	97,78	98,52	95,56
EU760784:ABD-C. Sauvignon	98,15	96,67	98,52	97,78	98,15	97,78	97,78	95,56
HQ162306:Çin	98,14	98,88	98,51	100,00	98,14	100,00	97,77	97,75
EF123035:Fransa-Moscato	98,14	98,88	98,51	100,00	98,14	100,00	97,77	97,75
EF123031:Fransa-Arinto	97,77	97,75	98,14	98,88	97,77	98,88	97,40	96,63
HQ162303:Çin	97,41	97,78	97,78	98,89	97,41	98,89	97,04	96,67
EF123036:Fransa-Morrastel	97,40	96,63	97,77	97,75	97,40	97,75	97,03	95,51
HQ162300:Çin	97,03	97,75	97,40	98,88	97,40	98,88	96,65	96,63
HQ162307:Çin	96,65	96,63	97,03	97,75	96,65	97,75	96,28	95,51
EF123018:Fransa-Cinsaut	88,72	93,18	89,10	94,32	88,72	94,32	88,35	92,05
KF417619:Virjinya,ABD-C. Sauvignon	87,21	91,86	87,60	93,02	87,21	93,02	86,82	90,70
Y15890:İtalya	86,47	93,18	86,84	94,32	86,47	94,32	86,09	92,05
EU760791:ABD-C. Sauvignon	84,21	90,91	84,59	92,05	84,96	92,05	83,83	89,77
EU760795:ABD-C. Sauvignon	83,83	89,77	84,21	90,91	84,59	90,91	83,46	88,64
EU760793:ABD-C. Sauvignon	83,83	90,91	84,21	92,05	84,59	92,05	83,46	89,77
EU760802:ABD-C. Sauvignon	83,08	88,64	83,46	89,77	83,83	89,77	82,71	87,50

NT: Nükleotit AA: Amino asit

Amino asit düzeyinde ise en yüksek benzerlik oranı İ-9 numaralı izolatın nükleotit düzeyinde göstermiş olduğu yüksek benzerlik oranına sahip yukarıdaki izolatlara ek olarak, KF417620 (Virjinya, ABD-Chardonnay), KF417617 (Virjinya, ABD-Seyval Blanc), EF123013 (Fransa-Chaouch Rose), HQ162306 (Çin) ve EF123035 (Fransa-Moscato) numaralı izolatlarla İ-9 ile M-12 numaralı izolatlar arasında %100 olarak elde edilmiştir. Nükleotit (%82,71) ve amino asit (%87,50)

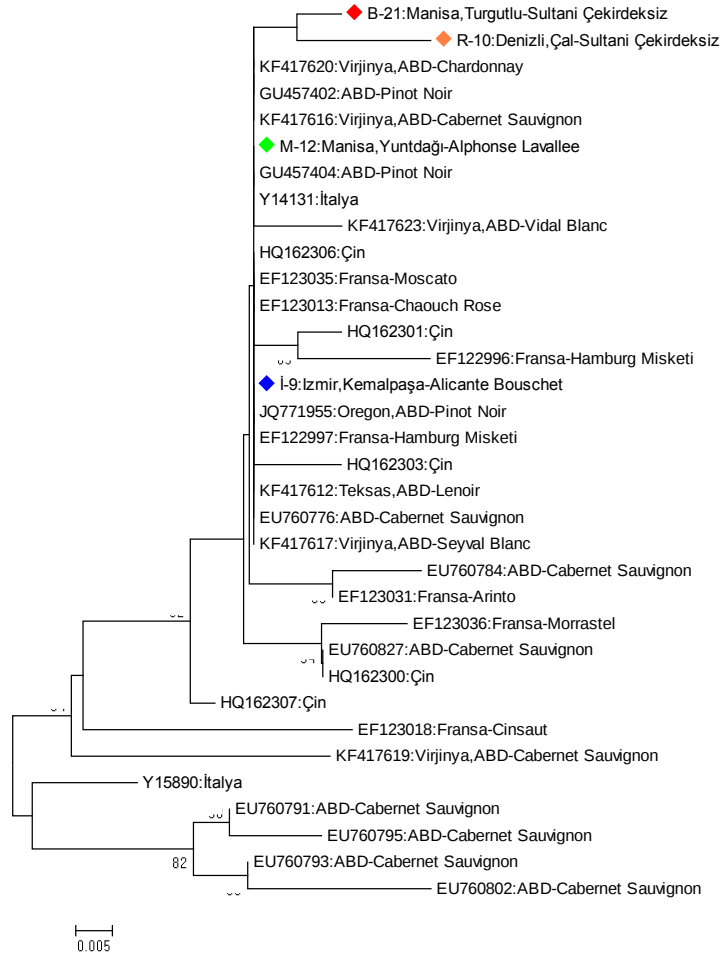
düzeyinde en düşük benzerlik oranı ise EU760802 (ABD-C. Sauvignon) ile R-10 numaralı izolat arasında belirtilen oranlarda elde edilmiştir.

Yerel GLRaV-2 izolatlarıyla NCBI gen bankasından alınan 30 referans izolatın HSP70h genine ait nükleotit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı Şekil 4.25'te amino asit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı ise Şekil 4.26'da yer almaktadır.



Şekil 4.25 Dünyadaki GLRaV-2 izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.

Şekil 4.25 ve Şekil 4.26 incelendiğinde, yerel izolatların tamamının birinci grupta, KF417620 (Virjinya, ABD-Chardonnay) ve KF417617 (Virjinya, ABD-Seyval Blanc) izolatlarıyla sınırlı olan alt grup içinde olduğu görülmektedir.



Şekil 4.26 Dünyadaki GLRaV-2 izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı.

4.5.3 GLRaV-3 ile ilgili sonuçlar

C-29, İ-9, İ-23, O-8 ve U-6 numaralı yerel GLRaV-3 izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerine ilişkin elde edilen benzerlik oranları Çizelge 4.24'te yer almaktadır.

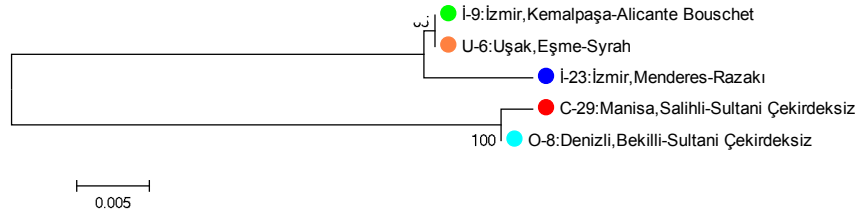
Çizelge 4.24 incelendiğinde genel olarak yerel izolatların nükleotit ve amino asit açısından %90'ın üzerinde yüksek bir benzerliğe sahip olduğu görülmektedir. Nükleotit ve amino asit düzeyinde en yüksek benzerlik oranının (%100) İ-9 ile U-6 numaralı izolat arasında olduğu belirlenmiştir. Nükleotit (%93,25) ve amino asit (%97,55) düzeyinde en düşük benzerlik ise C-29 ile İ-23 izolatları arasında belirtilen oranlarda elde edilmiştir.

Çizelge 4.24 Yerel GLRaV-3 izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları.

İzolat No: Lokasyon - Çeşit Adı	C-29 Manisa, Salihli S. Çekirdeksiz		İ-9 İzmir, Kemalpaşa A. Bouschet		İ-23 İzmir, Menderes Razakı		O-8 Denizli, Bekilli S. Çekirdeksiz	
	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)
C-29:Manisa,Salihli-S.Çekirdeksiz								
İ-9:İzmir,Kemalpaşa-A.Bouschet	93,87	98,16						
İ-23:İzmir,Menderes-Razakı	93,25	97,55	99,18	99,39				
O-8:Denizli,Bekilli-S.Çekirdeksiz	99,80	99,39	94,07	98,77	93,46	98,16		
U-6:Uşak,Eşme-Syrah	93,87	98,16	100,00	100,00	99,18	99,39	94,07	98,77

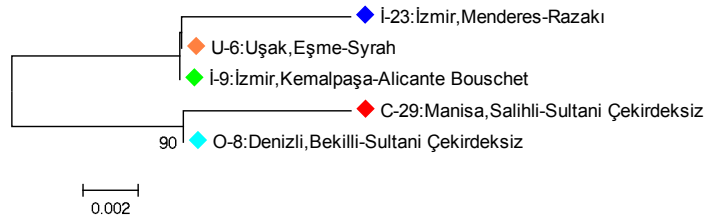
NT: Nükleotit AA: Amino asit

Yerel GLRaV-3 izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı Şekil 4.27’de amino asit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı ise Şekil 4.28’de yer almaktadır.



Şekil 4.27 Yerel GLRaV-3 izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.

Şekil 4.27 ve Şekil 4.28 incelendiğinde İ-9, U-6 ve İ-23 numaralı izolatların birinci grupta, C-29 ve O-8 numaralı izolatların ise ikinci grupta yer aldığı görülmektedir.



Şekil 4.28 Yerel GLRaV-3 izolatlarının HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı.

Yerel GLRaV-3 izolatlarıyla NCBI gen bankasından alınan 30 referans izolatın HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerine ilişkin elde edilen benzerlik oranları Çizelge 4.25'te yer almaktadır.

Çizelge 4.25 Dünyadaki GLRaV-3 izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları.

İzolat No: Lokasyon – Çeşit Adı	C-29 Manisa,Salihli S. Çekirdeksiz		İ-9 İzmir,Kemalpaşa A. Bouschet		İ-23 İzmir,Menderes Razakı		O-8 Denizli,Bekilli S. Çekirdeksiz		U-6 Uşak,Eşme Syrah	
	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)
KF417606:ABD- Chardonnay	100,00	100,00	93,87	98,16	93,25	97,55	99,80	99,39	93,87	98,16
KC953919:İspanya- Tempranillo	100,00	100,00	93,64	98,03	92,98	97,37	99,78	99,34	93,64	98,03
FJ195747:ABD-Riesling	100,00	100,00	94,60	97,89	93,90	97,18	99,77	99,30	94,60	97,89
JX282319:Hindistan- Sharad Seedless	99,80	99,39	94,07	98,77	93,46	98,16	100,00	100,00	94,07	98,77
KF417601:Virginia, ABD- Traminitte	99,80	99,39	94,07	98,77	93,46	98,16	100,00	100,00	94,07	98,77
KC953927:İspanya-Mencia	99,78	99,34	93,86	98,68	93,20	98,03	100,00	100,00	93,86	98,68
FJ883768:ABD- Chardonnay:Unlubit	99,77	99,30	94,37	97,18	93,66	96,48	99,53	98,59	94,37	97,18
KF417600:Virginia, ABD- Vidal Blanc	99,59	99,39	93,87	98,77	93,25	98,16	99,80	100,00	93,87	98,77
GQ352632:Güney Afrika- Ruby Cabernet	99,59	99,39	93,87	98,77	93,25	98,16	99,80	100,00	93,87	98,77
FJ883764:ABD-Chardonnay	99,30	99,30	94,60	98,59	93,90	97,89	99,53	100,00	94,60	98,59
AJ748516:Suriye	99,18	99,39	93,25	97,55	92,64	96,93	98,98	98,77	93,25	97,55
GQ344818:ABD-Merlot	98,76	98,12	92,53	96,25	91,91	95,62	98,55	97,50	92,53	96,25
HM245755:Merkez, Manisa	97,64	95,04	91,04	92,91	90,80	92,91	97,41	94,33	91,04	92,91
AJ748510:Avusturya	97,55	99,39	96,32	98,77	95,71	98,16	97,34	98,77	96,32	98,77
HM636875:Şili-Perlette	96,11	98,77	97,75	99,39	97,14	98,77	96,32	99,39	97,75	99,39
KC953917:İspanya- Brancellao	95,16	98,01	98,68	100,00	98,02	99,34	95,38	98,68	98,68	100,00
KC953914:İspanya-Albarino	94,52	98,03	99,12	100,00	98,46	99,34	94,74	98,68	99,12	100,00
AJ748511:Avusturya	94,27	98,16	99,59	100,00	98,98	99,39	94,48	98,77	99,59	100,00
GQ344810:ABD- Chardonnay	94,19	98,12	96,06	98,75	95,44	98,12	93,98	97,50	96,06	98,75
KF417602:Virginia, ABD- Sangiovese	94,03	98,15	100,00	100,00	99,79	100,00	94,24	98,77	100,00	100,00
JX559645:Kanada	94,03	98,15	100,00	100,00	99,79	100,00	94,24	98,77	100,00	100,00
HM636873:Şili-Red Globe	94,03	98,15	100,00	100,00	99,79	100,00	94,24	98,77	100,00	100,00
DQ780890:ABD	94,03	98,15	100,00	100,00	99,79	100,00	94,24	98,77	100,00	100,00
AJ748515:Suriye	94,03	98,15	100,00	100,00	99,79	100,00	94,24	98,77	100,00	100,00
GQ344827:ABD- C. Sauvignon	93,95	98,11	100,00	100,00	99,79	100,00	94,15	98,74	100,00	100,00
GQ344817:ABD-Merlot	93,95	98,11	100,00	100,00	99,79	100,00	94,15	98,74	100,00	100,00
HM636879:Şili- Crimson Seedless	93,83	98,15	99,79	100,00	99,59	100,00	94,03	98,77	99,79	100,00
KF029729:Polonya	93,42	98,15	99,38	100,00	99,18	100,00	93,62	98,77	99,38	100,00
AF037268:ABD	92,80	96,30	98,77	98,15	98,56	98,15	93,00	96,91	98,77	98,15
KC953936:İspanya-Mencia	93,64	98,03	100,00	100,00	99,12	99,34	93,86	98,68	100,00	100,00

NT: Nükleotit AA: Amino asit

Çizelge 4.25 incelendiğinde genel olarak yerel GLRaV-3 izolatlarının dünya izolatlarıyla nükleotit düzeyinde %90,80 ile %100 arasında, amino asit düzeyinde ise %92,91 ile %100 arasında yüksek bir benzerlik gösterdiği görülmektedir.

C-29 numaralı izolat için nükleotit ve amino asit düzeyinde en yüksek benzerlik oranının KF417606 (ABD-Chardonnay), KC953919 (İspanya-

Tempranillo) ve FJ195747 (ABD-Riesling) numaralı izolatlarla %100 olduğu belirlenmiştir.

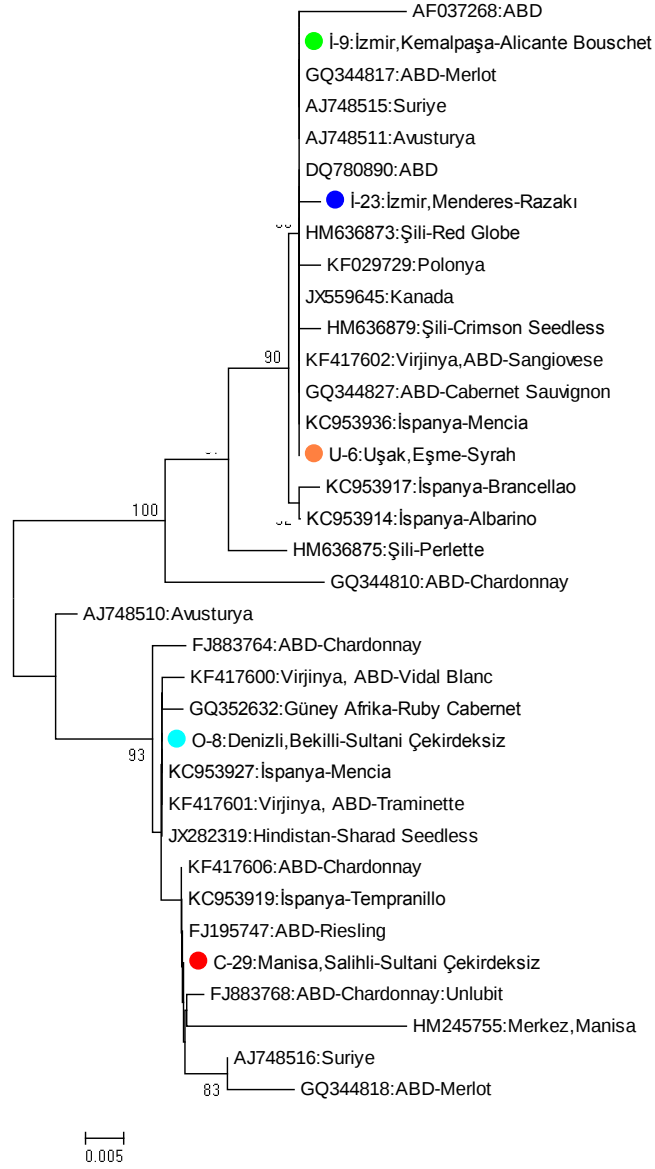
İ-9 ve U-6 numaralı izolatlar için ise KF417602 (Virjinya, ABD-Sangiovese), JX559645 (Kanada), HM636873 (Şili-Red Globe), DQ780890 (ABD), AJ748515 (Suriye), GQ344827 (ABD-C. Sauvignon), GQ344817 (ABD-Merlot) ve KC953936 (İspanya-Mencia) numaralı izolatlarla nükleotit ve amino asit düzeyindeki bezerlik oranlarının %100 olduğu tespit edilmiştir. İ-9 ve U-6 numaralı izolatların nükleotit ve amino asit düzeyinde %100 benzerlik gösterdiği yukarıdaki izolatlara ek olarak KC953917 (İspanya-Brancellao), KC953914 (İspanya-Albarino), AJ748511 (Avusturya), HM636879 (Şili-Crimson Seedless) ve KF029729 (Polonya) izolatlarıyla amino asit düzeyinde %100 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

O-8 numaralı izolat için ise JX282319 (Hindistan-Sharad Seedless), KF417601 (Virjinya, ABD-Tramnette) ve KC953927 (İspanya-Mencia) numaralı izolatlarla nükleotit ve amino asit benzerliklerinin %100 olduğu belirlenmiştir. O-8 numaralı izolatın nükleotit ve amino asit düzeyinde %100 benzerlik gösterdiği yukarıdaki izolatlara ek olarak KF417600 (Virjinya, ABD-Vidal Blanc), GQ352632 (Güney Afrika-Ruby Cabernet) ve FJ883764 (ABD, Chardonnay) izolatlarıyla amino asit düzeyinde %100 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

İ-23 numaralı izolatın ise KF417602 (Virjinya, ABD-Sangiovese), JX559645 (Kanada), HM636873 (Şili-Red Globe), DQ780890 (ABD), AJ748515 (Suriye), GQ344827 (ABD-C. Sauvignon), GQ344817 (ABD-Merlot), HM636879 (Şili-Crimson Seedless) ve KF029729 (Polonya) numaralı izolatlarla amino asit düzeyinde %100 benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

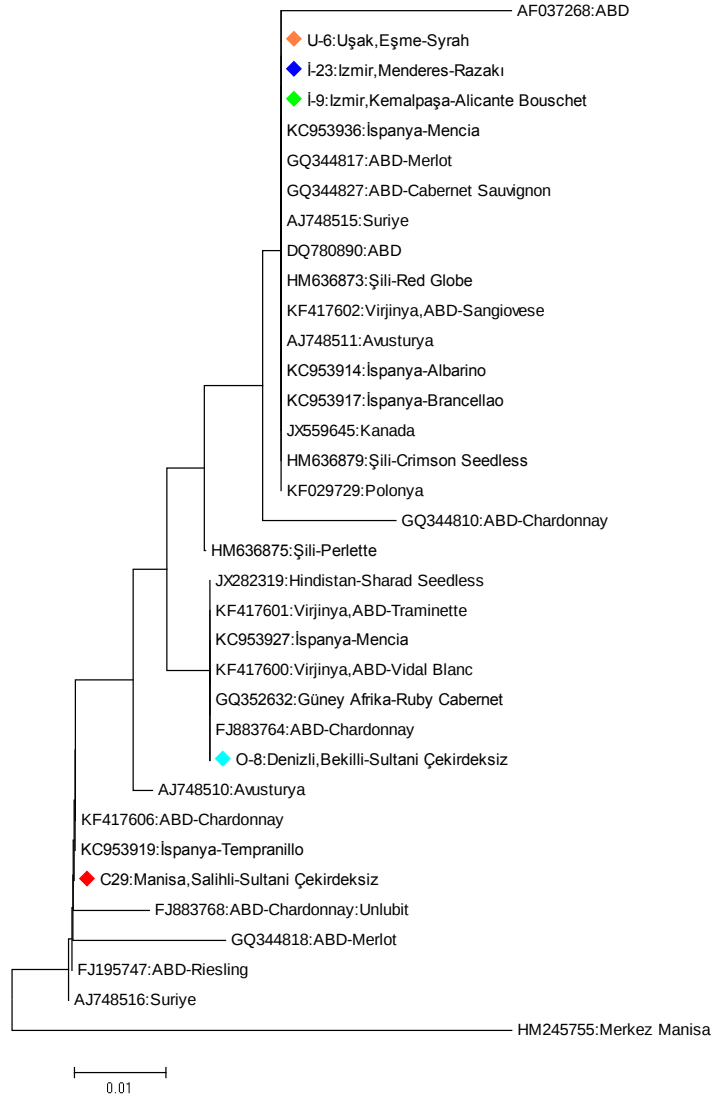
Nükleotit (%90,80) ve amino asit (%92,91) düzeyindeki en düşük benzerlik oranları ise İ-23 numaralı izolat ile HM245755 (Manisa, Merkez) numaralı izolat arasında belirtilen oranlarda tespit edilmiştir. Ayrıca İ-9 ve U-6 numaralı izolatlar da HM245755 (Manisa, Merkez) numaralı izolatla amino asit düzeyinde %92,91 ile en düşük benzerlik oranını göstermişlerdir.

Yerel GLRaV-3 izolatlarıyla NCBI gen bankasından alınan 30 referans izolatın HSP70h genine ait nükleotit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı Şekil 4.29'da amino asit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı ise Şekil 4.30'da yer almaktadır.



Şekil 4.29 Dünyadaki GLRaV-3 izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.

Şekil 4.29 incelendiğinde İ-9, İ-23 ve U-6 numaralı izolatların birinci grup içerisinde AF037268 (ABD) ve HM636875 (Şili-Perlette) izolatları ile sınırlı olan alt grup içerisinde yer aldığı O-8 ve C-29 numaralı izolatların ise ikinci grupta FJ883764 (ABD-Chardonnay) ve GQ344818 (ABD-Merlot) izolatlarıyla sınırlı olan alt grup içinde yer aldığı görülmektedir.



Şekil 4.30 Dünyadaki GLRaV-3 izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı.

Şekil 4.30 incelendiğinde tüm yerel izolatların birinci grup içerisinde AF037268 (ABD) ve FJ195747 (ABD-Riesling) izolatlarıyla sınırlı olan alt grup içerisinde yer aldığı, HM245755 (Merkez, Manisa) izolatının ise ikinci grupta bulunduğu görülmektedir.

4.5.4 GLRaV-4 ile ilgili sonuçlar

C-31, İ-1 ve R-73 numaralı yerel GLRaV-4 izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerine ilişkin elde edilen benzerlik oranları Çizelge 4.26'da yer almaktadır.

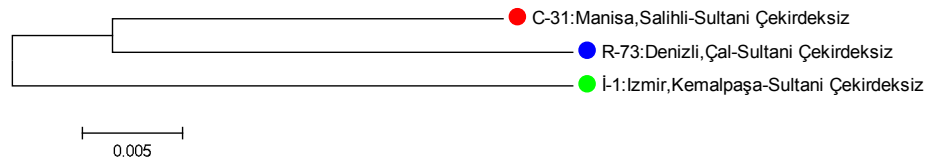
Çizelge 4.26 Yerel GLRaV-4 izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları.

İzolat No: Lokasyon - Çeşit Adı	C-31 Manisa,Salihli S. Çekirdeksiz		İ-1 İzmir,Kemalpaşa S. Çekirdeksiz	
	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)
C-31:Manisa,Salihli-Sultani Çekirdeksiz				
İ-1:İzmir,Kemalpaşa-Sultani Çekirdeksiz	94,98	98,11		
R-73:Denizli,Çal-Sultani Çekirdeksiz	95,92	98,11	94,67	98,11

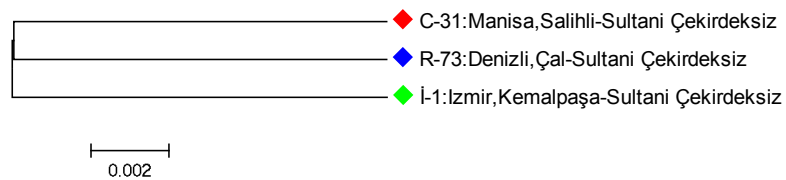
NT: Nükleotit **AA:** Amino asit

Çizelge 4.26 incelendiğinde genel olarak yerel izolatların nükleotit ve amino asit açısından %90'ın üzerinde yüksek bir benzerliğe sahip olduğu görülmektedir. Nükleotit (%95,92) ve amino asit (%98,11) düzeyinde en yüksek benzerlik oranı C-31 ile R-73 numaralı izolatlar arasında belirtilen oranlarda tespit edilirken diğer tüm izolatlar da birbirleriyle amino asit düzeyinde %98,11'lik benzerlik oranını göstermiştir. Nükleotit düzeyindeki en düşük benzerlik oranı ise İ-1 ve R-73 numaralı izolatlar arasında %94,67 olarak tespit edilmiştir.

Yerel GLRaV-4 izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı Şekil 4.31'de amino asit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı ise Şekil 4.32'de yer almaktadır.



Şekil 4.31 Yerel GLRaV-4 izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.



Şekil 4.32 Yerel GLRaV-4 izolatlarının HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı.

Şekil 4.31 ve Şekil 4.32 incelendiğinde C-31 ve R-73 numaralı izolatların birinci grupta yer aldığı İ-1 numaralı izolatın ise ikinci grupta yer aldığı görülmektedir.

Yerel GLRaV-4 izolatlarıyla NCBI gen bankasından alınan 14 referans izolatın HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerine ilişkin elde edilen benzerlik oranları Çizelge 4.27’de yer almaktadır.

Çizelge 4.27 Dünyadaki GLRaV-4 izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları.

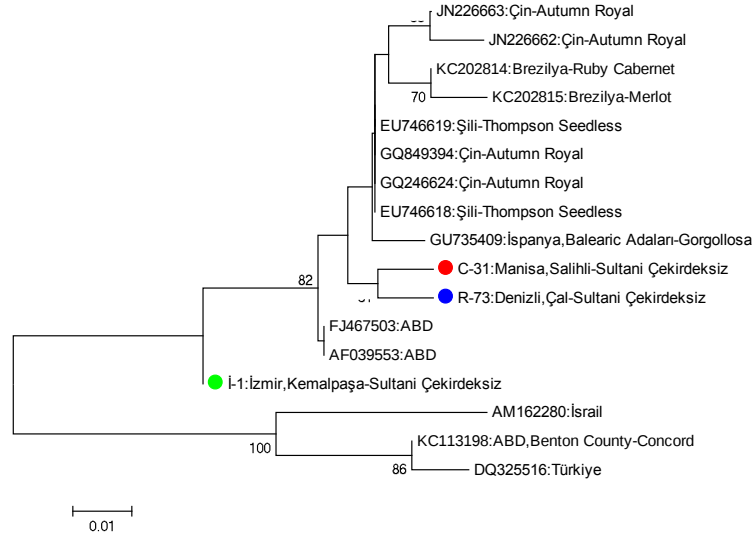
İzolat No: Lokasyon - Çeşit Adı	C-31 Manisa, Salihli S. Çekirdeksiz		İ-1 İzmir, Kemalpaşa S. Çekirdeksiz		R-73 Denizli, Çal S. Çekirdeksiz	
	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)
JN226663:Çin-Autumn Royal	97,87	100,00	97,16	100,00	97,87	97,87
JN226662:Çin-Autumn Royal	97,22	100,00	96,53	100,00	97,22	97,92
GQ849394:Çin-Autumn Royal	96,20	100,00	96,20	100,00	97,34	98,85
FJ467503:ABD	95,91	99,06	95,91	99,06	96,86	99,06
AF039553:ABD	95,91	99,06	95,91	99,06	96,86	99,06
GU735409:İspanya, Balearic Adaları-Gorgollosa	96,41	100,00	95,38	100,00	95,90	98,46
KC202814:Brezilya-Ruby Cabernet	95,36	98,00	95,36	99,00	96,36	98,00
GQ246624:Çin-Autumn Royal	95,91	98,11	95,28	98,11	96,86	98,11
EU746619:Şili-Thompson Seedless	95,91	99,06	95,28	99,06	96,86	99,06
KC202815:Brezilya-Merlot	95,03	98,00	95,03	99,00	96,03	98,00
EU746618:Şili-Thompson Seedless	95,57	99,05	94,94	99,05	97,15	99,05
KC113198:ABD, Benton County-Concord	90,07	89,36	92,20	89,36	90,07	89,36
AM162280:İsrail	89,44	89,36	91,55	89,36	89,44	89,36
DQ325516:Türkiye	89,94	93,40	88,68	93,40	89,62	94,34

NT: Nükleotit AA: Amino asit

Çizelge 4.27 incelendiğinde genel olarak yerel GLRaV-4 izolatlarının dünya izolatlarıyla nükleotit düzeyinde %88,68 ile %97,87 arasında, amino asit düzeyinde ise %89,36 ile %100 arasında bir benzerlik gösterdiği görülmektedir.

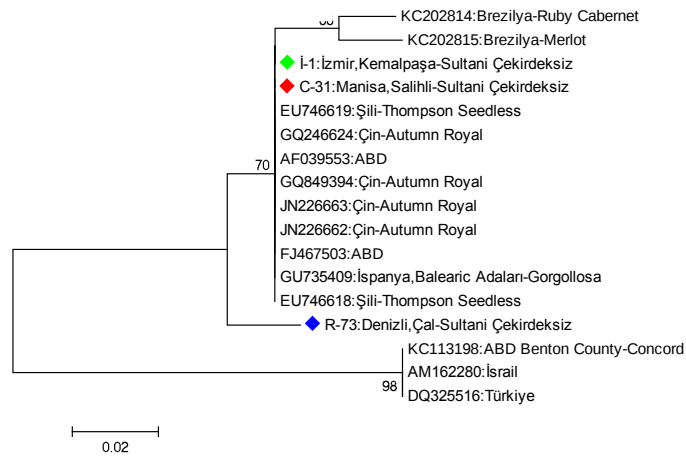
Nükleotit düzeyinde en yüksek benzerlik oranı C-31 ve R-73 ile JN226663 (Çin-Autumn Royal) izolatları arasında %97,87 olarak tespit edilmiştir. Amino asit düzeyinde ise en yüksek benzerlik oranı C-31 ve İ-1 ile JN226663 (Çin-Autumn Royal), JN226662 (Çin-Autumn Royal), GQ849394 (Çin-Autumn Royal) ve GU735409 (İspanya, Balearic Adaları-Gorgollosa) izolatları arasında %100 olarak belirlenmiştir. Nükleotit düzeyinde en düşük benzerlik oranı ise İ-1 ile DQ325516 (Türkiye) izolatı arasında %88,68 olarak belirlenirken amino asit düzeyinde en düşük benzerlik oranı C-31, İ-1 ve R-73 ile KC113198 (ABD, Benton County-Concord) ve AM162280 (İsrail) izolatları arasında %89,36 olarak belirlenmiştir.

Yerel GLRaV-4 izolatlarıyla NCBI gen bankasından alınan 14 referans izolatın HSP70h genine ait nükleotit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı Şekil 4.33'te amino asit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı ise Şekil 4.34'te yer almaktadır.



Şekil 4.33 Dünyadaki GLRaV-4 izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.

Şekil 4.33 incelendiğinde yerel izolatların tümünün birinci grupta yer aldığı görülmektedir. Yerel izolatlardan C-31 ve R-73, JN226663 (Çin-Autumn Royal) ve AF039553 (ABD) izolatlarıyla sınırlanmış alt grup içerisinde yer alırken İ-1 numaralı izolatın bu alt gruptan ayrı bir alt grupta yer aldığı görülmektedir.



Şekil 4.34 Dünyadaki GLRaV-4 izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı.

Şekil 4.34 incelendiğinde yerel izolatların tümünün birinci grupta yer aldığı görülmektedir. Yerel izolatlardan İ-1 ve C-31, KC202814 (Brezilya-Ruby Cabernet) ve EU746618 (Şili-Thompson Seedless) izolatlarıyla sınırlanmış alt grup içerisinde yer alırken R-73 numaralı izolatın farklı bir alt grupta yer aldığı görülmektedir.

4.5.5 GLRaV-5 ile ilgili sonuçlar

P-4 numaralı GLRaV-5 izolatıyla NCBI gen bankasından alınan 14 referans izolatın HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerine ilişkin elde edilen benzerlik oranları Çizelge 4.28’de yer almaktadır.

Çizelge 4.28 Dünyadaki GLRaV-5 izolatları ile P-4 numaralı izolatın HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları.

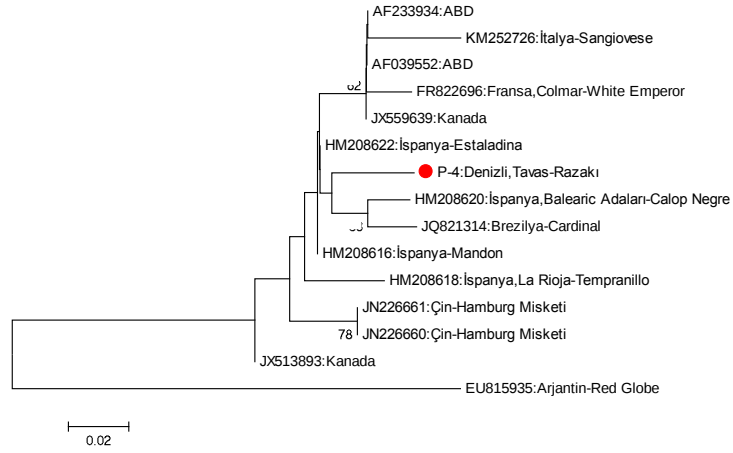
İzolat No: Lokasyon - Çeşit Adı	P-4:Denizli, Tavas-Razakı	
	NT (%)	AA (%)
HM208622:İspanya-Estaladina	97,53	96,30
HM208616:İspanya-Mandon	97,53	96,30
JX559639:Kanada	96,30	98,89
AF039552:ABD	96,30	98,89
HM208620:İspanya, Balearic Adaları-Galop Negre	96,30	96,30
AF233934:ABD	95,93	98,89
FR822696:Fransa, Colmar-White Emperor	95,56	98,89
JX513893:Kanada	95,19	97,78
JQ821314:Brezilya-Cardinal	95,19	98,89
HM208618:İspanya, La Rioja-Tempranillo	95,06	92,59
KM252726:İtalya-Sangiovese	95,02	97,26
JN226661:Çin-Hamburg Misketi	94,12	97,06
JN226660:Çin-Hamburg Misketi	94,12	97,06
EU815935:Arjantin-Red Globe	82,38	87,36

NT: Nükleotit **AA:** Amino asit

Çizelge 4.28 incelendiğinde P-4 numaralı izolatın dünya izolatlarıyla nükleotit düzeyinde %82,38 ile %97,53 arasında amino asit düzeyinde ise %87,36 ile %98,89 arasında benzerlik gösterdiği görülmektedir. P-4 numaralı izolatın nükleotit düzeyinde en yüksek benzerliği HM208622 (İspanya-Estaladina) ve HM208616 (İspanya-Mandon) izolatlarıyla %97,53 oranında gösterdiği belirlenmiştir. Amino asit düzeyinde ise P-4 numaralı izolatın JX559639 (Kanada), AF039552 (ABD), AF233934 (ABD), FR822696 (Fransa, Colmar-White Emperor) ve JQ821314 (Brezilya-Cardinal) numaralı izolatlarla %98,89 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Nükleotit (%82,38) ve amino asit (%87,36) düzeyinde

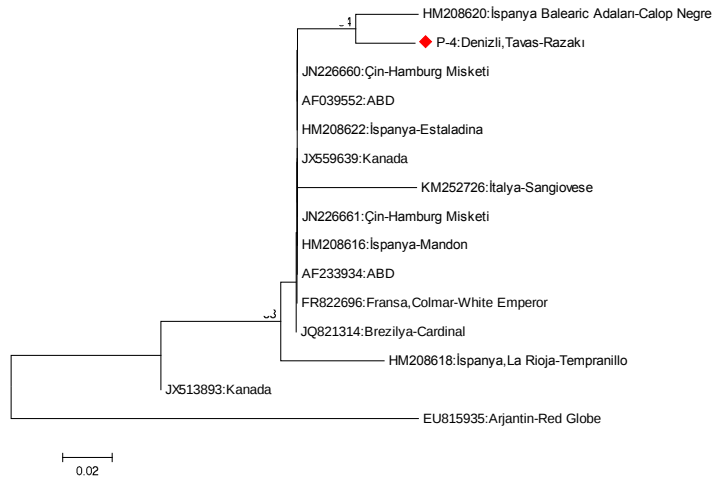
en düşük benzerlik oranı ise EU815935 (Arjantin-Red Globe) izolatu ile belirtilen oranlarda elde edilmiştir.

P-4 numaralı GLRaV-5 izolatuyla NCBI gen bankasından alınan 14 referans izolatu HSP70h genine ait nükleotit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı Şekil 4.35'te amino asit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı ise Şekil 4.36'da yer almaktadır.



Şekil 4.35 Dünyadaki GLRaV-5 izolatları ile P-4 numaralı izolatu HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.

Şekil 4.35 incelendiğinde P-4 numaralı izolatu birinci grup içinde AF233934 (ABD) ile HM208618 (İspanya, La Rioja-Tempranillo) izolatlarıyla sınırlanmış alt grup içerisinde yer aldığı görülmektedir.



Şekil 4.36 Dünyadaki GLRaV-5 izolatları ile P-4 numaralı izolatu HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı.

Şekil 4.36 incelendiğinde P-4 numaralı izolatin birinci grup içerisinde, HM208620 (İspanya, Balearic Adaları-Calop Negre) ile JQ821314 (Brezilya-Cardinal) numaralı izolatlarla sınırlanmış alt grupta yer aldığı görülmektedir.

4.5.6 GLRaV-Pr ile ilgili sonuçlar

C-31, D-12, İ-37, O-8 ve R-23 numaralı yerel GLRaV-Pr izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerine ilişkin elde edilen benzerlik oranları Çizelge 4.29’da yer almaktadır.

Çizelge 4.29 Yerel GLRaV-Pr izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları.

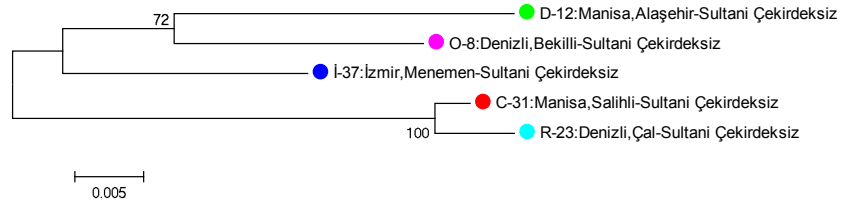
İzolat No: Lokasyon – Çeşit Adı	C-31 Manisa, Salihli S. Çekirdeksiz		D-12 Manisa, Alasehir S. Çekirdeksiz		İ-37 İzmir, Menemen S. Çekirdeksiz		O-8 Denizli, Bekilli S. Çekirdeksiz	
	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)
C-31:Manisa, Salihli- S. Çekirdeksiz								
D-12:Manisa, Alasehir- S. Çekirdeksiz	93,80	96,25						
İ-37:İzmir, Menemen- S. Çekirdeksiz	94,63	96,25	95,04	97,50				
O-8:Denizli, Bekilli- S. Çekirdeksiz	93,80	97,50	95,87	98,75	95,87	98,75		
R-23:Denizli, Çal- S. Çekirdeksiz	99,17	98,75	92,98	95,00	94,63	95,00	93,80	96,25

NT: Nükleotit AA: Amino asit

Çizelge 4.29 incelendiğinde yerel GLRaV-Pr izolatlarının nükleotit düzeyinde %92,98 ile %99,17 arasında, amino asit düzeyinde ise %95,00 ile %98,75 arasında yüksek bir benzerlik oranına sahip olduğu görülmektedir.

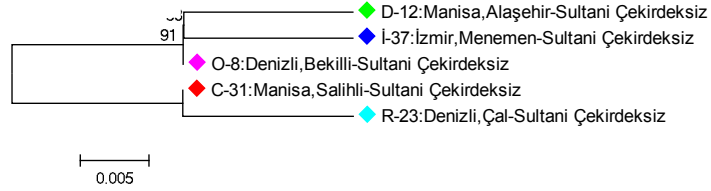
Nükleotit (%99,17) ve amino asit (%98,75) düzeyinde en yüksek benzerlik oranı C-31 ile R-23 numaralı izolatlar arasında belirtilen oranlarda tespit edilirken D-12 ile O-8 ve İ-37 ile O-8 numaralı izolatlar arasında da amino asit düzeyinde %98,75’lik yüksek bir benzerlik oranı belirlenmiştir. Nükleotit (%92,98) ve amino asit (%95,00) düzeyinde en düşük benzerlik oranı ise D-12 ile R-23 numaralı izolatlar arasında belirtilen oranlarda tespit edilirken İ-37 ile R-23 numaralı izolatlar arasında da amino asit düzeyinde %95,00’lik bir benzerlik oranı tespit edilmiştir.

Yerel GLRaV-Pr izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı Şekil 4.37’de amino asit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı ise Şekil 4.38’de yer almaktadır.



Şekil 4.37 Yerel GLRaV-Pr izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.

Şekil 4.37 incelendiğinde D-12, O-8 ve İ-37 numaralı izolatların birinci grupta yer aldığı, birinci grupta yer alan İ-37 numaralı izolatın diğer iki izolattan ayrılarak farklı bir alt grupta yer aldığı, C-31 ve R-23 numaralı izolatların ise ikinci grupta yer aldığı görülmektedir.



Şekil 4.38 Yerel GLRaV-Pr izolatlarının HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı.

Şekil 4.38 incelendiğinde D-12, İ-37 ve O-8 numaralı izolatların birinci grupta yer aldığı, birinci grupta yer alan O-8 numaralı izolatın diğer iki izolattan ayrılarak farklı bir alt grupta yer aldığı, C-31 ve R-23 numaralı izolatların ise ikinci grupta yer aldığı görülmektedir.

Yerel GLRaV-Pr izolatlarıyla NCBI gen bankasından alınan dört referans izolatın HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerine ilişkin elde edilen benzerlik oranları Çizelge 4.30'da yer almaktadır.

Çizelge 4.30 incelendiğinde genel olarak yerel GLRaV-Pr izolatlarının dünya izolatlarıyla nükleotit düzeyinde %90,08 ile %95,04 arasında, amino asit düzeyinde ise %95,00 ile %100 arasında yüksek bir benzerlik gösterdiği görülmektedir.

Nükleotit (%95,04) ve amino asit (%100) düzeyinde en yüksek benzerlik oranı C-31 numaralı izolatla AM745347 (Yunanistan-Prevezianiko) numaralı izolat arasında belirtilen oranlarda tespit edilmiştir.

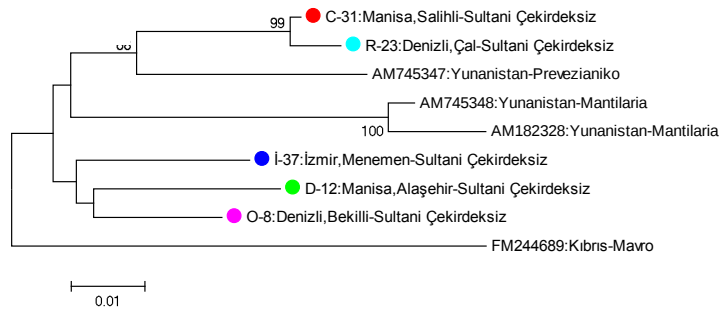
Çizelge 4.30 Dünyadaki GLRaV-Pr izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları.

İzolat No: Lokasyon - Çeşit Adı	C-31 Manisa,Salihli S. Çekirdeksiz		D-12 Manisa,Alaşehir S. Çekirdeksiz		İ-37 İzmir,Menemen S. Çekirdeksiz		O-8 Denizli,Bekilli S. Çekirdeksiz		R-23 Denizli,Çal S. Çekirdeksiz	
	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)
AM745347:Yunanistan-Prevezianiko	95,04	100,00	93,80	96,25	92,98	96,25	93,80	97,50	94,21	98,75
AM745348:Yunanistan-Mantilaria	92,98	96,25	92,98	97,50	91,74	95,00	93,39	96,25	92,15	95,00
AM182328:Yunanistan-Mantilaria	92,15	96,25	92,15	97,50	91,74	95,00	92,56	96,25	91,32	95,00
FM244689:Kıbrıs-Mavro	90,50	97,50	90,50	98,75	91,32	96,25	91,32	97,50	90,08	96,25

NT: Nükleotit AA: Amino asit

Nükleotit (%90,08) düzeyinde en düşük benzerlik oranı R-23 ile FM244689 (Kıbrıs-Mavro) numaralı izolat arasında, amino asit (%95,00) düzeyindeki en düşük benzerlik oranı ise İ-37 ve R-23 ile AM745348 (Yunanistan-Mantilaria) ve AM182328 (Yunanistan-Mantilaria) izolatları arasında belirtilen oranlarda tespit edilmiştir.

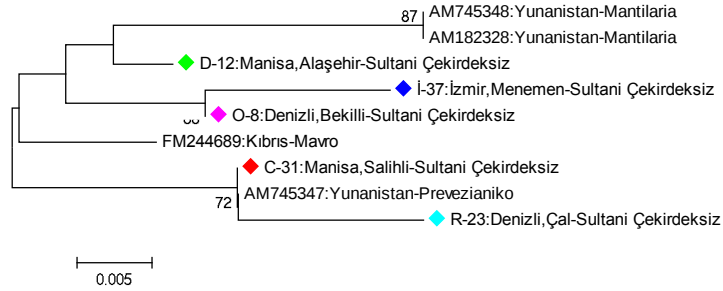
Yerel GLRaV-Pr izolatlarıyla NCBI gen bankasından alınan dört referans izolatın HSP70h genine ait nükleotit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı Şekil 4.39'da amino asit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı ise Şekil 4.40'da yer almaktadır.



Şekil 4.39 Dünyadaki GLRaV-Pr izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.

Şekil 4.39 incelendiğinde yerel izolatların tamamının birinci grupta yer aldığı görülmektedir. Yerel izolatlardan C-31 ve R-23 numaralı izolatlar AM745347 (Yunanistan-Prevezianiko), AM745348 (Yunanistan-Mantilaria) ve AM182328 (Yunanistan-Mantilaria) numaralı izolatlarla birlikte ayrı bir alt grupta yer alırken, İ-37, D-12 ve O8 numaralı izolatların ise ayrı bir alt grupta yer aldığı, FM244689

(Kıbrıs-Mavro) numaralı izolatın ise tek olarak ikinci grupta yer aldığı görülmektedir.



Şekil 4.40 Dünyadaki GLRaV-Pr izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı.

Şekil 4.40 incelendiğinde D-12, I-37 ve O-8 numaralı yerel izolatların AM745348 (Yunanistan-Mantilaria) ve FM244689 (Kıbrıs-Mavro) izolatlarıyla sınırlı olan birinci grup içerisinde yer aldığı, C-31, R-23 ve AM745347 (Yunanistan-Prevezianiko) izolatlarının ise ikinci grupta yer aldığı görülmektedir. Ayrıca birinci grupta yer alan izolatlardan FM244689 (Kıbrıs-Mavro) ve ikinci grupta yer alan izolatlardan R-23 yer aldıkları grupta bulunan diğer izolatlardan ayrı bir alt grup içerisinde yer almıştır.

4.5.7 GLRaV-De ile ilgili sonuçlar

B-21, D-24, R-75 ve U-5 numaralı yerel GLRaV-De izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerine ilişkin elde edilen benzerlik oranları Çizelge 4.31’de yer almaktadır.

Çizelge 4.31 Yerel GLRaV-De izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları.

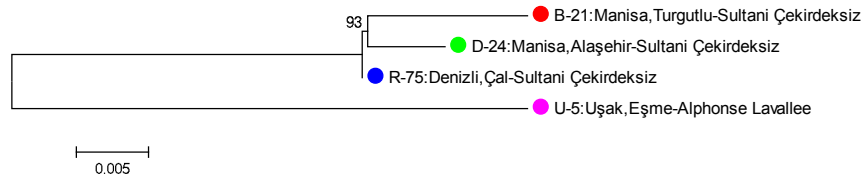
İzolat No: Lokasyon - Çeşit Adı	B-21 Manisa, Turgutlu S. Çekirdeksiz		D-24 Manisa, Alaşehir S. Çekirdeksiz		R-75 Denizli, Çal S. Çekirdeksiz	
	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)	NT (%)	AA (%)
B-21:Manisa, Turgutlu-S. Çekirdeksiz						
D-24:Manisa, Alaşehir-S. Çekirdeksiz	98,38	98,37				
R-75:Denizli, Çal-S. Çekirdeksiz	98,92	98,37	99,46	100,00		
U-5:Uşak, Eşme-A. Lavallée	93,24	97,56	93,78	99,19	94,32	99,19

NT: Nükleotit AA: Amino asit

Çizelge 4.31 incelendiğinde yerel GLRaV-De izolatlarının nükleotit düzeyinde %93,24 ile %99,46 arasında, amino asit düzeyinde ise %97,56 ile %100 arasında yüksek bir benzerlik oranına sahip olduğu görülmektedir.

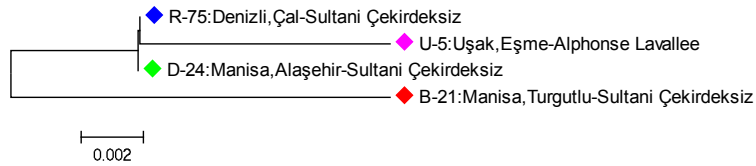
Nükleotit (%99,46) ve amino asit (%100) düzeyinde en yüksek benzerlik oranı D-24 ve R-75, nükleotit (%93,24) ve amino asit (%97,56) düzeyinde en düşük benzerlik oranı ise B-21 ve U-5 numaralı izolatlar arasında belirtilen oranlarda tespit edilmiştir.

Yerel GLRaV-De izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı Şekil 4.41’de amino asit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı ise Şekil 4.42’de yer almaktadır.



Şekil 4.41 Yerel GLRaV-De izolatlarının HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.

Şekil 4.41 incelendiğinde yerel izolatlardan B-21, D-24 ve R-75’in birinci grupta yer aldığı, R-75’in birinci grupta bulunan diğer iki izolattan ayrı bir alt grupta yer aldığı, U-5 numaralı izolatın ise ikinci grupta yer aldığı görülmektedir.



Şekil 4.42 Yerel GLRaV-De izolatlarının HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı.

Şekil 4.42 incelendiğinde R-75, U-5 ve D-24 numaralı izolatların birinci grupta yer aldığı, D-24’ün birinci grupta bulunan diğer iki izolattan ayrı bir alt grupta yer aldığı, B-21 numaralı izolatın ise ikinci grupta yer aldığı görülmektedir.

Yerel GLRaV-De izolatlarıyla NCBI gen bankasından alınan iki referans izolatın HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerine ilişkin elde edilen benzerlik oranları Çizelge 4.32’de yer almaktadır.

Çizelge 4.32 Dünyadaki GLRaV-De izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait nükleotit ve amino asit dizilerinin benzerlik oranları.

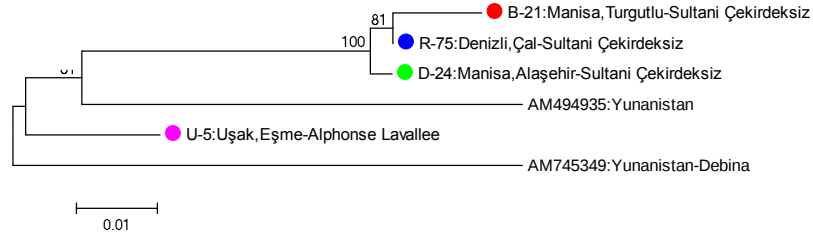
İzolat No: Lokasyon - Çeşit Adı	B-21 Manisa, Turgutlu S. Çekirdeksiz		D-24 Manisa, Alaşehir S. Çekirdeksiz		R-75 Denizli, Çal Sultani Çekirdeksiz		U-5 Uşak, Eşme A. Lavallée	
	NT	AA	NT	AA	NT	AA	NT	AA
AM494935:Yunanistan	90,27	94,31	91,89	95,93	91,35	95,93	92,70	96,75
AM745349:Yunanistan-Debina	89,46	93,50	89,46	95,12	90,00	95,12	92,43	94,31

NT: Nükleotit AA: Amino asit

Çizelge 4.32 incelendiğinde genel olarak yerel GLRaV-De izolatlarının dünya izolatlarıyla nükleotit düzeyinde %89,46 ile %92,70 arasında, amino asit düzeyinde ise %93,50 ile %96,75 arasında benzerlik gösterdiği görülmektedir.

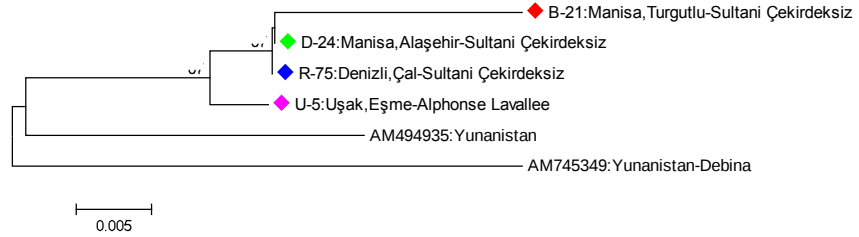
Nükleotit (%92,70) ve amino asit (%96,75) düzeyinde en yüksek benzerlik oranı U-5 ve AM494935 (Yunanistan) izolatları arasında belirtilen oranlarda tespit edilmiştir. Nükleotit (%89,46) ve amino asit (%93,50) düzeyinde en düşük benzerlik oranı ise B-21 ve AM745349 (Yunanistan-Debina) izolatları arasında belirtilen oranlarda tespit edilirken D-24 numaralı izolat da nükleotit düzeyinde AM745349 (Yunanistan-Debina) izolatı ile %89,46 oranında bir benzerlik göstermiştir.

Yerel GLRaV-De izolatlarıyla NCBI gen bankasından alınan iki referans izolatın HSP70h genine ait nükleotit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı Şekil 4.43’te amino asit dizilerine ilişkin filogenetik soy ağacı ise Şekil 4.44’te yer almaktadır.



Şekil 4.43 Dünyadaki GLRaV-De izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait nükleotit dizilerinin filogenetik soy ağacı.

Şekil 4.43 incelendiğinde yerel GLRaV-De izolatlarının tamamının AM494935 (Yunanistan) izolatıyla birlikte birinci grupta yer aldığı, bu grupta yer alan U-5 numaralı izolatın birinci grupta bulunan diğer izolatlardan ayrı bir alt grup içinde yer aldığı, AM745349 (Yunanistan-Debina) numaralı izolatın ise ikinci grupta yer aldığı görülmektedir.



Şekil 4.44 Dünyadaki GLRaV-De izolatları ile yerel izolatların HSP70h genine ait amino asit dizilerinin filogenetik soy ağacı.

Şekil 4.44 incelendiğinde yerel GLRaV-De izolatlarının tamamının AM494935 (Yunanistan) izolatı ile birinci grupta yer aldığı ve bu izolatın diğer izolatlardan ayrı bir alt grup ile ayrıldığı; AM745349 (Yunanistan-Debina) izolatının ise ikinci grupta yer aldığı görülmektedir.

5. TARTIŞMA

Dünya üretiminin büyük bir kısmı ılıman iklim kuşağı üzerinde yer alan ülkelerde gerçekleştirilen üzüm, dünyanın altıncı büyük üzüm üreticisi olan ülkemizde de en değerli meyve olarak görülmekte olup ülkemiz bağ alanlarının 1/3'ünü oluşturan, üzüm üretimimizin ise yarısını karşılayan Ege Bölgesi ülkemiz bağcılığında ayrı bir öneme sahiptir.

Bağcılıkta üretimi sınırlayan unsurların içerisinde hastalıklar ve zararlılar gerekli önlemler alınmadığı takdirde ürün kayıplarına neden olan en önemli faktörlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Bağlarda görülen virüs ve virüs benzeri hastalık etmenleri gerek sayılarının oldukça fazla olması ve hızlı yayılım göstermeleri, gerekse kolay ve hızlı sonuç veren bir mücadele yönteminin bulunmaması nedeniyle üzümün kalite parametrelerine olan olumsuz etkileri ve neden oldukları ürün kayıplarından dolayı hastalıklar ve zararlılar içerisinde önemli bir yere sahiptir.

Günümüzde asma bitkisinin 65'den fazla virüs ve virüs benzeri hastalığa konukçuluk ettiği bilinmekte olup bunlardan bir kısmı enfekteli asmalarda latent olarak bulunmaktadır. Yapılan son sınıflandırmayla günümüzde sayıları 11 olarak bildirilen (Bkz. Çizelge 1.3) asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler asmanın konukçuluk yaptığı viral etmenler içerisinde aynı hastalıktan sorumlu en büyük etmen grubunu oluşturmakta olup odunsu bitkiler içerisinde bugüne kadar aynı tipte ancak farklı virüsler tarafından neden olunan bir hastalık ile karşılaşılmamıştır (Martelli et al., 2012).

Yürütülen tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen sörvey çalışmaları sırasında beyaz üzüm çeşitlerinin yapraklarında damar bantlaşması, klorotik ve mozaik renk açılması, benek oluşumu, klorotik ve mozaik sararma, genel ve kısmi sararma, şekil bozukluğu, içe doğru kıvrılma, uç kısımlarda sararma görülürken bitki genelinde ise çalılışma tespit edilen semptomlar arasında yer almıştır (Bkz. Şekil 4.1). Renkli üzüm çeşitlerinde ise ana damar haricinde yaprak ayasında kızarıklık ve yapraklarda kıvrılmalar, yaprak genelinde kızarıklık, yaprak ayasında içi yeşil kırmızı haleler, yaprak ayasında kırmızı ve yeşil mozaik renk belirtileri ile karşılaşılmiştir (Bkz. Şekil 4.2). Beyaz ve renkli üzüm çeşitlerinde gözlenen söz konusu belirtilerin birçoğu asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler tarafından oluşturulan semptomlarla büyük ölçüde benzerlik göstermesine rağmen bu tip belirtileri bağlarda görülen diğer virüs ve virüs benzeri hastalık etmenleri ile

abiyotik faktörlerin de oluşturabileceği göz önünde bulundurularak örneklemeler gerçekleştirilmiştir.

Sörvey çalışması sırasında toplanan örneklerin 301'i beyaz üzüm çeşitlerinden ve 100'ü renkli üzüm çeşitlerinden olmak üzere 401'ini söz konusu simptomların en az birini gösteren asmalar oluşturmuşken özellikle beyaz üzüm çeşitlerinde latent enfeksiyonların görülme ihtimaline karşı 19'u beyaz üzüm çeşitlerinden ve dördü renkli üzüm çeşitlerinden olmak üzere 23 örnek ise simptom gözlenmeyen asmalardan tesadüfi olarak alınmıştır. Söz konusu örneklerde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin saptanması amacıyla gerçekleştirilen DAS-ELISA ve Real-time RT-PCR testleri sonucunda ise 109'u simptomlu, altısı simptomsuz olmak üzere beyaz üzüm çeşitlerinden alınan 115 örnekle renkli üzüm çeşitlerinden alınan simptomlu 18 örneğin söz konusu virüslerden en az biri ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Buna karşın beyaz üzüm çeşitlerinden alınan 192'si simptomlu, 13'ü simptomsuz 205 örnek ile renkli üzüm çeşitlerinden alınan 82'si simptomlu, dördü simptomsuz 86 örnek ise söz konusu virüsler açısından sağlıklı olarak saptanmıştır.

Beyaz ve renkli üzüm çeşitlerinde gözlenen simptomlarla DAS-ELISA ve Real-time RT-PCR sonuçları birlikte değerlendirildiğinde beyaz üzüm çeşitlerinde hastalıkla ilişkili virüsler tarafından oluşturulan latent enfeksiyonların da tespit edildiği buna karşın renkli üzüm çeşitlerinde tespit edilen enfeksiyonların tamamının simptomlu asmalardan alınan örneklerde saptandığı görülmektedir. Bununla birlikte simptom gözlenen 192'si beyaz, 82'si renkli üzüm çeşitlerine ait örnekler ise hastalıkla ilişkili virüsler açısından sağlıklı olarak belirlenmiştir. Latent enfeksiyonların görüldüğü çeşitler ve bu çeşitlerde saptanan virüsler incelendiğinde ise görülen latent enfeksiyonların tamamının Sultani Çekirdeksiz çeşidine ait olduğu; üç örneğin GLRaV-De, iki örneğin GLRaV-Pr, bir örneğin ise GLRaV-3 ile enfekteli olduğu, karışık enfeksiyonlardan kaynaklanan latent enfeksiyonlara ise rastlanılmadığı belirlenmiştir. Bu durum, diğer tüm hastalıklar ve zararlılarda olduğu gibi simptomatolojinin arazi koşullarında virüs hastalıklarının ön tanısı için büyük önem taşıdığını ancak kesin tanının mutlaka spesifik laboratuvar analizleri ile yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Nitekim asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerle gerçekleştirilen çalışmalarda Azeri (1990), çekirdeksiz üzüm ve Amerikan asma anaçlarında asma yaprak kıvrılma virüs hastalığının tipik belirtilerine rastlanılmamasına rağmen hastalıkla ilişkili virüslerin bu çeşitlerde de bulunduğunu biyolojik indeksleme testleriyle tespit ettiğini; Krake (1993), asma yaprak kıvrılma virüs hastalığının tipik simptomlarının çeşide, enfekte

eden virüse ve bunların kombinasyonlarına göre farklı belirtiler gösterebileceğini; Naidu et al. (2008), Pinot Noir, Cabernet Franc gibi bazı kırmızı ve Chardonnay gibi bazı beyaz üzüm çeşitlerinde hasat döneminde yapraklarda tipik bir şekilde aşağı doğru kıvrılma belirtisi görüldüğünü, diğer bazı çeşitlerde ise bu belirtilerin çok belirgin olarak görülmediğini semptomlarının çeşitlerde, hatta aynı çeşit içerisinde bile yüksek derecede farklılık gösterdiğini; Abou Ghanem-Sabanadzovic et al. (2010), Kaliforniya’da renkli bir üzüm çeşidi olan Carnelian’da saptadıkları hastalıkla ilişkili GLRaV-Car virüsünün asmalarda hafif şiddette semptom oluşturduğunu; Bertazzon et al. (2010) ve Poojari et al. (2013), GLRaV-2’nin bazı strain’lerinin asmalarda semptom göstermediğini; Al Rwahnih et al. (2012), GLRaV-7’nin asmalarda semptom göstermediğini; Al Rwahnih et al. (2015), GLRaVs belirtilerinin görüldüğü asmalarda GRSPaV enfeksiyonunun oldukça yüksek oranda (%89) tespit edildiğini; Naidu et al. (2015a) ise GLRaVs ile GRBaV’nin belirtilerinin farklı olmasına rağmen enfekteli beyaz üzüm çeşitlerinin hiçbirinde ve birçok kırmızı üzüm çeşidinde belirtilere rastlamadıklarını dolayısıyla bu virüslerin teşhisinin sadece semptomatolojiye dayalı olarak yapmanın zor olduğunu bildirmişlerdir.

Elde edilen semptomatolojik bulgular ile önceki çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde özellikle latent enfeksiyonların tümünün Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde görülmesi bu çeşitte hastalıkla ilişkili virüsler açısından latent enfeksiyon görülme potansiyelinin yüksek olabileceğini düşündürmektedir. Semptom görülen ancak GLRaVs enfeksiyonu tespit edilemeyen örneklerdeki belirtilerin, çalışma kapsamına dahil edilmeyen hastalıkla ilişkili yeni bir virüs olan GLRaV-Car ve/veya GLRaVs’e oldukça benzer semptomlar gösteren GRSPaV gibi bağlarda görülen diğer virüs ve virüs benzeri etmenler tarafından oluşturulma ihtimalinin yüksek olduğu düşünülmektedir.

Sörvey çalışmaları sırasında toplanan 424 asma örneğinde gerçekleştirilen DAS-ELISA testleri sonucunda 27 örneğin GLRaV-1+3; dokuz örneğin GLRaV-4-9; üç örneğin ise GLRaV-2 tanı kitleri ile pozitif reaksiyon verdiği, GLRaV-6 ve GLRaV-7 tanı kitleriyle yapılan testlerde ise enfekteli örneğe rastlanılmadığı belirlenmiştir. Buna karşın GLRaV-1+3 tanı kiti ile 30, GLRaV-4-9 tanı kiti ile 43 ve GLRaV-2 tanı kiti ile 46 örneğe ait absorbans değerlerinin negatif kontrolün 1,5-2 katı arasında olduğu ancak absorbans değerlerinin, pozitif değerlendirme koşulu olan negatif kontrolün iki katına ulaşmadığı tespit edilmiştir. Söz konusu bu örnekler DAS-ELISA testlerinde negatif olarak değerlendirilmiş ve Real-time RT-PCR çalışmalarına alınmıştır. Spesifik primerler (Bkz. Çizelge 3.7) kullanılarak

gerçekleştirilen Real-time RT-PCR çalışmalarında ise GLRaV-1+3 için testlenen 30 örneğin on (%33,3)'u; GLRaV-4-9 için testlenen 43 örneğin altı (%14)'sı ve GLRaV-2 için testlenen 46 örneğin dokuz (%19,6)'u enfekteli olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte DAS-ELISA sonucunda söz konusu etmenlerle enfekteli olduğu belirlenen örneklerin tümü Real-time RT-PCR tanı yöntemi sonucunda da enfekteli olarak saptanmıştır.

GLRaV-4'ün strain'leri olarak bildirilen GLRaV-Pr ve GLRaV-De virüslerini tanılamada ise GLRaV-4-9 DAS-ELISA kiti ile negatif sonuçlar alınmıştır. Ayrıca GLRaV-7 DAS-ELISA tanı kitiyle negatif reaksiyon veren örneklerden birinin Real-time RT-PCR sonucunda GLRaV-7 ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Söz konusu örneklerde gerçekleştirilen DAS-ELISA ve Real-time RT-PCR test sonuçları birlikte değerlendirildiğinde ise Real-time RT-PCR, asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslere göre değişmekle birlikte %14 ile %33,3 arasında daha fazla örnekte söz konusu virüsleri saptayabilmiştir. Nitekim Borja and Ponz (1992), Golino et al. (1992) ve Rowhani et al. (1992), DAS-ELISA yönteminin floemle sınırlı ve düşük konsantrasyona sahip örneklerde ve/veya kullanılan antiserumun akraba virüslerle çapraz reaksiyon göstermesi gibi bazı durumlarda zaman zaman güvenilir olmayan sonuçların ortaya çıkmasına neden olabileceğini; Dovas and Katis (2003), bitki içerisinde düzensiz dağılan, düşük ve mevsimsel olarak değişken konsantrasyona sahip olan GLRaVs'in belirlenmesinde materyal olarak kabuk doku kullanımı gerektiği için DAS-ELISA yönteminin kullanımının zor ve hassasiyetinin düşük olmasından dolayı güvenilir olmadığını; Bertazzon and Angelini (2004), GLRaV-2 ve GLRaV-2'nin RG ve BD varyantları için RT-PCR ile enfekteli olarak tespit ettikleri örneklerin yaklaşık olarak %10'unu DAS-ELISA sonucunda negatif olarak tespit ettiklerini, GLRAV-2'nin tanısında DAS-ELISA'dan ziyade RT-PCR kullanımının çok daha etkin olduğunu; Beuve et al. (2007), GLRaV-2 için SYBR Green Real-time RT-PCR'ın 125.000 kat sulandırılmış RNA örneklerinde bile pozitif sonuç verdiğini bu değerın klasik RT-PCR için en fazla 1000 kat olduğunu, asma materyali için SYBR Green ile Real-time RT-PCR'ın klasik RT-PCR'dan 125 kat daha hassas bir tanı yöntemi olduğunu; Osman et al. (2012), GLRaVs'in diğer virüslere göre doku içerisinde oldukça düzensiz bir şekilde dağıldığını, dağılımın mevsimsel değişkenlik gösterdiğini, floemle sınırlı virüsler için örneklerdeki virüs yoğunluklarının çok düşük konsantrasyonlarda olduğu dönemlerde bile Real-time RT-PCR'ın virüsleri tanılamada son derece hızlı, duyarlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

Söz konusu virüsler açısından elde edilen DAS-ELISA ve Real-time PCR test sonuçları ile önceki çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, DAS-ELISA tanı yönteminin söz konusu virüslerle enfekteli olduğu bu yöntem ile saptanan asma örneklerinde, Real-time RT-PCR yöntemi ile paralel sonuçlar verdiği görülmektedir. Elde edilen bu sonuçla ilgili yürütülen bir çalışmada da Kaya ve Erilmez (2014), GLRaV-1, -2, -3, -4 ve GFkV virüsleri açısından DAS-ELISA sonucu enfekteli olarak tespit ettikleri örnekleri RT-PCR ile test etmiş ve DAS-ELISA ile paralel sonuçlar elde ettiklerini bildirmişlerdir. Ancak DAS-ELISA tanı yöntemi sonucunda negatif reaksiyon gösteren bazı örneklerde Real-time PCR'ın %14 ile %33,3 arasında daha fazla örnekte söz konusu virüsleri saptayabilmesi, DAS-ELISA'nın floemle sınırlı olan asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin tanınmasında tek başına yeterli duyarlılıkta bir tanı yöntemi olmadığını ve moleküler tanı yöntemlerinden biri ile desteklenmesi gerektiğini göstermektedir. Elde edilen bu sonuçla ilgili olarak yapılan bir çalışmada da Valverde et al. (1990), bitkilerde görülen virüs hastalıklarının tanınmasında birden fazla yöntem kullanımının daha doğru sonuçlar sağlayacağını bildirmişlerdir.

Ege Bölgesi bağ alanlarında yürütülen bu çalışmada testlenen 424 örneğin 133 (%31,4)'ünün asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerden en az biri ile enfekteli olduğu belirlenmiş olup 291 örnekte (%68,6) ise hastalıkla ilişkili virüslere rastlanılmamıştır. GLRaVs, dünya bağ alanlarında bugüne kadar rapor edilen 65'den fazla virüs ve virüs benzeri hastalık etmenlerinden 11'ini oluşturmaktadır. Örneklerde saptanan %31,4'lük GLRaVs enfeksiyonu GLRaV-Car hariç asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili diğer virüsler tarafından oluşturulmuş olup test edilen örneklerde saptanan semptomlar ve bağlarda görülen diğer virüslerin de bulunma ihtimalleri değerlendirildiğinde hiç kuşkusuz enfeksiyon oranının çok daha yüksek değerlere ulaşabileceği düşünülmektedir. Ayrıca Ege Bölgesi ülkemiz üzüm üretiminde birinci sırada olmasının yanı sıra ülkemiz 2011 ve 2012 yılları ortalaması olan 8.258.038 adet asma fidanı üretiminin %79,4'ünü gerçekleştirerek asma fidanı üretiminde de lider durumdadır (Çelik, 2013). Bölgede faaliyet gösteren fidan üreticileri, asma fidanı üretimlerinin neredeyse tamamına yakını bölge bağlarından sağladıkları yerel üretim materyallerini kullanarak gerçekleştirmekte olup standart asma fidanı üretiminde yürürlükte olan yasal mevzuat çerçevesinde virüs hastalıkları açısından herhangi bir kontrol yapılmamaktadır. Ülkemiz üzüm üretiminde lider bölge olan Ege Bölgesi'nin asma fidanı üretimindeki potansiyeli, üretim sürecindeki yasal mevzuatlar ve bağlarda görülen virüslerin üretim materyalleri ile taşıyıcı olması

elde edilen enfeksiyon oranlarıyla birlikte değerlendirildiğinde saptanan enfeksiyon oranının bölge için oluşturduğu tehdidin ne kadar büyük olduğu anlaşılmaktadır.

Real-time RT-PCR sonuçlarına göre Ege Bölgesi genelinde karışık enfeksiyonlar dikkate alınmadan virüsler bazında bir değerlendirme yapıldığında testlenen 424 örnek içerisinde GLRaV-Pr'nin %16,8'lik bulunma durumuyla en yaygın virüs olduğu, bunu %12 ile GLRaV-De'nin izlediği belirlenmiştir. GLRaV-Pr ve GLRaV-De virüsleri Yunanistan bağ alanlarından rapor edilmiş olup GLRaV-4'ün genetik olarak farklı strain'leri olarak tanımlanmış ve hastalıkla ilişkili GLRaV-4, -5, -6, -9 ve -Car virüslerinin yer aldığı *Ampelovirus* cinsi içerisinde sınıflandırılmıştır (Maliogka et al., 2008a; Maliogka et al., 2009; Naidu et al., 2015b). Ancak literatür taramaları sonucunda GLRaV-Pr ve GLRaV-De virüslerinin yaygınlık durumları ile ilgili yapılmış herhangi bir çalışmaya ise rastlanılmamıştır. Söz konusu virüslerin bölgemiz bağ alanlarında en yaygın iki virüs olarak saptanması ve çalışmanın yürütüldüğü Aydın ili hariç olmak üzere Manisa, Denizli, İzmir ve Uşak illerinde yetiştiriciliği yapılan yerli ve yabancı üzüm çeşitlerinde tekli ve karışık enfeksiyonlar şeklinde varolması, GLRaV-Pr ve GLRaV-De virüslerinin Ege Bölgesi bağ alanlarında uzun zamandan beri var olabileceğini göstermektedir. Nitekim örneklemelerin yapıldığı bağlar genel olarak 5-20 (ortalama 17) yaş aralığına sahip olup bağların tesisinde kullanılan fidanların temininin ise yerel asma fidanı üreticilerinden sağlandığı bilinmektedir.

GLRaV-3 açısından bir değerlendirme yapıldığında ise %8,5'luk bulunma oranı ile GLRaV-Pr ve GLRaV-De'den sonra üçüncü sırada yer aldığı saptanmıştır. Kaya ve Erilmez (2014), Manisa, İzmir, Denizli ve Çanakkale bağ alanlarında GLRaV-3'ün bulunma oranını %45,1 olarak; Ege, İç Anadolu, Doğu ve Batı Anadolu bağ alanlarında gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise Ertunc and Turkmen (2015), GLRaV-3'ün bulunma oranını %50,35 olarak saptadıklarını bildirmişlerdir. GLRaV-3'ün bulunma durumuyla ilgili Türkiye'nin İç Anadolu Bölgesi, Güneydoğu Anadolu Bölgesi ile İran ve Şili bağ alanlarında yapılan çalışmalar incelendiğinde saptanan bulunma oranlarının bu çalışma kapsamında saptanan orandan daha düşük (%5,78 - %7) olduğu farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Akbaş et al., 2007; Çığışar ve Yılmaz, 1998; Rakhshandehroo et al., 2005; Fiore et al., 2008). Buna karşın Türkiye'nin çeşitli coğrafik bölgeleri ile Mısır, Suriye, İspanya, Kaliforniya, Washington ve Virjinya'da gerçekleştirilen çalışmalarda ise GLRaV-3'ün bulunma oranının bu çalışma kapsamında saptanandan daha yüksek (%8,7 - %71) olduğu farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Özaslan vd., 1991; Özaslan ve Yılmaz, 1995; Özaslan, 1998; Yılmaz

et al., 1997; Sarpkaya, 2003; Köklü, 1999; Ahmed et al., 2004; Mslmanieh et al., 2006; Baraff, 2011; Fiore et al., 2012).

Önceki çalışmalardan anlaşıldığı üzere GLRaV-3'ün testlenen örneklerde %5,78 ile %71 arasında değişen oranlarda bulunduğu anlaşılmaktadır. Bununla birlikte önceki çalışmalara ait bulunma oranlarının ortalamaları üzerinden bir değerlendirme yapıldığında ise GLRaV-3'ün %28,52'lik bulunma oranıyla hastalıkla ilişkili virüslerle yapılan çalışmalar arasında ilk sırada yer aldığı anlaşılmaktadır. Bu çalışma kapsamında GLRaV-3'ün bulunma durumuna ilişkin bulgular, ulusal ve uluslararası literatür bildirişleri ile birlikte değerlendirildiğinde ise %8,5 olarak saptanan bulunma oranının %5,78 ile %71 arasında yer aldığı ancak önceki çalışmaların ortalaması olan %28,52'nin ise altında olduğu görülmektedir. Ayrıca incelenen literatür bildirişlerinde GLRaV-Pr ve GLRaV-De virüsleriyle ilgili bir çalışma yapılmamış olup bu çalışmada da GLRaV-Pr ve GLRaV-De virüsleri ile ilgili elde edilen sonuçlar göz ardı edildiğinde GLRaV-3'ün hastalıkla ilişkili en yaygın virüs olacağı anlaşılmaktadır.

Gerçekleştirilen bu çalışmada GLRaV-2, Ege Bölgesi bağ alanlarında %2,8 bulunma oranı ile dördüncü sırada yer almıştır. Kaya ve Erilmez (2014), Manisa, İzmir, Denizli ve Çanakkale bağ alanlarında GLRaV-2'nin bulunma oranını %7,92 olarak saptadıklarını; buna karşın Ertunc and Turkmen (2015), Ege, İç Anadolu, Doğu ve Batı Anadolu bağ alanlarında gerçekleştirdikleri bir çalışmada GLRaV-2'nin bulunma oranını diğer çalışmalara göre oldukça yüksek bir oranda (%62) tespit ettiklerini bildirmişlerdir. GLRaV-2'nin bulunma oranlarına ilişkin Türkiye'nin İç Anadolu Bölgesi ile Mısır'da yapılan çalışmalar incelendiğinde bu çalışmada saptanan orandan daha düşük (%1,4 - %2,41) olarak belirlendiği farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Akbaş et al., 2007; Ahmed et al., 2004). Buna karşın Türkiye'nin Trakya bölgesi bağ alanları ile Suriye, Şili, Hırvatistan, Kaliforniya, İspanya ve Virjinya'da ise bu çalışmada saptanan orandan daha yüksek (%4,1 - %34) olarak tespit edildiği farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Köklü, 1999; Mslmanieh et al., 2006; Fiore et al., 2008; Voncina et al., 2010; Baraff, 2011; Fiore et al., 2012; Al Rwahnih et al., 2015; Jones et al., 2015). Bununla birlikte Çığır ve Yılmaz (1998) ise Güneydoğu Anadolu Bölgesi bağ alanlarında GLRaV-2 enfeksiyonu tespit edemediklerini bildirmişlerdir.

Önceki çalışmalarda GLRaV-2'nin testlenen örneklerde %1,4 ile %62 arasında değişen oranlarda bulunduğu görülmektedir. Bununla birlikte önceki çalışmalara ait bulunma oranlarının ortalamaları üzerinden bir değerlendirme

yapıldığında ise GLRaV-2'nin %17,64'lik bulunma oranıyla hastalıkla ilişkili virüslerle yapılan çalışmalar arasında üçüncü sırada yer aldığı anlaşılmaktadır. GLRaV-2'nin Ege Bölgesi'nde bulunma oranına ait elde edilen bulgular önceki çalışmaların sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde %2,8 olarak saptanan bulunma oranının %1,4 ile %62 arasında yer aldığı ancak %17,64 olarak belirlenen ortalamanın ise altında olduğu görülmektedir.

GLRaV-4 ise Ege Bölgesi bağ alanlarında %2,4 bulunma oranı ile beşinci sırada yer almıştır. Kaya ve Erilmez (2014), Manisa, İzmir, Denizli ve Çanakkale bağ alanlarında GLRaV-4'ün bulunma oranını %2,2 olarak saptamışlardır. Buna karşın Ertunc and Turkmen (2015), Ege, İç Anadolu, Doğu ve Batı Anadolu bağ alanlarından topladıkları örneklerde GLRaV-4-9 DAS-ELISA kiti kullanarak gerçekleştirdikleri testler sonucunda %81,12 oranında GLRaV-4-9 enfeksiyonu saptadıklarını bildirmişler ancak söz konusu virüslerin ayrımlarını gerçekleştirmemişlerdir. (Y. Türkmen, 2015, kişisel görüşme). Fiore et al. (2012), Valencia bağ alanlarında %0,8; Al Rwahnih et al. (2015) ise Kaliforniya genetik koleksiyon parselinde %17,1 oranında GLRaV-4 enfeksiyonu saptadıklarını bildirmişlerdir. Buna karşın Baraff (2011) ise Kaliforniya bağ alanlarında GLRaV-4'ü belirleyemediklerini bildirmiştir.

Önceki çalışmalardan da anlaşılabileceği üzere GLRaV-4'ün bulunma oranının %0,8 ile %17,1 arasında saptandığı görülmektedir. Önceki çalışmalara ait bulunma oranlarının ortalamaları üzerinden bir değerlendirme yapıldığında ise GLRaV-4'ün %6,7'lik bulunma oranıyla hastalıkla ilişkili virüslerle yapılan çalışmalar arasında altıncı sırada yer aldığı anlaşılmaktadır. GLRaV-4'ün bulunma durumuna ilişkin elde edilen bulgular literatür bildirişleri ile birlikte değerlendirildiğinde %2,4 olarak saptanan bulunma oranının %0,8 ile %17,1 arasında yer aldığı ancak %6,7 olarak belirlenen ortalamanın ise altında olduğu görülmektedir.

GLRaV-9'un bulunma durumu incelendiğinde ise toplanan örneklerin dördünde saptanarak %0,9 bulunma oranı ile altıncı sırada yer aldığı belirlenmiştir. Kaya ve Erilmez (2014), Manisa, İzmir, Denizli ve Çanakkale bağ alanlarında GLRaV-4-9 DAS ELISA kiti ile pozitif sonuç veren sekiz örnekte gerçekleştirdikleri RT-PCR testleri sonucunda GLRaV-9'u saptayamadıklarını bildirmişlerdir. Buna karşın Ertunc and Turkmen (2015) ise Ege, İç Anadolu, Doğu ve Batı Anadolu bağ alanlarından topladıkları örneklerde GLRaV-4-9 DAS-ELISA kiti kullanarak gerçekleştirdikleri testler sonucunda %81,12 oranında GLRaV-4-9 enfeksiyonu saptamışlar ancak söz konusu virüslerin ayrımlarını

gerçekleştirmemişlerdir (Y. Türkmen, 2015, kişisel görüşme). GLRaV-9'un bulunma oranlarına ilişkin yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde Baraf (2011), Kaliforniya bağ alanlarında GLRaV-9'u %2 oranında saptadığını bunun yanında Peake et al. (2004), Batı Avustralya bağ alanlarında Cabernet Franc parselinden aldıkları on asma örneğinin birinde; Giampetruzzi et al. (2011) ise İtalya bağ alanlarından elde ettikleri dokuz örneğin beşinde GLRaV-9'u tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Buna karşın Rai et al. (2015) ise Hindistan bağ alanlarında GLRaV-4-9 DAS-ELISA kiti ile pozitif reaksiyon veren asma örneklerinde gerçekleştirdikleri RT-PCR testleri sonucunda GLRaV-9'u saptayamadıklarını bildirmişlerdir.

Önceki çalışmalarda da görüldüğü üzere GLRaV-9'a ilişkin gerçekleştirilen çalışma sayısının ve test edilen örneklerde enfeksiyon oranının hastalıkla ilişkili diğer virüslere nazaran düşük seviyelerde olduğu anlaşılmaktadır. Önceki çalışmalara ait saptanan %2'lik bulunma oranıyla GLRaV-9'un hastalıkla ilişkili virüslerle yapılan çalışmalar arasında sekizinci sırada yer aldığı anlaşılmaktadır. GLRaV-9 için %0,9 olarak saptanan bulunma oranının önceki çalışmaların altında kaldığı ancak çalışmalarda genel olarak saptanan düşük bulunma oranıyla benzerlik gösterdiği anlaşılmaktadır.

GLRaV-1 açısından bir değerlendirme yapıldığında ise testlenen örneklerin ikisinde saptanarak hastalıkla ilişkili virüsler arasında %0,5'lik bulunma oranı ile yedinci sırada yer aldığı belirlenmiştir. Kaya ve Erilmez (2014), Manisa, İzmir, Denizli ve Çanakkale bağ alanlarında GLRaV-1'in bulunma oranını %7,1 olarak saptamışlardır. Buna karşın Ege, İç Anadolu, Doğu ve Batı Anadolu bağ alanlarında gerçekleştirilen bir çalışmada Ertunc and Turkmen (2015), GLRaV-1'in bulunma oranını diğer çalışmalara göre oldukça yüksek oranda (%75) saptadıklarını bildirmişlerdir. GLRaV-1'in bulunma durumlarına ilişkin Türkiye'nin çeşitli coğrafik bölgeleri ile Mısır, Suriye, Şili ve Kaliforniya'da yapılan çalışmalar incelendiğinde ise bu çalışmada saptanan orandan daha yüksek (%1,8 - %47,3) oranda tespit edildiği farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Özaslan vd., 1991; Özaslan ve Yılmaz, 1995; Yılmaz et al., 1997; Akbaş et al., 2007; Çığışar ve Yılmaz, 1998; Çığışar, 2002; Sarpkaya, 2003; Köklü, 1999; Ahmed et al., 2004; Mslmanieh et al., 2006; Fiore et al., 2008; Baraff, 2011; Al Rwahnih et al., 2015). Buna karşın Fiore et al. (2012), İspanya'nın Valencia bağ alanlarından topladıkları 127 örnekte GLRaV-1 enfeksiyonu saptayamadıklarını bildirmişlerdir.

Önceki çalışmalardan da anlaşılacağı üzere GLRaV-1'in asma örneklerinde %1,8 ile %75 arasında değişen oranlarda bulunduğu görülmektedir. Önceki çalışmalara ait bulunma oranlarının ortalamaları üzerinden bir değerlendirme yapıldığında ise GLRaV-1'in %25,95'lik bulunma oranıyla hastalıkla ilişkili virüslerle yapılan çalışmalarda ikinci sırada yer aldığı anlaşılmaktadır. Önceki çalışmaların aksine bu çalışma kapsamında GLRaV-1 enfeksiyonu sadece iki örnekte belirlenmiş olup %0,5 olarak saptanan bulunma oranının literatür bildirişlerinde en düşük bulunma oranı olan belirtilen %1,8'in de altında olduğu görülmektedir.

GLRaV-5 ise sadece bir örnekte saptanarak %0,2'lik bulunma oranı ile hastalıkla ilişkili virüsler arasında sekizinci sırada yer almıştır. Buzkan vd. (2010a), Ege Bölgesi'nde Manisa, Denizli ve İzmir bağ alanlarında GLRaV-5'in bulunma oranını %11,6 olarak saptamışlardır. Buna karşın Kaya ve Erilmez (2014), Manisa, İzmir, Denizli ve Çanakkale bağ alanlarında GLRaV-5 için gerçekleştirdikleri DAS-ELISA testi sonuçlarına göre GLRaV-5'i saptayamadıklarını bildirmişlerdir. Ancak GLRaV-4-9 DAS-ELISA kitiyle pozitif sonuç elde ettikleri sekiz örneği sadece GLRaV-4 ve GLRaV-9 için RT-PCR ile test etmişlerdir. Benzer şekilde Ertunc and Turkmen (2015), Ege, İç Anadolu, Doğu ve Batı Anadolu bağ alanlarından topladıkları örneklerde GLRaV-4-9 DAS-ELISA kiti kullanarak gerçekleştirdikleri testler sonucunda %81,12 oranında GLRaV-4-9 enfeksiyonu saptamışlar ancak GLRaV-4-9 DAS-ELISA kiti ile enfekteli olarak saptadıkları söz konusu virüslerin ayrımlarını gerçekleştirmemişlerdir (Y. Türkmen, 2015, kişisel görüşme). GLRaV-5'in bulunma oranlarına ilişkin yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde ise Buzkan et al. (2010b), Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde %16,1; Fiore et al. (2012) ise Valencia'da %3,2 oranında GLRaV-5 enfeksiyonu saptadıklarını bildirmişlerdir. Buna karşın Baraff (2011), Kaliforniya bağ alanlarından elde ettikleri örneklerde; Rai et al. (2015) ise Hindistan bağ alanlarından topladıkları ve GLRaV-4-9 DAS-ELISA kitiyle pozitif sonuç veren 23 örnekte gerçekleştirdikleri RT-PCR testleri sonucunda GLRaV-5'i saptayamadıklarını bildirmişlerdir. Önceki çalışmalardan da anlaşılacağı üzere GLRaV-5'in testlenen örneklerde %3,2 ile %16,1 arasında değişen oranlarda saptandığı görülmektedir.

Önceki çalışmalara ait bulunma oranlarının ortalamaları üzerinden bir değerlendirme yapıldığında ise GLRaV-5'in %10,3'lük bulunma oranıyla hastalıkla ilişkili virüslerle yapılan çalışmalarda dördüncü sırada yer aldığı anlaşılmaktadır. Bu çalışma kapsamında GLRaV-5'in %0,2 olarak saptanan

bulunma oranının literatür bildirişlerinde en düşük bulunma oranı olan belirlenen %3,2'nin de altında olduğu görülmektedir.

GLRaV-7 açısından bakıldığında ise testlenen örneklerin sadece birinde saptanarak hastalıkla ilişkili virüsler arasında %0,2 bulunma oranı ile GLRaV-5 ile birlikte sekizinci sırada yer aldığı belirlenmiştir. Kaya ve Erilmez (2014), Manisa, İzmir, Denizli ve Çanakkale bağ alanlarında GLRaV-7 DAS-ELISA kiti kullanarak gerçekleştirdikleri DAS-ELISA testi sonuçlarına göre GLRaV-7'yi saptayamadıklarını bildirmişlerdir. Ancak GLRaV-4-9 DAS-ELISA kitiyle pozitif sonuç elde ettikleri sekiz örneği sadece GLRaV-4 ve GLRaV-9 için RT-PCR ile test etmişlerdir. Buna karşın Ege, İç Anadolu, Doğu ve Batı Anadolu bağ alanlarında gerçekleştirilen bir çalışmada ise GLRaV-7'nin bulunma oranının %48,95 olarak diğer çalışmalara göre oldukça yüksek düzeyde olduğu ve GLRaV-7'nin Ege Bölgesi'nde hastalıkla ilişkili diğer virüslere göre daha baskın olduğu bildirilmiştir (Ertunc and Turkmen, 2015). GLRaV-7 enfeksiyonlarının bulunma oranlarına ilişkin yapılan çalışmalar incelendiğinde Türkiye'nin çeşitli coğrafik bölgeleri ile Şili ve Kaliforniya bağ alanlarında GLRaV-7'nin bulunma oranlarının %0,18 ile %6 arasında tespit edildiği farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Yılmaz et al., 1997; Akbaş et al., 2007; Köklü, 1999; Fiore et al., 2008; Baraff, 2011; Al Rwahnih et al., 2015). Buna karşın Fiore et al. (2012), İspanya'nın Valencia bağ alanlarından topladıkları 127 örnekte; Reynard and Gugerli (2012b) ise İsviçre bağ alanlarında topladıkları 1800 asma örneğinde gerçekleştirdikleri RT-PCR çalışmaları sonucunda GLRaV-7'yi saptayamadıklarını bildirmişlerdir.

Önceki çalışmalar incelendiğinde GLRaV-7'nin asma örneklerinde bulunma oranının %0,18 ile %48,95 oranında oldukça geniş bir aralıkta saptandığı görülmektedir. Önceki çalışmalara ait bulunma oranlarının ortalamaları üzerinden bir değerlendirme yapıldığında ise GLRaV-7'nin %9,85'lik bulunma oranıyla hastalıkla ilişkili diğer virüslerle yapılan çalışmalarda beşinci sırada yer aldığı anlaşılmaktadır. Bu çalışma kapsamında GLRaV-7'nin bulunma durumuna ilişkin bulgular literatür bildirişleri ile birlikte değerlendirildiğinde %0,2 olarak saptanan bulunma oranının %0,18 ile %48,95 arasında yer aldığı ancak %9,85 olarak belirlenen ortalamanın ise altında olduğu görülmektedir. Bu çalışma kapsamında GLRaV-7, Ege Bölgesi bağ alanlarında %0,2 olarak belirlenen düşük bulunma oranıyla Ertunc and Turkmen (2015)'in elde ettiği bulgular hariç olmak üzere genel olarak önceki çalışmalarla benzer sonuçlar vermiştir.

Ege Bölgesi bağ alanlarında yürütülen bu çalışma kapsamında GLRaV-6 enfeksiyonu ise saptanamamıştır. GLRaV-6 enfeksiyonlarının bulunma oranlarına ilişkin yapılan çalışmalar incelendiğinde Ertunc and Turkmen (2015), Ege, İç Anadolu, Doğu ve Batı Anadolu bağ alanlarında GLRaV-6'nın bulunma oranını %5 olarak saptamışlardır. Ayrıca araştırmacılar GLRaV-6'nın Ege Bölgesi'nde hastalıkla ilişkili diğer virüslere oranla nadiren görüldüğünü belirtmişlerdir. Bununla birlikte Kaya ve Erilmez (2014), Manisa, İzmir, Denizli ve Çanakkale bağ alanlarından topladıkları örneklerde GLRaV-6 için gerçekleştirdikleri DAS-ELISA testi sonuçlarına göre GLRaV-6'yı saptayamadıklarını bildirmişlerdir. Ancak GLRaV-4-9 DAS-ELISA kitiyle pozitif sonuç elde ettikleri sekiz örneği sadece GLRaV-4 ve GLRaV-9 için RT-PCR ile test etmişlerdir. Buna karşın Fiore et al. (2012), İspanya'nın Valencia bağ alanlarından topladıkları 127 örnekte ve Rai et al. (2015) ise Hindistan bağ alanlarından topladıkları ve GLRaV-4-9 DAS-ELISA kitiyle pozitif sonuç veren 23 örnekte gerçekleştirdikleri RT-PCR testleri sonucunda GLRaV-6'yı saptayamadıklarını bildirmişlerdir.

Önceki çalışmalara ait %5'lik bulunma oranıyla GLRaV-6'nın hastalıkla ilişkili virüslerle yapılan çalışmalarda yedinci sırada yer aldığı anlaşılmakta olup bu çalışma kapsamında GLRaV-6 enfeksiyonu bölge bağlarında saptanamamıştır.

Hastalıkla ilişkili virüslerin bulunma durumlarına ilişkin yapılan araştırmalarda aynı bölgede yürütülen çalışmalarda bile farklı oranların saptanabildiği anlaşılmaktadır. Bu durumun büyük oranda çalışmalar kapsamında alınan örnek sayılarıyla ve örnekleme yöntemiyle ilgili olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda hastalıkla ilişkili virüslerin bulunma durumlarının ortalamaları üzerinden bir değerlendirme yapıldığında ise genel olarak daha anlamlı bulguların elde edildiği görülmektedir.

Ege Bölgesi bağ alanlarında illerin enfeksiyon oranlarına göre bir değerlendirme yapıldığında ise Manisa ilinde toplam 227 adet örnekte %32,2 oranında, Denizli ilinde toplam 126 adet örnekte % 34,1 oranında, İzmir ilinde toplam 45 adet örnekte %26,7 oranında, Uşak ilinde toplam 15 örnekte %20 oranında ve Aydın ilinde toplam 11 adet örnekte %18,2 oranında asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler tarafından oluşturulan enfeksiyonlar saptanmıştır (Bkz. Şekil 4.12). Kaya ve Erilmez (2014), Manisa'dan topladıkları 142 örneğin 74 (%52,1)'ünün, İzmir'den topladıkları 173 örneğin 120 (%69,4)'sinin Denizli'den topladıkları 26 örneğin üç (%11,5)'ünün ve Çanakkale'den topladıkları 25 örneğin beş (%20)'inin GLRaV-1, -2, -3 ve -4

virüslerinden en az biri ile enfekteli olduğunu bildirmişlerdir. İki çalışmada da ortak olarak yer alan Manisa, Denizli ve İzmir illerinin enfeksiyon oranları değerlendirildiğinde her iki çalışmada da illere göre enfeksiyon oranlarında farklılıkların bulunduğu görülmektedir.

Çalışma kapsamında Manisa ilinden toplanan örneklerde Real-time RT-PCR analiz sonuçlarına göre %32,2 oranında virüs enfeksiyonu olduğu belirlenmiştir. İlçelere göre enfeksiyon oranları açısından bir değerlendirme yapıldığında ise Alaşehir (%10,1)'in ilk sırada yer aldığı bunu Salihli (%9,3), Saruhanlı ve Turgutlu (%4,9), Merkez (%2,2) ve Sarıgöl (%0,9) ilçelerinin izlediği belirlenmiştir. Kaya ve Erilmez (2014), GLRaV-1, -3 ve -4 virüslerinden en az birinin neden olduğu enfeksiyonların Manisa'nın ilçeleri olan Alaşehir'de %31,7; Sarıgöl'de %12; Salihli'de %5,6; Ahmetli'de %2,8; olduğunu, GLRaV-2, -9, -5, -6 ve -7'ye ise rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Her iki çalışmada da Alaşehir ilçesi enfeksiyon oranı açısından ilk sırada yer almaktadır. Alaşehir, Manisa'nın ilçeleri arasında üzüm üretimi açısından %23,5'luk payla ilk sırada yer almakta olup özellikle ihracata yönelik üretimiyle öne çıkmaktadır (TÜİK, 2013). Her iki çalışmada da Alaşehir'in enfeksiyon oranı açısından ilk sırada yer alması üretim ve ihracat potansiyeli üzerine oluşturabileceği riskler açısından endişe vericidir. Buna karşın bu çalışmada enfeksiyon oranları açısından Saruhanlı ve Turgutlu %4,9 ile üçüncü sırada yer alırken Kaya ve Erilmez (2014), Turgutlu'da hastalıkla ilişkili söz konusu virüsler açısından enfeksiyon tespit edemediklerini bildirmişlerdir.

Bu çalışma kapsamında Manisa ilinde belirlenen virüs enfeksiyonları açısından bir değerlendirme yapıldığında ise saptanan enfeksiyonların %22,9'unun bir, %9,3'ünün ise birden fazla virüs tarafından oluşturulduğu belirlenmiş olup Manisa, karışık enfeksiyon oranı açısından %9,3 ile Ege Bölgesi'nde üçüncü sırada yer almıştır. Manisa ilinde saptanan virüslerden GLRaV-De'nin %10,1'lik enfeksiyon oranı ile en yaygın virüs olduğu bunu GLRaV-Pr (%9,7), GLRaV-Pr, -De (%4), GLRaV-3 (%2,6), GLRaV-3,-Pr (%1,3), GLRaV-2,-3,-De (%0,9) ve birer enfekteli örnekle GLRaV-2; GLRaV-2, -3; GLRaV-9, -Pr; GLRaV-3, -4, -9; GLRaV-3, -4, -Pr; GLRaV-3, -9, -Pr; GLRaV-3, -4, -Pr, -De ve GLRaV-2, -3, -4, -Pr, -De virüslerin neden olduğu tekli ve karışık enfeksiyonların izlediği anlaşılmaktadır (Bkz. Çizelge 4.9). Buna karşın Kaya ve Erilmez (2014), Manisa ilinden topladıkları ve GLRaV-1, -3, -4 virüsleri ile enfekteli olarak saptadıkları örneklerde karışık enfeksiyona rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Çalışma kapsamında Manisa ilinde görülen karışık enfeksiyonlar incelendiğinde ise çoklu

enfeksiyonların GLRaV-Pr, GLRaV-De, GLRaV-2, GLRaV-4 ve GLRaV-9 virüsleri ile GLRaV-3 arasında olduğu görülmektedir.

Denizli ilinde %34,1 oranında virüs enfeksiyonu olduğu saptanmıştır. İlçelere göre bir değerlendirme yapıldığında ise Çal (%25,4)'ın ilk sırada yer aldığı bunu Bekilli (%4,8), Buldan (%2,4) ve Tavas (%1,6) ilçelerinin izlediği belirlenmiştir. Güney ilçesinden toplanan örneklerde ise hastalıkla ilişkili virüsler açısından herhangi bir enfeksiyona rastlanılmamıştır. Çal, Denizli'nin ilçeleri arasında üzüm üretimi açısından %35,1'lik payla ilk sırada yer almakta olup özellikle kurutmalık, sofralık ve şaraplık üzüm üretimiyle öne çıkmaktadır (TÜİK, 2013). Aynı zamanda Çal, Denizli ilinin en eski bağ üretim alanlarından biri olmakla birlikte bağların çoğu 25-30 yaş üzerinde yer bağı şeklindedir. Denizli ilçeleri arasında Çal'ın enfeksiyon oranı açısından ilk sırada yer alması, söz konusu virüslerin taşınmasının üretim materyalleri ile gerçekleştiği göz önünde bulundurulduğunda enfeksiyonların çok eski zamanlardan beri bölgede var olup üretimi tehdit ettiğini göstermektedir. Kaya ve Erilmez (2014), Denizli'nin Sarayköy ilçesinde GLRaV-3'ün enfeksiyon oranının %11,5 olduğunu, Çal ve Kınıklı (Merkez) ilçelerinde ise GLRaV-1, -2, -3, -4, -5, -6, 7 ve -9 enfeksiyonlarına rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışma kapsamında Çal, %25,4 olarak saptanan enfeksiyon oranı ile Denizli'nin ilçeleri arasında ilk sırada yer alırken Kaya ve Erilmez (2014), Çal'dan topladıkları beş örnekte söz konusu virüslere rastlamadıklarını bildirmişlerdir. İki çalışma arasında elde edilen farklı sonucun örnekleme sayısından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu çalışma kapsamında Denizli ilinde belirlenen virüs enfeksiyonları açısından bir değerlendirme yapıldığında ise saptanan enfeksiyonların %24,6'sının bir, %9,5'inin ise birden fazla virüs tarafından oluşturulduğu belirlenmiş olup Denizli, karışık enfeksiyon oranı açısından %9,5 ile Ege Bölgesi'nde ikinci sırada yer almaktadır. Denizli ilinde saptanan virüslerden GLRaV-Pr (%14,3) en yaygın virüs olarak belirlenmiş olup bunu %7,1 ile GLRaV-De, %3,2 ile GLRaV-3, -Pr, %1,6 ile GLRaV-3; GLRaV-4 ve GLRaV-Pr,-De ve birer enfekteli örnekle GLRaV-2, -3; GLRaV-2, -Pr; GLRaV-3, -5; GLRaV-1, -3, -9; GLRaV-2, -3, -4 ve GLRaV-2, -3, -De virüslerin neden olduğu karışık enfeksiyonlar izlemiştir (Bkz. Çizelge 4.10). Buna karşın Kaya ve Erilmez (2014), Denizli ilinde karışık enfeksiyona rastlamadıklarını bildirmişlerdir.

İzmir ilinden alınan örneklerde gerçekleştirilen Real-time RT-PCR yöntemleri ile yapılan analiz sonuçlarına göre hastalıkla ilişkili virüsler açısından

%26,7 oranında enfeksiyon belirlenmiştir. İlçelere göre bir değerlendirme yapıldığında ise Kemalpaşa (%13,3)'nın ilk sırada yer aldığı bunu Menemen (%6,7), Menderes (%4,4) ve Seferihisar (%2,2) ilçelerinin izlediği belirlenmiştir. Torbalı, Urla, Çeşme ve Selçuk ilçelerinden toplanan örneklerde ise hastalıkla ilişkili virüsler açısından herhangi bir enfeksiyona rastlanılmamıştır. Kaya ve Erilmez (2014), GLRaV-1, -2, -3 ve -4 virüslerinden en az birinin neden olduğu enfeksiyonların İzmir'in ilçeleri olan Menderes'te %36,4; Kemalpaşa'da %14,5; Urla'da %11,6; Menemen'de %6,9 olduğunu; GLRaV-5, -6 ve -7'ye ise rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Her iki çalışmada da illere göre enfeksiyon oranlarında farklılıkların bulunduğu bunun yanında bu çalışmada Urla'da enfeksiyon saptanamamışken Kaya ve Erilmez (2014), 'in Urla'daki enfeksiyon oranını %11,6 olarak bildirdiği görülmektedir. Söz konusu bu farklılığın örnekleme sayılarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

İzmir ilinde belirlenen virüs enfeksiyonları açısından bir değerlendirme yapıldığında ise saptanan enfeksiyonların %15,6'sının bir, %11,1'inin ise birden fazla virüs tarafından oluşturulduğu belirlenmiş olup İzmir, karışık enfeksiyon oranı açısından %11,1 ile Ege Bölgesi'nde ilk sırada yer almaktadır. İzmir ilinde GLRaV-Pr (%11,1) en yaygın görülen virüs olarak belirlenmiş olup bunu GLRaV-2, -3 (%4,4) ve birer enfekteli örnekle GLRaV-3; GLRaV-4; GLRaV-3, -4; GLRaV-2, -3, -7 ve GLRaV-3, -4, -Pr, -De virüslerinin neden olduğu tekli ve karışık enfeksiyonlar izlemiştir (Bkz. Çizelge 4.11). Kaya ve Erilmez (2014) ise Manisa, İzmir, Denizli ve Çanakkale bağ alanlarında gerçekleştirdikleri çalışmada GLRaV-2, -3'ün neden olduğu 14; GLRaV-1, -3'ün ve GLRaV-1, -2, -3'ün neden olduğu dörder karışık enfeksiyonu sadece İzmir ilinde saptadıklarını bildirmişlerdir. Benzer bir şekilde bu çalışmada da İzmir, karışık enfeksiyonların en yüksek oranda görüldüğü il olarak saptanmıştır.

Uşak ilinde ise toplanan örneklerde %20 oranında virüs enfeksiyonu saptanmış olup enfeksiyonların %13,3'ünün bir, %6,7'sinin ise birden fazla virüs tarafından oluşturulduğu belirlenmiştir. Uşak, karışık enfeksiyon oranı açısından %6,7 ile Ege Bölgesi'nde dördüncü sırada yer almaktadır. İlçelere göre bir değerlendirme yapıldığında ise %20'lik enfeksiyon oranıyla Eşme, hastalıkla ilişkili virüslerin tespit edildiği tek ilçe olurken enfekteli olarak belirlenen üç örneğin ikisinde GLRaV-Pr ve GLRaV-De tarafından oluşturulan tekli enfeksiyonun, bir örnekte ise GLRaV-3, -De tarafından oluşturulan ikili enfeksiyonun saptandığı belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.12).

Aydın ilinde ise toplanan örneklerde hastalıkla ilişkili virüsler açısından %18,2 oranında virüs enfeksiyonu saptanmış olup ilçelere göre bir değerlendirme yapıldığında %18,2'lik enfeksiyon oranıyla Kuşadası, hastalıkla ilişkili virüslerin tespit edildiği tek ilçe olurken enfekteli olarak belirlenen iki örnekte GLRaV-1 ve GLRaV-3 tarafından oluşturulan tekli enfeksiyon belirlenmiş olup karışık enfeksiyona ise rastlanılmamıştır (Bkz. Çizelge 4.13).

Çalışma kapsamında saptanan tekli ve karışık enfeksiyon sayılarıyla ilgili bir değerlendirme yapıldığında ise testlenen 424 örneğin 94 (%22,2)'ünün bir, 39 (%9,2)'unun ise birden fazla virüsle enfekteli olduğu belirlenmiştir. Karışık enfeksiyon tespit edilen 39 örnek içerisinde bir değerlendirme yapıldığında ise örneklerin 27 (%69,2)'sinin iki, dokuz (%23,1)'unun üç, iki (%5,1)'sinin dört ve bir (% 2,6)'inin ise hastalıkla ilişkili beş farklı virüsle enfekteli olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.14).

Kaya ve Erilmez (2014), Manisa, İzmir, Denizli ve Çanakkale bağ alanlarında testlenen örneklerin %55,2'sinin GLRaV-1, -2, -3 ve -4 virüslerinden en az biri ile enfekteli olduğunu; enfekteli olarak saptanan örneklerde tekli (%49,2), ikili (%4,9) ve üçlü (%1,1) enfeksiyonlara rastladıklarını bildirmişlerdir. Ertunc and Turkmen (2015), Ege, İç Anadolu, Doğu ve Batı Anadolu bağ alanlarında GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4-9 ve GLRaV-7'nin neden olduğu karışık enfeksiyonların sayılarının oldukça fazla olduğunu belirtmişlerdir.

Ahmed et al. (2004), Mısır'ın bağ alanlarında GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GVB, GFkV ve GFLV etmenlerinin saptanması amacıyla gerçekleştirdikleri DAS-ELISA testleri sonucunda örneklerin %29'unu bir; %49'unu ise birden fazla virüsle enfekteli olarak bulmuşlardır. Buna karşın Baraff (2011), Kaliforniya bağ alanlarında GLRaV-1, 2, 3, 4, 5, 7 ve 9 virüslerinin tespiti için gerçekleştirdiği multiplex RT-PCR çalışmaları sonucunda örneklerin %46'sının en az bir virüsle enfekteli olduğunu, karışık enfeksiyon oranının %5'in altında olduğunu bildirirken; Kaliforniya'da yürütülen başka bir çalışmada ise Al Rwahnih et al. (2015), GRSPaV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GLRaV-4, GVD, GVB, GFLV, GFkV, GLRaV-7 ve ToRSV etmenlerinin tanısı amacıyla gerçekleştirdiği RT-PCR çalışmaları sonucunda örneklerin %47,14'ünün söz konusu virüslerden en az biri ile enfekteli olduğunu; enfekteli olduğu belirlenen örneklerde tekli (%6,1), ikili (%9,1), dördü (%6,1), beşli (%24,2), altılı (%21,2), yedili (%24,2) ve sekizli (%9,1) enfeksiyonların belirtilen oranlarda görüldüğünü bildirmişlerdir.

Fiore et al. (2012), İspanya'nın Valencia bağ alanlarında GRSPaV, GLRaV-2, GFKV, GLRaV-3, GFLV, GRVfV, GYSVd-1, GLRaV-5, GVA ve GLRaV-4 virüslerinin neden olduğu tekli enfeksiyon oranının %37,8 olduğunu bunu sırasıyla ikili (% 20,5), üçlü (%7,9) dördü (%0,8) ve beşli (%0,8) enfeksiyonların izlediğini belirtmişlerdir. Naidu et al. (2015a) ise Washington bağ alanlarında GLRaV-3 ve GRBaV virüslerinin RT-PCR ile tanılama sonuçlarında örneklerdeki karışık enfeksiyon oranının %18 olduğunu bildirmişlerdir. Jones et al. (2015), Virjinya bağ alanlarında GLRaV-2, GLRaV-3 ve GFKV virüslerinin RT-PCR ile tanılama sonuçlarında sörvey çalışmasını gerçekleştirdikleri 77 bağdan %64'ünün en az bir, %18'inin iki, %3'ünün ise üç virüsle de enfekteli olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışma kapsamında testlenen 424 örneğin %22,2'sinin bir, %9,2'sinin ise birden fazla etmenle enfekteli olduğu saptanmış olup Ege Bölgesi'nde ve dünyada bağcılığın yoğun olarak yapıldığı ülkelerde gerçekleştirilen çalışmalarda da benzer şekilde değişen oranlarda karışık enfeksiyonlara rastlanıldığı anlaşılmaktadır.

Monis (2000), karışık bir virüs enfeksiyonu içinden Western blot analiziyle asma yaprak kıvrılma virüs hastalığı ile ilişkili 37-kDa ağırlığına sahip yeni bir virüs proteini bulduğunu ve bu yeni virüsün GLRaV-8 olduğunu bildirmiştir. Ancak Bertsch et al. (2009), GLRaV-8'e ait olduğu öne sürülen genomun asma genomuyla yüksek oranda benzerlik göstermesinden dolayı söz konusu genomun asma genomunun bir parçası olduğunu rapor etmişlerdir. Söz konusu gelişmelerin üzerine Martelli, et al. (2012), GLRaV-8'in *Ampelovirus* cinsinden çıkartıldığını bildirmiştir.

Bu çalışma kapsamında toplanan 424 asma örneğinin tümü GLRaV-8 primeri (Bkz. Çizelge 3.7) kullanılarak Real-time RT PCR yöntemi ile test edilmiş olup örneklerin 322 (%75,9)'sinin GLRaV-8 primeri ile pozitif sonuç verdiği 102 örneğin ise söz konusu primerle negatif sonuç verdiği belirlenmiştir. Ayrıca GLRaV-8 primerinin pozitif sonuç verdiği asma örnekleri simptomatolojik açıdan değerlendirildiğinde ise simptom gözlenen asmaların yanında simptom gözlenmeyen 24 asma örneğinin 16'sında tek başına, üçünde GLRaV-De virüsüyle ikisinde ise GLRaV-Pr virüsü ile birlikte pozitif reaksiyon verdiği belirlenmiştir.

GLRaV-8 primeriyle pozitif olarak belirlenen örneklerin elde edildiği çeşitlerle ilgili bir değerlendirme yapıldığında ise Fantasy Seedless, Kalecik Karası, Macabeu, Pembe Salman ve Pinot Noir çeşitlerine ait örneklerin hiçbirinin

GLRaV-8 primeriyle pozitif sonuç vermediği; Boğazkere, Superior Seedless, Cardinal, Foça Karası, Michele Palieri, Royal ve Sauvignon Blanc çeşitlerine ait örneklerin ise tamamının GLRaV-8 primeriyle pozitif sonuç verdiği; Sultani Çekirdeksiz, Çal Karası, Alphonse Lavallée, Alicante Bouschet, Razakı, Cabernet Sauvignon, Merlot, Mevlana, Osmanca, Ekse Karası, Syrah ve Red Globe çeşitlerinden ise aynı çeşide ait örneklerin bazılarının GLRaV-8 primeriyle pozitif sonuç verdiği, bazılarının ise GLRaV-8 primeriyle pozitif sonuç vermediği tespit edilmiştir.

Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde özellikle GLRaV-8 primerinin aynı çeşide ait farklı örneklerin bazılarında pozitif sonuç vermesi Bertsch et al. (2009)'un elde ettiği sonuçların aksine GLRaV-8 primerinin çoğalttığı bölgenin asma genomunun bir parçası olduğu teziyle çelişmektedir. Ayrıca GLRaV-8 primeriyle pozitif sonuç veren örneklerin 213 tanesinin sadece GLRaV-8 primeri ile pozitif sonuç verdiği, 109 örnekte ise asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerle tekli ve çoklu enfeksiyonların görüldüğü belirlenmiştir.

GLRaV-8 primerinin de pozitif sonuç verdiği tekli enfeksiyonlarda GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-Pr ve GLRaV-De virüsleri saptanırken çoklu enfeksiyonlarda bunlara ek olarak GLRaV-1 ve GLRaV-9 virüsleri de saptanmıştır. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde GLRaV-8 primerinin pozitif sonuç verdiği örneklerde saptanan hastalıkla ilişkili farklı virüslerle GLRaV-8 primeri arasında herhangi bir ilişki kurulamamıştır.

Bununla birlikte otsu bitkilere gerçekleştirilen biyolojik indeksleme çalışmalarında GLRaV-De virüsü ile enfekteli olduğu saptanan ve GLRaV-8 primeriyle de pozitif sonuç veren U-5 (Alphonse Lavallée) numaralı izolatin inokule edildiği dört *N. benthamiana* indikatörünün üçünde klorotik halkalı leke belirtilerinin (Bkz. Şekil 4.15) ortaya çıktığı gözlenmiştir. Buna karşın Monette et al. (1990), asma yaprak kıvrılma virüs hastalığı saptanan asma örneklerinde *N. benthamiana*'da yaprak damarlarında renk açılması ve küçülme ile yaprak yüzeyinde damarlar arası alanda sararma ve damar bantlaşması; Hu et al. (1990b), GLRaV-2'nin *N. benthamiana*'da yapraklarda hafif şiddette sararma; Castellano et al. (1995), yapraklarda damar açılması; Goszcynski et al. (1996) ise damar açılması ve nekrotik leke belirtilerini gözlediklerini bildirmişlerdir. Bununla birlikte Mslmanieh et al. (2006), GVA, GLRaV-1, GFkV, GLRaV-3, GLRaV-2, GFLV ve ArMV ile enfekteli asma örneklerinde gerçekleştirdikleri mekanik inokulasyon çalışmalarında *N. benthamiana*, *N. occidentalis* ve *C. quinoa*'da belirti gördüklerini

ancak bu indikatörlerde gerçekleştirdikleri DAS-ELISA testleri sonucunda sadece GFLV, ArMV ve GVA virüslerini tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Elde edilen bulgularla önceki çalışma sonuçları birlikte değerlendirildiğinde mekanik inokulasyon yoluyla otsu indikatörlere taşınabilen tek Closterovirüs olan GLRaV-2'nin *N. benthamiana*'da birçok farklı belirti oluşturduğu ancak saptanan belirtiler arasında bu çalışma sonucunda elde edilen klorotik halkalı leke simptomlarının bildirilmediği bununla birlikte GFLV, ArMV ve GVA virüslerinin de bu tip benzer belirtilere neden olabileceği anlaşılmaktadır. Buna karşın U-5 (Alphonse Lavallée) numaralı izolatin inokule edildiği otsu indikatörlerde yapılan Real-time RT-PCR testleri sonucunda ise testlenen örnekler GLRaV-De virüsü açısından negatif olarak saptanmış olup GLRaV-8 primeri, simptom gözlenen *N. benthamiana* indikatörlerinde pozitif, kontrol (sağlıklı) *N. benthamiana*'da ise negatif sonuç vermiştir (Bkz. Şekil 4.16).

Bertsch et al.'un (2009) GLRaV-8'e ait olduğu öne sürülen genomun asma genomunun bir parçası olduğu tezine karşın bu çalışma kapsamında GLRaV-8 primerinin klorotik halkalı leke simptomlarının gözleendiği *N. benthamiana*'larda (Bkz. Şekil 4.15) da pozitif sonuç vermesi ise şaşırtıcıdır. Bu durum, konunun Bertsch et al.'un (2009) bakış açısıyla değerlendirildiğinde GLRaV-8 primerinin *N. benthamiana* genomunu da amplifiye edebilme ihtimalinin olabileceğini düşündürmektedir. Ancak NCBI taramaları sonucunda çoğaltılan bölgenin *N. benthamiana* genomuyla ilgili olmadığı anlaşılmaktadır.

Bununla birlikte odunsu indikatörler kullanılarak yapılan biyolojik indekslemelerde sadece GLRaV-8 primeri ile pozitif sonuç verdiği tespit edilen P-3 (Razakı) numaralı izolatin indekslendiği C. Sauvignon ve P. Noir indikatörü üzerinde de asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin oluşturduklarına benzer simptomlar gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.20). Abou Ghanem-Sabanadzovic et al. (2010), *Vitis vinifera* cv. Carnelian'dan elde ettikleri asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili yeni bir virüsün (GLRaV-Car) indikatörler üzerinde hafif şiddette belirtilere neden olduğunu; Al Rwahnih et al. (2015) ise asma yaprak kıvrılma virüs hastalığının simptomlarını taşıyan kırmızı üzüm çeşitlerinde GRSPaV enfeksiyonunun oldukça yüksek oranda (%89) tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Elde edilen bulgular önceki çalışmaların sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde P-3 numaralı izolatin indekslendiği C. Sauvignon ve P. Noir

indikatöründe gözlenen semptomlara, çalışma kapsamında incelenmeyen GLRaV-Car ve/veya GRSPaV virüslerinin sebep olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu çalışma kapsamında GLRaV-8'e ilişkin elde edilen Real-time RT-PCR sonuçları ve özellikle de biyolojik indeksleme bulguların aydınlatılması noktasında net bir sonuca varılamamış olup konunun, yapılacak daha detaylı araştırmalarla incelenmesinin gerekli olduğu düşünülmektedir.

Çalışma kapsamında asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili farklı virüsleri içerdiği saptanan 13 izolat (Bkz. Çizelge 4.15) *N. occidentalis*, *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *C. quinoa* ve *C. amaranticolor*'a mekanik inokulasyon ile inokule edilmiştir. İnokulasyon sonucunda sadece GLRaV-De virüsünü içeren ve GLRaV-8 primeriyle de pozitif sonuç veren U-5 numaralı izolatın inokule edildiği dört *N. benthamiana* indikatörünün üçünde klorotik halkalı leke semptomlarının ortaya çıktığı gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.15). Semptom gözlenen *N. benthamiana*'larda gerçekleştirilen Real-time RT-PCR testleri sonucunda ise GLRaV-De virüsü açısından negatif sonuç elde edilmiş olup GLRaV-De virüsünün mekanik olarak asmadan *N. benthamiana*'ya taşınmadığı saptanmıştır.

Nitekim birçok araştırmacı, asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsler içerisinde GLRaV-2'nin şimdiye kadar mekanik inokulasyon yoluyla otsu bitkilere taşınabilen tek Closterovirüs olduğunu bildirmiştir (Roscioglione and Gugerli, 1989; Monette and Godkin, 1993; Boscia et al., 1995; Castellano et al., 1995; Goszczynski et al., 1996; Abou Ghanem-Sabanadzovic et al., 1997; Martelli, 2014). Ancak mekanik inokulasyon çalışmaları için seçilen örneklerden altısı GLRaV-2 virüsü açısından da enfekteli olarak saptanmasına karşın mekanik inokulasyon çalışmaları sonucunda otsu indikatörlerde herhangi bir semptom gözlenmemiştir. Nitekim Monette et al. (1990), asma yaprak kıvrılma virüs hastalığı saptanan örneklerde *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana glutinosa*, *Gomphrena globosa*, *Chenopodium amaranticolor* ve *Chenopodium quinoa* indikatörleri kullanarak gerçekleştirdikleri mekanik inokulasyon çalışmalarında inokulasyonu beş kez tekrarladıklarını, belirtileri sadece *N. benthamiana*'da gözlemlediklerini, birinci ve ikinci inokulasyonda iki bitkide, üçüncü ve dördüncü inokulasyonda bir bitkide yaprak damarlarında renk açılması ve küçülme, yaprak yüzeyinde damarlar arası alanda sararma ve damar bantlaşması belirtileri ortaya çıkarken beşinci inokulasyonda ise hiçbir bitkide belirti görmediklerini; Ahmed et al. (2004), GVA, GLRaV-3, GLRaV-1, GLRaV-2, GVB ve GFkV virüsleri ile enfekteli asma örneklerinde *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *C. sativus*, *N. benthamiana*, *N. cavicola*, *N. clevelandii* ve *N. occidentalis* kullanarak

gerçekleştirdikleri mekanik inokulasyon çalışmalarında hiçbir indikatör bitkide belirti ortaya çıkmadığını; Voncina et al. (2010) ise 16 GLRaV-2 izolatı kullanarak *N. benthamiana* 'ya gerçekleştirdikleri mekanik inokulasyon çalışmaları sonucunda herhangi bir semptomun ortaya çıkmadığını belirtmişlerdir. Buna karşın Mslmanieh et al. (2006) ise GVA, GLRaV-1, GFkV, GLRaV-3, GLRaV-2, GFLV ve ArMV ile enfekteli asma örneklerinde *C. quinoa*, *C. amaranticolor*, *C. sativus*, *N. benthamiana*, *N. cavicola*, *N. clevelandii*, *N. occidentalis*, *N. tabacum* kullanarak gerçekleştirdikleri mekanik inokulasyon çalışmalarında *N. benthamiana*, *N. occidentalis* ve *C. quinoa*'da belirti gördüklerini ancak bu indikatörlerde gerçekleştirdikleri DAS-ELISA testleri sonucunda sadece GFLV, ArMV ve GVA virüslerini saptayabildiklerini bildirmişlerdir.

Elde edilen bulgular önceki çalışma sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde çoğu çalışmada olduğu gibi bu çalışmada da GLRaV-2 ile enfekteli olduğu saptanan örneklerin inokule edildiği indikatörlerde herhangi bir semptom gözlenmemiştir. GLRaV-2'nin asmalardan otsu indikatörlere mekanik inokulasyon ile aktarımının çoğu zaman başarısız olmasının nedeninin asmanın içerdiği yüksek fenolik bileşenlerin virüsü inhibe etmesi ve Ling et al.'un (2007) da bildirdiği gibi asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin enfekteli asma dokularında çok düşük konsantrasyonlarda bulunmalarından dolayı elde edilmelerinin ve saflaştırılmalarının oldukça zor olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışma kapsamında asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili farklı virüsleri içerdiği saptanan 25 izolat (Bkz. Çizelge 4.16), odunsu indikatörlerden Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon ve Pinot Noir'e aşılanmış ve izolatların tamamı odunsu indikatörlerin en az birinde zayıftan şiddetliye (Bkz. Çizelge 4.18) kadar farklı derecelerde ve şekillerde hastalığın tipik semptomlarına neden olmuştur (Bkz. Şekil 4.18 ve Şekil 4.19).

Odunsu indikatörlerde ana damarlar haricinde yaprak ayasında ve/veya uçlarında görülen farklı şekilde ve şiddette kızarmalar ile zaman zaman yapraklarda görülen kıvrılmalar, ana damarlarla birlikte yaprak ayasında ve/veya uçlarında görülen farklı şekilde ve şiddette kızarmalar başlıca gözlenen semptomlar olmuştur. Nitekim Teliz et al. (1987) ve Martelli (1993), hastalığın karakteristik belirtileri olan yapraklarda geriye doğru kıvrılmalar ve kızarmaların odunsu indikatörler üzerinde farklı yoğunluklarda ve şiddette ortaya çıktığını bildirmişlerdir.

İzolatlardan M21, B23, D12 ve R10 üç odunsu indikatör üzerinde de değişen şiddetlerde simptom oluşumuna neden olurken dört izolat Cabernet Franc ve Cabernet Sauvignon, dokuz izolat Cabernet Sauvignon ve Pinot Noir, altı izolat sadece Cabernet Sauvignon, iki izolat ise sadece Pinot Noir indikatöründe simptom oluşturmuştur (Bkz. Çizelge 4.18). Ancak yapılan değerlendirmeler sonucunda hastalıkla ilişkili farklı virüslerin odunsu indikatörlerde simptom oluşum şiddeti ve hangi virüsün hangi indikatörde belirti oluşturup oluşturmadığıyla alakalı bir ilişki kurulamamıştır. Nitekim GLRaV-3, -4, Pr, -De virüsleriyle enfekteli M-21 numaralı izolat üç indikatör bitkide de zayıf derecede simptom oluşturmuşken aynı virüslerle enfekteli İ-37 numaralı izolat C. Sauvignon'da zayıf, Pinot Noir'de şiddetli simptom oluşturmuş C. Franc'ta ise simptom oluşturmamıştır. Benzer bir şekilde GLRaV-De virüsüyle enfekteli ve GLRaV-8 primeriyle pozitif sonuç veren R-75 numaralı izolat C. Sauvignon'da orta şiddetli, Pinot Noir'de şiddetli simptom oluşturmuşken C. Franc'ta simptom oluşturmamış buna karşın aynı enfeksiyonun tespit edildiği U-5 numaralı izolat ise sadece C. Sauvignon'da şiddetli simptom oluşumuna neden olmuş diğer iki indikatörde ise simptom gözlenmemiştir. Benzer şekilde Martelli (1993, 2014), İndeksleme çalışmalarının enfekteli kaynaklardaki virüslerin sayısı ve serotipi hakkında bilgi vermediğini, sadece sağlıklı ve hastalıklı materyallerin ayırt edilmesine yardımcı olduğunu bildirmiştir. Buna karşın Abou Ghanem-Sabanadzovic et al. (2010), *Vitis vinifera* cv. Carnelian'dan elde ettikleri asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili yeni bir virüsün (GLRaV-Car) indikatörler üzerinde hafif şiddette belirtilere neden olduğunu; Al Rwahnih et al. (2012) ise GLRaV-7'nin bağlarda simptom göstermediğini odunsu indikatörler üzerinde yaptıkları indekslemelerle doğrulamışlar ve belirti göstermeyen indikatörler üzerinde GLRaV-7'yi RT-PCR ile başarılı bir şekilde tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Tez çalışması kapsamında indekslenmesi yapılan 25 izolatın simptom oluşturdukları indikatör kombinasyonları göz önüne alınmadan tek olarak değerlendirildiğinde ise 23'ünün Cabernet Sauvignon, 15'inin Pinot Noir ve sekizinin ise Cabernet Franc üzerinde simptom oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir. Buna göre Cabernet Sauvignon en fazla simptom gözlenen indikatör olurken bunu Pinot Noir ve Cabernet Franc izlemiştir. Bununla beraber hafif şiddette simptomlar en fazla Cabernet Sauvignon indikatöründe görülürken bunu Cabernet Franc ve Pinot Noir indikatörleri izlemiştir. Orta şiddette belirtiler ise en çok Cabernet Sauvignon'da görülürken bunu Pinot Noir ve Cabernet Franc izlemiştir. Şiddetli simptomlar ise en çok Pinot Noir'da görülürken bunu Cabernet Sauvignon izlemiş; Cabernet Franc'da ise şiddetli simptom gözlenmemiştir (Bkz.

Çizelge 4.19). Nitekim Pathirana and McKenzie (2005), GLRaV-3 için C. Sauvignon'un LN33'den daha duyarlı bir indikatör olduğunu; Akbaş ve Erdiller (1998), asma yaprak kıvrılma virüs hastalığının Cabernet Franc ve Cabernet Sauvignon indikatörlerinde yaprak damar aralarında kırmızı renk değişimi ile birlikte yapraklarda aşağı doğru kıvrılmaların aşılardan 50-75 gün sonra görülmeye başladığını, ilerleyen günlerinde bu belirtilerin daha şiddetli ortaya çıktığını; Naidu et al. (2014) ise Cabernet Franc'ın asma yaprak kıvrılma virüs hastalığının indekslenmesinde en çok kullanılan odunsu indikatör olduğunu ve indikatörlerde gözlemledikleri hastalık simptomlarının yaprak ayası üzerinde damarlar arasındaki alanların kızarması, ana damarların yeşil olarak kalması ve yaprakların aşağı doğru kıvrılması şeklinde görüldüğünü; ayrıca GLRaV-2'nin bazı strain'lerinin ve GLRaV-7'nin belirti göstermemesinin biyolojik indekslemenin güvenilirliğini sınırladığını bildirmişlerdir. Buna karşın Kim et. al. (2002), GLRaV-3 inokulasyonu sonucunda Cabernet Franc, 110 R ve St. George indikatörlerinde simptom tespit edemediklerini; LN33 indikatöründe, yapraklarda kıvrılma ve kızarma; Kober 5BB indikatöründe ise yapraklarda mozaik belirtiler tespit ettiklerini en şiddetli belirtilerin LN33 indikatöründe gözlemlediklerini bildirmişlerdir.

Odunsu indikatörlerle gerçekleştirilen biyolojik indeksleme sonuçlarına ait bulgular önceki çalışmaların sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde gözlenen belirtiler ve indikatörlerin reaksiyonları açısından genel olarak benzer sonuçların alındığı bununla birlikte özellikle indikatör reaksiyonlarında elde edilen bazı farklı sonuçların virüslerin cinsine, yoğunluğuna ve indekslemenin gerçekleştiği mevsime göre farklılık gösterdiği düşünülmektedir.

Real-time RT-PCR analizleri sonucunda asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili farklı virüslerle enfekteli olarak saptanan örneklerden seçilen 27 izolata, izolatların kendi içlerinde ve referans izolatlarla olan filogenetik ilişkilerinin belirlenebilmesi amacıyla kısmi DNA dizilemesi uygulanmıştır. Ancak DNA dizilemesi sonucu GLRaV-7 ve GLRaV-9 virüslerini içeren dört izolata ait DNA dizileme verileri, kromotogram dosyalarındaki okumaların bozuk olmasından dolayı elde edilememiştir (Bkz. Çizelge 4.20). Real-time PCR testleri sonucunda spesifik primerler kullanılarak pozitif sonuç elde edilen söz konusu izolatlarda DNA dizileme işlemi iki kez tekrarlanmış olmasına rağmen benzer sonuçlar alınmıştır. Karşılaşılan bu sorunun, çalışma kapsamında DNA dizilemesi için PCR ürünlerinin doğrudan kullanılmış olması, DNA dizilemesinden önce klonlama işleminin yapılmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim Al Rwahnih

et al. (2012), GLRaV-7'nin; Alkowni et al. (2004) ise GLRaV-9'un kısmi genom dizileme çalışmalarında PCR ürünlerini bakteriye aktarıp klonladıktan sonra DNA dizilemesi işlemine geçtiklerini bildirmişlerdir.

Gerçekleştirilen genomik ve filogenetik analizler sonucunda, R-49 numaralı GLRaV-1 izolatının HSP70h genine ait taranan 257 baz çiftlik bölgenin referans izolatlarla nükleotit düzeyinde %91'in üzerinde, amino asit düzeyinde ise %94'ün üzerinde yüksek bir benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Bkz. Çizelge 4.21). Saptanan yüksek benzerlik oranlarına karşın dendogramlarda R-49 numaralı izolatın birinci grupta yer aldığı görülmektedir. Bu durum izolatlar arasında görülen yüksek benzerlik oranında bile bir varyasyonun olabileceğini göstermektedir. Ancak izolatlar a ait çeşit ve lokasyon bilgileri incelendiğinde bu varyasyonun coğrafik veya biyolojik etkenlerden kaynaklandığına dair bir ilişki kurulamamıştır. Bununla birlikte nükleotit dizilerine ilişkin dendogramda (Bkz. Şekil 4.20) EF195138 (Kaliforniya, ABD) numaralı izolatla AF195822 (Avustralya) numaralı izolatının diğer izolatlardan ayrılarak ikinci grupta; amino asit dizilerine ilişkin dendogramda (Bkz. Şekil 4.21) ise sadece EF195138 (Kaliforniya, ABD) numaralı izolatının diğer izolatlardan ayrılarak ikinci grupta yer aldığı görülmektedir. Karşılaşılan bu durumun AF195822 (Avustralya) numaralı izolat açısından aynı kodon içerisinde meydana gelen kısmi nükleotit değişikliklerinin amino asit çevrimine etkisinin olmamasından, EF195138 (Kaliforniya, ABD) numaralı izolat içinse söz konusu durumun amino asit çevrimine etkili olmasından kaynaklandığı anlaşılmaktadır.

Ayrıca R-49 numaralı izolatın nükleotit ve amino asit dizilerine ilişkin dendogramda ortak olarak EF195136 (Kaliforniya) numaralı izolatla farklı ana gruplarda yer aldığı görülmektedir. Buna karşın Elçi et al. (2015), Nardan elde ettikleri GLRaV-1 izolatlarıyla asmalardan elde edilen izolatların örtü proteinlerine ait nükleotit dizilerinin en az %91 oranında benzerlik gösterdiğini, en yüksek benzerliğin ise Kaliforniya izolatı (%94) ile elde edildiğini bildirmişlerdir. Fan et al. (2015) ise Çin'den elde ettikleri izolatların örtü proteinlerinin analizi sonucunda sekiz gruba dağıldığını, üç izolatın diğer izolatlardan farklı olarak hiçbir gruba dahil olmadığını bildirmişlerdir.

GLRaV-2 ile ilgili yapılan çalışmalarda ise B-21, İ-9, M-12 ve R-10 numaralı GLRaV-2 izolatlarının HSP70h genine ait taranan 270 baz çiftlik bölgenin kendi aralarında nükleotit düzeyinde %98'in, amino asit düzeyinde ise %97'nin üzerinde yüksek bir benzerlik gösterdiği ve İ-9 numaralı izolatla M-12 numaralı izolatın amino asit düzeyindeki benzerlik oranının %100 olmasından dolayı aynı olduğu

saptanmıştır (Bkz. Çizelge 4.22). Benzer bir şekilde Voncina et al. (2010), Hırvatistan'da enfekteli yerel asma çeşitlerinden elde ettikleri izolatların örtü proteinlerini kodlayan genin nükleotit düzeyinde %97,9-%99,6 oranında, amino asit düzeyinde ise %100 benzerlik gösterdiğini; buna karşın Abou Ghanem-Sabanadzovic and Sabanadzovic (2015), ABD'nin yerel çeşitleri olan Muscadine ve Summer'dan elde ettikleri yerel izolatlar olan GSM-1 ve MS-07'nin kendi aralarında %75 nükleotit, %82 amino asit benzerliği gösterdiğini, GSM-1 izolatının NCBI Gen bankasında kayıtlı olan RG (AF314061) izolatıyla nükleotit düzeyinde %87 amino asit düzeyinde ise %95'lik bir benzerlik gösterdiğini, MS-07 izolatının ise 93/955 (NC_007448.1) izolatıyla nükleotit düzeyinde %96, amino asit düzeyinde ise %97'lik benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Saptanan yüksek benzerlik oranlarına karşın nükleotit (Bkz. Şekil 4.23) ve amino asit (Bkz. Şekil 4.24) dizilerine ilişkin dendogramlarda R-10 numaralı izolatın diğer izolatlardan ayrı bir ana grupta yer aldığı görülmektedir. Bu durum izolatlar arasında görülen yüksek benzerlik oranında bile bir varyasyonun olabileceğini göstermektedir. İzolatların elde edildiği iller göz önünde bulundurulduğunda birinci grupta yer alan izolatların ikisinin Manisa birinin ise İzmir'den elde edildiği; ikinci grupta yer alan R-10 numaralı izolatın ise Denizli'den elde edildiği görülmektedir. Dolayısıyla bu varyasyonda ayırt edici coğrafik bir etkinin söz konusu olabileceği düşünülmektedir.

Yerel izolatların referans izolatlarla olan nükleotit düzeyindeki dendogramı (Bkz. Şekil 4.25) incelendiğinde KF417619 (Virjinya, ABD) numaralı izolatın diğer bazı izolatlarla ikinci grupta yer aldığı, amino asit düzeyindeki dendogramı (Bkz. Şekil 4.26) incelendiğinde ise KF417619 (Virjinya, ABD) numaralı izolatın birinci grupta yer aldığı görülmektedir. Karşılaşılan bu durumun KF417619 (Virjinya, ABD) numaralı izolat açısından aynı kodon içerisinde meydana gelen kısmi nükleotit değişikliklerinin amino asit çevrimine etkisinin olmamasından kaynaklandığı anlaşılmaktadır. Yerel izolatların referans izolatlarla nükleotit düzeyinde %82'nin üzerinde, amino asit düzeyinde ise %87'nin üzerinde genel olarak yüksek bir benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.23). Benzer bir şekilde Bertazzon et al. (2010), İtalya'dan elde ettikleri BD izolatının örtü proteinine ait sekans verisini ABD'den elde edilen PN ve Kaliforniya'dan elde edilen RG izolatlarıyla karşılaştırmışlardır. BD izolatının diğer izolatlardan nükleotit düzeyinde %25 oranında farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir.

Amino asit benzerlik oranlarına göre İ-9 ve M-12 numaralı izolatların, KF417616 (Virginia, ABD-C. Sauvignon), KF417612 (Teksas, ABD-Lenoir), JQ771955 (Oregon, ABD-P. Noir), GU457404 (ABD-P. Noir), GU457402 (ABD-P. Noir), EU760776 (ABD-C. Sauvignon), EF122997 (Fransa-Hamburg Misketi), Y14131 (İtalya), KF417620 (Virjinya, ABD-Chardonnay), KF417617 (Virjinya, ABD-Seyval Blanc), EF123013 (Fransa-Chaouch Rose), HQ162306 (Çin) ve EF123035 (Fransa-Moscato) numaralı izolatlarla aynı olduğu saptanmıştır. Buna karşın İ-9 ve M-12 numaralı izolatlarla amino asit düzeyinde %97'nin altında benzerlik gösteren izolatların EF123018 (Fransa-Cinsault), KF417619 (Virjinya, ABD-C. Sauvignon), Y15890 (İtalya), EU760791 (ABD-C. Sauvignon), EU760795 (ABD-C. Sauvignon), EU760793 (ABD-C. Sauvignon) ve EU760802 (ABD-C. Sauvignon) olduğu görülmektedir (Bkz. Çizelge 4.23). Söz konusu iki grup izolat incelendiğinde birbirinin aynı olan ve %97'nin altında benzerlik gösteren izolatların birçoğunun elde edildiği lokasyonun ve çeşidin aynı olduğu anlaşılmaktadır. Dolayısıyla izolatlar arasında gözlenen varyasyonlarda coğrafik ve biyolojik açıdan bir ilişki kurulamamıştır. Nitekim nükleotit (Bkz. Şekil 4.25) ve amino asit (Bkz. Şekil 4.26) dizilerine ilişkin dendogramlar incelendiğinde de benzer bulguların elde edildiği görülmektedir.

GLRaV-3 ile ilgili yürütülen çalışmalarda ise C-29, İ-9, İ-23 ve O-8 numaralı GLRaV-3 izolatlarının HSP70h genine ait taranan 489 baz çiftlik bölgenin kendi aralarında nükleotit düzeyinde %93'ün, amino asit düzeyinde ise %97'nin üzerinde yüksek bir benzerlik gösterdiği ve İ-9 numaralı izolatla U-6 numaralı izolatın benzerlik oranlarının %100 olmasından dolayı aynı olduğu saptanmıştır (Bkz. Çizelge 4.24). Buna karşın Baraff (2011), Kaliforniya bağlarında etmene ait farklı strain'leri belirlemek amacı ile 24 bağa ait 45 örneğin filogenetik analizini gerçekleştirmiştir. Sonuçta etmenin strain'leri açısından yüksek derecede bir genetik farklılığın görüldüğünü; Jooste et al. (2015) ise Güney Afrika bağ alanlarında 315 asma örneğinde Real-time PCR yöntemi ile yaptıkları High resolution melting (HRM) analizleri sonucunda etmene ait dört farklı varyantı (I, II, III ve VI) saptadıklarını bildirmişlerdir.

Yerel izolatlarda saptanan yüksek benzerlik oranlarına karşın nükleotit (Bkz. Şekil 4.27) ve amino asit (Bkz. Şekil 4.28) dizilerine ilişkin dendogramlarda C-29 ve O-8 numaralı izolatların İ-9, U-6 ve İ-23 numaralı izolatlardan ayrı bir ana grupta yer aldığı görülmektedir. Bu durum izolatlar arasında görülen yüksek benzerlik oranında bile varyasyonun olabileceğini göstermektedir. Gerek birbirleriyle aynı gerekse varyasyonların saptandığı izolatlar, elde edildikleri iller ve çeşitler

açısından incelendiğinde saptanan varyasyonlarda ve birbiriyle aynı olduğu belirlenen izolatlarda ayırt edici coğrafik bir etkinin olmadığı; ikinci grupta yer alan izolatların ise aynı çeşitten elde edildiği için kısmen biyolojik kökenli bir etkinin olabileceği düşünülmektedir.

Yerel izolatların referans izolatlarla olan nükleotit dizilerine ilişkin dendogramı (Bkz. Şekil 4.29) incelendiğinde O-8 ve C-29 numaralı yerel izolatlarla birlikte referans olarak alınan 15 izolatın diğer izolatlardan ayrılarak ikinci grupta yer aldığı; amino asit dizilerine ilişkin dendogramı (Bkz. Şekil 4.30) incelendiğinde ise söz konusu izolatlardan sadece HM245755 (Merkez, Manisa) numaralı referans izolatın ikinci grupta yer aldığı görülmektedir. Karşılaşılan bu durumun nükleotit düzeyindeki dendogramda HM245755 (Merkez, Manisa) numaralı izolat hariç ikinci grupta yer alan diğer tüm izolatların aynı kodon içerisinde meydana gelen kısmi nükleotit değişikliklerinin amino asit çevrimine etkisinin olmamasından kaynaklandığı anlaşılmaktadır. Yerel izolatların referans izolatlarla nükleotit düzeyinde %90'ın üzerinde, amino asit düzeyinde ise %92'nin üzerinde yüksek bir benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.25). Bunun yanında C-29 numaralı izolatın üç, İ-9 ve U-6 numaralı izolatların 13, İ-23 numaralı izolatın dokuz ve O-8 numaralı izolatın ise altı referans izolatla amino asit düzeyinde %100 benzerlik göstermesinden dolayı aynı olduğu saptanmıştır (Bkz. Çizelge 4.25). Buna karşın Maree et al. (2015), Güney Afrika'da New generation sequencing (NGS) yöntemi ile tüm genomunu elde ettikleri GH24 izolatını 13'ü tüm genom sekansı olmak üzere 819 kayıtla karşılaştırmışlardır. Tüm genomlar arasında yaptıkları analizlerde GH24 izolatının, etmenin bilinen strain'leriyle nükleotit düzeyinde %66'dan daha az bir benzerlik gösterdiğini ve bu izolatın etmenin oldukça yüksek düzeyde farklılık gösteren bir varyantı olduğunu bildirmişlerdir.

GLRaV-3'e ait tüm izolatların elde edildikleri lokasyon ve çeşit bilgileri incelendiğinde gerek aynı olan izolatlar gerekse varyasyon saptanan izolatlarda genel olarak coğrafik veya biyolojik kökenli ayırt edici bir etkinin gözlenmediği belirlenmiştir. Buna karşın ilginç bir şekilde beş yerel izolatın da amino asit düzeyinde en düşük benzerlik oranını HM245755 (Merkez, Manisa) numaralı referans izolatla gösterdiği saptanmıştır (Bkz. Çizelge 4.25). Nitekim amino asit dizilerine ilişkin elde edilen dendogram (Bkz. Şekil 4.30) incelendiğinde HM245755 (Merkez, Manisa) numaralı izolatın diğer izolatlardan ayrı olarak ikinci grupta yer almasının bu durumu doğrular nitelikte olduğu görülmektedir. Ortaya çıkan bu durum, birbirine çok yakın bölgelerden elde edilen izolatlarda bile varyasyonların ortaya çıkabileceğini göstermektedir.

GLRaV-4 ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalarda ise C-31, İ-1 ve R-73 numaralı GLRaV-4 izolatlarının HSP70h genine ait taranan 319 baz çiftlik bölgenin kendi aralarında nükleotit düzeyinde %94'ün, amino asit düzeyinde ise %98'in üzerinde yüksek bir benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Bkz. Çizelge 4.26). Benzer şekilde Saldarelli et al. (2006), Türkiye (Y253-TK) ve İsrail (Y252-IL)'den elde ettikleri iki virüsün HSP70h genlerinin amino asit düzeyinde %99, referans GLRaV-4 ile %95 oranında yüksek bir benzerlik gösterdiğini ve bu virüslerin GLRaV-4'ün varyantları olabileceğini; Rai et al. (2015) ise Hindistan bağ alanlarından elde ettikleri dokuz izolatının filogenetik analizleri sonucunda örneklerin kendi aralarında nükleotit düzeyinde %98 - %100 amino asit düzeyinde ise %97 - %100 benzerlik gösterdiklerini, LR106 (FJ467503.1) numaralı ABD izolatıyla ise nükleotit düzeyinde %99 amino asit düzeyinde %97 - %98 benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Yerel izolatlarda saptanan yüksek benzerlik oranlarına karşın nükleotit (Bkz. Şekil 4.31) ve amino asit (Bkz. Şekil 4.32) dizilerine ilişkin dendogramlarda İ-1 numaralı izolatın C-31 ve R-73 numaralı izolatlardan ayrı bir ana grupta yer aldığı görülmektedir. Bu durum izolatlar arasında görülen yüksek benzerlik oranında bile varyasyonun olabileceğini göstermektedir. Varyasyonların saptandığı izolatlar, elde edildikleri iller ve çeşitler açısından incelendiğinde saptanan varyasyonlarda ayırt edici coğrafik bir etkinin olmadığı; izolatların elde edildiği çeşitlerin aynı olmasına rağmen İ-1 numaralı izolatın diğer izolatlardan ayrıldığı dolayısıyla biyolojik bir etkinin de olmadığı görülmektedir.

Yerel izolatların referans izolatlarla nükleotit düzeyinde %88'in üzerinde, amino asit düzeyinde ise %89'un üzerinde genel olarak yüksek bir benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.27). Bunun yanında C-31 ve İ-1 numaralı yerel izolatların JN226663 (Çin-Autumn Royal), JN226662 (Çin-Autumn Royal), GQ849394 (Çin-Autumn Royal) ve GU735409 (İspanya, Balearic Adaları-Gorgollasa) numaralı referans izolatla amino asit düzeyinde %100 benzerlik göstermesinden dolayı aynı olduğu saptanmıştır. Buna karşın Reynard et al. (2015), İsviçre bağ alanlarından elde ettikleri nükleotit ve amino asit düzeyinde yüksek derecede farklılık gösteren Ob strain'inin *Ampelovirus* cinsi içerisinde ikinci alt grup içinde yer aldığını, Ob'nin örtü proteininin daha küçük olması, amino asit benzerlik oranının düşük olması ve sahip olduğu farklı serolojik özellikleriyle birlikte değerlendirildiğinde GLRaV-4'ün farklı bir strain'i olduğunu bildirmişlerdir.

Ayrıca C-31, İ-1 ve R-73 numaralı yerel izolatların tümünün KC113198 (ABD, Benton County-Concord), AM162280 (İsrail) ve DQ325516 (Türkiye) izolatları ile %95'in altında bir benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.27). Özellikle C-31 ve İ-1 numaralı izolatlarla aynı olduğu saptanan referans izolatlar incelendiğinde lokasyon olarak Çin, çeşit olarak ise Autumn Royal çeşidinin dikkat çektiği görülmektedir. Ancak yerel izolatların elde edildiği çeşitler incelendiğinde çeşidin Sultani Çekirdeksiz olduğu anlaşılmaktadır. Bununla birlikte Çin'de yine Autumn Royal'den elde edilen GQ246624 numaralı izolat ile yerel izolatların amino asit düzeyinde %98,11'lik bir benzerlik gösterdiği görülmektedir. Ortaya çıkan bu durum ayırt edici biyolojik bir etkiden söz edilemeyeceğini, coğrafik etkinin ise kısmen etkin olabileceğini göstermektedir. Nitekim nükleotit (Bkz. Şekil 4.33) ve amino asit (Bkz. Şekil 4.34) dizilerine ilişkin elde edilen dendogramlar da bu durumu doğrular niteliktedir. Ayrıca DQ325516 (Türkiye) izolatının dendogramlarda yerel izolatlardan ayrılarak ikinci ana grupta yer alması ise aynı coğrafik bölgeye ait izolatlarda bile varyasyonların ortaya çıkabileceğini göstermektedir.

GLRaV-5 ile ilgili yapılan çalışmalarda ise P-4 numaralı GLRaV-5 izolatının HSP70h genine ait taranan 270 baz çiftlik bölgenin referans izolatlarla nükleotit düzeyinde %82'nin üzerinde, amino asit düzeyinde ise %87'nin üzerinde genel olarak yüksek bir benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Bkz. Çizelge 4.28). Buna karşın Reynard and Gugerli (2012a), İsviçre bağ alanlarında tespit ettikleri GLRaV-4'ün yeni bir varyantının *Ampelovirus* cinsi içerisinde yer alan GLRaV-4, -5, -6, -9, -Car, -De ve -Pr virüsleriyle olan akrabalık ilişkilerini incelemişlerdir. Bu varyantın, HSP70 amino asit benzerlik oranlarına göre söz konusu virüslerle %63-66 oranında düşük bir benzerlik gösterdiğini dolayısıyla GLRaV-4 grubu ile yüksek oranda bir genetik farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada P-4 numaralı izolat, referans izolatlarla gösterdiği en düşük benzerliği EU815935 (Arjantin-Red Globe) izolatı ile göstermiştir. Nitekim nükleotit (Bkz. Şekil 4.35) ve amino asit (Bkz. Şekil 4.36) dizilerine ilişkin dendogramlarda söz konusu izolatın diğer tüm izolatlardan ayrı olarak ikinci ana grupta yer almış olması da bu durumu doğrular niteliktedir. İzolatların elde edildiği lokasyon ve çeşit bilgileri incelendiğinde nükleotit ve amino asit düzeyinde gözlenen varyasyonların coğrafik veya biyolojik etkenlerden kaynaklandığına dair ayırt edici bir ilişki ise kurulamamıştır.

GLRaV-Pr ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalarda ise C-31, D-12, İ-37, O-8 ve R-23 numaralı GLRaV-Pr izolatlarının HSP70h genine ait taranan 242 baz çiftlik bölgenin kendi aralarında nükleotit düzeyinde %92'nin, amino asit düzeyinde ise %95 ve üzerinde yüksek bir benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Bkz. Çizelge 4.29).

Yerel izolatlarda saptanan yüksek benzerlik oranlarına karşın nükleotit (Bkz. Şekil 4.37) ve amino asit (Bkz. Şekil 4.38) dizilerine ilişkin dendogramlarda C-31 ve R-23 numaralı izolatların ikinci ana grupta yer alarak D-12, İ-37 ve O-8 numaralı izolatlardan ayrıldığı görülmektedir. Bu durum izolatlar arasında görülen yüksek benzerlik oranında bile bir varyasyonun olabileceğini göstermektedir. Varyasyonların saptandığı izolatlar, elde edildikleri iller ve çeşitler açısından incelendiğinde ise saptanan varyasyonlarda ayırt edici coğrafik ve biyolojik bir etkinin saptanamadığı, aynı çeşitlerden ve aynı bölgeden elde edilen izolatlarda bile varyasyonun ortaya çıktığı anlaşılmaktadır. Yerel izolatların referans izolatlarla olan nükleotit dizilerine ilişkin dendogramı (Bkz. Şekil 4.39) incelendiğinde sadece FM244689 (Kıbrıs-Mavro) numaralı izolatın diğer tüm izolatlardan ayrılarak ikinci ana grupta yer aldığı; amino asit dizilerine ilişkin dendogramı (Bkz. Şekil 4.40) incelendiğinde ise FM244689 (Kıbrıs-Mavro) numaralı izolatın birinci ana grupta, C-31, R-23 ve AM745347 (Yunanistan-Prevezianiko) numaralı izolatların ise ikinci ana grupta yer aldığı görülmektedir. Karşılaşılan bu durumun nükleotit dizilerine ilişkin dendogramda ikinci ana grupta yer alan FM244689 (Kıbrıs-Mavro) numaralı izolatın kodon içerisinde meydana gelen kısmi nükleotit değişikliklerinin amino asit çevrimine etkisinin olmamasından, C-31, R-23 ve AM745347 (Yunanistan-Prevezianiko) numaralı izolatlarda ise aynı kodonda yer alan nükleotitlerdeki kısmi değişikliklerin amino asit çevrimine etkisinin olmasından kaynaklandığı anlaşılmaktadır.

Yerel izolatların referans izolatlarla nükleotit düzeyinde %90'ın üzerinde, amino asit düzeyinde ise %95'in üzerinde yüksek bir benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.30). Benzer şekilde Maliogka et al. (2008a), GLRaV-Pr izolatının HSP70 proteinini kodlayan geninin kısmi sekansının Güney Afrika'dan elde edilen WC-HSP-16 izolatıyla amino asit düzeyinde yüksek oranında (%93-%94) benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Yerel izolatlardan C-31'in AM745347 (Yunanistan-Prevezianiko) numaralı izolatla amino asit düzeyinde %100 benzerlik gösterdiği için bu iki izolatın aynı olduğu saptanmıştır. Nitekim amino asit dizilerine ilişkin dendogram (Bkz. Şekil 4.40) incelendiğinde C-31 ve R-23 numaralı izolatların AM745347 (Yunanistan-Prevezianiko) numaralı izolatla ikinci ana grupta yer aldığı, D-12, İ-37 ve O-8 numaralı izolatların ise diğer

referans izolatlarda birinci ana grupta yer aldığı görülmektedir. İzolatların elde edildiği çeşit ve lokasyon bilgileri incelendiğinde ise dendogramda görülen bu varyasyonda ayırt edici biyolojik bir etkinin görülmediğini, aynı şekilde coğrafik bir etkiyle de ilişki kurulamadığı anlaşılmaktadır.

GLRaV-De ile ilgili yürütülen çalışmalarda ise B-21, D-24, R-75 ve U-5 numaralı GLRaV-De izolatlarının HSP70h genine ait taranan 370 baz çiftlik bölgenin kendi aralarında nükleotit düzeyinde %93'ün, amino asit düzeyinde ise %97'nin üzerinde yüksek bir benzerlik gösterdiği ve D-24 numaralı izolatla R-75 numaralı izolatın amino asit düzeyindeki benzerlik oranlarının %100 olmasından dolayı aynı olduğu saptanmıştır (Bkz. Çizelge 4.31). Yerel izolatlarda saptanan yüksek benzerlik oranlarına karşın nükleotit dizilerine ilişkin dendogramda (Bkz. Şekil 4.41) U-5 numaralı izolatın, amino asit dizilerine ilişkin dendogramda (Bkz. Şekil 4.42) ise B-21 numaralı izolatın ikinci ana grupta yer alarak diğer yerel izolatlardan ayrıldığı görülmektedir. Karşılaşılan bu durumun U-5 numaralı izolat açısından aynı kodon içerisinde meydana gelen kısmi nükleotit değişikliklerinin amino asit çevrimine etkisinin olmamasından, B-21 numaralı izolat içinse söz konusu durumun amino asit çevrimine etkili olmasından kaynaklandığı anlaşılmaktadır. Amino asit dizilerine ilişkin dendogramda izolatların elde edildiği il ve çeşit bilgileri incelendiğinde saptanan varyasyonlarda ayırt edici coğrafik ve biyolojik bir etkinin gözlenmediği, aynı çeşide ve bölgeye ait izolatlarda bile varyasyonun ortaya çıktığı anlaşılmaktadır.

Yerel izolatların referans izolatlarla nükleotit düzeyinde %89'un üzerinde, amino asit düzeyinde ise %93'ün üzerinde yüksek bir benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.32). Saptanan yüksek benzerlik oranına karşın nükleotit (Bkz. Şekil 4.43) ve amino asit (Bkz. Şekil 4.44) dizilerine ait dendogramlar incelendiğinde AM745349 (Yunanistan-Debina) numaralı izolatın diğer izolatlardan ayrılarak ikinci ana grupta yer aldığı görülmektedir. Bu durum yüksek benzerlik oranlarında bile izolatlar arasında varyasyonların olabileceğini göstermektedir. Ancak varyasyonların görüldüğü izolatların elde edildiği lokasyon ve çeşit bilgileri incelendiğinde coğrafik açıdan ayırt edici bir etkinin gözlenmediği biyolojik açıdan ise Debina çeşidine ait izolatın ikinci ana grupta yer almasından dolayı düşük de olsa biyolojik bir etkinin olabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ege Bölgesi'nde bağcılığın yoğun olarak yapıldığı Manisa, Denizli, İzmir, Uşak ve Aydın illeri bağ alanlarında 2011-2015 yılları arasında yürütülen bu çalışma ile GLRaV-Car hariç asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili on farklı virüsün serolojik yöntemlerden DAS-ELISA ve moleküler yöntemlerden Real-time RT-PCR kullanılarak bulunma durumlarının saptanması, seçilen bazı örneklerin biyolojik indeksleme ile otsu ve odunsu indikatörlerde oluşturduğu semptomların belirlenmesi ve elde edilen DNA dizileme verileriyle yerel izolatların birbirleriyle ve dünya izolatlarıyla olan filogenetik ilişkileri ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Yürütülen araştırmanın ilk bölümünde DAS-ELISA ve Real-time PCR yöntemleri ile yapılan analizler sonucunda test edilen 424 asma örneğinin %31,4'ü hastalıkla ilişkili virüsler ile enfekteli olarak saptanmıştır. Bununla birlikte testlenen 424 örneğin %22,2'sinin bir, %9,2'sinin ise hastalıkla ilişkili birden fazla virüsle enfekteli olduğu belirlenmiştir. Ülkemizde hastalıkla ilişkili önceden saptanan ve çalışılan virüslere karşın Yunanistan'dan rapor edilen GLRaV-Pr virüsünün %16,8'lik bulunma durumuyla en yaygın virüs olduğu, ikinci sırada ise yine Yunanistan'dan rapor edilen GLRaV-De virüsünün %12'lik bulunma durumuyla yer aldığı tespit edilmiştir. Ayrıca gerçekleştirilen DAS-ELISA testleri sonucunda negatif olduğu tespit edilen GLRaV-1+3 için testlenen 30 örneğin on (%33,3)'u; GLRaV-4-9 için testlenen 43 örneğin altı (%14)'sı ve GLRaV-2 için testlenen 46 örneğin dokuz (%19,6)'u spesifik primerler kullanılarak gerçekleştirilen Real-time RT-PCR çalışmaları sonucunda enfekteli olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde biyolojik indeksleme için seçilen izolatların otsu indikatörlerden sadece U-5 numaralı izolatın inokule edildiği *N. benthamiana*'da semptom oluşumuna neden olduğu, odunsu indikatörlerle yapılan biyolojik indeksleme çalışmalarında ise seçilen tüm izolatların Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon ve Pinot Noir indikatörlerinin en az birinde değişen şiddetlerde semptom oluşturduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca asma genomunun bir parçası olduğu için *Ampelovirus* cinsinden çıkartılan GLRaV-8 ile ilgili olarak da GLRaV-8 primeriyle testlenen 424 asma örneğinin %75,9'unun pozitif sonuç verdiği, aynı çeşitlere ait örneklerin bazılarının GLRaV-8 primeriyle pozitif sonuç verdiği, bazılarının ise GLRaV-8 primeriyle pozitif sonuç vermediği tespit edilmiştir. Bunun yanında U-5 numaralı izolatın

inokule edildiği simptom gözlenen *N. benthamiana*'ların GLRaV-8 primeriyle pozitif sonuç verdiği, aynı zamanda GLRaV-8 primeriyle pozitif sonuç veren P-3 numaralı izolatın odunsu indikatörlerden C. Sauvignon ve P. Noir üzerinde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerin oluşturduklarına benzer simptomlar gözlemlendiği belirlenmiştir.

Çalışmanın üçüncü bölümünde ise hastalıkla ilişkili saptanan farklı virüslere ait HSP70h gen bölgesinin kısmi dizileme verisi elde edilen izolatlar önce kendi aralarında sonra ise NCBI gen bankasından seçilen referans izolatlarla filogenetik ilişkileri açıdan analiz edilmiş ve genel olarak izolatların kendi içlerinde ve referans izolatlarla yüksek oranda benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Bunun yanında elde edilen dizileme verileri NCBI gen bankasına kayıt edilerek veriler araştırmacıların kullanımına sunulmuştur.

Yukarıdaki sonuçlardan yola çıkarak;

- ❖ Bölgemiz bağlarında asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüslerden bulunma oranı açısından ilk iki sırada saptanarak ülkemiz için ilk kayıt olarak bildirilen ve serolojik tanı kiti bulunmayan GLRaV-Pr ve GLRaV-De virüsleri ile bu çalışma kapsamına alınmayan ancak ülkemiz bağlarında da bulunması ihtimal dahilinde olan GLRaV-Car virüsünün “Meyve ve Asma Fidanı ile Üretim Materyallerinde Bitki Sağlığı Standartları Talimatı” ve “Bitki Karantinası Yönetmeliği” kapsamında moleküler yöntemler ile analizlerinin yapılması gerekmektedir.
- ❖ Birçok farklı araştırmacı tarafından da bildirildiği üzere bu çalışma kapsamında da DAS-ELISA yönteminin asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsleri tanılamada hassasiyetinin düşük olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla başta karantina hizmeti veren kurumlar ile “Meyve ve Asma Fidanı ile Üretim Materyallerinde Bitki Sağlığı Standartları Talimatı” kapsamında kontrol kuruluşu olarak görevli olan kurumların söz konusu hastalıkla ilişkili virüslerin analizlerinde metot birlikteliğine vararak seçecekleri moleküler yöntemleri kullanmaları yanlış negatif sonuçların önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır.
- ❖ Ege Bölgesi'nin asma fidanı üretiminde de lider olmasının yanında fidan üreticilerinin üretim materyallerinin büyük bir kısmını bölgedeki üretim bağlarından sağlıyor olması özellikle de beyaz üzüm çeşitlerinde hastalıkla

ilişkili virüsler açısından latent enfeksiyonların görülme potansiyeliyle birlikte değerlendirildiğinde virüs hastalıklarının kontrolsüz bir şekilde yayılması açısından endişe vericidir. Dolayısıyla asma fidanı üretimi amacıyla bölge bağlarından üretim materyali sağlanmasının önüne geçilmeli, üretim materyalleri fidan üreticilerinin kuracağı virüsten ari damızlık parsellerinden sağlanmalıdır. Nitekim bu amaçla Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü liderliğinde 2012 yılında tamamlanan 107G116 numaralı “Ülkemizde Yetiştiriciliği Yapılan Ekonomik Öne Sahip Bazı Üzüm Çeşit ve Amerikan Asma Anaçları ile Klonlarının Virüsler ve *Agrobacterium vitis* Yönünden Arındırılması, Tanımlanması ve Yeni Üzüm Çeşitlerinin Geliştirilmesi” başlıklı TÜBİTAK 1007 projesi ile arındırma çalışmalarına başlanılmıştır. Bu kapsamda 2015 yılı itibarıyla 12 farklı anaç ve 30 farklı üzüm çeşidine ait virüsten ari materyal elde edilmiştir. Bunlardan sekiz anaç ve 14 çeşide ait üretim materyallerini üç nolu damızlık üretim parseli kurmak amacıyla 2014 ve 2015 yıllarında Fidan Üreticileri Alt Birliği (FÜYAB) üyesi özel bir firma satın almıştır.

- ❖ Üreticilere sertifikalı fidan arzının gerçekleştirilmeye başlanmasıyla birlikte standart asma fidanının üretimi ve satışı planlanacak bir program dahilinde durdurulmalı ve tesis edilecek yeni bağlar sertifikalı asma fidanlarıyla kurulmalıdır.
- ❖ Genel olarak bağ virüslerinin uzak alanlara taşınması üretim materyalleri (aşı gözü, kalem, fidan) ile olmakta, sınırlı bir alan içerisinde yayılmaları ise vektörler ve vektörlere konukçuluk eden yabancı otlar ile olmaktadır. Ayrıca GLRaV-2 gibi bazı asma virüsleri ayrıca mekanik olarak da taşınabilmektedir. Dolayısıyla söz konusu virüslerle mücadelede koruyucu önlemler büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla vektör böceklerle mücadele ihmal edilmemeli, bağlarda kullanılan budama alet ve ekipmanları asmadan asmaya geçerken dezenfekte edildikten sonra kullanılmalı, budama artıkları ise toplanarak imha edilmelidir.
- ❖ Asma genomunun bir parçası olduğu için *Ampelovirus* cinsinden çıkartılan GLRaV-8 ile ilgili olarak çalışma kapsamında saptanan bulgular yapılacak kapsamlı çalışmalarla ortaya konulmalıdır.
- ❖ Çalışma kapsamına hastalıkla ilişkili saptanan farklı virüslere ait tek bir gen bölgesinin kısmi dizileme verileri elde edilerek filogenetik analizler

gerçekleştirilmiş olup genel olarak yüksek benzerlik oranlarına rağmen izolatlar arasında varyasyonlar saptanmıştır. Ancak elde edilen kısmi dizileme verileri genomun küçük bir kısmını temsil etmektedir. Farklı gen bölgelerine ait hatta tüm genomu kapsayacak şekilde elde edilecek dizileme verileriyle yapılacak olan filogenetik analizlerin muhtemel varyasyonların saptanmasında daha detaylı ve güvenilir bulgular sağlayacağı düşünülmektedir.

- ❖ Protein kodlayan genlere ait dizileme verilerinde aynı kodon içerisinde meydana gelen bazı nükleotit değişikliklerinin zaman zaman amino asit çevimine etkisinin olmamasından dolayı filogenetik analizlerde nükleik asit dizilerine ait sekans verilerinin kullanımıyla birlikte amino asit dizi verilerinin de kullanılmasının benzerliklerin ve farklılıkların yorumlanmasında daha doğru ve destekleyici sonuçlar vereceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aboughanem-Sabanadzovic, N. and Sabanadzovic, S.**, 2015, First report of Grapevine leafroll-associated virus 2 infecting muscadine (*Vitis rotundifolia*) and summer grape (*Vitis aestivalis*) in the United States.. Plant Disease Vol 99 No. 1 pp. 163.
- Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Sabanadzovic, S., Castellano, M. A., Boscia, D. and Martelli, G. P.**, 2000, Properties of a new isolate of Grapevine leafroll-associated virus 2. Vitis-Geilweilerhof, 39(3), 119-121.
- Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Sabanadzovic, S., Minefra, A., Saldarelli, P., Castellano, M.A. and Martelli, G.P.**, 1997, Physico-chemical and molecular characterisation of grapevine leafroll-associated virus-2 Proc. 12th Meeting of ICGV, Lisbon, 28 September-2 October 1997. 15.
- Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Sabanadzovic, S., Uyemoto, J.K., Golino, D. and Rowhani, A.**, 2010, A putative new ampelovirus associated with grapevine leafroll disease. Archives of Virology 155: 1871-1876.
- Ahmed, H. M. H., Digiaro, M. and Martelli, G. P.**, 2004, Viruses and virus diseases of grapevine in Egypt. EPPO Bulletin, 34(3), 395-398.
- Ağaoğlu, Y.S.**, 1999, Bilimsel ve Uygulamalı Bağcılık (Asma Biyolojisi). Kavaklıdere Eğitim Yayınları, Cilt I, No:1, 205 s. Ankara.
- Akbaş, B. and Erdiller, G.**, 1993. Researches on Grapevine Virus Diseases and Determination of Their Incidences in Ankara, Türkiye. Journal of Turkish Phytopath. Soc. V. 22(2-3): 55-63.
- Akbaş, B. ve Erdiller, G.**, 1998, Karaman, Konya ve Nevşehir ili bağ alanlarında görülen virüs hastalıkları. Türkiye VIII. Fitopatoloji Kongresi, 149-153. 21-25 Eylül 1998, Ankara.
- Akbaş B, Kunter B. and Ilhan D.**, 2007, Occurrence and distribution of grapevine leafroll associated viruses 1,2,3 and 7 in Turkey. J Phytopathol 155:122–124.
- Alkowni, R., Rowhani, A., Daubert, S. and Golino, D.A.**, 2004. Partial characterization of a new ampelovirus associated with grapevine leafroll disease Journal of Plant Pathology 86: 123-133.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Al Rwahnih, M., Dolja, V. V., Daubert, S., Koonin, E. V. and Rowhani, A.,** 2012, Genomic and biological analysis of Grapevine leafroll-associated virus 7 reveals a possible new genus within the family Closteroviridae. *Virus Res.* 163:302-309.
- Al Rwahnih, M., Osman, F., Sudarshana, M., Uyemoto, J.K., Minafra, A., Saldarelli, P., Martelli, G.P. and Rowhani, A.,** 2013, Detection of Grapevine leafroll-associated virus 7 using real time qRT-PCR and conventional RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 179: 383-389.
- Al Rwahnih, M., Rowhani, A., Golino, D. A., Islas, C. M., Preece, J. E. and Sudarshana, M. R.,** 2015, Detection and genetic diversity of Grapevine red blotch-associated virus isolates in table grape accessions in the National Clonal Germplasm Repository in California. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 37(1), 130-135.
- Azeri, T.,** 1990, Detection of Grapevine Leafroll Virus in Different Grapevine Varieties by Indexing. *Journal of Turkish Phytopathological Society*, 19 (3):103-110.
- Azeri, T. ve Çiçek, Y.,** 1995, İntrodüksiyon ve Klon Seleksiyonuyla Elde Edilmiş Bazı Bağ Çeşitleri ve Anaçlarındaki Virüs ve Virüs Benzeri hastalıkların Saptanmasına Yönelik Araştırmalar. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi. Adana. 26-29 Eylül 1995, s. 374-377.
- Azeri, T. and 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.
- Baraff, B. N.,** 2011, “Genetic Diversity and Distribution of Grapevine leafroll-associated virus in California”, http://nature.berkeley.edu/classes/es196/projects/2011final/BaraffB_2011.pdf (2011) (Erişim tarihi: 12.10.2015)
- Basso, M. F., Fajardo, T. V. M., Santos, H. P., Guerra, C. C., Ayub, R. A. and Nickel, O.,** 2010, Leaf physiology and enologic grape quality of virus infected plants. *Trop. Plant Pathol.* 35:351-359.
- Bertazzon, N. and Angelini, E.,** 2004, Advances in the detection of grapevine leafroll-associated virus 2 variants. *J Plant Pathol* 86:283–290.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bertazzon, N., Borgo, M. and Angelini, E.,** 2010, The complete genome sequence of the BD variant of grapevine leafroll-associated virus 2. Arch Virol 155:1717–1719.
- Bertsch, C., Beuve, M., Dolja, V.V., Wirth, M., Pelsy, F., Herrbach, E. and Lemaire, O.,** 2009, Retention of the virus-derived sequences in the nuclear genome of grapevine as a potential pathway to virus resistance. Biology Direct 4: 21.
- Beuve, M., Sempé, L. and Lemaire, O.,** 2007, A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detecting Grapevine leafroll-associated virus 2 variants in grapevine. Journal of Virological Methods, 141(2), 117-124.
- Bora, T. ve Karaca, İ.,** 1970, Kültür bitkilerinde hastalığın ve zararın ölçülmesi. Ege Üniversitesi Yardımcı Ders Kitabı, Yayın No: 167, E.Ü. Mat., Bornova-İzmir, 8s.
- Borja, M.J. and Ponz, F.,** 1992, An appraisal of different methods for the detection of the walnut strain of cherry leaf roll virus. Journal of Virological Methods, 36:73-83.
- Boscia, D., Greif, C., Gugerli, P., Martelli, G.P., Walter, B. and Gonsalves, D.,** 1995, Nomenclature of grapevine leafroll-associated putative closteroviruses. Vitis 34, 171-175.
- Buzkan, N., Işıkber, A.A. ve Gümüş, M.,** 2010a. Doğu Akdeniz ve Ege Bölgesi Bağlarında GLRaV-5 Enfeksiyonunun Asma ve Vektörlerinde Moleküler Teşhisi, TÜBİTAK 109 O 391 nolu proje sonuç raporu (yayımlanmamış).
- Buzkan, N., Karadağ, S., Kaya, A., Baloğlu, S., Minafra, A. and Ben-Dov, Y.,** 2010b. First Report of the Occurrence of Grapevine leafroll-associated virus-5 in Turkish Vineyards. J Phytopathol 158:448–449.
- Cabaroğlu T. ve Yılmaztekin M.,** 2006, Üzümün bileşimi ve insan sağlığı üzerine etkisi, Buldan Simpozyumu Bildiri Kitabı, 23-24 Kasım 2006 Buldan, 999-1004.
- Cadman, C.H., Dias, H.F. and Harrison, B.D.,** 1960, Sap-Transmissible Viruses Associated with Diseases of Grape Vines in Europe and North America. Nature 187,577-579.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Castellano, M.A., Abou-Ghanem, N., Martelli, G.P., Boscia, D. and Savino, V.,** 1995, Cytopathology of two filamentous grapevine viruses and their intracellular identification by gold immunolabelling. *J. Plant Dis. Prot.* 102, 23-33.
- Chooi, K.M., Cohen, D. and Pearson, M.N.,** 2013, Molecular characterisation of two divergent variants of Grapevine leafroll-associated virus 3 in New Zealand. *Archives of Virology* 158:1597-1602.
- Chou, Q., Russel, M., Birch, D., Raymond, J. and Bloch., W.,** 1992, Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acid Res.* 20 (7), 1717-1723.
- Choueiri, E., Boscia, D., Digiario, M., Castellano, M.A. and Martelli, G.P.,** 1996, Some properties of a hitherto undescribed filamentous virus of the grapevine. *Vitis* 35: 91-93.
- Clark, M.F. and Adams, A.N.,** 1977, Characteristics of the Microplate Methods of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *I. Gen. Virol.* 34: 475-438.
- Cooke, P.** <http://www.wineappreciation.co.uk/BWAC%20Tastings/Around%20TW.html> (Erişim tarihi: 06.10.2015)
- Çelik, H.** “Türkiye Bağcılığında Üretim Hedefleri”, www.hasancelik.web.tr/Yayinlar/122.pdf (2013) (Erişim tarihi: 06.10.2015)
- Çığsar, İ.,** 2002, Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Nevşehir İllerinde Bağlarda Zararlı Virüs ve Virüs Benzeri Hastalıkların Biyolojik ve Serolojik Yöntemlerle Saptanması ve İki Yeni Nepovirüsün Karakterizasyonu. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 111 s.
- Çığsar, İ. ve Yılmaz, M.A.,** 1998, Güneydoğu Anadolu Bağlarında Görülen Virüs Hastalıklarının Serolojik Yöntemlerle Saptanması. Türkiye VIII. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri. Ankara, 21-25 Eylül 1998, s. 154-157.
- Digiario, M., Martelli G.P. and Savino V.,** 2000, Phloem-limited viruses of the grapevine in the Mediterranean and Near East. *Extended Abstracts 13th ICGV*, Adelaide, pp. 75-76.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dovas, C. I. and 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.
- Elçi, E., Gazel, M. and Çağlayan, K.,** 2015, Comparative sequence analysis of partial coat protein genes of different Grapevine leafroll-associated virus-1 isolates. *Proceedings 18th Congress of ICVG, Ankara, Turkey*: 55-56.
- Endeshaw, S. T., Sabbatini, P., Romanazzi, G., Schilder, A. C. and Neri, D.,** 2014, Effects of grapevine leafroll associated virus 3 infection on growth, leaf gas exchange, yield and basic fruit chemistry of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Franc. *Scientia Horticulturae*, 170, 228-236.
- Engel, E.A., Escobar, P., Montt, C., Gomez-Talquenca, S. and Valenzuela, P.D.T.,** 2008, First Report on the Occurrence of Grapevine leafroll-associated virus 7 and 9 in Chilean Grapevines. *Plant Dis.* 92, 1252.
- Ertunc, F. and Turkmen, Y.,** 2015, Grapevine leaf roll associated virus infections in Turkey. *Proceedings 18th Congress of ICVG, Ankara, Turkey*: 166.
- Fan, X., Hong, N., Dong, Y., Ma, Y., Zhang, Z. P., Ren, F., Hu, G., Zhou, J. and Wang, G.,** 2015, Genetic diversity and recombination analysis of grapevine leafroll-associated virus 1 from China. *Archives of virology*, 1-10.
- Fiore, N., Prodan, S., Montealegre, J., Aballay, E., Pino, A. M. and Zamorano, A.,** 2008, Survey of grapevine viruses in Chile. *Journal of Plant Pathology*, 125-130.
- Fiore, N., Zamorano, A., Sánchez-Diana, N., Pallás, V. and Navarro, J.A.,** 2012, Survey and Partial Molecular Characterization of Grapevine Virus and Viroids from Valencia, Spain. *Proceedings 17th Congress of ICVG, Davis, USA*: 196-197.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division (FAOSTAT).** <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E> (2013) (Erişim tarihi: 06.10.2015).
- Giampetruzzi, A., Chiumenti, M., Roberto, R., Pirolo, C., Minafra, A. and Saldarelli, P.,** 2011, First detection of Grapevine leafroll-associated virus 9 in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 93(4, Supplement).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Goheen, A. C. and Cook, J. A.,** 1959, Leafroll (red-leaf or rougeau) and its effects on vine growth, fruit quality, and yields. *Am. J. Enol. Vitic.* 10(4):173-181.
- Golino, D.A., Verdegaaal, P., Rowhani, A. and Walker, M.A.,** 1992, Sampling procedures to find nepoviruses in grapevines need improvement. *Calif. Agric.*, 46:11-13.
- Gollmick, F., Bocker, H. and Grünzel, H.,** 1970, DAS WEINBUCH. 3., Neubearb. Aufl., 542 Seiten, 209 Abb., 16 Farbtafeln und 21 Tab., VEB Fachbuchverlag, Leipzig 1970. Preis: 32,-M. *Food/Nahrung*, 16(1), 82-82.
- Goszcynski, D.E., Kasdorf, G.G.F., Pietersen, G. and Vantonder, H.,** 1996, Detection of two strains of grapevine leafroll-associated virus-2. *Vitis* 35, 133-135.
- Gugerli, P. and Ramel, M.E.,** 1993, Grapevine leafroll-associated virus II analyzed by monoclonal antibodies. Extended Abstracts 11th Meeting of ICVG, Montreux, Switzerland: 23-24.
- Gürsoy, Y.Z.,** 1991, Asma Yaprak Kıvrılma Virüsü (Grapevine Leafroll Virus Tip I ve III)'nun Bazı Üzüm Çeşitlerinde ELISA testi ile Saptanması. VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi. İzmir, 7-11 Ekim 1991, s.397-400.
- Hu, J. S., Wang, M., Maixner, M. and Gonsalves, D.,** 1990b, Mechanical transmission and characterization of a closterovirus from a grapevine leafroll diseased grapevine. In *Proceedings of 10th Meeting of ICVG, Volos, Greece*: p.63.
- Ilgın, C., Erdem, A. ve Akman, İ.,** 1998, Tüplü Fidan Üretiminde En Uygun Harç Karışımının Saptanması Üzerine Araştırmalar. IV. Bağcılık Sempozyumu, Yalova, 127-131.
- Ito, T., Nakaune, R., Nakano, M. and Suzaki, K.,** 2012, Novel variants of grapevine leafroll-associated virus 4 and 7 detected from a grapevine showing leafroll symptoms. *Archives of Virology* 158: 273-275.
- Jones, T. J., Rayapati, N. A. and Nita, M.,** 2015, Occurrence of Grapevine leafroll associated virus-2,- 3 and Grapevine fleck virus in Virginia, USA, and factors affecting virus infected vines. *European Journal of Plant Pathology*, 142(2), 209-222.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jooste, A. E., Molenaar, N., Maree, H. J., Bester, R., Morey, L., de Koker, W. C. and Burger, J. T.,** 2015, Identification and distribution of multiple virus infections in Grapevine leafroll diseased vineyards. *European Journal of Plant Pathology*, 142(2), 363-375.
- Kaya, A. ve Erilmez, S.,** 2014, Ege Bölgesi Bağlarında Virüs Hastalıklarının Belirlenmesi. *J. Turk. Phytopath.* Vol:43 No:1-3, 45-57.
- Kaya, A., Erilmez, S., Paylan, İ. C. and Erkan, S.,** 2012, First Report of Grapevine Leafroll-associated Virus 4 in Vineyards of Turkey. *Plant Disease*, Vol. 96(8) pp.1230.
- Kim, H. R., Park, Y. M., Chung, B. N., Park, G. S. and Kim, J. S,** 2002. Biological Assay and Cytopathological Characteristics of Grapevine leafroll-associated 3 virus (GLRaV-3) and Grapevine fanleaf virus (GFLV). *The Plant Pathology Journal*, 18(5), 244-250.
- Komar, V., Vigne, E., Demangeat, G., Lemaire, O. and Fuchs, M.,** 2010, Comparative performance analysis of virus-infected *Vitis vinifera* cv. Savagnin rose grafted onto three rootstocks. *Am. J. Enol. Vitic.* 61:68-73.
- Kovacs, L. G., Hanami, H., Fortenberry, M. and Kaps, M. L.,** 2001, Latent infection by leafroll agent GLRaV-3 is linked to lower fruit quality in French-American hybrid grapevines Vidal blanc and St. Vincent. *Am. J. Enol. Vitic.* 52:254-259.
- Köklü, G.,** 1999, Trakya Bölgesi Bağlarında Asma Yaprak Kıvrılma Virüs Hastalığının Karakterizasyonu ve Surveyi. *Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi*, 142 s (yayımlanmamış).
- Köklü, G. ve Baloğlu, S.,** 2001a, Asma Yaprak Kıvrılması İle İlişkili Virüs 3 (GLRaV-3)'ün Saflaştırılması ve Antiserum Üretimi, *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 1(1), 5-8.
- Köklü, G. ve Baloğlu, S.,** 2001b, Trakya Bölgesi Yetiştirilen Bağlarda dsRNA Analizleriyle Asma Yaprak Kıvrılması ile İlişkili Virüslerin Tespit Edilmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi* 1(1), 1-4.
- Krake, L.R.,** 1993, Characterization of Grapevine Leafroll Disease by Symptomology. *Wine Industry Journal*, February, p.40-44.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Krake, L.R., Scott, N.S., Rezaian, M.A. and Taylor, R.H.,** 1999, Graft-transmitted Diseases of Grapevines. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, 137 s.
- Ling, K.S., Zhu, H.Y., Petrovic, N. and Gonsalves, D.,** 2007, Serological Detection of Grapevine leafroll virus 2 Using an Antiserum Developed against the Recombinant Coat Protein†. *Journal of phytopathology*, 155(2), 65-69.
- Maliogka, V.I, Dovas, C.I. and Katis N.I.,** 2008a, Evolutionary relationships of virus species belonging to a distinct lineage within the Ampelovirus genus. *Virus Res* 135:125–135.
- Maliogka, V.I, Dovas, C.I. and Katis N.I.,** 2008b, 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. and 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.
- Maree, H. J., Pirie, M. D., Oosthuizen, K., Bester, R., Rees, D. J. G. and Burger, J. T.,** 2015, Phylogenomic Analysis Reveals Deep Divergence and Recombination in an Economically Important Grapevine Virus. 1-19. <http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0126819&representation=PDF> (Erişim tarihi: 14.10.2015).
- Martelli, G.P.,** 1986, Virus and virus-like diseases of the grapevine in the Mediterranean area. *FAO Plant Protection Bulletin* 34, 25-42.
- 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.,** 1993, Graft-Transmissible Diseases of Grapevines. Handbook for detection and Diagnosis. *ICVG, FAO, Rome*, 263 s.
- Martelli G.P.,** 2014, Directory of Virus and Virus-Like Diseases of The Grapevine and Their Agents. *Journal of Plant Pathology* 96(1S), 1-134.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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. and 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: 7-19.
- Martelli, G.P. and Boudon-Padieu, E.,** 2006, Directory of Infectious Diseases of Grapevines and Viroses and Virus-like Diseases of the Grapevine: Bibliographic Report 1998-2004, Chiam, 2006.
- Matus, J.T., Vega, A., Loyola, R., Serrano, C., Cabrera, S. and Arce-Johnson, P.,** 2008, *Electronic Journal of Biotechnology*, 11 (5), Special Issue. 1-10.
- Monette, P.L. and Godkin, S.E.,** 1993, Mechanical transmission of closterovirus-like particles from a corky bark affected grapevine to an herbaceous species. *Plant Pathology (Trends in Agric. Sci.)* 1, 7-12.
- Monette, P. L., Godkin, S. E. and James, D.,** 1990, Mechanical sap transmission of a closterovirus from in vitro shoot tip cultures of a leafroll-affected grapevine to *Nicotiana benthamiana*. *Vitis*, 29(1), 49-55.
- Monis, J.,** 2000, Development of monoclonal antibodies reactive to a new grapevine leafroll-associated closterovirus. *Plant Disease* 84: 858-862.
- Mslmanieh, T., Digiaro, M., Elbeaino, T., Boscia, D. and Martelli, G. P.,** 2006, Viruses of grapevine in Syria. *EPPO Bulletin*, 36(3), 523-528.
- Murashige, T. and Skoog, F.,** 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497.
- Naidu, R.A., Donda, B. and Adiputra, J.,** 2015a, Grapevine leafroll and red blotch diseases in Washington State vineyards. *Proceedings 18th Congress of ICVG*, Ankara, Turkey: 38-39.
- Naidu, R. A., Maree, H. J. and Burger, J. T.,** 2015b, Grapevine Leafroll Disease and Associated Viruses: A Unique Pathosystem. *Annu. Rev. Phytopathol*, 53, 613-34.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Naidu, R., Rowhani, A., Fuchs, M., Golino, D. and Martelli, G. P.,** 2014, Grapevine leafroll: A complex viral disease affecting a high-value fruit crop. *Plant Disease*, 98(9), 1172-1185.
- Naidu, R. A., O'Neil, S. and Walsh, D.,** 2008, "Grapevine leafroll disease". WSU Extension Bulletin EB2027E. <http://cru.cahe.wsu.edu/CEPublications/eb2027e/eb2027e.pdf> (Erişim tarihi: 13.10.2015).
- National Center for Biotechnology Information (NCBI),** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore> (2015) (Erişim tarihi: 09.10.2015).
- Oraman, M.N.,** 1972, Bağcılık Tekniği II. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları, No:470, Ankara Üniv. Basımevi, 238-260 s.
- Osman, F., Golino, D. and Rowhani, A.,** 2012, The Effect of Seasonal Changes on the Titer of grapevine viruses in infected *Vitis vinifera* and their Downstream Detection using RT-PCR and qRT-PCR. *Proceedings 17th Congress of ICVG, Davis, USA*: 218-219.
- Osman, F., Leutenegger, C., Golino, D. and Rowhani, A.,** 2007, Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of Grapevine leafroll associated viruses 1–5 and 9. *J. Virol. Methods* 141, 22–29.
- Osman, F. and Rowhani, A.,** 2006, Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *J. Virol. Methods* 133, 130–136.
- Özaslan M.,** 1998, Çukurova Bölgesi Bağlarında Yeni Bir Virüs Hastalığı. *Asma Virüs A (Grapevine Virüs A). VIII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi. Bildiriler. Türkiye VIII. Fitopatoloji Kongresi 21-25 Eylül, Bildirileri Ankara s. 366-369.*
- Özaslan, M., Baloğlu, S. ve Yılmaz, M.A.,** 1991, Kahramanmaraş Bölgesi'nde Lokal Olarak Yetiştirilen Üzüm Çeşitlerinde Virüs Hastalıkları. *VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi. Bildiriler, (401-406 S), Türkiye Fitopatoloji Derneği.*
- Özaslan, M. ve Yılmaz, M.,** 1995, Adana, Tarsus, Gaziantep, Şanlıurfa ve Adıyaman Bölgelerinde Yetiştirilen Bağlara Zarar Veren Virüs Hastalıkları. *VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi. Adana, 26-29 Eylül 1995, s.306-312.*
- Padilla, C. V., Cretazzo, E., Alcalá, M. J., Hita, I., López, N., Padilla, V. and Velasco, L.,** 2013, First report of Grapevine leafroll-associated virus 9 in Spain. *Journal of Plant Pathology*, 95(3).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pathirana, R. and McKenzie, M.J.**, 2005, A modified green-grafting technique for large-scale virus indexing of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae* 107, 97–102.
- Peake, B. K., Mackie, A. E., Sivasithamparam, K., Habili, N. and McKirdy, S. J.**, 2004. First report of grapevine leafroll associated virus 9 (GLRaV-9) in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 33(3), 445-446.
- Pearson, R.C. and Goheen, A.C.**, 1988, Compendium of Grape Diseases, pp. 47–54. St. Paul: APS Press. 93 pp.
- Pekekti, A., Çağlayan, K. ve Gazel, M.**, 2001, Hatay İlinde Asma Yaprak Kıvrılma Virüsünün (GLRaV-1+GLRaV-3) Mevsimsel ve Organlara Göre Dağılımının Elisa Yöntemiyle Belirlenmesi. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi, 3-8 Eylül, Tekirdağ. S.563-571.
- Poojari, S., Alabi, O.J. and Naidu, R.A.**, 2013. Molecular characterization and impacts of a Grapevine leafroll-associated virus 2 strain causing asymptomatic infection in a wine grape cultivar. *Virology Journal* 10: 324.
- Rai, R., Baranwal, V.K., Khurana, S.M.P. and Kumar, S.**, 2015, Occurrence and Characterization of *Grapevine leafroll-associated virus 4* in Indian Vineyards. Proceedings 18th Congress of ICVG, Ankara, Turkey: 61-62.
- Rakhshandehroo, F., Pourrahim, R., Zamani Zadeh, H., Rezaee, S. and Mohammadi, M.**, 2005, Incidence and distribution of viruses infecting Iranian vineyards. *Journal of phytopathology*, 153(7-8), 480-484.
- Ravaz, L. and Roos, L.**, 1905, Le rougeau de la vigne. *Progrés Agricole et Viticole* 22: 39-40.
- Reynard, J.S. and Gugerli, P.**, 2012a, Partial Characterization of a New Divergent Variant of GLRaV-4. Proceedings 17th Congress of ICVG, Davis, USA: 72-73.
- Reynard, J.S. and Gugerli, P.**, 2012b, Current Status of Major Grapevine Viruses in La Côte Vineyards of Switzerland. Proceedings 17th Congress of ICVG, Davis, USA: 74-75.
- Reynard, J. S. S., Schneeberger, P. H., Frey, J. and Schaerer, S.**, 2015, Biological, serological and molecular characterization of a highly divergent strain of GLRaV-4 causing grapevine leafroll disease. *Phytopathology*, 105(9), 1262-1269.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rosciglione, B. and Gugerli, P.,** 1989, Transmission of grapevine leafroll disease and associated closteroviruses to healthy grapevine by the mealybug *Planococcus ficus* Signoret. Proc. 9th Meeting of ICGV, Israel, 6-11 September 1987, 67-69.
- Rowhani, A., Uyemoto, J.K. and Golino, D.A.,** 1997, A comparison between serological and biological assays in detecting grapevine leafroll associated viruses. Plant Disease 81, 779-801.
- Rowhani, A., Uyemoto, J. K., Golino, D. A. and Martelli, G. P.,** 2005, Pathogen Testing and Certification of Vitis and Prunus Species*. Annu. Rev. Phytopathol., 43, 261-278.
- Rowhani, A., Walker, M.A. and Rokni, S.,** 1992, Sampling strategies for the detection of grapevine fanleaf virus and the grapevine strain of tomato ringspot virus. Vitis, 31:35-44.
- Saldarelli, P., Cornuet, P., Vigne, E., Talas, F., Bronnenkant, I., Dridi, A. M., Andret-Link, P., Boscia, D., Gugerli, P., Fuchs, M. and Martelli, G. P.,** 2006, Partial characterization of two divergent variants of grapevine leafroll-associated virus 4. Journal of Plant Pathology, 203-214.
- Sarpkaya, K.,** 2003, Gaziantep ili ve ilçelerinde bağ virüs hastalıklarının serolojik yöntemlerle saptanması. Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 56 s.
- Tekinel, N., Dolar, M.S., Nas, Z., Bilgin, N., Salih, H. ve Salcan, Y.,** 1971, Akdeniz bölgesi bağlarında bulaşık soysuzlaşma (fanleaf)'nın araştırılması. Bitki Koruma Bülteni, 11, 225-247.
- Teliz, D., Tanne, E., Gonsalves, D. and Zee, F.,** 1987, Field serology of viral antigens associated with grapevine leafroll disease. Plant Dis., 71: 704-709.
- Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK),** <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (2013) (Erişim tarihi: 06.10.2015).
- Valverde, R. A., Nameth, S. T. and Jordan, R. L.,** 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. Plant Disease, 74(3), 255-258.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Voncina, D., Simon, S., Dermic, E., Cvjetkovic, B., Pejic, I., Malatic, E. and Kontic, J.K.,** 2010, Distribution and partial molecular characterization of Grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV-2) found in Croatian autochthonous grapevine (*Vitis vinifera* L.) germplasm. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 117 (5), 194-200.
- Winkler, A.J., Cook, J.A., Kliewer, W.M. and Lider, L.A.,** 1974, *General Viticulture*. University of California Press, Berkeley, California, 710p.
- Wolpert, J. A. and Vilas, E. P.,** 1992, Effect of mild leafroll disease on growth, yield, fruit maturity indices of Riesling and Zinfandel. *Am. J. Enol. Vitic.* 43:367-369.
- Woodham, R. C., Antcliff, A. J., Krake, L. R. and 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., Cigsar I. and Ozaslan, M.,** 1997, A Survey of Grapevine Viruses in Turkey. 12th Proc. of ICVG. Lisbon, Portugal. 28 Sep.2 Oct, 1997. P 113.
- Zimmermann, D., Bass, P., Legin, R. and 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.
- Zipper, H., Brunher, H. and Bernhagen, J.,** 2004, Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acid Res.* 32 (12), e103.

ÖZGEÇMİŞ

Araştırmacı 02.03.1982 tarihinde İstanbul'da doğdu. 1999 yılında İstanbul Tuzla Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi'nden mezun oldu. 1999 Yılında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesini kazandı ve 2003 yılında fakültenin Bitki Koruma Bölümü'nden fakülte birincisi olarak dereceyle mezun oldu. Aynı yıl Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma A.B.D. Fitopatoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitime başladı. 2004 yılında Fitopatoloji Bilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2007 yılında *'Edremit Körfez Bölgesi'ndeki Satsuma Mandarinlerinde Yaygın Olan Virüs ve Virüs Benzeri Hastalıkların Biyolojik ve Serolojik Yöntemlerle Saptanması'* konulu Yüksek Lisans tezini tamamladı. Aynı yıl Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'na geçiş yaptı. 2007 – 2009 yılları arasında Sivas İli Suşehri İlçe Tarım Müdürlüğü'nde Ziraat Yüksek Mühendisi olarak görev yaptı. 2008 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma A.B.D. Fitopatoloji Bilim Dalı'nda Doktora programını kazandı. 2009 yılında Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsü'ne geçiş yaptı. Enstitüde 03.11.2011 ile 21.07.2014 tarihleri arasında Koordinatör olarak görev yaptı. Halen aynı enstitünün viroloji laboratuvarında görev yapmaktadır. Evli ve bir çocuk babasıdır.

EKLER

Ek 1 Yerel GLRaVs izolatlarının nükleotit ve amino asit dizileri

> GLRaV-1 izolat R-49 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

TTGTCGGGATTCACGGAGTTAGTTATTTTTCCCAAAGGTCATCCGATA
CCGTCCGTATATGAAACGAGCTTTCAAATATCAGGAAGCACTATGGA
GTACGGCATTTTTGAGGGCGAGTCTAATCGCACCTGGTTGAATGAGAT
CGCTTTTAAGGGGACGGACTACAGACCGTCTAATGAAAGGAAGAGTG
ATAAAGTTAAATACGAGATATCAGTGGACGGAAAATTGAACTGAGC
GTCGATGGCAGAGAATTGAA

LSGFTELVIKPKGHPIPSVYETSFQISGSTMEYGIFEGESNRTWLNEIAFKG
TDYRPSNERKSDKVKYEISVDGKLKLSVDGREL

> GLRaV-2 izolat M-12 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

ATCCCCACTTACCTCTATCTCTTCTCCGATTCTAACCACATGACTTTTG
GTTACGAGGCCGAATCACTGATGAGTAATCTGAAAGTTAAAGGTTCT
TTTTATAGAGATTTAAAACGTTGGGTGGGTGCGATTGAGTAACCTC
GACGCGTACCTTGACCGTTTAAAACCTCATTACTCGGTCCGCTTGGTT
AAGATCGGCTCTGGCTTGAACGAACTGTTTCAATTGGAACTTCGG
GGGCACTGTTAAGTCTGAGGCTCATCTGCCA

IPTYLYLFSDSNHMTFGYEAESLMSNLKVKGSFYRDLKRWVGCDSNLD
AYLDRLKPHYSVRLVKIGSGLNETVSIGNFGGTVKSEAHLP

> GLRaV-2 izolat B-21 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

ATCCCCACTTACCTCTATCTCTTCTCCGATTCTAACCACATGACTTTTG
GTTACGAGGCCGAATCACTGATGAGTAATCTGAAAGTTAAAGGTTCTG
TTTTATAGAGATTTAAAACGTTGGGTGGGTGCGATTGAGTAACCTC
GACGCGTACCTTGACCGTTTAAAACCTCATTACTCGGTCCGCTTGGTT
AAGATCGGCTCTGGCTTGAACGAACTGTTTCAATTGGAACTTCGG
GGGCACTGTTAAGGCTGAGGCTCATCTGCCA

IPTYLYLFSDSNHMTFGYEAESLMSNLKVKGSFYRDLKRWVGCDSNLD
AYLDRLKPHYSVRLVKIGSGLNETVSIGNFGGTVKAEAHLP

> GLRaV-2 izolat R-10 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

ATCCCCACTTACCTCTATGTCTTCTCCGATTCTAACCACATGACTTTTG
GTTACGAGGCCGAATCACTGATGAGTAATCTGAAAGTTAAAGGTTTCG
TTTTATAGAGATTTAAAACGTTGGGTGGGTTCGATTTCGAGTAACCTC
GACGCGTACCTTGACCGTTTAAAACCTCATTACTCGGTCCGCTTGGTT
AAGATCGGCTCTGGCTTGAACGAAACTGTTTCAATTGGAACTTCGG
GGGCACTGTTAAGTGTGAGGCTCATCTGCCA

IPTYLYVFSDSNHMTFGYEAESLMSNLKVKGsfYRDLKRWVGCDSSNLD
AYLDRLKPHYSVRLVKIGSGLNETVsignfGGTVKCEAHLp

> GLRaV-2 izolat İ-9 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

ATCCCCACTTACCTCTATCTCTTCTCCGATTCTAACCACATGACTTTTG
GTTACGAGGCCGAATCACTGATGAGTAATCTGAAAGTTAAAGGTTTCG
TTTTATAGAGATTTAAAACGTTGGGTGGGTTCGATTTCGAGTAACCTC
GACGCGTACCTTGACCGTTTAAAACCTCATTACTCGGTCCGCTTGGTT
AAGATCGGCTCTGGCTTGAACGAAACTGTTTCAATTGGAACTTCGG
GGGCACTGTTAAGTCTGAGGCTCATCTGCCA

IPTYLYLFSDSNHMTFGYEAESLMSNLKVKGsfYRDLKRWVGCDSSNLD
AYLDRLKPHYSVRLVKIGSGLNETVsignfGGTVKSEAHLp

> GLRaV-3 izolat C-29 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

TATCCAGACCCTGTTATTGCTGTTATGACTGGGGGGTCAAGTGCTCTA
GTTAAGGTCAGGAGTGATGTGGCCAATTTGCCGCAGATATCTAAGGT
TGTGTTTCGACAATACTGATTTTAGGTGTTTCGGTAGCCTGTGGGGCTAA
GGTTTACTGTGATATTTTGGCAGGTAATAGCGGACTGAGACTGGTGG
ACACTTTGACGAATACGCTAACGGACGAGGTGGTGGACTTTCAACCG
GTGGTAATTTTCCCGAAAGGTAGTCCAATACCCTGTTTCATACACTCAC
AGATACACAGTGGGTAGTGGAGATGTGGTGTACGGTATATTTGAAGG
GGAGAATAACAGGGCTTTTCTAAATGAACCGACGTTCCGGGGCGTAT
CGAAACGTAGGGGAGACCCAAAAGAGACCGACGTAGCGCAATTTAA
TTTATCCACAGACGGTACGGTATCTGTTATTGTTAACGGTGAGGAAGT
AAAGAATGAATATCTG

YPDPVIAVMTGGSSALVKVRSDVANLPQISKVVFNDNTDFRCSVACGAKV
YCDILAGNSGLRLVDTLTNTLTDEVVDFQPVVIFPKGSPIPCSYTHRYTVG
SGDVVYGIFEGENNRAFLNEPTFRGVSKRRGDPKETDVAQFNLSTDGTV
SVIVNGEEVKNEYL

> GLRaV-3 izolat O-8 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

TATCCAGACCCTGTTATTGCTGTTATGACTGGGGGGTCAAGTGCTCTA
GTTAAGGTCAGGAGTGATGTGGCCAATTTGCCGCAGATATCTAAGGT
TGTGTTTCGACAATACTGATTTTAGGTGTTTCGGTAGCCTGTGGGGCTAA
GGTTTACTGTGATATTTTGGCAGGTAATAGCGGACTGAGACTGGTGG
ACACTTTGACGAATACGCTAACGGACGAGGTGGTGGACTTTCAACCG
GTGGTAATTTTCCCGAAAGGTAGTCCAATACCCTGTTCATACACTCAC
AGATACACAGTGGGTGGTGGAGATGTGGTGTACGGTATATTTGAAGG
GGAGAATAACAGGGCTTTTCTAAATGAACCGACGTTCCGGGGCGTAT
CGAAACGTAGGGGAGACCCAAAAGAGACCGACGTAGCGCAATTTAA
TTTATCCACAGACGGTACGGTATCTGTTATTGTTAACGGTGAGGAAGT
AAAGAATGAATATCTG

YPDPVIAVMTGGSSALVKVRSDVANLPQISKVVFNDNTDFRCSVACGAKV
YCDILAGNSGLRLVDTLTNTLTDEVVDFQPVVIFPKGSPIPCSYTHRYTVG
GGDVVYGIFEGENNRAFLNEPTFRGVSKRRGDPKETDVAQFNLSTDGTV
SVIVNGEEVKNEYL

> GLRaV-3 izolat İ-9 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

TACCCAGACCCGGTTATTGCTGTTATGACTGGGGGGTCAAGTGCTCTA
GTTAAGGTCAGGAGTGATGTGGCTAATTTGCCGCAGATATCTAAGGT
CGTGTTTCGACAGTACCGATTTTAGATGTTTCGGTGGCTTGTGGGGCTAA
GGTTTACTGCGATATTTTGGCAGGTAATAGCGGACTGAGACTGGTGG
ACACTTTAACGAATACGCTAACGGACGAGGTAGTGGATTTTCAGCCG
GTGGTAATTTTCCCGAAAGGTAGTCCAATACCCTGTTCATATACTCAT
AGATACACAGTGGGTGGTGGAGATGTGGTATACGGTATATTTGAAGG
GGAGAATAACAGAGCTTTTCTAAATGAACCGACGTTCCGGGGCGTAT
CGAAACGTAGGGGAGACCCAGTAGAGACCGACGTGGCGCAGTTTAAT
CTCTCCACGGACGGAACGGTGTCTGTTATCGTTAATGGTGAGGAAGT
AAAGAATGAATATCTG

YPDPVIAVMTGGSSALVKVRSDVANLPQISKVVFDSTDFRCSVACGAKV
YCDILAGNSGLRLVDTLTNTLTDEVVDFQPVVIFPKGSPIPCSYTHRYTVG
GGDVVYGIFEGENNRAFLNEPTFRGVSKRRGDPVETDVAQFNLSTDGTV
SVIVNGEEVKNEYL

> GLRaV-3 izolat İ-23 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

CTACCAGACCCGGTTATTGCTGTTATGACTGGGGGGTCAAGTGCTCTA
GTTAAGGTCAGGAGTGATGTGGCTAATTTGCCGCAGATATCTAAGGT
CGTGTTTCGACAGTACCGATTTTAGATGTTTCGGTGGCTTGTGGGGCTAA
GGTTTACTGCGATATTTTGGCAGGTAATAGCGGACTGAGACTGGTGG
ACACTTTAACGAATACGCTAACGGACGAGGTAGTGGATTTTCAGCCG
GTGGTAATTTTCCCGAAAGGTAGTCCAATACCCTGTTCATATACTCAT
AGATACACAGTGGGTGGCGGAGATGTGGTATACGGTATATTTGAAGG
GGAGAATAACAGAGCTTTTCTAAATGAACCGACGTTCCGGGGCGTAT
CGAAACGTAGGGGAGACCCAGTAGAGACCGACGTGGCGCAGTTTAAT
CTCTCCACGGACGGAACGGTGTCTGTTATCGTTAATGGTGAGGAAGT
AAAGAATGAATATCTG

LPDPVIAVMTGGSSALVKVRSDVANLPQISKVVFDSTDFRCSVACGAKV
YCDILAGNSGLRLVDTLTNTLTDEVVDFQPVVIFPKGSPIPCSYTHRYTVG
GGDVVYGIFEGENNRAFLNEPTFRGVSKRRGDPVETDVAQFNLSTDGTV
SVIVNGEEVKNEYL

> GLRaV-3 izolat U-6 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

TACCCAGACCCGGTTATTGCTGTTATGACTGGGGGGTCAAGTGCTCTA
GTTAAGGTCAGGAGTGATGTGGCTAATTTGCCGCAGATATCTAAGGT
CGTGTTTCGACAGTACCGATTTTAGATGTTTCGGTGGCTTGTGGGGCTAA
GGTTTACTGCGATATTTTGGCAGGTAATAGCGGACTGAGACTGGTGG
ACACTTTAACGAATACGCTAACGGACGAGGTAGTGGATTTTCAGCCG
GTGGTAATTTTCCCGAAAGGTAGTCCAATACCCTGTTCATATACTCAT
AGATACACAGTGGGTGGTGGAGATGTGGTATACGGTATATTTGAAGG
GGAGAATAACAGAGCTTTTCTAAATGAACCGACGTTCCGGGGCGTAT
CGAAACGTAGGGGAGACCCAGTAGAGACCGACGTGGCGCAGTTTAAT
CTCTCCACGGACGGAACGGTGTCTGTTATCGTTAATGGTGAGGAAGT
AAAGAATGAATATCTG

YPDPVIAVMTGGSSALVKVRSDVANLPQISKVVFDSTDFRCSVACGAKV
YCDILAGNSGLRLVDTLTNTLTDEVVDFQPVVIFPKGSPICSYTHRYTVG
GGDVVYGIFEGENNRAFLNEPTFRGVSKRRGDPVETDVAQFNLSTDGTV
SVIVNGEEVKNEYL

> GLRaV-4 izolat C-31 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

TTCTCCACCTTGTGCTTTTCGGCGGGGCGGGGAATTGACGGTTGTGTT
CCAGAAAGTGATACCATATACATAACCAACTGTCGTAGGTATAAGGAA
TGATGGAACATATACCATTTGGGCTTGGTGCTCTACTAGAGAAGGATG
TGCTGGTCTACAGAGATATAAAGAGGTATTTTCGGTATGAACAAGTTC
AATGCTAATACCTACATGATGAAGCTTAGACCTAAATTTGAGGTCTTG
GTCAAAGACTGGTCAGTGAGTATAGGACCGGTTTCCGGGGAGAAAGG
TAAACAAGGAGTGTAATTGCACTCGCTTGTATGA

FSTLCFSAGRGIDGCVPESDTIYIPTVVGIRNDGTYTIGLGALLEKDVLVY
RDIKRYFGMNKFNANTYMMKLRPKFEVLVKDWSVSIGPVSGEKGKTRS
VIALACM

> GLRaV-4 izolat R-73 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

TTCTCCACCTTGTGCTTTTCGGCGGGGCGGGGAGTTGACGGTTGTGTT
CCAGAGAGTGATACCATATACATAACCGACCGTTGTGGGTATAAGGAA
TGATGGAACATATACCATTTGGACTTGGTGCTCTACTAGAGAAGGATG
TACTGGTTTACAGGGACATAAAGAGGTATTTTCGGTATGAACAAGTTC
AATGCTAGTACCTACATGATGAAGCTTAGACCTAAATTTGAGGTCTTG
GTCAAAGACTGGTCAGTGAGTATAGGACCGGTTTCCGGAGAGAAAGG
TAAACAAGGAGTGTAATTGCACTCGCTTGTATGA

FSTLCFSAGRGVDGCVPESDTIYIPTVVGIRNDGTYTIGLGALLEKDVLVY
RDIKRYFGMNKFNASTYMMKLRPKFEVLVKDWSVSIGPVSGEKGKTRS
VIALACM

> GLRaV-4 izolat İ-1 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

TTCTCCAACCTGTGCTTTTCGGCGGGGAGGGGAGTTGACGGTTGTGTT
CCGGAGAGTGATACCATATACATAACCAACCGTTGTAGGTATAAGGAA
TGATGGAACGTATACCATTTGGGCTTGGTGCTCTACTAGAGAAGGACG

TGCTAGTTTACAGAGATATAAAAAGGTATTTCCGGTATGAACAAGTTC
AATGCTAATACCTACATGATGAAGCTTAGACCTAAATTTGAGGTCTTG
GTCAAAGACTGGTCGGTGAGTATAGGACCGGTTTCTGGAGAGAAAGG
TAAACAAGGAGTGTAATTGCACTCGCTTGTATGA

FSNLCFSAGRGVDGCVPESDTIYIPTVVGIRNDGTYTIGLGALLEKDVLVY
RDIKRYFGMNKFNANTYMMKLKPKFEVLVKDWSVSIGPVSGEKGKTRS
VIALACM

> GLRaV-5 izolat P-4 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

ACACTCTGCTTTTCTGCTGGCAGAGGCGTAGATGGTTGTGTTCTGAG
AGCGACACCGTGTATATACCAACAGTCGTTGGTATACGAAAAGACGG
AACATACACAATAGGTTTGGGGGCTTTGCTAGAAAAGGATGTACTCG
TTTATCGAGACATAAAAAGATATTTTGGTATGAACAAGTTCAATGCCG
AAGTATACAGGAAAAAGCTAAAACCTAAATTTGAGGTCATAGTGAAG
AACTGGTCGGCTTACATTGGTCCGTCTTCTGGA

TLCFSAGRGVDGCVPESDTVYIPTVVGIRKDGTYTIGLGALLEKDVLVYR
DIKRYFGMNKFNAEVYRKKLKPKFEVIVKNWSAYIGPSSG

> GLRaV-Pr izolat C-31 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

CTTGTGTACAGGGATATAAAACGATACTTCGGGATGAATAAATTCAA
TGCTGATTCTTACTTGAAGAAGCTCAAGCCGAACTTTGAAGTAATCGT
AAAGACGTGGTCAGCTTACATCGGGCCTGTGTCTGGTGAGAGGGGAA
AGACGCGTAGTGTTATTGCCCTGGCTTGCATGTTTGTGTCCGCGTTGG
CTCGGATGGCCGTGCAAATTACAGGAACGCAAGTGTCTCTTTCCGTTT
GCTC

LVYRDIKRYFGMNKFNADSYLKKLKPNEVIVKTWSAYIGPVSGERGKT
RSVIALACMFVSALARMAVQITGTQVSLSVCS

> GLRaV-Pr izolat D-12 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

CTTGTGTACAGGGATATAAAACGATACTTCGGGATGAATAAATTCAA
TGCTGATTCTTACATGAAGAAGCTCAAGCCGAATTTTGAAGTAGTCGT
GAAGACTTGGTCAGCTTACATCGGACCTGTATCTGGTGAGAGAGGGA
AGACGCGTAGTGTTATCGCCTTAGCTTGTATGTTTGTGTCCGCGTTGG
TTCGGATGGCCGTGCAAATTACAGGGACGCAAGTGTCTCTTTCCGTTT
GCTC

LVYRDIKRYFGMNKFNADSYMKKLKPNFEV VVKTWSAYIGPVSG
ERGKTRSVIALACMFVSALVRMAVQITGTQVSLSVCS

> GLRaV-Pr izolat O-8 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

CTTGTGTACAGGGATATAAAACGCTACTTCGGGATGAATAAGTTTAAT
GCTGATTCTTACTTGAAGAAGCTCAAGCCGAATTTTGAAGTAGTCGTG
AAGACTTGGTCAGCTTACATCGGGCCTGTATCTGGTGAGAGAGGGAA
GACGCGTAGTGTTATTGCCTTAGCTTGCATGTTTCGTATCCGCGTTGGT
TCGGATGGCCGTGCAAATTACAGGAACGCAAGTGTCTCTTTCCGTTTG
CTC

LVYRDIKRYFGMNKFNADSYLKKLKPNFEV VVKTWSAYIGPVSG
ERGKTRSVIALACMFVSALVRMAVQITGTQVSLSVCS

> GLRaV-Pr izolat R-23 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

CTTGTGTACAGGGATATAAAACGCTACTTCGGGATGAATAAATTCAG
TGCTGATTCTTACTTGAAGAAGCTCAAGCCGAAC TTTGAAGTAATCGT
AAAGACGTGGTCAGCTTACATCGGGCCTGTGTCTGGTGAGAGGGGAA
AGACGCGTAGTGTTATTGCCCTGGCTTGCATGTTTGTGTCCGCGTTGG
CTCGGATGGCCGTGCAAATTACAGGAACGCAAGTGTCTCTTTCCGTTT
GCTC

LVYRDIKRYFGMNKFSADSYLKKLKPNFEVIVKTWSAYIGPVSG
ERGKTRSVIALACMFVSALARMAVQITGTQVSLSVCS

> GLRaV-Pr izolat İ-37 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

CTTGTGTACAGGGATATAAAACGCTACTTCGGGATGAATAAGTTCAA
TGCTGATTCTTACTTGAATAAGCTCAAGCCGAAGTTCGAAGTAGTCGT
GAAGACTTGGTCGGCTTACATCGGACCTGTATCTGGTGAGAGAGGAA
AGACGCGTAGTGTTATTGCCTTGGCTTGCATGTTTGTGTCCGCGTTGG
TTCGGATGGCCGTGCAAATTACAGGAACGCAAGTGTCTCTTTCCGTTT
GCTC

LVYRDIKRYFGMNKFNADSYLNKLKPNFEVVVKTWSAYIGPVSG
ERKTRSVIALACMFVSALVRMAVQITGTQVSLSVCS

> GLRaV-De izolat B-21 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

GCTGGGAGAGGCGTTGAAGGTTGCGTTCCTGAGAGTGACACAATCTA
CATACCAACTGTGGTTGGTATCAGAAGGGATGGGACATACACGATAG
GTCTGGGAGCGTTGCTGGAACCGGACGTGATGGTATACCGAGATATC
AAGAGGTATTTTGGTATGAACAAATTTAACGCTGAGAGCTACAGAAG
CAAGCTGAAACCTAAGTTTGAAGTGATAGTTAAAAATTGGTCGGCTT
ACATCGGACCAACCTCTGGGGAAAAAGGGAAGGCTAGGAGCGTCAT
AGCTCTGACCTGTATGTTCTGTATCAGCTTTAGCAAAAATGGCATCTTC
TATGACTGGGAGTGCCGTCCTCTGTCTGTTTGTCTGTGC

AGRGVEGCVPESDTIYIPTVVGIRRDGTYTIGLGALLEPDVMVYRDIKRY
FGMNKFNAESYRSKLKPKFEVIVKNWSAYIGPTSGEKGKARSVIALTCM
FVSALAKMASSMTGSAVTLVSVCSV

> GLRaV-De izolat D-24 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

GCTGGGAGAGGCGTTGAAGGTTGCGTTCCTGAGAGTGACACAATCTA
CATACCAACTGTGGTTGGTATCAGAAAGGATGGGACATACACGATAG
GTCTGGGAGCGTTGCTGGAACCGGACGTGATGGTATACCGAGATATC
AAGAGGTATTTTGGTATGAACAAATTTAACGCTGAGAGCTACAGAAG
CAAGCTGAAACCTAAGTTTGAAGTGATAGTTAAAAATTGGTCGGCTT
ACATCGGACCAACCTCTGGAGAAAAAGGGAAGGCTAGGAGTGTCATA

GCTCTGACCTGTATGTTTCGTATCGGCTTTAGCAAAAATGGCAGTTTCT
ATGACTGGGAGTGCCGTCCTCTGTCTGTTTGTCTGTGC

AGRGVEGCVPESDTIYIPTVVGIRKDGTYTIGLGALLEPDVMVYRDIKRY
FGMNKFNAESYRSKLKPKFEVIVKNWSAYIGPTSGEKKGKARSIALTCMF
VSALAKMAVSMTGSAVTLSVCSV

> GLRaV-De izolat R-75 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

GCTGGGAGAGGCGTTGAAGGTTGCGTTCCTGAGAGTGACACAATCTA
CATACCAACTGTGGTTGGTATCAGAAAGGATGGGACATACACGATAG
GTCTGGGAGCGTTGCTGGAACCGGACGTGATGGTATACCGAGATATC
AAGAGGTATTTTGGTATGAACAAATTTAACGCTGAGAGCTACAGAAG
CAAGCTGAAACCTAAGTTTGAAGTGATAGTTAAAAATTGGTCGGCTT
ACATCGGACCAACCTCTGGGGAAAAAGGGAAGGCTAGGAGTGTCATA
GCTCTGACCTGTATGTTTCGTATCAGCTTTAGCAAAAATGGCAGTTTCT
ATGACTGGGAGTGCCGTCCTCTGTCTGTTTGTCTGTGC

AGRGVEGCVPESDTIYIPTVVGIRKDGTYTIGLGALLEPDVMVYRDIKRY
FGMNKFNAESYRSKLKPKFEVIVKNWSAYIGPTSGEKKGKARSIALTCMF
VSALAKMAVSMTGSAVTLSVCSV

> GLRaV-De izolat U-5 HSP70h genine ait kısmi sekans verisi ve amino asit dizisi

GCTGGGAGAGGCGTTGAAGGTTGCGTTCCTGAGAGTGATAACAATCTA
CATACCGACTGTGGTTGGTATCAGAAAAGATGGAACATACACGATAG
GTCTGGGAGCCTTGTTGGAACCGGACGTGATGGTATACCGGGATATC
AAGAGGTATTTTGGTATGAACAAATTCATGCTGAGAGTTACAGGAA
CAAGCTGAAACCTAAGTTCGAAGTGATAGTGAAAAATTGGTCGGCTT
ACATTGGACCGACCTCTGGGGAGAAAGGCAAGGCTAGGAGTGTCATA
GCTCTGACCTGTATGTTTCGTATCAGCTTTGGCAAAAATGGCTGTTTCT
ATGACTGGGAGCGCCGTCCTCTGTCTGTTTGTCTGTGC

AGRGVEGCVPESDTIYIPTVVGIRKDGTYTIGLGALLEPDVMVYRDIKRY
FGMNKFNAESYRNKLKPKFEVIVKNWSAYIGPTSGEKKGKARSVIALTCM
FVSALAKMAVSMTGSAVTLSVC

