



T.C.

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞU AKDENİZ VE GÜNEYDOĞU ANADOLU
BÖLGESİ BAĞLARINDA OTOKTON ASMA
VARYETELERİNDE YENİ BİR VİROİD TÜRÜ:**

Australian grapevine viroid

DÖNE KILIÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİ KORUMA BÖLÜMÜ ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2017

T.C.
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

**DOĞU AKDENİZ VE GÜNEYDOĞU ANADOLU
BÖLGESİ BAĞLARINDA OTOKTON ASMA
VARYETELERİNDE YENİ BİR VİROİD TÜRÜ:**

Australian grapevine viroid

DÖNE KILIÇ

**Bu tez,
Bitki Koruma Bölümü Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS
Derecesi için hazırlanmıştır**

KAHRAMANMARAŞ 2017

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Döne KILIÇ tarafından hazırlanan “**DOĞU AKDENİZ VE GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGESİ BAĞLARINDA OTOKTON ASMA VARYETELERİNDE YENİ BİR VİROİD TÜRÜ: *Australian grapevine viroid***” adlı bu tez, jürimiz tarafından 01/04/2017 tarihinde oy birliği/oy çokluğu ile Bitki Koruma Bölümü Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Nihal BUZKAN (DANIŞMAN)

Bitki Koruma

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Yrd.Doç.Dr. Mustafa KÜSEK (ÜYE)

Bitki Koruma

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Yrd.Doç.Dr. Bülent ARPACI (ÜYE)

Bitki Koruma

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Mustafa ŞEKKELİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

DÖNE KILIÇ



Bu çalışma KSÜ BAP tarafından desteklenmiştir.

Proje NO: 2016/3-33YLS

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

**DOĞU AKDENİZ VE GÜNEYDOĞU ANADOLU BÖLGESİ BAĞLARINDA
OTOKTON ASMA VARYETELERİNDE YENİ BİR VİROİD TÜRÜ:**

Australian grapevine viroid

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DÖNE KILIÇ

ÖZET

Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde yerli asma varyeteleriyle kurulmuş yaşlı bağlardan, temmuz ayında yeşil yapraklı sürgün ve geç ağustos-eylül aylarında bir yaşlı odun çelikleri toplanmıştır. Örnekleme çalışması virüs ve virüs-benzeri hastalık belirtisi taşıyan ve sağlıklı görünüşlü asmalardan tesadüfi olarak yapılmıştır. Odun çelikleri (20-30 cm, 3-4 göz) sera ortamında köklendirilmiştir. Toplam 200 adet örnekten toplam nükleik asit izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır. Hazırlanan cDNA'lar Avustralya asma viroid (*Australian grapevine viroid*, AGVd) için hazırlanmış primer dizinleriyle PCR ile testlenmiştir. Testlenen örneklerin 7 tanesinde 369 bp büyüklüğünde AGVd DNA bantları elde edilmiştir. Beş örnekten alınan PCR DNA'ların doğrudan dizilemesi iki yönlü olarak yaptırılmış ve MEGA 6.0 yazılımıyla yapılarak gen bankasında kayıtlı yüksek benzerlik gösteren viroid nükleotid dizileriyle karşılaştırılmıştır. Türk AGVd izolatları Gen Bankasına kaydedilmiştir (Gen bankası erişim no: KY114492 - KY114496). Neighbor-joining (NJ) yöntemiyle hazırlanmış filogenetik ağaç üzerinde Türk (TR) AGVd izolatları birbirlerine yakın pozisyonda, aynı grupta yer alırken, TR179 ve TR189 izolatları farklılık göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Asma, viroid, *Apscaviroid*, AGVd

Kahramanmaraş Sütcü İmam Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı, **01/2017**

Danışman: Prof. Dr. Nihal BUZKAN

Sayfa sayısı: 26

**A NEW VIROID SPECIES IN AUTOCHTHONOUS GRAPEVINE VARIETIES IN
THE VINEYARDS OF EASTERN MEDITERRANEAN AND SOUTHEAST
ANATOLIA REGIONS: *Australian grapevine viroid***

(M.Sc. THESIS)

DÖNE KILIÇ

SUMMARY

Green shoots in July and one-year old dormant cuttings in late August-September were collected from old vineyards with autochthonous grapevine cultivars in the Eastern Mediterranean and Southeast Anatolia regions. Sampling was randomly made from healthy- and diseased-looking plants. Woody cuttings (20-30 cm in length, 3-4 buds) were rooted in greenhouse conditions. Nucleic acid isolation was done from a total of 200 plant samples followed by cDNA synthesis. Prepared cDNA's were subjected to PCR analysis with primer sets specific to *Australian grapevine viroid* (AGVd). Of the seven samples, DNA bands at 369 bp in size were obtained. PCR DNA's from five samples were sequenced in two directions and BLAST analysis was performed in MEGA 6.0 software to retrieve the homologous nucleotides in GenBank. Nucleotide sequences of five samples were registered in GenBank (GenBank acc.no: KY114492 - 114496). Phylogenetic tree prepared by Neighbor-joining (NJ) method showed that Turkish (TR) AGVd isolates were grouped in one cluster except TR179 and TR189 with minor changes in their nucleotides.

Keywords: Grapevine, viroid, *Apscaviroid*, AGVd

University of Kahramanmaraş Sutcu Imam

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Plant Protection, **01/2017**

Supervisor: Prof. Dr. Nihal BUZKAN

Page Numbers: 26

TEŐEKKÜR

Tezimin bütn oluŐum aŐamalarında benden hiçbir yardımı esirgemeyen, değerli vaktini bana ayıran, derin bilgi birikiminden ve yüksek tecrübelerinden yararlandığım saygıdeğer tez danıŐmanım Sayın Prof. Dr. Nihal BUZKAN'a sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aŐamasında benimle birlikte emek harcayan ve yardımlarını hiçbir Őekilde esirgemeyen sevgili ArŐ.Gör. Selin Ceren BALSAK'a, yüksek lisans ğrencileri AyŐe Gül (TEKİK) YILDIZ, Merve YAKAR, Mustafa Kemal ZTIRAK'a çok teŐekkür ederim.

Tüm ęrenim hayatım boyunca maddi ve manevi tüm desteklerini bana sunan, her Őekilde beni gözeten çok sevgili ablama teŐekkürü borç bilirim.

Dne KILIÇ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	i
SUMMARY	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
1.GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
3. MATERYAL VE METOT	11
3.1. Materyal	11
3.2. Metod	11
3.2.1. Saha çalışması.....	11
3.2.2. Bitki örneklerinden toplam nükleik asit (TNA) izolasyonu	12
3.2.3 İki Aşamalı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction, RT-PCR).....	13
3.2.4. PCR DNA 'larının nükleotid dizinlerinin çıkartılması	13
4. BULGULAR	14
4.1. Simptom Gözlenmesi ve Bitkisel Örneklemesi	14
4.2. AGVd cDNA'larının PCR Analizi	16
4.3. AGVd'in Filogenetik Analizi	19
5. TARTIŞMA.....	21
6. KAYNAKLAR.....	23

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

- Şekil 4. 1. Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde bağlarda örneklemelerin yapıldığı iller 14
- Şekil 4.2. Saha çalışmasında otokton asma varyetelerinde gözlenen virüs-benzeri simptomlar: A) Yapraklarda klorotik beneklenme, B) yapraklarda damar klorozu, C) sürgünlerde kalınlaşma, D) yapraklarda mozaik, E) salkımda homojen olmayan olgunlaşma, F) asma üzerinde küsküt (*Cuscuta* sp.) 16
- Şekil 4.3. Asma TNA'larından hazırlanan cDNA'lar ile hazırlanmış ve AGVd için PCR ile çoğaltılan DNA'ların elektroforetik analizi. S: DNA standartı "100 bç DNA standartı" (Fermentas) kullanılmıştır 17
- Şekil 4.4. TR AGVd izolatlarının neighbor-joining (NJ) metoduna göre gen bankasından kayıtlı, yüksek nükleotidi dizin benzerliği gösteren izolatlarla hazırlanmış filogenetik ağacı. Ağaç topolojisi kuvveti, 1,000 bootstrap olarak alınmıştır ... 20

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 1.1. Asmayı enfekteleyen virüsler, taksonomik yerleri ve tür sayıları	2
Çizelge 2.1. Viroid taksomisi	6
Çizelge 4.1. Saha çalışmasının yapıldığı alanlar ve yerli asma çeşitlerinde AGVd'in bulunma durumu	18



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AGVd	<i>Australian grapevine viroid</i>
bç	Baz çifti
cDNA	complementary DNA (Tamamlayıcı DNA)
DNA	Deoxyribonucleicacid
dNTP	Deoxynucleotidetriphosphate
EDTA	Etilene diamine tetra acetic acid
EtOH	Etil Alkol
GYSVd	<i>Grapevine yellow speckle viroid</i>
HSVd	<i>Hop stunt viroid</i>
Ha	Hektar
Kb	Kilobaz
MgCl₂	Magnezyum klorür
Mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
NaI	Sodyum Iyodür
nt	Nükleotid
Nm	Nanometre
PCR	Polimeraz Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RT	Reverse transcription (Tersine Transkripsiyon)
RNA	Ribonucleicacid

rpm	Round per minute (Dakika-devir)
TAE	Tris acetate-EDTA
TNA	Toplam Nükleik asit
UV	Ultraviole



1.GİRİŞ

Asma (*Vitis* spp) ılıman iklim kuşağında yaygın olarak yetiştirilen ve ekonomik olarak önemli odunsu bitkidir. Bu kadar yaygın olarak yetişmesine karşılık, patojen saldırılarına en fazla maruz kalan konukçudur. *Vitis* ve *Muscadinia* cinslerini enfekteleyen 62 virüs, 5 viroid, 8 fitoplazma ve böcek taşıyan ksilem bakterisi rapor edilmiştir (Çizelge 1.1.). Bu bakımdan asma bitkisi en fazla hücre içi patojenle etkelenen tek bitki olarak kabul edilmektedir (Martelli, 2015).

Viroidler bilinen en küçük bitki patojenleridir ve ekonomik olarak önemli birçok bitki kültüründe tanılanmışlardır. Yapıları kapsidi olmayan, küçük, dairesel ve kovalent bağlarıyla kapanmış tek iplikli RNA (246-401 nükleotid uzunluğunda) moleküllerinden meydana gelmiştir (Flores ve ark., 2005; Ding, 2009). Viroidlerin replikasyonu tamamen konukçu faktörüne bağlı, kendiliğinden dairesel yuvarlanarak meydana gelmektedir. Bugüne kadar iki familya içerisine yerleştirilmiş 30'dan fazla viroid tanımlanmıştır: *Pospiviroidae* (merkez korunmuş bölgeye sahip) ve *Avsunviroidae* (merkez korunmuş bölgeye sahip değil) (Koltunow ve Rezaian, 1989a).

Birçok bitki türü viroidlerin doğal konukçusu olarak bilinmektedir. Bunların arasında asma en önemli viroid konukçularından biridir. Bu türde şimdiye kadar *Şerbetçiotu cüceleşme viroid* (*Hop stunt viroid*, HSVd) (Sano ve ark., 1986), *Asma sarı benek viroid-1 ve -2* (*Grapevine yellow speckle viroid*, GYSVd), *Avustralya asma viroid* (*Australian grapevine viroid*, AGVd) (Rezaian, 1990; Elleuch ve ark., 2002; Guo ve ark., 2007), *Turunçgil exocortis viroid* (*Citrus exocortis viroid*, CEVd) (Flores ve ark., 1985; Sano ve ark., 1986; Garcia-Arenal ve ark., 1987; Koltunow ve Rezaian, 1988; Rezaian ve ark., 1988). Yakın zamanda *Asma çekiçbaşı viroid-benzeri* (*Grapevine hammerhead viroid*, GHVd) olarak adlandırılmış dairesel bir RNA rapor edilmiş olmasına karşın, RNA'nın asma çeliklerinde enfeksiyöz etkisinin olmadığı anlaşılmıştır (Wu ve ark., 2012). HSVd, GYSVd-1 asmanın yetiştirildiği her yerde yaygın bulunurken, GYSVd-2, AGVd ve CEVd daha az sıklıkta yaygındır (Little ve Rezaian, 2003).

AGVd, asma viroidleri içerisinde en az araştırılmış olmasına karşın, yakın zamanda Avustralya (Rezaian ve ark., 1990), Tunus (Elleuch ve ark., 2002, 2003), ABD (Al Rwahnih ve ark., 2009), Çin (Jiang ve ark., 2009), İran (Zaki-Aghl ve Izadpanah, 2009), İtalya (Gambino ve ark., 2014), Hindistan (Adkar-Purushothama ve ark., 2014)'da tanımlanmıştır.

Çizelge 1. 2. Asmayı enfekteleyen virüsler, taksonomik yerleri ve tür sayıları (Martelli, 2015)

FAMİLYA	CİNS	TÜR SAYISI
(+)ssRNA bulunduran, izometrik partiküllü virüsler		
<i>SECOVIRIDAE</i>	<i>Fabavirus</i>	1
	<i>Nepovirus</i>	16
<i>BROMOVIRIDAE</i>	<i>Alphavirus</i>	1
	<i>Cucumovirus</i>	1
	<i>Ilarvirus</i>	2
<i>TOMBUSVIRIDAE</i>	<i>Carmovirus</i>	1
	<i>Necrovirus</i>	1
	<i>Tombusvirus</i>	2
<i>TYMOVIRIDAE</i>	<i>Marafivirus</i>	4
	<i>Maculavirus</i>	2
<i>AMALGAVIRIDAE</i>	<i>Amalgavirus</i>	1
Familyaya yerleştirilememiş virüsler	<i>Idaeivirus</i>	1
	<i>Sobemovirus</i>	1
dsRNA bulunduran, izometrik partiküllü virüsler		
<i>REOVIRIDAE</i>	<i>Oryzavirus</i>	1
<i>ENDORNAVIRIDAE</i>	<i>Endornavirus</i>	2
<i>PARTITIVIRIDAE</i>	<i>Alphacryptovirus</i>	2
(+)ssRNA bulunduran, iplikli partiküllü virüsler		
<i>CLOSTEROVIRIDAE</i>	<i>Closterovirus</i>	1
	<i>Ampelovirus</i>	3 (GLRaV-4'ün 5 streyni)
	<i>Velarivirus</i>	1
<i>ALPHAFLEXIVIRIDAE</i>	<i>Potexvirus</i>	1
<i>BETAFLEXIVIRIDAE</i>	<i>Foveavirus</i>	1
	<i>Trichovirus</i>	2
	<i>Vitivirus</i>	5
<i>POTYVIRIDAE</i>	<i>Potyvirus</i>	1
DNA bulunduran virüsler		
<i>CAULIMOVIRIDAE</i>	<i>Badnavirus</i>	2
<i>GEMINIVIRIDAE</i>	Kesinleşmemiş	1
Taksonomik olarak kesinleşmemiş virüsler		4

Asmada enfeksiyon yapan patojenler içerisinde, konukçularında belirgin simptom vermedikleri nedeniyle çok az bilgi bulunmaktadır. Türkiye’de bağ alanlarında viroidler konusunda yapılan tek güncel araştırma Gazel ve Önelge (2003)’nin yapmış olduğu çalışmadır. Araştırmacılar GYSVd-1, -2, HSVd ve CEVd-g’yi Güneydoğu Anadolu ve Akdeniz Bölgeleri’nde rapor etmiştir. Gökçek (2007) ise Gaziantep illindeki bağlarda GYSVd-1 ve -2’yi sPAGE ile tanılamış, ancak veriler yayınlanmamıştır. AGVd üzerine bir çalışmaya yer verilmemiştir ve izolatların çeşitliliği hakkında bilgi bulunmamaktadır. Bu araştırma Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri’nde yerli asma varyetelerinde AGVd’nin yaygınlıklarının ve populasyon çeşitliliğinin incelenmesi amacıyla yapılmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Viroidler küçük, dairesel tek iplikli enfektif RNA moleküllerden meydana gelmiş bilinen en küçük bitki patojenidir (Diener, 2001; Flores ve ark., 2000). Genom büyüklükleri Avokado güneş yanıklık viroidi (*Avocado sunblotch viroid*, ASBVd)'de 246 nükleoid (nt) olurken Krizantem klorotik beneklenme viroid (*Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*, ChCMVd) 'de 399 nt kadardır (Navarro ve Flores, 1997). Viroidlerin büyük bir kısmı *Pospiriviridae* familyasında toplanmıştır. Bunlar beş yapısal bölgeye sahiptir (Keese ve Symnos, 1985): iki terminal bölge, sağ (terminal right, TR) ve sol (terminal left, TL), bir patojenik (pathogenic, P), bir değişken (variable, V) ve bir korunmuş merkez bölgesiyle (central conserved region, CCR) birlikte bir merkez (central, C). Çekiçbaşı şeklinde kendiliğinden oluşmuş bağlantı bulunduran CCR bölgesine sahip olmayan diğer viroidler ise *Avsunviridae* familyasında toplanmıştır (Flores ve ark., 2000) (Çizelge 2.1.).

Sanger ve ark., (1976), hastalık etmeni olarak viroidlerin protein kılıfı olmayan, düşük moleküler ağırlığa sahip, halka formunda, tek zinciri, kapalı kovalent bağları olan ve kendi kendine replike olabilen RNA'ların oluşturduğu bir patojen grubu olduğunu bildirmiştir. Viroidlerin çoğaltma materyali ile taşınmakta ve ısıya son derece dayanıklı (min. 20 °C ve 35°C de artış kapasitesi) oldukları belirtilmektedir (Keese ve Symons, 1985). Mc Innes ve Symons, (1991) serolojik yöntemlerin viroidlerin protein kılıf bulundurmaması nedeniyle uygulanamadığını ve nükleik asit hibridizasyon yönteminin spesifik olması ve yüksek hassasiyete sahip olması nedeniyle uygulandığını bildirmiştir.

Viroidlerin tanılanmasında kullanılan en eski temel yöntem, indikatör bitkilerin kullanımı olup, etmenin patojen olup olmadığının doğrulanmasında, taşınma şekli ve konukçu çevresinin belirlenmesinde mutlaka kullanılması gerekli olan bir yöntemdir. Ancak tek başına yeterli olmadığı için kesin tanı için diğer yöntemler ile desteklenmelidir. Habili ve ark., (1992)'na göre son yıllara kadar viroid tanılamasının biyolojik indeksleme yöntemiyle yapılmaktaydı. Ancak enfekteli konukçuda viroid konsantrasyonundaki değişiklik nedeniyle daha hassas yöntemler kullanılması da gerekmektedir (Morton ve ark., 1993; Gafny ve ark.,1995).

Rezaian ve ark., (1992) ve Staub ve ark., (1995), PCR yönteminin viroid nükleik asit kalıplarının çoğaltılması nedeniyle sıklıkla kullanılmakta olduğunu, hassasiyetinin çeşitli modifikasyonlarla arttırıldığını bildirmişler ve sonuç olarak asma viroidleri için birkaç PCR çalışması yayınlamışlardır.

Poliakrilamid jel elektroforez (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) viroidlerin tanılanmasında uygulanması gereken temel bir teknik olup, yaygın olarak sertifikasyon programlarında, viroid ırklarının ayırımında diğer tekniklerle kombine olarak kullanılmaktadır (Singh ve ark., 1991). PCR tekniğinde primerlerin aynı cins içerisinde yer alan viroidlerin genomlarının belirlenmesi ile korunmuş bölgelerin seçilmesi, aynı cins içerisinde yer alan bütün viroidlerin tanısını sağlamaktadır. Değişken bölgelerin belirlenmesi için seçilecek primerlerin kullanılması ile de spesifik olarak bir viroid ya da viroidin farklı ırkları belirlenebilmektedir.

Asma (*Vitis vinifera* L.) beş viroid tarafından enfektelenmektedir: Şerbetçi otu cüceleşme viroid (*Hop stunt viroid*, HSVd), Turunçgil exocortis viroid (*Citrus exocortis viroid*, CEVd), Asma sarı benek viroid-1 (*Grapevine yellow speckle viroid-1*, GYSVd-1), Asma sarı benek viroid-2 (*Grapevine yellow speckle viroid-2*, GYSVd-2) ve Australian grapevine viroid (*Australian grapevine viroid*, AGVd) (Flores ve ark., 1985; Sano ve ark., 1985; Gracia-Arenal ve ark., 1987; Rezaian, 1990; Wan Chow Wah ve Symnos, 1997; Szychowski ve ark., 1998). Bu viroidler taksonomik olarak *Pospiviridae* familyasında üç cinsten sınıflanmıştır. GYSVd-1, GYSVd-2 ve AGVd *Apscaviroid* cinsinde bulunmaktadır. Bu cinsi *Apple scar skin viroid* (ASSVd) temsil etmektedir. HSVd, *Hostuviroid* cinsinde; CEVd ise *Pospiviroid* cinsinde yer alır. *Pospiviroid* cinsini temsil eden tür Patates iğ yumru viroid (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd) (Çizelge 2.1.) (Di Serio ve ark., 2014).

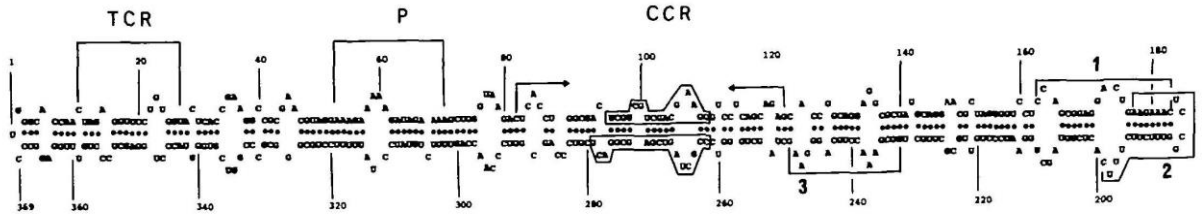
Viroidlerin konukçularını belirlemek amacıyla yapılan çalışmada bazı viroidlerin sınırlı veya spesifik konukçularını sahip olduğunu örnek olarak da GYSVd-1 ve 2, AGVd'in sadece *Vitaceae* familyasına özgü olduğunu belirtilmektedir (Flores ve ark., 2005).

Çizelge 2.2. Viroid taksomisi

<i>Avsunviroidae</i>	
<i>Avsunviroid</i>	<i>Avocado sunblotch viroid</i>
<i>Pelamoviroid</i>	<i>Chrysanthemum chlorotic mottle viroid, Peach latent mosaic viroid</i>
<i>Elaviroid</i>	<i>Eggplant latent viroid</i>
<i>Pospiviroidae</i>	
<i>Pospiviroid</i>	<i>Chrysanthemum stunt viroid, Citrus exocortis viroid, Columnea latent viroid, Iresine viroid 1, Mexican papita viroid , Pepper chat fruit viroid , Potato spindle tuber viroid, Tomato apical stunt viroid, Tomato chlorotic dwarf viroid, Tomato planta macho viroid</i>
<i>Hostuviroid</i>	<i>Hop stunt viroid</i>
<i>Cocadviroid</i>	<i>Citrus bark cracking viroid, Coconut cadang-cadang viroid, Coconut tinangaja viroid, Hop latent viroid</i>
<i>Apscaviroid</i>	<i>Apple dimple fruit viroid, Apple scar skin viroid, Australian grapevine viroid, Citrus bent leaf viroid, Citrus dwarfing viroid, Citrus viroid Va , Citrus viroid VIa , Grapevine yellow speckle viroid 1, Grapevine yellow speckle viroid 2, Pear blister canker viroid</i>
<i>Coleviroid</i>	<i>Coleus blumei viroid 1, Coleus blumei viroid 2, Coleus blumei viroid 3</i>

AGVd ilk kez Avustralya'da Rezaian ve ark., (1988) tarafından GYSVd, HSVd ve CEVd enfeksiyonlarıyla karışık veya tek enfeksiyonlar şeklinde sadece asmalardan izole edilmiştir. Viroidin tüm genomu bölgelere ayrılmış olup, bazı segmentleri PSTVd, ASSVd, CEVd ve GYSVd'in nükleotid dizilişleriyle yüksek dizin benzerliği göstermiştir. Bu durum AGVd'in diğer viroidlerin RNA rekombinasyonu sonucunda ortaya çıkmış olduğunu sonucunu çıkarmaktadır. Bu durumda, çok sayıda patojen enfeksiyonu taşıyan asmanın uzun yıllardır vejetatif yollarla çoğaltılıyor olmasının etkisi büyüktür (Rezaian, 1990). AGVd 396 nt içeren tek iplikli, dairesel RNA molekül yapıdadır (Şekil 2.1).

Diğer viroidlerde olduğu gibi, RNA yapısı protein kodlamaz. AGVd'nin merkez bölgesi (C) ASSVd viroid grubunda olduğu gibi korunmuş bölgesi içermektedir (CCR). Terminal korunmuş bölge (terminal conserved region, TCR), viroid replikasyonu ve patojen etkisinden sorumludur. AGVd, karışık viroid enfeksiyonu taşıyan asmalardan izole edilmiş olmasına karşın hıyar (Rezaian ve ark., 1988), domates ve viroid taşımayan asma fidanlarından izole edilmiştir (yayınlanmamış veri, Rezaian, 1990). Ancak asmada AGVd'in etiyolojisi hala bilinmemektedir (Rezaian ve ark., 1988).



Şekil 2.1. Australian grapevine viroid (AGVd)'in dairesel molekül yapısı

Elleuch ve ark., (2003a) Akdeniz havzasında asmada AGVd'ni ilk kez Tunus'ta rapor etmiştir. AGVd, PCR yöntemi kullanılarak enfekteli asmalarda, Carignan ve Syrah çeşitlerinde tanılanmıştır. AGVd'nin Afrika kıtasında tanılanmasıyla, viroidin aslında geniş bir coğrafya'da yaygın olabileceği sonucunu çıkarmaktadır. AGVd'nin carignan ve Syrah çeşitlerindeki izolatlarının genetik çeşitliliği restriksiyon analizleriyle ve cDNA'nın dizilenmesiyle yapılmıştır.

Elleuch ve ark., (2003b) enfekteli asmalardan CEVd, GYSVd-1 ve AGVd'in güvenilir tanısının yapılması için farklı RNA izolasyon yöntemlerini karşılaştırmıştır. Fenol-temelli, ticari kit (TRIZOL) ve yüksek tuz iyonları içeren üç farklı RNA izolasyon yöntemleri ve ayrıca bunların, iyonik olmayan selüloz içeren kısmi saflaştırma metoduyla kombine edilmiştir. Kombinasyon halinde kullanılan yöntemler en iyi sonucu vermiş ve izole edilen PCR analizlerinde turuncgilllerde ve asmada viroidlerin tanınması başarıyla yapılmıştır. geliştirilen metodun özellikle sertifikasyon programlarında, virüs-taşımayan çoğaltma materyalleri çoğaltılmasında etkili olacağı belirtilmiştir.

İran'da asmalarda AGVd'nin enfeksiyonu Zaki-Aghl ve Izadpanah (2004, 2005, 2006) tarafından, farklı lokasyonlarda tanınmıştır. Zaki-Aghl ve ark., (2013) daha sonraları AGVd izolatlarının biyolojik karakterizasyonunu yapmışlar ve etmeni deneysel konukçularına mekanik olarak taşımışlardır. Denemelerde AGVd konukçularda bodurluk, yapraklarda deformasyon, beneklenme ve damar açılması semptomları vermiştir. Mekanik inokülasyon ile çoğaltılan AGVd, hıyar ve domates konukçularından toplam nükleik asit izolasyonu ve agro-filtrasyon ile saflaştırılmıştır. AGVd-Ir izolatının, patojeniteden sorumlu bölgesinde dizinlerinin değişikliğe uğradığı ve viroid replikasyonunun azaldığını göstermiştir.

Li ve ark., (2006) Çin'de Xinjiang Bölgesi'ndeki yaşlı asmalardan HSVd, GYSVd, CEVd ve *Apple fruit crinkle viroid* (AFCVd) enfeksiyonlarının tanınması için dot-blot veya dioxigenin-etiketli problemlerin kullanıldığı northern blot hibridizasyon sistemlerini kullanmıştır. AFCVd asmalarda daha önce hiç tanınmamışken, kullanılan prob AGVd ile %85'den fazla nükleotidi dizin benzerliği paylaşmıştır. AFCVd-şüphesi taşıyan viroidi aslında AGVd-benzeri bir viroid olabileceği yaklaşımıyla PCR (Polymerase chain reaction) yöntemiyle doğrulamaya çalışmışlardır. Ancak bilinmeyen bir sebeple çalışma başarısızlıkla sonuçlanmış olmakla birlikte, Çin'de AGVd-benzeri etmenin asmalarda enfeskiyonu ilk kez rapor edilmiştir.

Jiang ve ark., (2009) Çin'de AGVd'in Thompson Seedless, Jingchuan ve Zaoyu çeşitlerindeki izolatlarının genetik çeşitliliğini incelemiştir. Toplam 300 örnekte üç çeşitten elde edilen viroid izolatlarının yüzlerce bağımsız cDNA klonunun nükleotid dizilemesi yapılmıştır. Bunlardan 29 klonda iki baskın izolatın Thompson seedless, 48 klonda tek baskın varyantın Jingchuan ve Zaoyu çeşitlerinden elde edildiğini bildirmiştir.

Siliko-yakalama tekniğiyle sol terminal bölgede baz değişikliğinin her üç izolatta ikincil yapıda olduğunu rapor etmiştir. Bu değişiklikler ikincil yapıdaki değişimin düzeyini etkilemektedir.

Jiang ve ark., (2012)'nin AGVd ile birlikte asmada enfeksiyon yapan viroid türlerinin (GYSVd-1, GYSVd-2, HSVd, GYSVd-3-yeni önerilen tür) Japonya ve Çin'deki izolatların karakterizasyonu ve karşılaştırması konusunda yaptıkları araştırmada, Çin'de asmada bildirilen beş viroid türü ve öneri durumunda olan yeni tür GYSVd-3'ü tanıladıklarını bildirmişlerdir. Araştırmacılar Japonya'da HSVd, GYSVd-1 ve -2'nin tanısını yapmışlardır. Çin'de tanılanan asma viroid türleriyle, İran ve Avustralya'da tanılananların diğer ülkelerde rapor edilmiş olanlardan farklılık gösterdiklerini belirtmektedirler. Çin ve Japonya'da tanılanan türlerin populasyon yapıları, türlere bağlı olarak HSVd her iki ülkede de benzer özelliklere sahip bulunmuştur. Ancak GYSVd-1, -2 ve AGVd ise aynı ülke içerisinde tanılananlar arasında dahi farklılıklara sahip bulunmuştur.

Elleuch ve ark., (2013) tek iplik konformasyon (single-strand conformation polymorphism, SSCP) kullanarak turunçgil, asma, şeftali ve armut ağaçlarında enfeksiyon yapan AGVd, GYSVd-1, HSVd, Turunçgil cücelik viroid (*Citrus dwarfing viroid*, CDVd), Şeftali latent mozaik viroid (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd) ve *Pear blister canker viroid* (PBCVd) izolatlarının moleküler çeşitliliklerini incelemişlerdir. Viroid izolatların alınan klonlar SSCP analizi için farklı elektroforez koşullarında değerlendirilmiştir. HSVd, PLMVd ve AGVd içlerinde baskın bir haplotipin olmadığı heterojen bir desen vermiştir. SSCP yöntemi viroid izolatlarının moleküler çeşitliliğinin incelenmesinde tekrarlanabilir sonuç verdiği için güvenilir kabul edilmiştir. AGVd ve PBCVd için SSCP ilk kez bu çalışmada kullanılmıştır.

AGVd, asmada enfeksiyon yapan viroidler içerisinde en az çalışılanı olmasına karşın, asmanın yetiştirildiği birçok ülkede son yıllarda rapor edilmeye başlanmıştır. Gambino ve ark., (2014), Kuzey (Piemonte, Valle D'Aosta, Liguria, Trentino Alto Adige) ve Güney İtalya (Calabria, Campania)'da yaptıkları surveylerde 284 örnekte multiplex-PCR yöntemiyle asmada bilinen beş viroid için testlemeler yapmıştır. Testlemelerde HSVd ve GYSVd-1'in bağlarda çok yaygın olduğunu, GYSVd-2 ve AGVd'in ise sadece iki sofralık üzüm çeşidinde (Sultanina Bianca, Red Globe) tanılandığını bildirmiştir. Testleme çalışmaları genişletilmiş ve AGVd ve GYSVd-2'nin güney İtalya'da da yaygınlığını kesinleştirmişlerdir. AGVd varyantlarının filogenetik analizi, Tunus ve Avustralya'da

bildirilen varyantlarıyla yakın ilişkili olduklarını göstermiştir. İtalya'da bağlarda tanılanan AGVd, Avrupa'daki bağlarda ilk tanı niteliği taşımaktadır.

Geniş coğrafi dağılım içerisinde AGVd'nin asmalarda enfeksiyonu Hindistan'da da rapor edilmiştir (Adkar-Purushothama ve ark., 2014). Araştırmacılar AGVd'nin asmalarda %9.3 oranında yaygın olduğunu, bu oranın Tunus ve İran haricinde diğer yerlerde bildirilen orandan daha fazla olduğunu belirtmektedir. Hindistan'daki AGVd izolatlarının moleküler çeşitliliği çeşit ve lokasyon kriterlerine göre yapılmıştır. Elde edilen beş varyantın temel varyantlar olma özelliği taşıdığını, bunun dışındaki 44 varyantın ise "olası-tür (quasi-species)" olma özelliği taşıyor olduğunu rapor etmişlerdir. izolatların filogenetik analizinde Hint izolatları iki farklı grup oluşturarak , bunların birbirinden ayrı evrimsel bağlantılarının olabileceğini göstermiştir.

Türkiye'de asma viroidleri hakkında yapılan en geniş kapsamlı çalışma Gazel ev Önelge (2003) tarafından yapılmıştır. Doğu Akdeniz Bölgesi'ndeki bağlardan alınan 184 asma örneği, sPAGE testinde kullanılmış ve 62 örnekte viroid tanısı yapılmıştır. Aynı örnekler PCr ile testlendiklerinde 23 tanesinde GYSVd-1, 4 tanesinde GYSVd-2, 11 tanesinde HSVd belirlenmiştir. Örneklerin bir kısmında GYSVd-1+GYSVd-2, GYSVd-1+HSVd, GYSVd-1+GYSVd-2+HSVd karışık olarak tanılanmıştır. CEVd-g ise bu çalışmayla Türkiye'de ilk kez rapor edilmiştir.

Bu çalışmayı Gaziantep bağlarında yapılmış bir doktora tezi araştırması takip etmiştir. Gökçek (2007) GYSVd-1 ve GYSVd-2 enfeksiyonlarını, sarı benek-benzeri semptom taşıyan asmalarda önce simptomatolojik daha sonra sPAGE ile tanıladığını bildirmiştir. Yakın zamandaki bir çalışmada ise AGVd, Ege Bölgesi'nde cv. Menendi'de sadece bir asmada tanılanmıştır. Türk AGVd varyantının (Gen Bankası erişim no: KR706469) filogenetik analizinde Hint (KJ019304), Çin (EU743606) ve İran (KF876037) izolatlarıyla yüksek nükleotid benzerliğine sahip olduğunu belirtmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Araştırma materyalini oluşturan asma örnekleri Doğu Akdeniz (Adana, Hatay, Mersin) ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri (Gaziantep, Kilis ve Şanlıurfa)' nde bağcılığın ticari önem taşıdığı lokasyonlardaki, eski bağlardan toplanmıştır. Yaz döneminde yeşil sürgünler, sonbaharın ilk dönemlerinde toplanan bir yaşlı odun çelikleri oluşturmaktadır. Odun çeliklerinin soğuklama ihtiyacı, Bitki Koruma Laboratuvarı soğutucu dolaplarında, çeliklerin köklendirme çalışmaları Ziraat Fakültesi serasında gerçekleştirilmiştir.

Örneklerden toplam nükleik asit izolasyonu, tamamlayıcı DNA sentezi ve PCR analizi için kullanılan kimyasal maddeler çeşitli firmalardan, revers transkriptaz ve DNA polimeraz enzimleri Thermo Scientific firmalarından temin edilmiştir.

3.2. Metod

3.2.1. Bitki örneklerinin toplanması

Survey çalışmaları Doğu Akdeniz (Mersin, Adana, Hatay) ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri (Adıyaman, Kilis, Gaziantep, Şanlıurfa)'nde otokton asma varyetelerinin bulunduğu, aşısız bağ alanlarında yapılmıştır. Bağ alanlarında çalışmalar iklim özellikleri, çeşitlerin olgunlaşma zamanları ve böceklerin biyolojisi dikkate alınarak otokton varyetelerin genel özelliklerini (yaprak şekli, yaprak tüylülüğü, yaprak sinüs yapısı, meyve rengi, dane şekli vs) izlemek ve bitkisel materyal toplamak üzere temmuz-ağustos aylarında gerçekleştirilmiştir.

Surveylerde gözlem yapılan bağlarda, asma gövdelerinde yivleşme, yaprak kıvrıcıklığı, yapraklarda kızarma (kırmızı çeşitlerde) veya sarılıklar (beyaz çeşitlerde), damar nekrozu, salkımlarda küçük dane oluşumu gibi virüs-benzeri enfeksiyonların neden olduğu belirtiler aranmıştır. Asmalardan yeşil ve/veya bir yıllık odunlaşmış sürgünler (her asmadan en az 4-5 adet, 25-30 cm uzunluğunda, 3-4 göz taşıyan çelik) alınmış ve üzerlerine lokasyon adı ve/veya koordinatları yazılarak soğuk ortamlarda (+4°C) laboratuvar viroid testlerinde kullanılmaya kadar depolanmıştır. Viroid tanınması için toplanan tüm örnekler numaralandırılıp kayıt altına alınmıştır. Yeşil örnekler, TNA izolasyonu yapıldıktan sonra -20°C'de depolanmıştır.

Uyur elikler iki göz taşıyan kısa çelikler haline getirilmiş, nemli talaş bulunan plastik torbalar içerisinde sıkıca sarılarak soğuklama isteğini almaları için +4°C’de depolanmıştır. Çelikler torf ve volkanik tuf karışımı (1:1) toprağa dikilmiştir. Çeliklerin sera ortamında köklenmesi sağlanmıştır.

3.2.2. Bitki örneklerinden toplam nükleik asit (TNA) izolasyonu

Bağlardan toplanan bitkisel örneklerden TNA izolasyonu için Foissac vd. (2005)’nin yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır.

✓ Yaprak örnekleri veya uyur çeliklerden hazırlanan floem kazıntıları (0.1 g) 1:10 hacimde (ağırlık:hacim) izolasyon tamponu (4 M guanidine thiocyanate, 2 M sodyum asetat, pH 5.2, 25 mM EDTA, 1 M potasyum asetat, %2.5 PVP-40) ve %1 β-merkaptolanol içinde homojenize edilmiştir.

✓ Bitki özsuyu 14000 devir/dak hızda 10 dak santrifüj edilerek çökelti­lerden temizlenmiştir. Temizlenmiş sıvı kısmın üzerine %10 sodium lauryl sarcosine eklenmiştir. Karışım 70°C’de 10 dak bekletilmiştir.

✓ 3 M potasyum asetat çözeltisinden 100 µl eklenmiş ve buzda bekletilmiştir.

✓ Karışım 14000 devir/dak hızda 5 dak santrifüj edildikten sonra, üzerine 700 µl 6 M NaI ve 10 µl silika süspansiyonu (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) ilave edilmiştir.

✓ Silika ökeltisine 0.5 ml yıkama tamponu (20 mM Tris [pH 7.5], 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, %50 ethanol) eklenerek yıkanmıştır (10000 devir/dak’da 1 dak).

✓ Silika çökeltisi ortamdaki 14000 devir/dak hızda 2 dak santrifüj edilerek toplanmış ve sıvı kısmın 300 µl’si alınarak temiz tüplere aktarılmıştır. İzole edilen TNA’lar PCR çalışmalarında kullanılmaya kadar -20°C’de depolanmıştır.

TNA’larda spektrofotometrik (SmartSpec Plus Spectrometer, BioRad, ABD) okuma (A_{260}/A_{280}) yapılarak, TNA içerisinde RNA’nın saflığı ve konsantrasyonu kontrol edilmiştir. Moleküler testleme için 25 ng/µl RNA kalıbı kullanılmıştır.

3.2.3 İki aşamalı polimeraz zincir reaksiyonu (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

Asma örneklerinden izole edilen RNA'nın tersine transkripsiyonu için 50 ng/ µl RNA, 1 µl "hexanucleotide random hexamer" (0.5 µg/µl) (Fermentas) ile karışımı 95°C'de 5 dak bekletilmiştir. Örnekler üzerine 0.8 µl 200 U/µl Maloney-Murine Leukemia Virus Reverse Transriptase (M-MLV RT) enzimi (Fermentas) cDNA (10 µl 5X first strand buffer, 2 µl 10 mM dNTP karışımı) karışımı eklenmiştir. Sentez reaksiyonu 42°C'de 1 saat süreyle yapılmıştır. Reaksiyon 70°C'de 10 dak bekletilerek sonlandırılmıştır.

Sentezlenen cDNA'ların PCR analizi 50 µl reaksiyon karışımı içinde yapılmıştır. Karışım her reaksiyon için 5 µl cDNA, 1X PCR termofilik tampon, 1.5-2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP'nin her birisi, 1 µM virüs spesifik homolog ve heterolog primerler (Çizelge 4), 1U DNA *Taq* polymerase (Fermentas) ile hazırlanmıştır. PCR döğüsü 94°C'de 5 dak (ilk denatürasyon), 30 döngüde 94°C'de 30 sn (denatürasyon), 56°C'de 30 sn (hibridizasyon), 72°C'de 30 sn (uzama) ve son uzama aşaması 72°C'de 5 dak olarak belirlenmiştir.

PCR çalışmasında elde edilen DNA ürünlerinin elektroforetik analizleri % 1.5'lük agaroz jel üzerinde 1XTAE (0.04 M Tris-asetat, 1 mM EDTA, pH 8.0) tamponu kullanılarak yapılmıştır. Elektroforetik analizlerde "50 veya 100 bç DNA standartı" (Fermentas) kullanılmıştır. Agaroz jel etidium bromid boyamasından sonra UV transilluminator üzerinde gözlenmiş, jel fotoğrafları "GelDoc-It imaging system" ile çekilmiştir.

3.2.4. PCR DNA'larının nükleotid dizinlerinin çıkartılması

AGVd P7/AGVd P8 (Jiang ve ark., 2009) primerleriyle tanı konulan izolatların PCR DNA'larının nükleotid dizinleri doğrudan, her ik primer dizisi kullanılarak iki yönlü olarak MEDSANTEK (Türkiye) firmalarına yaptırılmıştır. Nükleotid dizinleri CLUSTAL W programında (Thompson vd., 1994) hizalanmıştır. En uygun nükleotid modeli MEGA 6 yazılımıyla (Tamura vd., 2013) blastn kullanılarak, gen bankasında kayıtlı yüksek nükleotid dizin benzerliği gösteren izolatlarla karşılaştırılmıştır. Filogenetik yapı çeşitliliği Tamura Nei modeline göre, "neighbor-joining (NJ)" metodu kullanılarak yapılmıştır. Filogenetik ağaç topolojisi kuvveti (bootstrap) 1,000 alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Simptom Gözlenmesi ve Bitkisel Örnekleme

Doğu Akdeniz (Adana, Mersin, Hatay) ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde (Gaziantep, Kilis, Şanlıurfa) yedi il (Şekil 4.1.)’de otokton asma varyetelerinin yetiştirildiği bağlara surveyler düzenlenmiş, virüs-benzeri simptomlar gözlenmiş ve örnekleme yapılmıştır. Yaz (temmuz) ve erken sonbahar döneminde (eylül) sırasıyla yeşil sürgünler ve uyur çeliklerden örnekleme yapılmıştır. Asmaların büyük bir kısmı kendi kökleri üzerinde ve/veya arazide aşılanmıştır. Mersin ve Adana dışındaki lokasyonlarda ziyaret edilen bağların tamamında serpene olmayıp, destek kullanılmaksızın ve çoğunlukla “serpene” adı verilen geleneksel yöntemlerle yetiştiricilik yapılmaktadır.



Şekil 4. 1. Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde bağlarda örnekleme yapıldığı iller

Survey yapılan bölgelerde yetiştiriciliği yapılan bağlardan Trakya İlkeren, Ceviz Üzüümü, Yerli çekirdeksiz Yalova incisi, Tarsus beyazı, Ergin çekirdeksiz, Dokuztekne karası, Pafu, Hönüsü, Hatun parmağı, Horoz karası, Çiloreş, Azezi, Küllahi, Çilurut, Sergi karası, Antep karası (syn: Cibine), Besni, Tahannebi, Peygamber üzümü, Rumi, Sultani Çekirdeksiz çeşitlerinden örnekler alınmıştır. Bağlarda gözlenen simptomlar genellikle yapraklarda klorotik beneklenme, damar klorozu, çift yaprak ve sürgün oluşumu, az sayıdaki asmada özellikle siyah çeşitlerde yaprak kıvrıcılığı simptomları da kaydedilmiştir. Yapraklarda sarı mozaik ve salkımlarda homojen olmayan dane olgunlaşmasında izlenen diğer hastalık belirtilerdir (Şekil 4.2.).

Bunun yanısıra Kilis’de gözlem yapılan bağların birçoğunda küsküt (*Cuscuta* spp.) (Şekil 4.2.) sorunu belirlenmiştir. Bazı çeşitlerde yapraklarda damarlar arası sarılık, yaprak

yüzeyinde genel sararma, klorotik renk açılması ve mozaik deseni belirtileri kaydedilmiştir.





kloroz

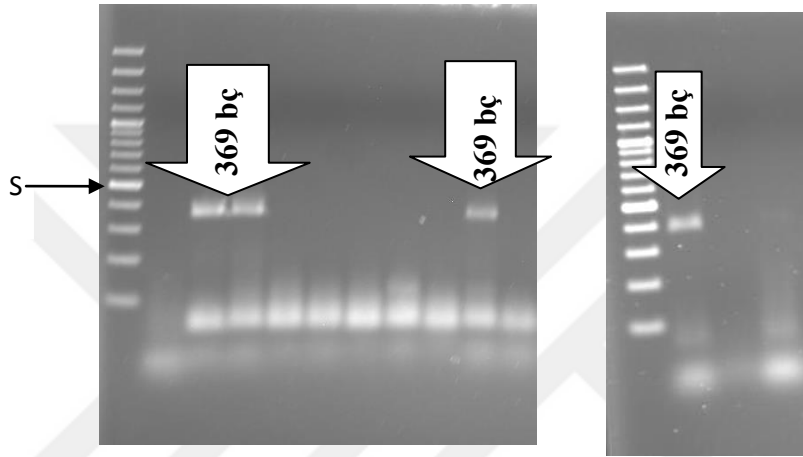


küsküt

Şekil 4. 2. Saha çalışmasında otokton asma varyetelerinde gözlenen virüs-benzeri belirtiler: A) Yapraklarda klorotik beneklenme, B) yapraklarda damar klorozu, C) sürgünlerde kalınlaşma, D) yapraklarda mozaik, E) salkımda homojen olmayan olgunlaşma, F) asma üzerinde küsküt (*Cuscuta* sp.)

4.2. AGVd cDNA'larının PCR Analizi

Saha çalışmalarında her iki bölgede toplam 34 adet bağda, 22 çeşit üzerinde gözlem ve örnekleme çalışması yürütülmüştür. Gözlem yapılan asmalarda virüs-benzeri hastalık belirtisi taşıyan 200 asmadan alınan materyaller AGVd tanısının yapılması için kullanılmıştır. Bitkisel materyallerden izole edilen TNA'lardan hazırlanmış cDNA'ların AGVd P7/AGVd P8 primer dizinleriyle yapılan PCR analizinde 7 asma örneğinden, AGVd'nin nükleik asit parçasını temsil eden 369 bç büyüklüğünde DNA bantları elde edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Asma TNA'larından hazırlanan cDNA'lar ile hazırlanmış ve AGVd için PCR ile çoğaltılan DNA'ların elektroforetik analizi. S: DNA standartı "100 bç DNA standartı" (Fermentas) kullanılmıştır

AGVd'in tanılandığı asma çeşitleri Rumi, Horoz karası, Antep karası, Ceviz üzümü ve Yerli çekirdeksiz çeşitleridir. Viroid Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Mersin, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Gaziantep, Şanlıurfa ve Kilis'deki bağlardan alınan örneklerde tanılanmıştır (Çizelge 4.1.). Araştırma kapsamında testlenmiş örneklerin %3.5'luk kısmında AGVd'in enfeksiyonlarına rastlanmıştır.

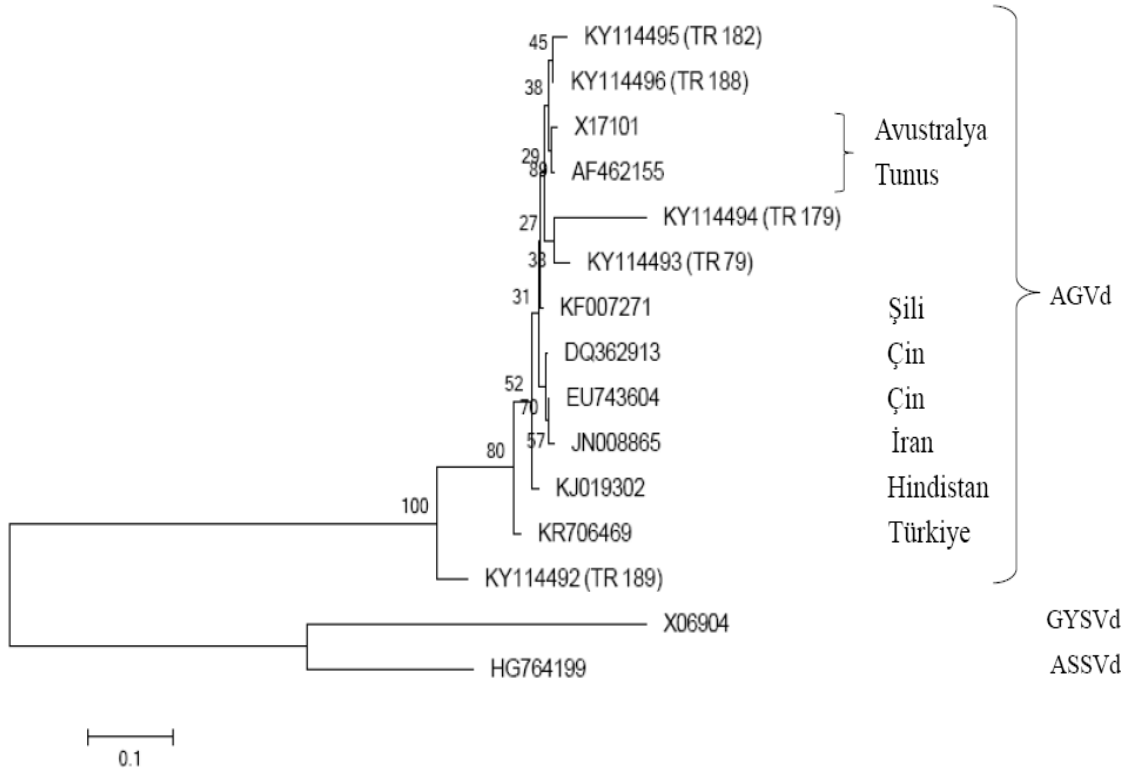
Çizelge 4. 1. Saha çalışmasının yapıldığı alanlar ve yerli asma çeşitlerinde AGVD'in bulunma durumu

Bölge	Lokasyon	Bağ (No.)	Çeşit	Pozitif testlenmiş (No.)
Doğu Akdeniz	Mersin	10	Yalova incisi, Tarsus beyazı, Ergin çekirdeksiz, Trakya ilkeren, Ceviz üzümü, Yerli çekirdeksiz	2/34
	Adana	3	Yalova incisi, Trakya ilkeren, Dokuztekne karası	0/12
	Hatay	3	Pafu, Hönüsü	0/8
Güneydoğu Anadolu	Gaziantep	2	Hatun parmağı, Horoz karası	3/26
	Şanlıurfa	2	Çiloreş, Azezi, Küllahi, Çilorut, Sergi karası, Antep karası (syn: Cibine),	1/21
	Adıyaman	4	Besni, Tahannebi, Peygamber üzümü	0/29
	Kilis	10	Rumi, Sultani çekirdeksiz, Horoz karası	1/70
TOTAL		34	200	7

4.3. AGVd'in Filogenetik Analizi

AGVd tanısı yapılmış 5 izolatan nükleotid dizinleri çıkartılmış ve gen bankasına depolanmıştır (KY114492-114496). Türk AGVd izolatlarının 331 nt'lik nükleotid dizisinin, gen bankasında homolog nükleotidi dizisine sahip izolatlarla karşılaştırmasında Türk izolatlarının kayıtlı AGVd izolatlarıyla %96 dizin benzerliği taşıdığı gözlenmiştir. MEGA 6.0 yazılımı kullanılarak NJ metoduyla izolatların filogenetik ağacı oluşturulmuştur. Ağaç topoloji kuvveti 1,000 bootstrap olarak alınmıştır. Türk (TR) 79, 179, 182, 188 AGVd izolatları (KY114493, KY114494, KY114495, KY114496), Avustralya'da tanılanan AGVd izolatu (X17101) ile Tunus izolatanın (AF462155) nükleotid dizinleriyle yüksek benzerlik taşımaktadır. TR 179 (KY114493) izolatanın nükleotid dizinleri, diğer izolatların (TR79, TR 182, TR 188) nükleotidi dizinlerinden bazı farklılıklar göstermiş olmasına karşın, aynı grupta yer almıştır.

TR 189 izolatu (KY114492) izolatu nükleotidi dizin homolojisi bakımından diğer TR izolatların ayrılmış ve filogenetik ağaç üzerinde farklı bir desen sergilemiştir. TR189 izolatanın nükleotidi dizini, Hindistan izolatanın (KJ019302) nükleotidi diziniyle benzerlik oranı daha yüksek bulunmuştur. Hindistan izolatu (KJ019302), Şili (KF007271), Çin (DQ362913,EU743604) ve Ege Bölgesi'nde Menendi çeşidinden izole edilmiş AGVd izolatuyla (KR706469) (Çandar ve ark., 2015) yüksek dizin benzerliği taşımaktadır.



Şekil 4.4. TR AGVd izolatlarının neighbor-joining (NJ) metoduna göre gen bankasından kayıtlı, yüksek nükleotidi dizin benzerliği gösteren izolatlarla hazırlanmış filogenetik ağacı. Ağaç topolojisi kuvveti, 1,000 bootstrap olarak alınmıştır

TR(79) Gaziantep – Horoz Karası

TR(179) Gaziantep – Horoz Karası

TR(188) Şanlıurfa - Antep Karası

TR(189) Şanlıurfa - Ceviz Üzümü

TR(182) Kilis - Ceviz Üzümü

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Australian grapevine viroid (AGVd) Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'ndeki eski bağcılığın serpene yapıldığı, çoğunlukla aşısız olarak yetiştirilen yerli asma çeşitlerinde tanılanmıştır. Toplam 200 asma örneğinin PCR yöntemi kullanılarak değerlendirildiği araştırmada AGVd'in, testlenmiş örneklerde bulunma yaygınlığı %3,5 düzeyinde bulunmuştur. Ancak İran'da %18,7 (Zaki-Aghl ve ark., 2013), Hindistan'da %10 (Adhar Purustothama ve ark., 2014) düzeyinde asmalarda AGVd enfeksiyonu rapor edilmiştir. Çandar ve ark., (2015) testledikleri 52 örneğin sadece sadece 1 tanesinde AGVd tanıladıklarını bildirmişlerdir. AGVd'in araştırma için alınan az sayıda örnekte tanılanmasının nedeni, örneklerin eski bağlardan ve aşısız anaç kullanılmaması olarak açıklanabilmektedir. Viroidlerin geniş alanlara yayılmasında en önemli faktör mekanik olarak ve aynı zamanda çoğaltma için kullanılan bitkisel materyallerdir.

Kaynak bilgilerinde AGVd, diğer asma viroidlerine göre daha seyrek bulunan viroid olarak belirtilmekle birlikte yakın zamanda Avrupa kıtasında ilk rapor İtalya'dan gelmiştir (Gambino ve ark., 2014). Tunus'taki bağlarda AGVd'in tanısıyla viroidin Afrika kıtasındaki varlığı belirlenmiştir. Ayrıca ABD (Al Rwahnih ve ark., 2009), Çin (Jiang ve ark., 2009), Hindistan (Adhar Purustothama ve ark., 2014) ve Türkiye (Çandar ve ark., 2015)'den gelen raporlarla, AGVd'nin bağcılık yapılan ülkelerde geniş bir coğrafya'da yayılmış olduğunu göstermektedir. Ancak viroidin, asmada etiolojisi bilinmediği için semptomatolojik olarak fark edilmesi mümkün değildir. Bu durum, latent olarak enfeksiyon yapan etmenlerin asmanın vejetatif çoğaltılması nedeniyle daha geniş alanlara yayılma riskini ortaya çıkarmaktadır. Bağlarda hastalık etmenlerinin doğal yayılmasında en önemli faktör bulaşık aşı metaryali veya çeliklerin üretiminde kullanılmasıdır. Üreticiler yeni bağ alanları tesis ederken temiz ve hastalıklara karşı testlenmiş üretim metaryali kullanmalıdır. Viroidler mekanik olarak bulaşık aşı bıçağı, budama alet ve ekipmanları ile kolaylıkla taşınmaları nedeniyle üreticilerin bağ budaması esnasında budama aletlerini %1'lik sodyum hipoklorit uygulamasından geçirmeleri mekanik taşınmanın önlenmesi açısından önerilmektedir.

Türk AGVd izolatlarının filogenetik akrabalık ilişkileri incelendiğinde, Çandar ve ark., (2015)'nin Menendi çeşidinden izole edilen AGVd izolatının nükleotid diziniyle homolojiye sahip olduğu gözlenmiştir. Araştırmadan elde edilen izolatlar Menendi izolatı (KR706469) gibi Hint (KJ019304), Çin (EU743606) ve İran (KF876037) izolatlarının

nükleotidi dizinleriyle yüksek benzerlikler göstermiştir. AGVd için yapılacak araştırmalarda izolatların tam genom dizisinin çıkarılması ve populasyon çeşitliliğinin daha geniş alanda incelenmesi önerilmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Adkar-Purushothama, C.R., Kanchepalli,P.R., Yanjarappa,S.M., Zhang,Z. and Sano,T. 2014. Detection, distribution, and genetic diversity of Australian grapevine viroid in grapevines in India. *Virus Genes*, 49 (2): 304-311.
- Al Rwahnih, M., Daubert, S., Golino, D. and Rowhani, A. 2009. Deep Sequencing Analysis of RNAs from a Grapevine Showing Syrah Decline Symptoms Reveals a Multiple Virus Infection that Includes a Novel Virus. *Viol.*, **387**: 395-401.
- Çandar, A., Öner, S., Usta,M., Paylan, I.C., Sipahioglu, M., Gümüş M, 2015. "First report of Australian grapevine viroid (AGVd) in the Aegean region". *Proceedings of the 18th Congress of ICVG, Ankara, Turkey. 7-11 September* 196-197 p.
- Diener, T.O. 2001. "The viroid: biological oddity or evolutionary fossil?", *Adv. Virus Res.*, 57, 137–84,
- Ding, B. 2009. "The biology of viroid- host infections," *Annual Review of Phytopathology*, 47, 105-131.
- Di Serio, F., Flores, R., Verhoeven, J.Th.J., Li, S.F., Pallas, V., Randles J.W., Sano, T., Vidalakis, G., Owens, R.A. 2014. "Current status of viroid taxonomy," *Archives of Virology*, 159, 3467-3478.
- Elleuch, A., Fakhfakh, H.,Pelchat,M., Landry, P.,Marrakchi,M., Perreault, J.P., 2002. "Sequencing of Australian grapevine viroid and Yellow speckle viroid isolated from a Tunisian grapevine without passage in an indicator plant,"*European Journal of Plant Pathology* 108,815-820.
- Elleuch, A., Marrakchi, M., Perreault, J. P. and Fakhfakh, H. 2003a. First report of *Australian Grapevine Viroid* from the Mediterranean Region. *J. Plant Pathol.*, **85**:53-57.
- Elleuch, A., Fakhfakh, H., Jendoubi, L., Bessaiesand, N., Marrakchi, M., 2003b. "Comparative analysis of techniques for detection of grapevine and citrus viroid in Tunisia," *Bulletin OEPP/EPP Bulletin*,33,369-374.
- Elleuch, A., Hamdi, I., Bessaies, N., Fakhfakh, H., 2013. Single-strand conformation polymorphism for molecular variability studies of six viroid species". *Bisence Biotechnology and Biochemistry*, 77, 182-188.
- Flores, R., Duran-Vila, N., Pallas, V., Semancik, J.S., 1985. "Detection of viroid and viroid-like RNAs from grapevine, " *Journal of General Virology* ,66, 2095-2102.
- Flores,R.,Randles,J.W.,Bar-Joseph,M.,Diener,T.O., 1998. "A proposed scheme for viroid classification and nomenclature," *Archives of Virology*,143,623-629.
- Flores R., Dar`os, J.A., Hern´andez, C., 2000. "The *Avsunviroidae* family: viroids with hammerhead ribozymes", *Adv. Virus Res.*, 55, 271–323.

- Flores, R., Randles, J.W., Owens, R.A., Bar-Joseph, M., Diener, T.O. 2005. "Subviral agents: viroids" in *Virus Taxonomy. Eighth Report of the international Committee on Taxonomy of Viruses*. Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Editors). Elsevier Academic Press, San Diego.
- Foissac, X., Svanella-Dumass, L., Gentit, P., Dulucq, M.J., Marais, A., Candresse, C. 2005. "Polyvalent degenerate oligonucleotides reverse transcription-Polymerase chain reaction: a polyvalent detection and characterization tool for Trichoviruses, Capilloviruses, and Foveaviruses," *Phytopathology* 95(6), 617-625.
- Gafny, R., Mogilner, N., Nitzan, Y., Ben-Shalom, J., Bar-Joseph, M., 1995. "The movement and distribution of citrus tristeza virus and citrus exocortis viroid in citrus seedlings", *Ann. Appl. Biol.*, 126, 465-470.
- Gambino, G., Navarro, B., Torchetti, E.M., La Notte, P., Schneider, A., Mannini, F., Di Serio, F., 2014. "Surveys on viroids infecting grapevine in Italy: identification and characterization of Australian grapevine viroid and Grapevine yellow speckle viroid 2," *European Journal of Plant Pathology* 140, 199-205.
- Garcia-Arenal, F., Pallas, V., Flores, R., 1987. "The sequence of a viroid from grapevine closely related to severe isolates of citrus exocortis viroid", *Nucleic Acids Res.*, 15, 4203-4210.
- Gazel, M., Önelge, N., 2003. "First report of grapevine viroids in the East Mediterranean region of Turkey," *Plant Pathology*, 52, 405.
- Gökçek, B., 2007. "Gaziantep ili bağlarında Bağ sarı benek (GYSVd-1 ve 2) hastalığının araştırılması," Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Guo, R., Sano, T., Cheng, Z.M., Li, S.F., 2007. "Detection of Australian grapevine viroid in a grapevine more than 100 years old in Xinjiang, China," *Plant Pathology*, 56, 339.
- Habili, N., Krake, L.R., Barlass, M., Rezaian, M.A., 1992. "Evaluation of biological indexing and ds RNA analysis in grapevine virus elimination", *Ann. Appl. Biol.*, 121, 277-283.
- Jiang, D., Peng, P., Wu, Z., Cheng, Z. and Li, S. 2009. Genetic Diversity and Phylogenetic Analysis of *Australian Grapevine Viroid* Isolated from Different Grapevines in China. *Virus Genes*, 38: 178-183.
- Jiang, D., Sano, T., Tsuji, M., Araki, H., Sagawa, K., Adkar-Purushothama, C.R., Zhang, Z., Guo, R., Xie, L., Wu, Z., Wang H. and Li, S. 2012. Comprehensive diversity analysis of viroids infecting grapevine in China and Japan. *Virus Research* 169: 237-245.
- Keese, P. and Symons, R. 1985. Domains in Viroids: Evidence of Intermolecular RNA Rearrangements and Their Contribution to Viroid Evolution. *PNAS*, 82: 4582-4586.
- Keese, P., Symons, R. H., 1985. "Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution", *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, 4582-4586.

- Koltunow, A. M. and Rezaian, M. A. 1988. *Grapevine Yellow Speckle Viroid: Structural Features of a New Viroid Group*. *Nucleic Acids Res.*, **15**: 7040-7052.
- Koltunow, A.M., Rezaian, M.A., 1989a. "A scheme for viroid classification", *Intervirology*, **30**, 194-204.
- Koltunow, A.M., Rezaian, M.A., 1988. "Grapevine yellow speckle viroid: structural features of a new viroid group", *Nucleic Acids Research*, **16**, 849-864.
- Li, S.F., Guo, R., Peng, S., Sano, T., 2006. "Grapevine yellow speckle viroid 1 and Grapevine yellow speckle viroid 2 isolates from China", *Journal of Plant Pathology*, **89**, 572.
- Little, A., Rezaian, M.A. 2003. "Grapevine viroids". In *Virods*. Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Semancik, J.S. (Editors). Collingwood: CSIRO Publishing, Australia.
- Martelli, G.P., 2015. "Grapevine Virology: A historical account with an eye to the studies for the last 60 years or so", *Proceedings of the 18th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine*. September 7-11, 2015. Ankara, Turkey. 16-22 p.
- Mc Innes, J.L., Symons, R.H. 1991. "Comparative structure of viroids and their rapid detection using radioactive and nonradioactive nucleic acid probes", In: K. Maramorosch (Ed.), *Viroids and Satellites: Molecular Parasites at the Frontier of Life*, CRC press, Boca Raton, FL, pp. 21-58.
- Morton, A., Barbara, D.J., Adams, A.N., 1993. "The distribution of hop latent viroid within plants of *Humulus lupulus* and attempts to obtain viroid-free plants", *Ann. Appl. Biol.*, **123**, 47-53.
- Rezaian, M. A. 1990. *Australian Grapevine Viroid: Evidence for Extensive Recombination between Viroids*. *Nucleic Acids Res.*, **18**: 1813-1818.
- Rezaian, M. A., Koltunow, A. M. and Krake, L. R., 1988. Isolation of Three Viroids and a Circular RNA from Grapevines. *J. Gen. Virol.*, **69**: 413-422.
- Sanger, H.L., Klotz, G., Riesner, D., Gross, H.J., and Kleinschmidt, A.K. 1976. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **73**: 3852-3856.
- Sano, T., Uyeda, I., Shikata, E., Meshi, T., Ohno, T., Okada, Y. 1985. "A viroid-like RNA isolated from grapevine has high sequence homology with Hop stunt viroid" *Journal of General Virology*, **66**, 333-338.
- Sano, T., Ohshima, K., Hatay, T., Uyeda, I., Shikata, E., Chou, T.G., Meshi, T., Okada, Y., 1986. "A viroid resembling Hop stunt viroid in grapevine from Europe, the United States and Japan", *Journal of General Virology*, **67**, 1673-1678.
- Singh, R.P., 1991. "Experimental host range of the potato spindle tuber 'virus'", *American Journal of Potato Research*, **50**, 111-123.

- Staub, U., Polivka, H., Gross, H.J., 1995. "Two rapid microscale procedures for isolation of total RNA from leaves rich in polyphenols and polysaccharides: application for sensitive detection of grapevine viroids", *J. Virol. Methods*, 52, 2099218.
- Szychowski, J. A., Credi, R., Reanwarakorn, K. and Semancik, J. S. 1998. Population Diversity in *Grapevine Yellow Speckle Viroid-1* and the Relationship to Disease Expression. *Virol*, **248**: 432–444.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0", *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson T.J., 1994. "The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools", *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.
- Wan Chow Wah, J. and Symons, R. 1997. A Highly Sensitive RT-PCR Assay for the Diagnosis of Grapevine Viroids in Field and Tissue Culture Samples. *J. Virol. Methods*, **63**: 57-69.
- Wu, Q.F., Wang, Y., Cao, M.J., Pantaleo, V., Burgyan, J., Li, W.X., Ding, S.W., 2012. "Homology independent discover of replicating pathogenic RVAs by deep sequencing and a new computational algorithm" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1117815109/-/DCSupplemental>.
- Zaki-Aghl, M. and Izadpanah, K. 2004. Identification and Transmission of *Grapevine Yellow Speckle Disease* in Iran. *Proc. 16th Iran. Plant Protec. Cong.*, Tabriz, Iran, **2**: 359.
- Zaki-Aghl, M. and Izadpanah, K. 2005. Identification of several different viroids from grapevine in Fars province. *Third Iran. Virol. Cong.* P. 171.
- Zaki-Aghl, M. and Izadpanah, K. 2006. Sequencing and Genome Analysis of Iranian Isolate of *Grapevine Yellow Speckle Viroid 1*. *Proc. 17th Iran. Plant Protec. Cong.*, Karaj, Iran, **2**: 358.
- Zaki-Aghl, M., Izadpanah, K., 2009. "Identification and Partial Characterization of Grapevine Viroids in Southern Iran", 16th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine, Dijon, France. 354 PP.
- Zaki-Aghl, M., Izadpanah, K., Niazi, A., Behjania, S.A.A. and Afsharifar, A.R. 2013. Molecular and biological characterization of the Iranian isolate of the *Australian grapevine viroid*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15: 855-865.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : DÖNE KILIÇ

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri : 18/09/1987 / MALATYA

Telefon : 05316077690

e-posta : kilicdone40@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	KSÜ / Bitki Koruma Bölümü	2017
Lisans	KSÜ / Bitki Koruma Bölümü	2014

Yabancı Dil

İngilizce