

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**Banu GÖKÇEK**

**GAZİANTEP İLİ BAĞ ALANLARINDA BAĞ SARI BENEK (GYSVd-1 ve 2)  
HASTALIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**ADANA, 2007**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GAZİANTEP İLİ BAĞ ALANLARINDA BAĞ SARI BENEK**  
**(GYSVd-1 ve 2) HASTALIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**Banu GÖKÇEK**  
**DOKTORA TEZİ**  
**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

Bu Tez 21.09.2007 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği ile Kabul Edilmiştir.

İmza..... İmza..... İmza.....  
Prof. Dr. Nüket ÖNELGE Prof. Dr. Semih TANGOLAR Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR  
**Danışman Üye Üye**

İmza..... İmza.....  
Doç. Dr. Gassan KÖKLÜ Yrd. Doç. Dr. Muharrem Arap KAMBEROĞLU  
**Üye Üye**

Bu Tez Enstitümüz Bitki Koruma Anabilim Dalında hazırlanmıştır.  
Kod No:

**Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ**  
**Enstitü Müdürü**

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.  
Proje No: ZF2006D6

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

## ÖZ

### DOKTORA TEZİ

#### GAZİANTEP İLİ BAĞ ALANLARINDA BAĞ SARI BENEK (GYSVd-1 ve 2) HASTALIĞININ ARAŞTIRILMASI

**Banu GÖKÇEK**

#### ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE

Yıl : 2007, Sayfa : 94

Jüri : Prof. Dr. Semih TANGOLAR

Prof. Dr. Mehmet Ertuğrul GÜLDÜR

Doç. Dr. Gassan KÖKLÜ

Yrd. Doç. Dr. Muharrem A. KAMBEROĞLU

Bu çalışma Gaziantep ili bağ alanlarında *Bağ sarı benek* (BSB) hastalığının varlığını, bulaşıklılık durumunu ve etmenlerinin karakterizasyonunu belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Hastalığı araştırmak amacıyla yürütülen sörvey çalışması Gaziantep ilinde yaklaşık 4500 da'lık alanda 766363 omca üzerinde hastalığın makroskopik semptomları olan sarı beneklenme ve damar bantlaşması semptomları gözlenerek yapılmıştır. Sörvey çalışması sonucunda 652 omcanın BSB hastalığı ile bulaşık bulunduğu belirlenmiştir. Hastalığın bulaşıklık oranı % 0,08'dir. Etmenlerini araştırmak amacıyla yürütülen sPAGE çalışmasında 67 örnekte GYSVd-1 ve 2'nin viroid bantları saptanmıştır.

Organik bağ alanlarında yürütülen çalışmada BSB hastalığının bulaşıklık oranı % 0,04 olarak bulunmuştur. Organik olarak üretilen Dımışkı ve Öküzgözü çeşitlerinde sPAGE analizi sonucunda GYSVd-1 ve 2 viroidleri akrilamid jel üzerinde belirlenmiştir.

Antepfıstığı Araştırma Enstitüsünde üretilen fidanlarda BSB hastalığının bulaşıklık oranı % 0,49 olarak saptanmıştır. Ancak bu fidanlıkta damızlık bloklarının bu hastalık açısından temiz olduğu belirlenmiştir.

RT-PCR çalışmaları sonucunda, GYSVd-1 ve 2'nin varlığı agar jel üzerinde belirlenmiştir. Bu viroidlerin nükleotid dizilim analizleri sonucunda GYSVd-1'in 366 nükleotid içerdiği; GYSVd-2'nin ise 361 nükleotid sayısında olduğu bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: Bağ sarı benek hastalığı, GYSVd-1 ve 2, sPAGE, PCR

## ABSTRACT

### PhD THESIS

# THE INVESTIGATION OF *GRAPEVINE YELLOW SPECKLE DISEASE* (GYSVd-1 AND 2) IN GAZİANTEP GRAPEVINE AREAS

**Banu GÖKÇEK**

**UNIVERSITY OF ÇUKUROVA  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
DEPARTMENT OF PLANT PROTECTION**

Supervisor : Prof. Dr. Nüket ÖNELGE

Year : 2007 Page: 94

Jury : Prof. Dr. Semih TANGOLAR

Prof. Dr. Mehmet GÜLDÜR

Associate Prof. Dr. Gassan KÖKLÜ

Assistant Prof. Dr. Muharrem KAMBEROĞLU

This study was conducted to determine presence, infection rates and characterization of factors for *Grapevine yellow speckle* (GYS) disease of Gaziantep vineyards. Gaziantep region GYS disease was examined approximately in 4500 da on the 766363 grapevine plants for macroscopic symptoms of yellow speckle and vein banding. 652 grapevine plants were found to be infected with grapevine yellow speckle disease. The infection rate is % 0,08 in Gaziantep vineyards. At the 67 grapevine plants in infection, the viroid bands of GYSVd-1 and 2 were observed in sPAGE analysis.

The infection rate of GYS disease at organic grapevine yards was found to be % 0,04. In organic varieties of Dımışkı and Öküzgözü, viroid bands of GYSVd-1 and 2 were also found as a result of sPAGE analysis that were observed on acrylamide gel.

GYS disease was found at the % 0,49 infection rate on grapevine seedlings at Pistachio Research Institute. In the Institute the mother blocks were determined to be clean about GYS disease.

RT-PCR studies GYSVd-1 and 2 were determined on agarose gel. Nucleotide analysis of the length of GYSVd-1 was found as 366 nts. However the results of GYSVd-2 was to be 361 nucleotides.

**Key Worlds:** Grapevine yellow speckle disease, GYSVd-1ve 2, sPAGE, PCR

## TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve bana “Gaziantep İli Bağ Alanlarında *Bağ Sarı Benek* Hastalığının Araştırılması” konulu Doktora Tezini veren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nüket ÖNELGE’ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın tüm aşamasında bana yol gösteren ve olumlu katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Semih TANGOLAR’a, Sayın Yard. Doç. Dr. Muharrem KAMBEROĞLU’na ve Doç. Dr. Gassan KÖKLÜ’ye teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım sırasında emeği geçen Çukurova Üniversitesi Bitki Koruma Bölümü Turunçgil Virüsleri Laboratuvar arkadaşarımdan Dr. Orhan BOZAN başta olmak üzere Zir. Müh. Nazan BAYAR’a, Zir. Müh. Yüşra BULDU’ya ve yazım aşamasında da emekleri ile katkıda bulunan Zir. Müh. Medine GÖK’e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmam için tüm bölüm olanaklarından yararlandıran Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölüm Başkanlığı’na, maddi destek veren Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne (Proje no: ZF2006D6) en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmam esnasında tüm zorluklara rağmen bana desteğini ve sevgisini hiç esirgemeyen aileme, dostlarıma, sevgili eşim Alparslan GÖKÇEK’e ve oğullarım Alp ve Arda GÖKÇEK’e sonsuz teşekkürler ederim.

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>SAYFA</b>
ÖZ.....	I
ABSTRACT .....	II
TEŞEKKÜR .....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	X
1. GİRİŞ .....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
3. MATERYAL VE METOD .....	19
3.1. Materyal.....	19
3.2. Metod.....	19
3.2.1. Sörvey Metodu ve Çalışma Materyalinin Alınması .....	19
3.2.1.1. Gaziantep İli Bağ Alanlarında Sörvey Metodu ve Çalışma Materyalinin Alınması .....	19
3.2.1.2. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nde Üretilen Asma Fidanları ve Damızlık Bloklarında Yürütülen Sörvey Yöntemi ve Çalışma Materyalinin Alınması.....	21
3.2.1.3. Gaziantep İli Organik Bağ Alanlarında Sörvey Yöntemi ve Çalışma Materyalinin Alınması.....	23
3.2.2. Moleküler Çalışmalar İle İlgili Metodlar .....	24
3.2.2.1. Alınan Örneklerin Nükleik Asit Ekstraksiyon ve Purifikasyon Yöntemi .....	24
3.2.2.2. Elde Edilen Nükleik Asitlerin sPAGE Yöntemi İle Analiz Edilmesi .....	25
3.2.2.3. Elde Edilen Viroid RNA'larının Gümüş Nitrat (AgNO <sub>3</sub> ) Boyama Yöntemi İle Belirlenmesi .....	26
3.2.2.4. sPAGE Analizlerinde İnfekteli Oldukları Saptanan Viroidlerin RT-PCR Yöntemi ile Teşhis Edilmesi.....	27

3.2.2.5. RT-PCR Analizlerinde GYSVd-1 ve GYSVd-2 ile İnfekteli Oldukları Saptanan Viroidlerin PCR Ürününün Çoğaltılması ve Saflaştırılması .....	28
3.2.2.6. Dışıski izolatlarından elde edilen GYSVd-1 ve GYSVd-2 ile Saflaştırılan PCR Ürününün Nükleik asit Diziliminin Belirlenmesi .....	29
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	30
4.1. Sörvey Çalışması Sonucu Elde Edilen Bulgular.....	30
4.1.1. Gaziantep İli Bağ Alanlarında Elde Edilen Simptomolojik Bulgular .....	30
4.1.2. Gaziantep İli Organik Bağ Alanlarında Elde Edilen Simptomolojik Bulgular .....	41
4.1.3. Gaziantep İli Bağ Fidanı Üretim Alanından Elde Edilen Simptomolojik Bulgular .....	43
4.2. Sörvey Çalışması Sonucu Toplanan Örneklerin sPAGE Analiz Bulguları.....	47
4.2.1. Gaziantep İli Bağ Alanlarından Toplanan Örneklerin sPAGE Analiz Bulguları .....	47
4.2.2. Gaziantep İli Organik Bağ Alanlarından Toplanan Örneklerin sPAGE Analiz Bulguları.....	50
4.2.3. Gaziantep İli Bağ Fidanı Üretim Alanından Toplanan Örneklerin sPAGE Analiz Bulguları.....	52
4.3. sPAGE Analiz Sonuçları Pozitif Çıkan Örneklerin RT-PCR Analiz Bulguları.....	53
4.4. RT-PCR Analiz Sonuçları Pozitif Çıkan İki Örneğin Nükleik Asit Dizilimlerinin Belirlenmesi .....	57
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	63
KAYNAKLAR.....	67
ÖZGEÇMİŞ .....	75
EKLER.....	76

## ÇİZELGELER DİZİNİ

## SAYFA

Çizelge 1.1. Türkiye'de tarım bölgelerine göre bağ alanı (ha) ve üzüm üretim miktarı (ton) .....	1
Çizelge 1.2. Akdeniz Tarım Bölgesi illerinin bağ alanı (ha) ve üzüm üretim miktarları (ton) .....	2
Çizelge 1.3. Gaziantep ili bağ alanlarının ilçe düzeyindeki dağılımı .....	2
Çizelge 2.1. Viroidlerin sınıflandırılması.....	6
Çizelge 2.2. Bazı viroidlerin zarar oluşturdukları konukçu bitkiler .....	7
Çizelge 2.3 Bazı viroid hastalıklarının genel özellikleri .....	8
Çizelge 2.4. Bağlarda bilinen viroidler .....	11
Çizelge 3.1. Gaziantep ili ilçelerinin en çok yetiştirilen üzüm çeşitleri ile toplam alanı, sörvey alanı ve sPAGE analizine alınan örnek sayısı .....	20
Çizelge 3.2. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü 2006 yılı asma fidanı çeşit adı, toplam fidan sayısı.....	22
Çizelge 3.3. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nde incelenen damızlık bloğu çeşit adı, toplam omca adedi ve sPAGE analizine alınan örnek sayısı.....	23
Çizelge 3.4. Gaziantep ili organik bağ alanlarının bulunduğu ilçeler, üzüm çeşitleri ve sörveylenen omca sayısı.....	24
Çizelge 3.5. RT-PCR'da kullanılan viroidlere özgü primerler ve baz dizilimleri.....	27
Çizelge 4.1. Gaziantep ili bağ alanlarında yapılan GYSVd'leri için sörvey çalışmasındaki simptomolojik bulgular (sb: sarı beneklenme, sb ve db: sarı beneklenme ve damar bantlaşması, fl: yelpaze yapraklılık (fan leaf), bk: boğum arası kısılması, bs: bir boğumdan birden fazla sürgün oluşumu, (zs): zigzag sürgün oluşumu, (ys): yaprak sararması, (b): genel viroid simptomları olan bodurluk ve (yk): buna bağlı yaprak küçülmesi .....	32

Çizelge 4.2. Gaziantep ili bağ alanlarında ilçelere ve çeşitlere göre elde edilen sörvey sonuçları .....	38
Çizelge 4.3. Gaziantep ili organik bağ alanlarında <i>Bağ sarı benek</i> hastalığının sörvey sonuçları.....	42
Çizelge 4.4. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü asma fidanlığı üretim kapasitesi ve <i>Bağ sarı benek</i> hastalığı için yapılan araştırma sonuçları.....	45
Çizelge 4.5. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nde incelenen damızlık bloğu çeşit adı, toplam omca adedi, makroskobik gözlem sonuçları.....	46
Çizelge 4.6. Gaziantep ili bağ alanlarından toplanan örneklerin GYSVd-1 ve 2 açısından sPAGE analiz sonuçları .....	48
Çizelge 4.7. Gaziantep ili organik bağ alanlarında <i>Bağ sarı benek</i> hastalığının sPAGE yöntemi ile elde edilen sonuçları .....	51
Çizelge 4.8. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nde incelenen damızlık bloğu çeşit adı, toplam omca adedi, sPAGE analizine alınan örnek sayısı ve sonuçları.....	53
Çizelge 4.9. sPAGE analizi sonucu pozitif çıkan örneklerden seçilen 10 örneğin RT-PCR analiz sonuçları .....	55
Çizelge 4.10. GYSVd-1 Dımışkı örneğinin nükleik asit dizilimi.....	57
Çizelge 4.11. GYSVd-2 Dımışkı örneğinin nükleik asit dizilimi .....	58
Çizelge 4.12. Dımışkı çeşidinde bulunan GYSVd-1 viroidinin nükleotid dizilim karşılaştırması .....	59
Çizelge 4.13. Dımışkı çeşidinde bulunan GYSVd-2 viroidinin nükleotid dizilim karşılaştırması .....	61
Çizelge 4.14. Gaziantep ili bağ alanlarında Dımışkı çeşidinden elde edilen ve nükleotid dizimleri belirlenen GYSVd-1 ve GYSVd-2 viroidlerinin soy ağacı.....	62

## ŞEKİLLER DİZİNİ

## SAYFA

- Şekil 4.1. *Bağ sarı benek* hastalığına ait sarı beneklenme belirtileri (1,2,3,4), A; sağlıklı bağ yaprağı ve B; sarı benek belirtisi gösteren bağ yaprağı (5)..... 33
- Şekil 4.2. *Bağ sarı benek* hastalığına ait damar bantlaşması belirtileri (1,2), A; sağlıklı bağ yaprağı B; damar bantlaşması belirtisi gösteren bağ yaprağı (3) ..... 35
- Şekil 4.3. *Bağ sarı benek* hastalığı ile bulaşık omcalarda beneklenme ile birlikte gözlenen viral enfeksiyonlara ait belirtiler; 1) yelpaze yapraklılık ve bir boğumdan birden fazla sürgün oluşumu 2) zigzag sürgün oluşumu ve boğum arası kısalması, 3) yaprak küçülmesi ve sararması ..... 36
- Şekil 4.4. Bağlarda gözlenen bodurluğa bağlı yaprak küçülmesi belirtileri..... 37
- Şekil 4.5. Gaziantep bağ alanlarında *Bağ sarı benek* hastalığı ile simptomolojik olarak bulaşık bulunan omcaldan alınan örneklerin GYSVd-1 ve 2 viroidleri açısından sPAGE analizi sonuçları 1) GYSVd-1 ve 2 ile bulaşık pozitif kontrol, 2)GYSVd-1 ile bulaşık Dımışkı çeşidi, 3) GYSVd-1 ve 2 ile bulaşık Dımışkı çeşidi 4,5) GYSVd-2 ile bulaşık Dökülgen çeşitleri, 6) negatif kontrol bağ..... 49
- Şekil 4.6. Organik bağ üretim alanından alınan örneklerle yapılan sPAGE analizi 1; GYSVd-1 ve 2 ile infekteli pozitif bağ, 2; Negatif kontrol bağ, 3; GYSVd-1 ve 2 ile infekteli Öküzgözü çeşidi ..... 52
- Şekil 4.7. RT-PCR analizi ile sPAGE analizi sonucu pozitif çıkan örneklerin GYSVd-1 ve 2 açısından sonuçları a; DNA Marker, b; GYSVd-1 ile bulaşık Dımışkı çeşidi, c; GYSVd-2 ile bulaşık Dımışkı çeşidi ..... 54
- Şekil 4.8. RT-PCR sonucunda pozitif bulunan GYSVd-1-Dımışkı örneğinin PCR'da çoğaltılması..... 56

Şekil 4.9. Saflaştırma sonucu elde edilen viroid bantları a; DNA Marker, b; GYSVd-1-Dımışkı örneğinin saflaştırılmış 366 bp sahip viroid bandı, c; GYSVd-2-Dımışkı örneğinin saflaştırılmış 361 bp sahip viroid bandı ..... 56

## SİMGELER VE KISALTMALAR

A	: Adenin
C	: Sitozin
G	: Guanin
T	: Timin
AgNO <sub>3</sub>	: Gümüş nitrat
BSB	: <i>Bağ sarı benek</i> hastalığı
EtBr	: Ethidium bromür
HCl	: Hidroklorik asit
HCHO	: Formaldehit
KOH	: Potasyum hidroksit
KCl	: Potasyum klorür
LiCl	: Lityum klorür
MgCl <sub>2</sub>	: Magnezyum klorür
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	: Sodyum sülfat
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	: Sodyum karbonat
TEMED	: Tetramethylethylenediamine
TAE	: Tris-asetik asit-EDTA
TBE	: Tris-borik asit-EDTA
TKM	: Tris potasyum klorür magnezyum klorür
SDS	: Sodyum dodesyl sülfat
STE	: Sodyum klorür tris EDTA
EM-2	: Sodyum sulfit SDS mercaptoethanol
da	: Dekar
ha	: Hektar
cDNA	: Complementer deoksiribo nükleik asit
hDNA	: Homolog deoksiribonükleik asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid tri fosfat
RNA	: Ribonükleik asit
ssRNA	: Tek sarmallı RNA

dH <sub>2</sub> O	: Distile su
dPAGE	: Denature - poliakrilamid jel elektroforez
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforez
sPAGE	: Ardışık - poliakrilamid jel elektroforez
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RT-PCR	: Reverse transkriptaz – polimeraz zincir reaksiyonu
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
°C	: Santigrat derece
gr	: Gram
d/dak	: Devir / dakika
kg	: Kilogram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mA	: Miliamper
ng	: Nanogram
sn	: Saniye
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu
UV	: Ultraviyole
(C)	: Merkez bölge
(TR)	: Sağ terminal bölge
(TL)	: Sol terminal bölge
(P)	: Patojenite bölgesi
(V)	: Değişken bölge
(b)	: Bodurluk
(bk)	: Boğum arası kısalması
(bs)	: Birden fazla sürgün oluşumu
(db)	: Damar bantlaşması
(fl)	: Yalpaze yapraklılık
(sb)	: Sarı beneklenme
(yk)	: Yaprak küçülmesi

(ys) : Yaprak sararması  
(zs) : Zigzag sürgün oluşumu  
AGVd : Australian grapevine viroid  
ArMV : Arabis mosaic virus  
ASBVd : Avocado sunblotch viroid  
CCaVd : Citrus cachexia viroid  
CCCVd : Coconut cadang-cadang viroid  
CChMVd: Chrysanthemum chlorotic mottle viroid  
CEVd-g : Citrus exocortis viroid-grapevine  
ELVd : Eggplant latent viroid  
HLVd : Hop latent viroid  
HSVd-g : Hop stunt viroid - grapevine  
GFLV : Grapevine Fanleaf Virus  
GYSVd-1: Grapevine yellow speckle viroid 1  
GYSVd-2: Grapevine yellow speckle viroid 2  
PLMVd : Peach latent mosaic viroid  
PSTVd : Potato spindle tuber viroid

## 1. GİRİŞ

Bağcılık için yerkürenin en elverişli iklim kuşağı olan 34°-49° kuzey ve güney enlemleri arasında bulunan ülkemiz, asmanın gen merkezi olmasının yanı sıra köklü bir bağcılık kültürüne de sahiptir.

Ülkemiz 2004 yılı istatistiklerine göre dünya ülkeleri arasında bağ alanı yönünden 565000 ha ile 4. sırada, yaş üzüm üretim bakımından 3650000 ton ile 5.sırada yer almaktadır (Anonim, 2007a).

Gaziantep ili ülkemiz tarım bölgeleri arasında bağ alanı bakımından 103172 ha (Çizelge 1.1) ile ikinci sırada yer alan Akdeniz bölgesi içerisinde 30430 ha (Çizelge 1.2) dikim alanı ile en fazla bağ alanına sahip olan ilimizdir (Anonim, 2007b). Gaziantep ilinin en fazla bağ alanlarına sahip ilçeleri Şahinbey, Şehitkamil, İslahiye ve Nizip'dir (Çizelge 1.3) (Anonim, 2005).

Çizelge 1.1. Türkiye'de tarım bölgelerine göre bağ alanı (ha) ve üzüm üretim miktarı (ton)

Bölgeler	Alan (ha)	Oran(%)	Üretim (ton)	Oran(%)
1.Orta Kuzey	36187	6.7	139101	3.9
2.Ege	174698	33.0	1558939	43.3
3.Marmara	27462	5.8	213857	5.9
4.Akdeniz	103172	19.5	706105	19.6
5.Kuzeydoğu	1657	0.3	11256	0.3
6.Güneydoğu	69882	13.2	369082	10.3
7.Karadeniz	1222	0.2	8727	0.2
8.Orta doğu	34593	6.5	96305	2.7
9.Orta güney	81127	15.3	496628	13.8
<b>Toplam</b>	<b>530000</b>	<b>100</b>	<b>3600000</b>	<b>100</b>

Dünya'da bağ alanları yönünden 4. sırada yer almamıza rağmen gerek Akdeniz bölgesinde gerekse diğer bölgelerimizde birim alandan elde edilen ürün miktarı oldukça düşüktür. Bu durum bağlarımızda toprak işleme, sulama, gübreleme,

budama, hastalık ve zararlılarla mücadele gibi uygulamaların gerektiği kadar yapılamadığının bir göstergesidir.

Çizelge 1.2. Akdeniz Tarım Bölgesi illerinin bağ alanı (ha) ve üzüm üretim miktarları (ton)

İller	Alan (ha.)	Üretim (Ton)
Adana	7485	37871
Antalya	2486	20699
İçel	18853	149530
Kahramanmaraş	24974	91289
Gaziantep	30430	143060
Hatay	4987	37630

Çizelge 1.3. Gaziantep ili bağ alanlarının ilçe düzeyindeki dağılımı

İlçe Adı	Sofralık	Kurutmalık	Şaraplık	Toplam	Oran (%)
Şahinbey	1336	4100	1900	<b>7336</b>	27
Şehitkamil	2000	2600	2058	<b>6658</b>	25
İslahiye	4500	480	820	<b>5800</b>	22
Nizip	949	1450	200	<b>2599</b>	10
Karkamış	200	1600	0	<b>1800</b>	7
Oğuzeli	360	530	370	<b>1260</b>	4
Araban	500	610	0	<b>1110</b>	4
Yavuzeli	100	170	0	<b>270</b>	1
Nurdağı	40	43	0	<b>83</b>	0.3
<b>Toplam</b>	<b>9985</b>	<b>11583</b>	<b>5348</b>	<b>26916</b>	<b>100</b>

Bağlarda zarar yapan fungal ve bakteriyel hastalıklar kimyasal savaş yöntemleri ile kontrol edilebilmektedir ancak virüs, viroid ve viroid benzeri hastalıklar açısından böyle bir avantaja sahip olunmaması bu hastalıkların önemini

arttırmaktadır (Cramer, 1967; Martelli ve Savino, 1988; Szychowski ve ark., 1995). Bugüne kadar bağlarda 60'dan fazla virüs, viroid ve viroid benzeri etmen saptanmıştır (Martelli, 1999).

Viroidlerin oluşturdukları belirtilerin genellikle virüs belirtileri ile benzerlik göstermelerinden, başlangıçta gelişim geriliği olarak nitelendirildiklerinden ve hiç belirtil oluşturmaksızın latent durumda kalabildiklerinden dolayı keşifleri oldukça geç olmuştur.

İlk viroid bundan 40 yıl önce (Diener ve Raymer, 1967), bağ viroidleri ise yaklaşık 20 yıl önce belirlenmiştir (Sano ve ark., 1985).

Bugüne kadar bilinen 5 adet bağ viroidi vardır. Bunlardan sadece ikisi hastalık etmeni olarak kabul edilmektedir. Bunlar; *Grapevine yellow speckle viroid 1* [*Bağ sarı benek viroidi-1* (GYSVd-1)] ve *Grapevine yellow speckle viroid 2* [*Bağ sarı benek viroidi -2* (GYSVd-2)]'dir (Koltunow ve Rezaian, 1988 ve 1989a). Bu iki viroid *Grapevine yellow speckle* [*Bağ sarı benek* (BSB)] hastalığını oluşturan etmenlerdir.

*Bağ sarı benek* hastalığının makroskopik olarak gözlenebilen spesifik belirtisi bağ yapraklarında sarı beneklenme (yellow speckle) ve damar bantlaşması (vein banding) belirtileridir. Sarı beneklenme yaprakların ana ve yan damarları arasında serpilmiş gibi görünen sarı noktalar veya beneklerden oluşmaktadır. Damar bantlaşması ise ana ve yan damarlar boyunca sarı noktalar, benekler veya bantlar şeklinde belirt oluşturur. *Grapevine fanleaf virus*'ü (GFLV) ile GYSVd'leri bir arada bulunması ile sinerjik etki oluşturarak daha da şiddetli damar bantlaşmasının ortaya çıktığı bildirilmektedir (Taylor ve Woodham, 1972; Szychowski ve ark., 1995; Little ve Rezaian, 2003).

*Bağ sarı benek* hastalığı Dünya'da oldukça yaygın olarak bulunup, yapraklarda sarı beneklerin fotosentezi engellediği bundan dolayı da ürün kayıpları oluşturduğu bildirilmiştir. Bu hastalık için bir çok ülkede kontrol stratejisi olarak eradikasyon ve sağlıklı üretim materyalinin kullanımı uygulanmaktadır. Bu hastalığın çoğaltma materyali, azda olsa tohum ya da polen ile taşınıp, mekanik yollar ve vektörler ile taşınmadığı, otsu konukçularının ise belirlenmediği bilinmektedir (Randles, 2003).

GYSVd-1 ve 2 viroidleri protein kılıfları olmadıkları için serolojik yöntemler ile teşhis edilemezler. Otsu konukçuları olmadıkları için otsu indikatör bitkilerle biyolojik indeksleme bu viroidlerin tanılmasında uygulanamamaktadır (Reisner ve Gross, 1985; Semancik, 1987). GYSVd-1 ve 2 viroidleri moleküler tekniklerle ve bağlarda oluşturdukları makroskobik belirtileri ile teşhis edilebilmektedirler. İki yönlü ardışık poliakrilamid jel elektroforez [sequential poliakrilamid gel electrophoresis (sPAGE)] ve polimeraz zincir reaksiyon [Reverse transkripsiyon (RT)-Polymerase Chain Reaction (PCR) =RT-PCR] analizleri günümüzde en çok kullanılan moleküler düzeyde viroid teşhis yöntemleridir (Flores ve ark., 1985; Semancik, 1987 ve Syzchowski ve ark., 1988).

Dünya’da GYSVd-1 ve 2 viroidleri Çin, Avrupa, Amerika ve Avustralya gibi bağcılığın yoğun yapıldığı pek çok ülkeden bildirilmiştir (Stellmach ve Goheen, 1988; Semancik ve Syzchowski, 1992; Li ve ark., 2005).

Ülkemizde ilk kez 1990 yılında 6 üzüm çeşidi örneğinden sadece 1 örnek Devegözü çeşidinde GYSVd-1, GYSVd-2 ve *Hop stunt viroid-grapevine* (HSVd-g) bulunmuş, diğer 5 örnekte ise GYSVd-1 ve HSVd-g viroidleri saptanmıştır (Minafra ve ark., 1990).

Ülkemizde detaylı çalışmalar ise ilk kez Doğu Akdeniz Bölgesi Adana, Hatay ve İçel illerindeki üzüm çeşitlerinde ve anaçlarda GYSVd-1, GYSVd-2, HSVd-g ve *Citrus exocortis viroidi-grapevine* (CEVd-g) viroidlerinin olduğu sPAGE ve RT-PCR yöntemleri ile incelenerek rapor edilmiştir (Önelge ve Gazel, 2001; Gazel ve Önelge, 2002; Gazel, 2002).

Gaziantep ili bağ alanlarında yapılan çalışmalar sonucunda dünyada var olan *Asma yaprak kıvrıcılık virüsü* type-III (GLRV-III), *Asma kısa boğum virüsü* (GFLV), *Arabis mozaik virüsü* (ArMV) ve *Asma yaprak kıvrıcılık virüsü* type-I (GLRV-I)’nin varlığı ortaya konulmuştur (Sarpkaya, 2003). Ancak günümüze kadar Gaziantep ilinde bağ viroidleri ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışma Gaziantep ili ve ilçelerinde geleneksel ve organik bağ üretim alanları ile fidanlıklarda *Bağ sarı benek* hastalığının durumunu belirlemek, hastalığın etmeni olan GYSVd-1 ve 2’yi moleküler yöntemlerle araştırmak amacıyla yürütülmüştür.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Viroidlerin oluşturduğu simptomlar genellikle virüs simptomları ile benzerlik gösterdiği için yıllardır virüsler ile karıştırılmış ya da gelişim geriliği olarak nitelendirilmiş, bazen de hiç simptom oluşturmadan latent durumda kalabildikleri için keşifleri oldukça geç olmuştur.

Viroidler ilk kez bundan 40 yıl önce patatesten daha önce bir virüs hastalığı olarak düşünülen, *Potato Spindle Tuber (Patates İğ Yumru)* (PSTVd) hastalığında keşfedilmiştir. Hastalık araştırıldığında aslında hastalığın bir virüs hastalığı olmadığı, virüsten daha düşük moleküler ağırlığa sahip, protein manto içermeyen infeksiyöz ribonükleik asitlerden (RNA) kaynaklandığı bulunmuştur. Bu RNA'ları tanımlamak için viroid terimi kullanılmıştır (Diener ve Raymer, 1967).

Viroidlerin hastalık etmeni olarak düşük moleküler ağırlığa sahip, protein mantosu olmayan, tek zincir, halka formunda, kapalı kovalent bağları bulunan ve kendi kendine replike olabilen RNA'lardan oluşan bir patojen grubu olduğu bildirilmiştir. Ayrıca viroidlerin çoğaltma metaryali ile taşındığı ve ısıya son derece dayanıklı (en az 20 °C ve 35 °C bile artış gösterir) oldukları tespit edilmiştir. Araştırmacılar 246-401 nükleotid arasında değişen geniş baz çiftine sahip olduğu keşfedilen viroidleri çubuk benzeri ikincil yapıda ve sadece çiçekli bitkilerde zarar oluşturduğunu gözlemlemişlerdir (Sanger ve ark., 1976; Keese ve Symons, 1985; Flores ve ark., 2005).

Viroidler keşfedildikten sonra sebebi bilinmeyen bir çok hastalığın kaynağının viroid olduğu bulunmuş ve bu güne kadar yaklaşık 30 farklı viroid türü tanımlanmıştır (Çizelge 2.1) (Flores ve ark., 2005). Viroidlerin ekonomik ürün kayıpları oluşturduğu bildirilen bazı bitkiler patates, bağ, turunçgil, hindistan cevizi, şerbetçiotu, domates, avokado, şeftali, elma, armut, patlıcan ve krizantemdir (Çizelge 2.2). Bazı viroidler geniş bir konukçu spektrumuna sahiptir. Örneğin, *Hop stunt viroid*'i (HSVd), *Carnabaceae*, *Vitaceae*, *Cucurbitaceae*, *Rosaceae* ve *Rutaceae*; *Turunçgil exocortis viroid*'i (CEVd) *Rutaceae*, *Vitaceae*, *Compositae* ve *Solanaceae* familyalarındaki bir çok türde infeksiyona neden olmaktadır (Singh ve ark., 2003).

Çizelge 2.1. Viroidlerin sınıflandırması (Flores ve ark., 2005)

<b>Familiya Pospiviroidae</b>			
<b>Tür adı</b>	<b>Kısa adı</b>	<b>Nükleotid sayısı</b>	<b>Cins adı</b>
<i>Potato spindle tuber viroid</i>	PSTVd	356,359-360	Pospiviroid
<i>Chrysanthemum stunt viroid</i>	CSVd	354,356	
<i>Citrus exocortis viroid</i>	CEVd	370-375,463	
<i>Columnea latent viroid</i>	CLVd	370,372	
<i>Iresine 1 viroid</i>	IrVd	370	
<i>Mexican papita viroid</i>	MPVd	360	
<i>Tomato apical stunt viroid</i>	TASVd	360-363	
<i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i>	TCDVd	360	
<i>Tomato planta macho viroid</i>	TPMVd	360	
<i>Hop stunt viroid</i>	HSVd	295-303	Hostuviroid
<i>Coconut cadang-cadang viroid</i>	CCCVd	246-247,287-301	Cocadviroid
<i>Coconut tinangaja viroid</i>	CTVd	254	
<i>Hop latent viroid</i>	HLVd	256	
<i>Citrus viroid IV</i>	CVd-IV	284	
<i>Apple scar skin viroid</i>	ASSVd	329-330	Apscaviroid
<i>Apple dimple fruit viroid</i>	ADFVd	306-307	
<i>Australian grapevine viroid</i>	AGVd	369	
<i>Citrus bent leaf viroid</i>	CBLVd	318	
<i>Citrus viroid III</i>	CVd-III	294,297	
<b>Grapevine yellow speckle viroid-1</b>	<b>GYSVd-1</b>	<b>366-368</b>	
<b>Grapevine yellow speckle viroid-2</b>	<b>GYSVd-2</b>	<b>363</b>	
<i>Pear blister canker viroid</i>	PBCV-d	315-316	
<i>Coleus blumei viroid-1</i>	CbVd-1	248, 250-251	Coleviroid
<i>Coleus blumei viroid-2</i>	CbVd-2	301-302	
<i>Coleus blumei viroid-3</i>	CbVd-3	361-362, 364	
<b>Familiya Avsunviroidae</b>			
<b>Tür adı</b>	<b>Kısa adı</b>	<b>Nükleotid sayısı</b>	<b>Cins adı</b>
<i>Avocado sunblotch viroid</i>	ASBVd	246-250	Avsunviroid
<i>Peach latent mosaic viroid</i>	PLMVd	337	Pelamoviroid
<i>Chysanthemum chlorotic mottle viroid</i>	CChMVd	399	
<i>Eggplant latent viroid</i>	ELVd	333	Elaviroid

Çizelge 2.2. Bazı viroidlerin zarar oluşturdukları konukçu bitkiler (Singh ve ark., 2003)

Viroid	Ana konukçusu	Familya	Diğer konukçuları
HSVd	Şerbetçiotu	<i>Carnabaceae, Rosaceae, Rutaceae, Vitaceae, Cucurbitaceae</i>	Turunçgiller, <b>bağ</b> , hıyar, erik, şeftali, armut
CEVd	Turunçgiller	<i>Rutaceaea, Vitaceae, Compositae, Solanaceae</i>	Bakla, havuç, krizantem, patlıcan, <b>bağ</b> , petunya, patates, domates, şalgam, kirli hanım çiçeği
CCCVd	Hindistan cevizi	<i>Palmae</i>	<i>Buri palm, African oil palm, Manila palm, Royal palm, Palmera</i>
ASBVd	Avokado	<i>Lauraceae</i>	Tarçın
PLMVd	Şeftali	<i>Rosaceae</i>	Sert çekirdeklilerden: erik, kayısı, kiraz. Yumuşak çekirdeklilerden:armut
ChCNVd	Krizantem	<i>Compositae</i>	<i>Chrysanthemum morifolium</i>
PSTVd	Patates	<i>Solanaceae</i>	Domates, Kıbrıs kavunu, avokado
TCDVd	Domates	<i>Solanaceae</i>	<i>Nicandra physaloides, Physalis spp.</i>
GYSVd	Bağ	<i>Vitaceae</i>	

Bazı viroidlerin ise sınırlı yada kendilerine özgü doğal konukçulara sahip olduğu yapılan araştırmalarda ortaya konulmuştur. Örneğin GYSVd-1, GYSVd-2 ve *Australian grapevine viroid*'lerinin (AGVd) sadece *Vitaceae* familyasında bulunduğu araştırmacılar tarafından belirtilmektedir (Flores ve ark., 2005).

Viroidlerin Dünya'da yaygın bir şekilde bulunduğu ve önemli ekonomik kayıplar oluşturduğu bildirilmiştir (Çizelge 2.3.). Viroidlerin öldürücü, şiddetli, orta şiddetli, değişebilen, bodurluk oluşumu gibi zarar şekillerinin bulunduğu, bunların da ürün ve kalite kaybına neden olduğu ortaya konulmuştur (Randles, 2003).

*Coconut cadang-cadang viroid* (CCCVd) 'inin Filipinlerde 30 milyondan fazla hindistan cevizini öldürdüğü ve 500000 den fazla ağacın her yıl bu yüzden yok olduğu bildirilmiştir (Hanold ve Randles, 1991; Randles ve Rodriguez, 2003).

Çizelge 2. 3. Bazı viroid hastalıklarının genel özellikleri (Hadidi ve ark., 2003)

Viroid	Ekonomik konukçu	Yayılışı	Verdiği zarar	Ürüne etkisi	Yayılış Şekli				Kontrol stratejisi
					Çoğaltma materyali	Tohum/ Polen	Böcek	Mekanik	
ASBVd	Avokado	Yaygın	Şiddetli	Ürün azalması	+	+	-	-	Eradikasyon
CCCVd&CTiVd	Hindistancevizi	Sınırlı	Öldürücü	Ürün yenileme	Uygulana mayabilir	Düşük oran	Bilinmiyor	Bilinmiyor	Karantina
Turunçgil viroidleri	Turunçgil	Yaygın	Değişebilir	Ürün azalması	+	-	-	+	Eradikasyon
Bağ viroidleri	Bağ	Yaygın	Değişebilir	Gelişimini etkiler	+	+	-	-	Eradikasyon
HSVd	Şerbetçiotu	Sınırlı	Orta	Ürün kalitesi	+	-	-	+	Eradikasyon
HSVd	Hıyar	Sınırlı	Suluk meyve	Ürün kalitesi	-	-	-	+	Eradikasyon
PSTVd	Patates	Sınırlı	Orta	Ürün kalitesi	+	-	-	+	Eradikasyon
PSTVd	Domates	Sınırlı	Bodurluk	Ürün kalitesi	Uygulana mayabilir	+	+	+	Eradikasyon
TPMVd	Domates	Sınırlı	Şiddetli	Üründe azalma	Uygulana mayabilir	Bilinmiyor	+	+	Eradikasyon

PSTVd' nin genelde bodurluk oluşturarak % 40-45 ürün kaybına neden olduğu ve bu viroidin şiddetli ırklarında ürün kaybının % 64 oranına ulaştığı bildirilmiştir (Singh, 1988). HSVd 'nin 1968 yılında Japonya'da şerbetçi otu yetiştirilen alanlarda % 60'a varan bulaşıklıklara sebebiyet verdiği rapor edilmiştir (Yamamoto ve ark., 1973). *Hop latent viroid* (HLVd)'inin İngiltere'de bazı ticari şerbetçi otu üretim alanlarında % 90'a varan hastalık oluşturduğu tespit edilmiştir (Barbora ve ark., 1990).

Ülkemizde ise Doğu Akdeniz bölgesinde turunç üzerine üretilen turunçgillerde simptom gözükmemeyle birlikte yoğun olarak CEVd ile bulaşık olduğu ve *Citrus cachexia viroid* (CCaVd)'inin mandarin çeşitlerinde ekonomik ölçüde zarar oluşturduğu bildirilmiştir (Güllü, 1989; Önelge, 1994).

Viroidlerin birçok konukçuya mekanik ve çoğaltma materyali ile taşındığı bildirilmiş (Çizelge 3), ayrıca viroidlerin polen, tohum ve böceklerle düşük oranda da olsa taşındığı ortaya konulmuştur (Diener, 1987; Hull, 2002).

Son taksonomik çalışmalarda viroidlerin iki familyaya ayrıldığı, bunların *Pospiviroidae* ve *Avsunviroidae* familyaları olduğu bildirilmiştir (Çizelge 1). Viroidlerin bilinen 30' a yakın türünün *Pospiviroidae* familyası içerisinde yer aldığı belirtilmiştir (Flores ve ark., 2005).

*Pospiviroidae* familyasının tipik türünün PSTVd olduğu (Diener, 1971; Gross ve ark., 1978), çubuk benzeri yapıya sahip bulunduğu ve sekonder yapısının (Sanger ve ark., 1976; Ding ve Owens, 2003) 5 farklı yapısal bölge içerdiği bildirilmiştir. Bu bölgelerin iyi korunmuş bir merkez (C) bölge, patojenite (P) bölgesi, değişken (V) bölge, sağ (TR) ve sol (TL) terminal bölge olduğu rapor edilmiştir (Keese ve Symons, 1985, 1987; Sano ve ark., 1992; Flores ve ark., 2005).

*Avsunviroidae* familyasının tipik türü *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd)'dir. Korunmuş bir merkez bölgeye sahip değildir. Fakat kendi kendine yarıлма özelliği gösteren çekiç başı yapısına sahip olup, bu familya üyelerinin ribozim aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir (Flores ve ark., 2000). Diğer üyeleri *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) (Hernandez ve Flores, 1992; Bussiere ve ark., 2000), *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd) (Navarro ve Flores, 1997) ve yeni bir üye olan *Eggplant latent viroid* (ELVd) 'dir (Fadda, 2003).

Bağ viroidleri 20 yıl kadar önce, ilk kez Japonya'daki bağ alanlarında *Hop stunt viroid - grapevine* (HSVd-g)'in varlığı ortaya konularak saptanmıştır (Shikata ve ark., 1984; Sano ve ark., 1985).

GYSVd-1-2 ilk kez Avusturalya'da Taylor ve Woodham (1972) tarafından *Grapevine yellow speckle disease* (Bağ sarı benek hastalığı) (BSB) olarak tanımlanmıştır. Sonradan bu hastalığa viroid etmenleri olarak GYSVd-1 ve GYSVd-2'nin neden olduğu bildirilmiştir (Koltunow ve Rezaian, 1988; Koltunow ve ark., 1989).

Bundan sonra birçok ülkede bağ viroidlerinin varlığı bildirilmiştir. En son taksonomiye göre 5 tane bağ viroidi tanımlanmıştır (Çizelge 2.4). Bunlardan iki tanesinin özellikleri birbirlerine çok yakın olan *Grapevine yellow speckle viroid 1* (Bağ sarı benek viroidi-1 (GYSVd-1)) ve *Grapevine yellow speckle viroid 2* (Bağ sarı benek viroidi -2 (GYSVd-2)) olduğu (Koltunow ve Rezaian, 1988; 1989a), diğerlerinin *Australian grapevine viroid* (Avustralya bağ viroidi (AGVd)) (Rezaian, 1990), *Hop stunt viroid- grapevine* (Şerbetçiotu cüceleşme viroidi-bağ (HSVd-g)) (Sano ve ark., 1985) ve *Citrus exocortis viroid- grapevine* (Turunçgil exocortis viroid-bağ=CEVd-g) (Garcia-Arenal ve ark., 1987) olduğu bildirilmiştir (Little ve Rezaian, 2003).

Tanımlanmış bağ viroidlerinin tamamının *Pospiviroidae* familyası içinde yer aldığı rapor edilmiştir (Çizelge 2.1). Bunlardan GYSVd-1, GYSVd-2, AGVd'nin Apscaviroid cinsi içinde yer aldığı, diğer iki bağ viroidinden, HSVd-g'nin *Hostuviroid* cinsi ve CEVd-g'in *Pospiviroid* cinsine ait olduğu son sınıflandırmada belirtilmiştir (Flores ve ark., 2005).

Çizelge 2.4. Bağlarda bilinen viroidler (Little ve Rezaian, 2003)

Bağ viroidleri	Nükleotid sayısı	Bağdaki patojenitesi	Otsu konukçusu	Sinonimi	Kaynak
GYSVd-1	366	sarı benek	bilinmiyor	GVd-f, GV-I	Koltunow ve Rezaian, 1988
GYSVd-2	363	sarı benek	bilinmiyor	GV-2, GV-IB	Koltunow ve Rezaian, 1989a;1989b
AGVd	369	simptom yok	hıyar	bilinmiyor	Rezaian, 1990
HSVd-g	297	rapor edilmemiş	hıyar	GV-3	Sano ve ark., 1985
CEVd-g	369	rapor edilmemiş	domates	GV-s	Garcia-Arenal ve ark., 1987

GYSVd-1, GYSVd-2 ve AGVd'nin sadece bağlarda bulunduğu ve diğer iki viroid olan HSVd-g ve CEVd-g'nin diğer bitki türlerinde de zarar yaptığı ve çok farklı bitki gruplarından izole edildiği bildirilmiştir (Flores ve ark., 2005).

Bağ viroidlerinin genel olarak gelişim geriliğine ve üretimde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Randles (2003), GYSVd-1 ve GYSVd-2'nin dünyada yaygın bir şekilde bulunduğunu ve bağlarda gelişim geriliğine sebep olduğunu belirtmiştir.

HSVd-g'a Japonya'da bütün bağ koleksiyon parsellerinde, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'dan ithal edilen stoklarda rastlandığı belirtilmiştir (Sano ve ark., 1985). HSVd-g başta Avustralya'da olmak üzere Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da yetiştirilen anaç ve üzüm çeşitlerinde rapor edilmiştir. Bu viroidin dünyadaki bağ alanlarında geniş bir alanda yayılıma sahip olabileceği ve hatta bütün bağların potansiyel olarak HSVd-g ile infekteli olabileceği vurgulanmıştır (Sano ve ark., 1986; Semancik ve ark., 1987; Koltunow ve ark., 1988).

Bağ viroidlerinden bugüne kadar tek hastalık etmeni olarak bilinen GYSVd-1 ve GYSVd-2 simptomlarının sarı beneklenme (yellow speckle) olarak adlandırılan, yan veya ana damarlar arasına serpilmiş sarı beneklenmeler olduğu, diğer bir simptomun ise damar bantlaşma simptomu (vein banding) olarak adlandırılan ana ve yan damarların, damar boyunca sararak belirginleşmesi şeklinde olduğu bildirilmiştir. *Grapevine fanleaf virus*'ü (GFLV) ile GYSVd'lerinin bir arada bulduklarında sinerjik etki oluşturarak şiddetli damar bantlaşmasına neden

oldukları ispatlanmıştır. Fakat bu semptomların oluşmasının uygun iklimik şartlara bağlı olduğu, sıcaklıklar arttıkça (30-35 °C üstü) semptomların daha iyi geliştiği rapor edilmiştir. HSVd-g ve CEVd-g viroidlerinin spesifik hastalık semptomlarının bilinmediği ve AGVd'nin ise bağlarda henüz rapor edilmiş bir semptomunun olmadığı bildirilmiştir (Taylor ve Woodham, 1972; Little ve Rezaian, 2003).

GYSVd'nin neden olduğu damar bantlaşması hastalığının Kaliforniya ve Avrupa'da yaygın olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiş ve viroidlerden arı *Vitis vinifera* çeşitlerinden Cabernet Sauvignon ve Sauvignon Blanc ile kurulmuş bağ alanında bağ viroidleri ile GFLV arasındaki ilişki araştırılmıştır. Bu çalışmada damar bantlaşması semptomu gösteren çeşitlerden GYSVd-1, GYSVd-2, HSVd ile birlikte GFLV izole edilmiştir. Sauvignon Blanc çeşidinde sadece HSVd ve GFLV izole edilmiş fakat damar bantlaşma semptomuna rastlanamamıştır. Damar bantlaşma semptomunun GYSVd-1 veya GYSVd-2 ile birlikte GFLV olduğunda ortaya çıktığı tespit edilmiştir (Szychowski ve ark., 1995). İtalya'da bağlarda da GYSVd-1 ve HSVd'nin her ikisi ile bulaşık omcalarda semptom gözükmediği halde bazen damar bantlaşması semptomlarına rastlanmıştır. Ayrıca semptom göstermeyen fakat yoğun GYSVd-1 ile bulaşık materyal GFLV ile infektelendiğinde yoğun damar bantlaşması semptomu göstermiştir. GFLV ile GYSVd-1 veya GYSVd-2'nin birlikte bulunması damar bantlaşması oluşturduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Szychowski ve ark., 1995).

GYSVd-1 ve GYSVd-2'nin GFLV ile birlikte bulunduğu omcalarda görülen damar bantlaşması hastalığının hassas varyetelerde % 80'e varan ürün kayıplarına neden olduğu bildirilmiştir (Martelli ve Savino, 1988).

Bağlarda viroidlerin karışık infeksiyonları gözlenmiştir. Bir veya daha fazla viroidin karışık infeksiyonunda ürün kalitesinde dejenerasyon meydana geldiği rapor edilmiştir (Little ve Rezaian, 2003).

GYSVd-1 ilk kez *Bağ sarı benek* hastalığı ile infekteli Cabernet Franc üzüm çeşidinden izole edilmiştir (Koltunow ve Rezaian, 1988). Bağ dokularında GYSVd-1 düşük oranda (yaprak dokusunu (kg) /RNA (1µg)) bulunmaktadır (Rezaian ve ark., 1988). GYSVd-2 *Bağ sarı benek* hastalığı, bununla infekteli "Dogridge" anacı

üzerine aşılı "Kyoto" üzüm çeşitinden purifiye edilmiştir (Koltunow ve Rezaian, 1989a).

AGVd'i, GYSVd-1, GYSVd-2, CEVd-g ve HSVd-g içeren omcalardan izole edilmiştir. AGVd'nin diğer 4 viroidden elektroforetik özellikleri, hıyarda ve domateste çoğalma yeteneği ve hibridizasyondaki özelliklerinden dolayı ayırt edildiği bildirilmiştir (Rezaian ve ark., 1988).

CEVd-g Japonya, Avustralya ve Kaliforniya'da susuz bağ alanlarından izole edilmiştir (Flores ve ark., 1985; Rezaian ve ark., 1988; Semancik ve Szychowski, 1992).

GYSVd-1, GYSVd-2 ve HSVd-g bağ viroidlerinin en az bir veya birden fazlasının Kaliforniya'daki ticari bağlarda ve üretim bloklarındaki *Vitis* çeşitlerinde ve anaç seleksiyonlarında var olduğu bildirilmiştir (Semancik ve ark., 1987; Szychowski ve ark., 1988).

GYSVd-1 ve HSVd-g'nin Avrupa ve Kaliforniya'da üzüm çeşitlerinde en yaygın viroid oldukları, GYSVd-2'nin sofralık üzüm çeşitlerinde daha yaygın olduğu ve GYSVd-1 ve GYSVd-2'nin bilinen başka alternatif konukçusu olmadığı bildirilmiştir (Semancik ve Szychowski, 1992).

GYSVd-1, GYSVd-2'nin Avustralya'da ve Kaliforniya'daki pek çok üzüm çeşidinde yaygın olduğu, fakat sarı benek semptomlarının oluşumu için belirli iklimik şartlara gerek duyulduğu, semptomların yaz ayları boyunca daha belirgin olduğu ve sadece ısı muamelesi ile *Bağ sarı benek* hastalığının elimine edilemeyeceği belirlenmiştir (Stellmach ve Goheen, 1988).

CEVd-g Avrupa, Amerika ve Avustralya'daki üzüm çeşitlerinde tespit edilmiştir (Garcia-Arenal ve ark., 1987; Rezaian ve ark., 1988; Szychowski ve ark., 1988).

Çin'de 2002-2005 yıllarında yapılan bir sörvey çalışmasında 70 adet toplanan asma yaprak örneğinden 41'i HSVd-g, 29'u GYSVd ile ve 1 örneğin de AGVd-benzeri viroid ile bulaşık bulunduğu ve CEVd-g viroidinin bulunmadığı saptanmıştır. Ayrıca 23 örnek HSVd-g ve GYSVd ile bulaşık olup 1 örneğin de AGVd-benzeri viroid, HSVd-g ve GYSVd ile bulaşık olduğu bildirilmiştir (Li ve ark., 2005).

CEVd-g, HSVd-g ve AGVd'nin hıyara, domatese ve viroidden ari bağlara mekanik olarak taşınabildiği ve bağlarda gözle görülebilir simptom oluşturmadıkları saptanmıştır (Rezaian, 1990).

Viroidler RNA'lardan oluştuğu ve protein manto içermedikleri için tanımlanmalarında serolojik teknikler kullanılamamaktadır. Elektron mikroskobu denemelerinin viroidlerin rutin olarak tanısında başarılı olmadığı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Riesner ve Gross, 1985).

Günümüzde viroidlerin en uygun tanılama işleminin viroid bandlarının elektroforetik olarak tanısının yapıldığı jel elektroforez yöntemi, PCR ve moleküler hidridizasyon yöntemleri olduğu bildirilmiştir (Flores ve ark., 1985; Semancik, 1987; Syzchowski ve ark., 1988).

Schumacher ve ark. (1983), hibridizasyon teknikleri ile viroidlerin teşhisinin oldukça duyarlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu fakat cDNA probleminin hazırlanması ve radyoaktif materyalin kullanılması için özel laboratuvar ve laboratuvar gereçleri ile birlikte deneyimli teknik personelin bulunması gerektiğini bildirmişlerdir.

Elektroforez terimi genellikle elektrik yüklü bir alan etkisi altında belirli bir solüsyon içinde küçük iyonların ve yüklü makromoleküllerin hareket ettirilmesini ifade etmektedir. Bu prensipten yararlanılarak RNA'ların belirli bir büyüklükte ayrımı, uygun delik büyüklüğü içindeki jelde başarılmaktadır (Gierson, 1982).

Elektroforez işlemi tüpler veya belirli boydaki plaka jeller içinde gerçekleştirilmektedir. Agar ve poliakrilamid olmak üzere farklı jel materyallerinin kullanılabilmesi bildirilmektedir. Poliakrilamid jellerin akrilamid ve N',N'-metylenbisakrilamide karışımı ile hazırlanabileceği, polimerizasyonun ise % 0,05 Tetramethylenediamine (TEMED) kullanılarak sağlanabileceği araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Schumacher ve ark., 1983; Semancik, 1987).

Poliakrilamid jel elektroforez (poliakrilamid gel electrophoresis (PAGE)) analizi baştan beri viroidleri araştırmada anahtar bir rol oynamıştır. Diener (1971) ile Semancik ve Weathers (1972) önderliğinde yapılan çalışmalar, PSTVd ve CEVd'lerinin moleküler ağırlığının virüslerinkinden çok daha küçük olduğunu

göstermek için sukroz densiti gradient santrifüjlemesi ve poliakrilamid jel elektroforez kombinasyonunu kullanmışlardır.

PAGE yöntemi ile infekteli bitki dokularından kısmi olarak nükleik asitlerin ekstrakte edilmesi ve jel elektroforezde viroidlerin doğrusal ve halkasal formlarının ayırt edilmesinin 8 saat gibi kısa bir sürede tamamlanabileceği rapor edilmiştir (Riesner ve Gross, 1985).

Viroidlerin saflaştırma işlemleri genellikle iki aşamada gerçekleştirilmektedir. Bunlardan birincisi düşük moleküler ağırlıktaki RNA ekstraktının hazırlanması, ikincisi ise bu ekstraktan viroid RNA'sının saflaştırılmasıdır (Riesner ve Gross, 1985).

Szychowski ve ark. (1988) 5 g kadar oldukça az miktardaki genç asma yapraklarının suya doymuş fenol içeren ekstraksiyon ortamı ile ezilmesi ve santrifüjlenmesinden sonra nükleik asit örneklerinin CF-11 selüloz ile kromatografiden geçirilip kolonların % 30 etanol içeren STE tampon çözeltisiyle bir kaç kez yıkandıktan sonra 4M LiCl çökeltilmesi yapılarak nükleik asitlerin elde edilebileceğini bildirmişlerdir.

Schumacher ve ark. (1983) tarafından geliştirilen iki yönlü ardışık poliakrilamid jel elektroforez tekniği [sequential poliakrilamid gel electrophoresis (sPAGE)] ile kısmi olarak saflaştırılan RNA'ların birbirinden ayırt edilebildiği belirtilmiştir. Araştırmacılar bu yöntemle tek bir jel üzerinde çok sayıda örneğin aynı anda analiz edilebileceğini rapor etmişlerdir.

Semancik (1986) tarafından geliştirilmiş sPAGE yönteminin, turuncgil ve bağları etkileyen viroid komplekslerini belirlemede de yaygın olarak kullanılabileceği araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Duran-Vila ve ark., 1986; Duran-Vila ve ark., 1988).

sPAGE tekniğinde, nükleik asit örneklerinin ilk jelde doğal olarak yürütüldüğü, ikinci jelde ise ürenin denatüre edici (dPAGE) olarak kullanıldığı ve böylece doğrusal ve halkasal yapı RNA moleküllerinin ayırımının yapılabileceği bildirilmiştir (Semancik, 1987).

PAGE tekniğinde viroidlerin göç hızından yaklaşık iki kat daha fazla hıza sahip olan bromofenol mavisi ile viroidlerle aynı hıza sahip xylene-cyanol'un belirteç olarak kullanılabilmesi belirtilmektedir (Gierson, 1982).

Elektroforezi takiben viroidlerin ya elektroforez tamponundaki 0.5 mg/ml etidium bromid (Sambrook ve ark., 1989) veya toluidin mavisi (Palukaitis ve Symons 1980) ile (Suda % 0,05) ya da gümüş nitrat (Sammons ve ark., 1981; Igloi, 1983) ile boyanarak görüntülenebildiği belirtilmiştir. Boyama protokolünü üç faktörün belirlediği rapor edilmiştir. Birincisi, mevcut viroid RNA miktarı (gümüş boyama en hassastır, toluidin mavisi en az hassas) ikincisi, boyama süresi (Etidium bromid boyaması 10-15 dk kadar kısa bir sürede tamamlanır ve boya kaybolmaz), üçüncüsü ise analiz edilen RNA'nın ne amaçla kullanıldığıdır (Hanold ve ark., 2003).

İlk jeli 0,5 mg/ml ethidium bromid ile 5-10 dakika boyanarak CEVd ve ASBVd'nin gözleendiği, ancak diğer viroidlerin gözlenmediği, bu durumun viroid hattının belirlenmesinde yararlı olduğu bildirilmektedir (Duran-Vila ve ark., 1988).

İlk jelden çıkarılan viroid hattının ikinci jel üzerine veya jelin alt kısmına yerleştirilerek denatüre edici jel ile (dPAGE) teması sağlanıp ikinci bir yürütme işlemi ile viroidlerin moleküler ağırlıklarına göre ayırımının yapılabileceği bildirilmiştir (Schumacher ve ark., 1983; Semancik ve ark., 1988a;1988b).

Semancik (1986), daha önce tanımladığı yöntemi modifiye ederek % 5'lik poliakrilamid jel'i pH 6.5 TAE tampon çözeltisi içinde hazırlamış ve TBE yürütme çözeltisi içinde (pH 8.3) viroidlerin yavaş hareket eden halka formlarını birbirinden ayırt etmiştir.

Ethidium bromid ile poliakrilamid jel'in içinde boyanması (0,5 µg/ml 10 dakika) gerekli olan nükleik asit hattının görülmesi ve bu hattın kesilerek ikinci jele yerleştirilmesi sağlanırken, aynı zamanda viroidlerin biyolojik olarak aktif bir durumda elde edilmesinin de sağlandığı bildirilmiştir (Igloi, 1983).

Viroidlerin tanımlanmasında daha duyarlı bir boyama yöntemi olan gümüş nitrat (AgNO<sub>3</sub>) boyama yöntemi Igloi (1983) tarafından tanımlanmıştır. Günümüzde birçok araştırmacı bu yöntemin etidium-bromid yöntemine göre çok daha duyarlı

olduğunu belirtmiş, fakat bu yöntem ile boyamanın viroidleri inaktif duruma getirdiğini de belirtmişlerdir (Semancik, 1987; Duran-Vila ve ark., 1988).

Bitki viroidlerinin teşhisinde PCR yönteminin kullanılabilceği ilk kez 1990'da rapor edilmiştir (Hadidi ve Yang, 1990). Ayrıca bitki viroidlerinin PCR ile tanımlanmasında PCR amplifikasyonundan önce başlangıçta bir reverse transkripsiyon (RT) adımının uygulanması gerektiği bildirilmiştir. Bu adımda RT enzimi ile hedef RNA'ların cDNA'lara dönüştürülmesi gerektiği rapor edilmiştir. Tüm viroid genomlarının PCR'la amplifikasyonu monokotiledon ve dikotiledon bitki varyetelerinde, odunsu veya odunlaşmış materyalleri içeren örneklerde başarıyla yapılabilmektedir (Hadidi ve ark., 1992; Wan Chow Wah ve Symons, 1997).

PCR'ın önemi spesifik DNA veya cDNA sıralarından elde edilen kompleks kalıbın az miktarının amplifiye edilerek çoğaltılması ve bunun bitki viroidlerini tanımlamada önemli bir yöntem olduğu araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. Ayrıca PCR'ın hassas ve doğru olmasındaki diğer bir kriter küçük de olsa tek bir nükleotid mutasyonun sıralamasında oluşabilecek farklılıkların belirlenmesine olanak sağladığı tespit edilmiştir (Hadidi ve Candresse, 2003).

RT-PCR yöntemiyle viroidlerin belirlenmesinde infekteli dokulardan elde edilen toplam nükleik asit miktarının 1-100 pg arasında olduğu ve jel olarak viroidlerin belirlenmesinde cDNA probları kullanılarak yapılan hibridizasyon yöntemlerinden 10-100 kat daha hassas, PAGE yöntemlerinden ise 2500 kat daha hassas olduğu gösterilmiştir (Hadidi ve Yang, 1990).

cDNA probları kullanılarak yapılan nükleik asit hibridizasyon çalışmaları ile ayırt edilemeyen GYSVd-1 ve GYSVd-2 viroidleri viroide spesifik bir primer kullanılarak kolaylıkla ayırt edilebilecekleri bildirilmiştir (Hadidi ve Yang, 1990; Hadidi ve ark., 1991).

GYSVd-1, GYSVd-2 (Rezaian ve ark., 1992), CEVd-g, HSVd-g (Hadidi ve ark., 1992) ve AGVd'inin PCR'la testlenmesinde bağ yapraklarının en uygun doku olduğu belirlenmiştir (Wan Chow Wah ve Symons, 1997).

Moleküler hibridizasyon ve PCR tekniklerinin, iyi tanımlanmış viroidlerin rutin tespitinde PAGE'in yerini önemli oranda almış olduğu bildirilse de, elektroforezin bilinmeyen viroid-benzeri moleküler yapıların belirlenmesinde başlıca

araç olmayı sürdürdüğü kanıtlanmıştır. Viroidlerin araştırılmasında kullanılan bütün moleküler teknikler arasında sadece PAGE yöntemi, hiçbir nükleotid dizi bilgisi gerektirmemektedir. Hedef bilindiğinde, moleküler hibridizasyon ve RT-PCR analizi gibi nükleotid dizi bilgisine dayalı tekniklerin avantajlı olabileceği ancak çok yönlü ve kullanımı kolay PAGE analiz yönteminin viroid araştırmasında kullanılan öncelikli bir teknik olmayı sürdürdüğü rapor edilmiştir (Hanold ve ark., 2003).

Ülkemizde Doğu Akdeniz bölgesindeki bağ çeşitlerinde ve anaçlarda GYSVd-1, GYSVd-2, HSVd-g ve CEVd-g'lerinin olduğu sPAGE ve RT-PCR yöntemleri ile incelenerek rapor edilmiştir. Bu incelemelerde örneklerin tek veya viroid karışımı ile infekteli olduğu belirtilmiştir. İncelenen 184 bağ örneğinde % 20,65 oranında tekli infeksiyonlara ve % 13,04 oranında ise bu viroidlerin karışık infeksiyonlarına rastlandığı belirtilmiştir. Bölgede testlenen bağlarda en yaygın olarak bulunan viroidin % 25,54 oranıyla GYSVd-1 olduğu bunu sırasıyla % 15,21 oranıyla HSVd-g, % 11,41 oranıyla GYSVd-2 ve en düşük olarak da % 2,17 oranıyla CEVd-g'nin izlediği bildirilmiştir. Bu çalışmada sPAGE ile testlenen 15 bağ anaç çeşidinden 10 tanesinin bir veya birden fazla viroidle bulaşık olduğu saptanmıştır. Testlenen 110 R, 1103 P, 5BB, 41 B ve 110 R anaçlarının HSVd-g ile, 5BB ve 41 B anaçlarının GYSVd-1 ile 1103 P anacının ise üçlü infeksiyon olarak GYSVd-1, GYSVd-2 ve HSVd-g ile bulaşık olduğu bildirilmiştir (Önelge ve Gazel, 2001; Gazel ve Önelge, 2002; Gazel, 2002).

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

Sörvey çalışmasının ana materyalini Gaziantep ili bağ alanları (Çizelge 3.1), Gaziantep ilinin tek resmi bağ fidan üreticisi olan Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü bağ fidanlığı ve damızlık blokları (Çizelge 3.2) ile Gaziantep ili organik yetiştiricilik yapılan bağ alanları (Çizelge 3.3) oluşturmuştur.

Bu sörvey alanlarında simptomolojik olarak saptanan *Bağ Sarı Benek Viroidi-1* [*Grapevine yellow speckle viroid-1* (GYSVd-1)] ve *Bağ Sarı Benek Viroidi-2*'yi [*Grapevine yellow speckle viroid-2* (GYSVd-2)] belirlemek amacıyla nükleik asit ekstraksiyonu, purifikasyonu, ardışık poliakrilamid jel elektroforez (sPAGE) ve reverse transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizleri uygulanmıştır. Nükleik asit ekstraksiyonu, purifikasyonu ve sPAGE analizlerinde kullanılmak üzere, bu belirlenen sörvey alanlarından, GYSVd-1, GYSVd-2'nin karakteristik simptomları olan sarı beneklenme (yellow speckle) ve damar bantlaşması (vein banding) gösteren omcalardan alınan genç yapraklar çalışmanın ana materyalini oluşturmuştur. RT-PCR çalışmalarında ise materyal olarak GYSVd-1 ve GYSVd-2'nin sPAGE analizi sonucunda pozitif çıkan örnekleri kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak, GYSVd-1 ve GYSVd-2 viroidlerini içeren bağ örneği ve negatif kontrol olarak da herhangi bir viroid içermeyen sağlıklı bağ örneği kullanılmıştır. Bu kontrol bitkiler, Kaliforniya Üniversitesi Bitki Patolojisi Bölümünden temin edilmiştir. Ayrıca moleküler çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve malzemeler de bu çalışmanın materyalini oluşturmuştur (Ek 1; Ek 2).

#### 3.2. Metod

##### 3.2.1. Sörvey Metodu ve Çalışma Materyalinin Alınması

##### 3.2.1.1. Gaziantep İli Bağ Alanlarında Sörvey Metodu ve Çalışma Materyalinin Alınması

Gaziantep ili bağ alanlarındaki 1000 da üzerinde yetiştiriciliği yapılan çeşitler sörvey kapsamına alınmıştır. Gaziantep ili ilçelerindeki üzüm çeşitlerinin toplam

alanlarının yaklaşık % 2'si sörvey alanı olarak seçilmiştir (Çizelge 3.1) (Bora ve Karaca, 1970; Gottwald, 1993).

Sörveylenen alanın dikim aralıkları her bağ alanı için farklılık göstermekle birlikte bu dikim aralıkları genellikle 2x3, 2.5x2.5, 4x4 m olarak belirlenmiştir. Bağdaki omca sayıları üreticiden edinilen bilgiyle ve sörvey sırasında gözlemler yapılarak kayıt edilmiştir.

Çizelge 3.1. Gaziantep ili ilçelerinin en çok yetiştirilen üzüm çeşitleri ile toplam alanı, sörvey alanı ve sPAGE analizine alınan örnek sayısı

Gaziantep ilinde sörveylenen ilçeler	İlçedeki toplam bağ alanı (ha)	Sörveylenen üzüm çeşitleri	İlçedeki üzüm çeşitlerinin toplam alanı (da)	Sörvey alanı (da)	Sörvey alanındaki omca sayısı	sPAGE analizine alınan örnek sayısı
Araban	1110	Dımsıkı	5500	107	17869	2
		Hönüsü	4500	85	14195	2
İslahiye	5800	Hönüsü	40000	786	131262	16
		S. çekirdeksiz	12000	235	39245	5
		Dökülgen	5000	92	15364	2
		Dımsıkı	3000	50	8350	1
Karkamış	1800	Dımsıkı	14000	283	47261	6
		Besni	1000	22	3674	1
Nizip	2599	Dımsıkı	10500	194	32398	4
		Besni	8000	156	26052	3
		Dökülgen	1500	30	5010	1
Nurdağı	83	Dımsıkı	30	5	835	1
		Kabarcık	30	4	668	1
Oğuzeli	1260	Dımsıkı	5000	87	14529	2
		Dökülgen	3000	55	9185	1
		Hönüsü	1000	12	2004	1
		Muhammediye	1000	17	2839	1
Şahinbey	7336	Dımsıkı	37000	724	120908	15
		Dökülgen	13000	245	40915	5
		Hönüsü	9730	211	35237	4
Şehitkamil	6658	Dımsıkı	20000	365	60955	8
		Hönüsü	18000	343	57281	7
		Dökülgen	14480	284	47428	6
Yavuzeli	270	Dımsıkı	11000	197	32899	4
		Hönüsü	1000	12	2004	1
<b>TOPLAM</b>	<b>26916</b>		<b>238270</b>	<b>4589</b>	<b>766363</b>	<b>100</b>

Sörveylenen bağ alanlarının tamamı W şeklinde çaprazlama örnekleme yöntemi ile gezilerek omcalar tek tek makroskobik simptomlar açısından gözlenmiştir (Bora ve Karaca, 1970; Gottwald, 1993). Sörvey çalışması hastalık belirtilerinin en yaygın olarak ortaya çıktığı Haziran-Eylül ayları arasında gerçekleştirilmiştir.

Yapılan sörvey sırasında GYSVd-1 ve GYSVd-2'ye ait simptomlar olan yapraklarda sarı beneklenme ve damar bantlaşması simptomları aranmıştır. Sörvey esnasında GYSVd-1 ve GYSVd-2'nin oluşturduğu simptomların yanında gözlenen diğer simptomlar da kaydedilmiştir.

GYSVd-1 ve GYSVd-2'ye ait simptomları gösteren omcalardan moleküler tanı çalışmalarında kullanılmak üzere toplam 100 örnek alınmıştır (Çizelge 3.1). Alınan yaprak örnekleri plastik poşetler içerisine konulmuş ve etiketler üzerine omcanın bulunduğu köy, omcanın yaşı, çeşidi ve örnek alınan tarih bilgileri kaydedilmiştir. Örnekler buz kutusu içerisinde laboratuara getirilmiştir. Alınan yapraklar 10'ar gram tartılıp torbalara koyularak nükleik asit ekstraksiyonu ve purifikasyonunda direk kullanıldığı gibi bazı örnekler sıvı azotla ezilerek -20 °C' de korunmaya alınmış ve daha sonra bu örnekler laboratuvar çalışmasında kullanılmıştır.

### **3.2.1.2. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nde Üretilen Asma Fidanları ve Damızlık Bloklarında Yürütülen Sörvey Yöntemi ve Çalışma Materyalinin Alınması**

Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nde 2006 yılında üretilen tüm bağ fidanları, en fazla üretimi yapılan 5 çeşit (Dımışkı, Hönüsü, Dökülgen, Sultani çekirdeksiz ve Besni) ve 4 anacın (1103 P, 140 Ru, 99 R ve 110 R) damızlık blokları (Anonim 2006) GYSVd-1ve GYSVd-2 viroidleri açısından incelenmiştir. İncelemede *Sarı benek* hastalığının karakteristik simptomları olan sarı beneklenme ve damar bantlaşması simptomları araştırılmıştır. Toplam 54500 adet fidan ve 89 damızlık omca incelenmiştir (Çizelge 3.2 ve 3.3).

Yetiştirilen asma fidanlarında moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere 10 gr kadar yaprak örneği çıkarılamadığı ve satışta olmaları nedeniyle yaprak toplanmasına

izin verilmediği için asma fidanı üretim alanından sPAGE analizi için örnek alınamamıştır. Bunun yerine Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nde yörede en fazla üretimi yapılan 5 çeşit (Dımışkı, Hönüsü, Dökülgen, Sultani çekirdeksiz ve Besni) ve 4 anacın (1103 P, 140 Ru, 99 R ve 110 R) damızlık bloklarının her bir çeşidinden simptom göstermeksizin beşer örnek olmak üzere toplam 45 örnek (Çizelge 3.3) laboratuvar çalışmalarında kullanılmak üzere toplanmıştır.

Çizelge 3.2. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü 2006 yılı asma fidanı çeşit adı, toplam fidan sayısı

<b>Bağ fidanı çeşit adı</b>	<b>Toplam fidan sayısı</b>
Dımışkı	3000
Hatunparmağı	2500
Öküzgözü	2000
Sergi karası	6000
Horoz karası	6000
Kabarcık	3000
Boğazkere	2000
Yalova incisi	2000
Besni	3000
Dökülgen	7000
Hönüsü	7000
Altın sarısı	2000
İtalyan	2000
Sultani çekirdeksiz	2000
Kilis karası	2000
Trakya ilkeren	2000
<b>TOPLAM</b>	<b>54500</b>

Çizelge 3.3 Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nde incelenen damızlık bloğu çeşit adı, toplam omca adedi ve sPAGE analizine alınan örnek sayısı

<b>Damızlık bloğunda incelenen çeşit adı</b>	<b>İncelenen toplam omca adedi</b>	<b>sPAGE analizi için alınan örnek adedi</b>
Dımışkı	20	5
Dökülgen	20	5
Hönüsü	19	5
Sultani çekirdeksiz	5	5
Besni	5	5
1103 P	5	5
140 Ru	5	5
99 R	5	5
110 R	5	5
<b>TOPLAM</b>	<b>89</b>	<b>45</b>

### 3.2.1.3.Gaziantep İli Organik Bağ Alanlarında Sörvey Yöntemi ve Çalışma

#### Materyalinin Alınması

Gaziantep ilinde organik bağ alanlarında bulunan 52225 omca GYSVd-1 ve 2 viroidlerinin karakteristik simptomu olan sarı beneklenme ve damar bantlaşması simptomları açısından sörveylenmiştir (Çizelge 3.4). Makroskobik simptom gösteren ya da göstermeyen çeşitlerden toplam 52 tane olmak üzere omcalardan moleküler tanı çalışmalarında kullanmak amacıyla genç yaprak örnekleri alınmıştır.

Çizelge 3.4. Gaziantep ili organik bağ alanlarının bulunduğu ilçeler, üzüm çeşitleri (Anonim 2005) ve sörveylenen omca sayısı

Organik bağ üretimi yapılan ilçeler	Organik bağ çeşitleri	Sörveylenen omca sayısı	sPAGE analizi için alınan örnek sayısı
Oğuzeli	Dimişki	1000	5
	Dökülgen	20	2
	Muhammediye	5	1
Nizip	Boğazkere	9000	5
	Öküzgözü	6400	5
	Şiraz	12500	5
	Cabernet Sauvignon	2500	5
Nizip	Boğazkere	5000	5
	Öküzgözü	5000	5
	Şiraz	5000	5
	Cabernet Sauvignon	5000	5
Karkamış	Horoz Karası	480	2
	Hönüsü	320	2
<b>TOPLAM</b>		<b>52225</b>	<b>52</b>

### 3.2.2. Moleküler Çalışmalar İle İlgili Metodlar

#### 3.2.2.1. Alınan Örneklerin Nükleik Asit Ekstraksiyon ve Purifikasyon Yöntemi

Sörvey çalışmaları sonucunda makroskopik semptomlara dayanılarak alınan örnekler GYSVD-1 ve 2 viroidleri için ekstrakte edilmiş ve arıtılmıştır (Szychowski ve ark., 1988).

-Semptom gösteren bitki yaprakları 10 g tartılmış ve ince bir şekilde doğranmıştır. Üzerine 12 ml EM-2 tampon çözeltisi (0.5 M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, % 1 SDS, % 4 merkapttoethanol) ve 36 ml suyla doyurulmuş fenol eklenmiş ve örnek buz üzerinde parçalayıcı ile ezilmiş ve solüsyon santrifüj tüplerine alınmıştır.

-Tüpler 12.000 d/dak.'da 35 dakika +4 °C'de santrifüj (Beckman, J-21C) edilmiştir. Santrifüjden sonra üst sıvı faz steril bir pipetle alınmış ve her bir tüpten alınan sıvı miktarı kaydedilmiştir. Alınan her ml'lik sıvı için 0.668 ml % 95 lik etanol ve 0,185 ml 10XSTE tampon çözeltisi eklenmiştir. Ayrıca her bir örnek için 1g selüloz (Whatman CF-11) tartılmış ve örnek solüsyon ile karıştırılmıştır.

-Tüpler tüm gece oda sıcaklığında çalkalayıcıya (GFL 3006) koyularak çalkalanması sağlanmıştır.

-Selüloz kromatografisi için 10 ml'lik enjektörler alınarak taban kısmı steril edilmiş bir kurutma kağıdı veya cam elyaf ile kapatılmış ve tüm gece çalkalanan örnek-selüloz karışımı bu plastik şırıngalar içine dökülmüş ve sıvı kısmın tamamen akması için beklenmiştir.

-Daha sonra kolon üzerine 40 ml % 30'luk etanol içeren STE çözeltisi ilave edilmiş ve sıvının tamamen akması sağlanmıştır.

-Bu yıkanan kolona 0.8 ml 1XSTE daha eklenmiş ve yıkanmıştır. Örnek 6 ml 1XSTE çözelti ile son kez yıkanarak 50 ml'lik tüpler içinde toplanmıştır. Toplanan sıvı üzerine 0,6 ml 3M sodyum asetat (Ph 5.5) ve 2,5 kat % 95 lik soğuk etanol ilave edilmiştir. Bu tüpler daha sonra -20 °C'de en az 2 saat bekletilmiştir.

-Tüpler 12.000 d/dak.'da 35 dak. +4 °C'de santrifüj edilmiş ve katı faz alınarak kurutulmuştur.

-Tüplerdeki katı faz 1 ml TKM tampon çözeltisi ile sulandırılmış ve üzerine 1 ml 4M LiCl eklenmiş ve tüpler +4 °C'de en az 4 saat bekletilmiştir.

-Tüpler 12.000 d/dak.'da 35 dak. +4 °C'de santrifüj edilmiş ve santrifüjden sonra sıvı faz alınarak ve yaklaşık 3 kat % 95'lik soğuk etanol eklenmiş ve -20 °C'de en az 30 dak. bekletilmiştir.

-Tüpler 12.000 d/dak.'da 35 dak. +4 °C'de santrifüjlenmiş ve katı faz alınarak, tüpler kurutulmuştur.

-Tüplerdeki katı faz 300 ml TKM tampon çözeltisi ile çözülmüş ve sPAGE analizinde kullanılmaya kadar -20 °C'de tutulmuşlardır.

### 3.2.2.2. Elde Edilen Nükleik Asitlerin sPAGE Yöntemi İle Analiz Edilmesi

Sörvey alanlarından alınan örnekler purifiye edilip sPAGE yöntemiyle analiz edilmiş, ethidium bromide (EtBr) ve gümüş nitrat (AgNO<sub>3</sub>) ile boyanmışlardır (Igloi, 1983). sPAGE analizi çalışmasında kullanılan tampon çözeltiler Ek-2'de verilmiştir.

Saflaştırılan viroid RNA'ları önce % 5'lik doğal akrilamid (30:0,75 akrilamid:bisakrilamid) ile sPAGE analiz yöntemi uygulanarak bitki RNA'larından ayrılmıştır. Elektroforez uygulamasında % 5'lik poliakrilamid içinde viroid RNA'ları ile aynı hızda hareket eden xylene-cyanol ve viroid RNA'larından iki kat daha hızlı

ilerleyen bromofenol mavisi işaretleyici olarak kullanılmıştır. TAE tampon çözeltisi ile hazırlanan % 5'lik poliakrilamid jel içine polimerizasyon sağlaması amacıyla 500 µl amonyum persülfat (% 10) ve katalizör olarak 50 µl TEMED (Tetramethylethylenediamine) ilave edilmiştir. Akrlamid jel (pH 7) 16 cm x 16 cm x 1.5 mm boyutunda cam tabaka içine dökülmüş ve örnekleri jele yerleştirmek amacıyla üst tarafına tarak yerleştirilmiştir. Jel buzdolabında yaklaşık 1-2 saat polimerize edilmiştir. Jele purifiye edilmiş örnekler ve işaretleyici koyulduktan sonra TAEX1 tampon çözeltisi (pH 7.2) içinde 60-70 mA'de bromofenol mavisi cam tabakanın alt kısmına erişinceye kadar yürütülmüştür. Jel ethidium bromide solüsyonu ile boyanarak viroid RNA'larının bulunduğu hat yaklaşık 3 cm kalınlıkta kesilmiş ve ikinci jelin üst kısmına yerleştirilmiştir (Semancik ve Harper, 1984).

Jel TBEX1 (denaturing buffer) tampon çözeltisi (pH 8.3) içinde 20-25 mA'lık sabit akımda xylene-cyanol jel içinde cam tabakanın en alt kısmına erişinceye kadar yürütülmüştür. Elektroforez işleminin bitmesinden sonra viroid RNA bantlarını gözle görünür hale getirebilmek amacıyla akrilamid jel gümüş nitrat ile boyanmıştır.

### 3.2.2.3. Elde Edilen Viroid RNA'larının Gümüş Nitrat (AgNO<sub>3</sub>) Boyama Yöntemi İle Belirlenmesi

Çalışmada jelin AgNO<sub>3</sub> ile boyanması Igloi (1983)'nin uyguladığı yöntemeye göre aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

- |  |           |
|--|-----------|
| 1. % 50 Etanol + % 10 Asetik asit                                | 60 dakika |
| 2. % 10 Etanol + % 1 Asetik asit                                 | 60 dakika |
| 3. 12 mM (AgNO <sub>3</sub> )                                    | 60 dakika |
| 4. Destile su  | 10 dakika |
| 5. 0.75 M Potasyum Hidroksit (KOH)+<br>% 0,28 Formaldehit (HCHO) | 20 dakika |
| 6. 0,07 M Sodyum Karbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )     | 10 dakika |

### 3.2.2.4. sPAGE Analizlerinde İnfekteli Oldukları Saptanan Viroidlerin RT-PCR Yöntemi ile Teşhis Edilmesi

Bağlardan alınan örneklerin ekstraksiyon ve purifikasyonu sonucunda uygulanan sPAGE analizlerinde viroid ile infekteli olduğu saptanan Dımışkı, Hönüü, Dökülgen ve Sultani çekirdeksiz çeşitlerinden 10 örnek RT-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. GYSVd-1 ve GYSVd-2 için direkt olarak bağdan elde edilen purifikasyon materyali RT-PCR çalışmalarında kullanılmıştır.

Viroidler tek sarmallı RNA (ssRNA) yapısında olduklarından ekstrakte edilen RNA'ların RT-PCR yöntemi kullanarak belirlenmesi amacıyla önce reverse transkriptaz enzimi ile tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezlenmiştir.

RT-PCR'da kullanılan viroidlere özgü primerler ve baz dizilimleri çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. RT-PCR'da kullanılan viroidlere özgü primerler ve baz dizilimleri

Viroid	Primer adı		Dizilimi
GYSVd-1	YS-1c	cDNA	5' TTGAGG CCT GGC GTA ACG C 3'
	YS-2h	hDNA	5' GGA CGC GAA CGT GAA TAG G 3'
GYSVd-2	D-512	cDNA	5' ACCGGC TTC GGA GAT AGA AG 3'
	D-513	hDNA	5' TTG AGG CCC GGC GAA ACG C 3'

PCR Yönteminde öncelikle Reverse transkripsiyon (RT) adımı uygulanmıştır. (Visvader ve Symons, 1985). RT reaksiyonunda 2 µl RNA, 5 µl RNase enzim içermeyen dH<sub>2</sub>O ve 2µl cDNA karıştırılmış ve thermocycler da (Whatman, Biometra T Personal) 80 °C'de 5 dak., 37 °C'de 15 dakika tutulduktan sonra tüp buz içine alınmıştır. Bu karışıma 4 µl 5X Reaksiyon çözeltisi (RT Buffer) (50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl; 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT), 4 µl dNTP karışımı (10 mM), 1µl RT enzim (200 U/ml) Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (M-MLV) ve 2 µl dH<sub>2</sub>O eklenmiş ve 42 °C'de 40 dak. bekletilmiş ve tüp hemen buz üzerine alınmıştır.

PCR işlemi, 20 µl'lik PCR karışımında sentezlenen cDNA'dan 1 µl DNA, 2 µl 10XPCR çözeltisi (50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 0.1 mM DTT; % 50 glycerol ve % 1 Triton X-100), 1 µl Taq DNA polimeraz enzimi (5µ/ml), 0.8 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.5 µl dNTP karışımı (10 mM), 0.2 µl cDNA (350 ng/ml) primer'i ve 1 µl hDNA (100 ng/ml) primer'i eklenmiştir (Semancik ve ark., 1994). Taq polimeraz ortamında 95 °C'de 0,5 dakika, 45 °C' de 1 dakika ve 72 °C'de 2 dakikalık toplam 35 döngülük bir thermocycler rejiminden sonra 72 °C de 10 dak. bekletilip hızla +4 °C de soğutularak işlem tamamlanmış ve DNA sentezlenmiştir (Visvader ve Symons, 1985).

Elde edilen PCR ürünü % 2'lik agar jelde TBE tampon çözeltisi içinde 70 mA'de yaklaşık yarım saat yürütülmüştür. Jel ethidium bromide (0.5 mg EtBr/400 ml dH<sub>2</sub>O) ile boyanmış ve UV transilluminatörde (Vilber Lourmat) gözlenerek fotoğrafı çekilmiştir.

### **3.2.2.5. RT-PCR Analizlerinde GYSVd-1 ve GYSVd-2 ile İnfekteli Oldukları Saptanan Viroidlerin PCR Ürününün Çoğaltılması ve Saflaştırılması**

RT-PCR sonucu pozitif bulunan örnekler öncelikle aynı koşullarda PCR uygulanarak 200 µl olacak şekilde çoğaltılmıştır. Çoğaltılan örnekler düşük ısıda çözünen agar kullanılarak tekrar jelde yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir ve ethidium bromür ile boyandıktan sonra viroid bantlarının olduğu kısım jelden kesilerek alınmış ve (High Pure PCR Purification Kit (Roche)) purifikasyon kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. Jel ısıyla çözüldürülmüş ve üzerine 500 µl yapıştırma çözeltisi eklenerek karıştırılmış ve yüksek oranda saflaştırılmış filtre tüpüne aktarılmıştır. Tüp 13.000 g hızda yaklaşık 60 sn. santrifüjlenmiş ve sıvı faz atılmıştır. Bu tüpe 500 µl yıkama çözeltisi eklenmiş ve 13.000 g hızda yaklaşık 60 sn. santrifüjlenmiş ve sıvı faz yine atılmıştır. Sonra 200 µl yıkama çözeltisi eklenerek yıkamalara devam edilmiş ve tüp 13.000 g hızda yaklaşık 60 sn. santrifüjlenmiş ve yine sıvı faz uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 50-100 µl ayrıştırma çözeltisi eklenerek 13.000 g hızda yaklaşık 60 sn. santrifüjlenmiş ve sıvı faz bu sefer toplanarak ürün saflaştırması gerçekleştirilmiştir (Ek 3).

Elde edilen saflaştırılmış PCR ürünü % 2'lik agar jelde TBE tampon çözeltisi içinde 70 mA'de yaklaşık yarım saat yürütülmüştür. Jel ethidium bromide (5mg/ml'den 100 ml EtBr/400 ml dH<sub>2</sub>O) ile boyanmış ve UV transilluminatörde viroidin saflaşma oranı gözlenerek fotoğrafı çekilmiştir.

#### **3.2.2.6. Dımışkı izolatlarından elde edilen GYSVd-1 ve GYSVd-2 ile Saflaştırılan PCR Ürününün Nükleik asit Diziliminin Belirlenmesi**

Saf cDNA'nın nükleik asit dizilimi ticari bir firma olan IONTEK firması tarafından belirlenmiştir.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Sörvey Çalışması Sonucu Elde Edilen Bulgular

Sörvey çalışması Gaziantep ili toplam bağ üretim alanlarının ilçe ve çeşit bazında yaklaşık % 2'si sörveyleyerek (Bora ve Karaca, 1970; Gottwald, 1993) gerçekleştirilmiştir. Çeşitlere göre sörveylenen omca sayısı, bulaşık omca sayıları, sörvey sırasında bulaşık omcalarda belirlenen diğer simptomlar ve bulaşıklık oranları çizelge 4.1 ve çizelge 4.2'de verilmiştir.

Sörvey çalışması, Araban, İslahiye, Karkamış, Nizip, Nurdağı, Oğuzeli, Şahinbey, Şehitkamil ve Yavuzeli ilçelerinde yapılmıştır. Yapılan sörveyde bağ alanlarında yüksek telli sistem gibi modern bir bağ yetiştiriciliğinin olmadığı gözlenmiştir. Bağ alanlarının büyük çoğunluğunda goble ve benzeri alçak gövdeli desteksiz yetiştiricilik yapılmaktadır.

#### 4.1.1 Gaziantep İli Bağ Alanlarında Elde Edilen Simptomatolojik Bulgular

Sörvey çalışmalarında arazi gözlemlerinde ilk aranılan simptom GYSVd-1 ve GYSVd-2' nin neden olduğu *Bağ sarı benek* (BSB) hastalığının karakteristik simptomu olan sarı beneklenme simptomudur. Ayrıca GYSVd-1 ve/veya GYSVd-2'nin *Asma yelpaze yapraklılık virüsü* (*Grapevine fanleaf virus* (GFLV)) ile birlikte bulunduğu daha belirginleşen damar bantlaşması simptomu aranan diğer bir simptomdur.

Dünya'da yapılan çalışmalar sonucu bağlarda varlığı belirlenen diğer 3 viroidin *Australian grapevine viroid* [*Avustralya bağ viroidi* (AGVd)] (Rezaian, 1990), *Hop stunt viroid-grapevine* [*Şerbetçiotu cüceleşme viroidi-bağ* (HSVd-g)] (Sano ve ark. 1985) ve *Citrus exocortis viroid-grapevine* (*Turunçgil exocortis viroid-bağ*=CEVd-g) (Garcia-Arenal ve ark., 1987) gözle görülür bir simptom oluşturmadığı ve herhangi bir hastalık sendromu belirlenmediği için bu viroidlere ait gözlemler yapılamamıştır.

GYSVd-1 ve GYSVd-2 için yapılan bu sörvey çalışmasında GYSVd-1 ve GYSVd-2'nin karakteristik simptomu olan sarı beneklenme (sb) ve damar bantlaşmasının (db) yanında farklı diğer simptomlar da gözlenmiştir. Gözlenen bu

simptomların başlıcaları: yelpaze yapraklılık (fanleaf (fl)), yaprak sararması (ys), boğum arası kısalması (bk), bir boğumdan birden fazla sürgün oluşumu (bs), zigzag sürgün oluşumu (zs), bodurluk (b) ve buna bağlı yaprak küçülmesi (yk) simptomlarıdır (Çizelge 4.1).

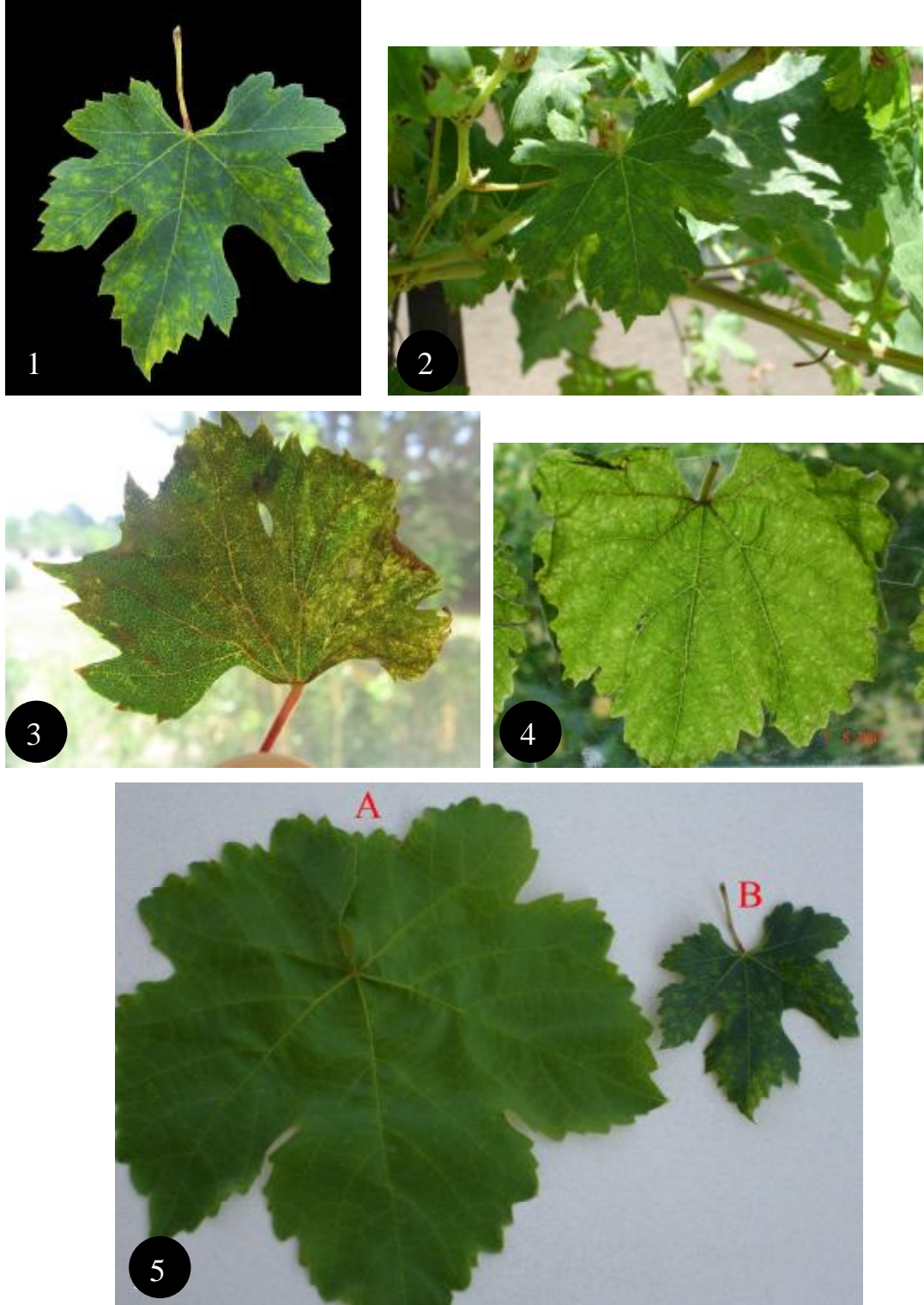
Gaziantep bağ alanlarında GYSVd-1 ve GYSVd-2'nin bulaşıklık oranını belirlemek amacıyla yürütülen sorvey çalışmasında 766363 omca incelenmiş ve 652 omca makroskobik simptomlara göre bulaşık bulunmuştur.

Çizelge 4.1'de belirtildiği gibi sorvey yapılan alanlarda en yaygın gözlenen simptomun sarı beneklenme simptomu olduğu belirlenmiştir. Sorvey sonucunda *Bağ sarı benek* hastalığı ile bulaşık bulunan 652 omcanın 652'sinde de sarı beneklenme simptomuna rastlanmıştır. Sarı beneklenme simptomu gösteren omcalardan 55 tanesinde ayrıca damar bantlaşması simptomu bulunmuştur.

Sörveylenen bağ alanlarındaki yapraklarda görülen sarı beneklenme simptomu ana ve yan damarlar arasına serpiştirilmiş sarı renkte noktalar veya benekler şeklindedir (Şekil 4.1). Özellikle yaz aylarının başlarında bu simptomlar oldukça belirgin biçimde gözlenmiştir.

Çizelge 4.1. Gaziantep ili bağ alanlarında yapılan GYSVd'leri için sorvey çalışmasındaki simptomolojik bulgular (sb: sarı beneklenme, sb ve db: sarı beneklenme ve damar bantlaşması, fl: yelpaze yapraklılık (fan leaf), bk: boğum arası kısalması, bs: bir boğumdan birden fazla sürgün oluşumu, (zs): zigzag sürgün oluşumu, (ys): yaprak sararması, (b): genel viroid simptomları olan bodurluk ve (yk): buna bağlı yaprak küçülmesi

İlçe adı	Çeşit adı	Sörvey alanındaki omca sayısı	Bulaşık omca sayısı	GYSVd-1 ve 2		Damar bantlaşması ile birlikte gözlenen diğer simptomlar					Diğer simptomlar b+ yk
				sb	sb + db	fl	bk	bs	zs	ys	
Araban	Dımışk1	17869	41	41	4	3	3	0	1	0	11
	Hönüsü	14195	15	15	3	2	1	0	0	1	4
İslahiye	Hönüsü	131262	34	34	5	4	3	0	0	0	4
	S.çekirdeksiz	39245	13	13	2	2	1	1	0	0	2
	Dökülgen	15364	14	14	1	1	0	0	0	0	1
	Dımışk1	8350	7	7	0	0	0	0	0	0	0
Karkamış	Dımışk1	47261	27	27	3	2	1	0	1	0	2
	Besni	3674	4	4	0	0	0	0	0	0	0
Nizip	Dımışk1	32398	29	29	3	2	1	1	0	2	3
	Besni	26052	19	19	2	1	2	0	1	1	2
	Dökülgen	5010	3	3	0	0	0	0	0	0	0
Nurdağı	Dımışk1	835	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Kabarcık	668	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Oğuzeli	Dımışk1	14529	24	24	7	3	2	1	1	0	8
	Dökülgen	9185	11	11	1	0	1	0	0	3	1
	Hönüsü	2004	2	2	0	0	1	0	0	1	0
	Muhammediye	2839	2	2	0	0	0	0	0	0	0
Şahinbey	Dımışk1	120908	98	98	6	3	4	1	1	5	19
	Dökülgen	40915	27	27	2	0	1	0	0	2	9
	Hönüsü	35237	37	37	1	1	1	1	0	0	11
Şehitkamil	Dımışk1	60955	65	65	5	2	1	1	2	3	14
	Hönüsü	57281	94	94	6	3	2	1	1	2	12
	Dökülgen	47428	67	67	3	1	2	1	1	7	8
Yavuzeli	Dımışk1	32899	16	16	1	1	1	0	1	5	4
	Hönüsü	2004	3	3	0	0	0	0	0	1	1
<b>TOPLAM</b>		<b>766363</b>	<b>652</b>	<b>652</b>	<b>55</b>	<b>31</b>	<b>28</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>33</b>	<b>116</b>



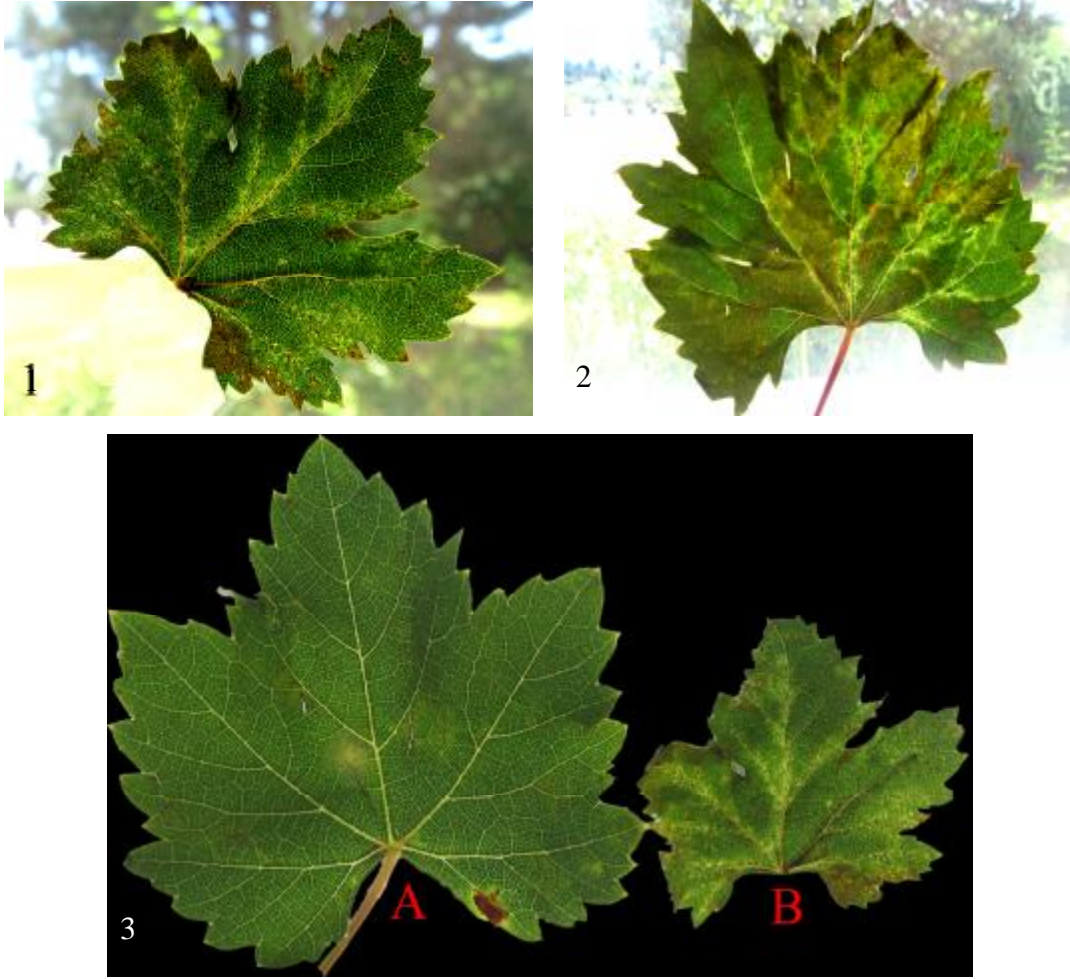
Şekil 4.1. *Bağ sarı benek* hastalığına ait sarı beneklenme belirtileri (1,2,3,4), A; sağlıklı bağ yaprağı ve B; sarı benek belirtileri gösteren bağ yaprağı (5)

Avustralya’da bağlarda yapılan bir çalışmada *Bağ sarı benek* hastalığının karakteristik simptomu olan sarı benek simptomunun, yazın erken döneminde bağ yapraklarının ana ve yan damarları arasına serpiştirilmiş, sanki ağartılmış gibi görünen beneklenmelerden oluştuğu bildirilmiştir. Bu simptomların özellikle omcanın en üst veya yan sürgünlerinin açıkta kalan yapraklarında geliştiği ayrıca sarı beneklenmenin yaz başlarında göz alıcı bir sarılıkta olduğu, yaz sonlarında ise sarılığın soluklaşıp açık yeşil bir renge dönüştüğü belirtilmiştir (Taylor ve Woodham, 1972). Sörvey çalışmasında benzer şekilde Haziran ayı sonu ve Temmuz ayı başlarında genç sürgün dönemlerinde sarı benek simptomunun oldukça belirgin ana ve yan damarlar arasında dağınık bir şekilde bulunan sarı benekler şeklinde olduğu, Temmuz ayı sonunda ise belirginliğini kaybetmeye başladığı belirlenmiştir.

Gözlenen damar bantlaşması simptomları, ana ve yan damarlar boyunca sarı noktalar, benekler veya kalın çizgi şeklinde renk açılmaları biçiminde gözlenmiştir (Şekil 4.2). Damar bantlaşması simptomları, yaz ayları başlarında yaprağın bazı damarlarında belli belirsiz görülürken, mevsim sonuna doğru Temmuz-Eylül ayları arasında daha da belirginleştiği saptanmıştır. Taylor ve Woodham (1972) Avustralya’da yaptıkları çalışmada bağ yapraklarında damar bantlaşması simptomlarını ana ve yan damarlar boyunca sarı renk açılmaları, kalın benekler veya çizgi şeklinde renk açılmaları olarak tanımlamışlar, bu simptomların oluşması için ise belirli iklimik şartların gelişmesinin gerekliliğini belirtmişlerdir.

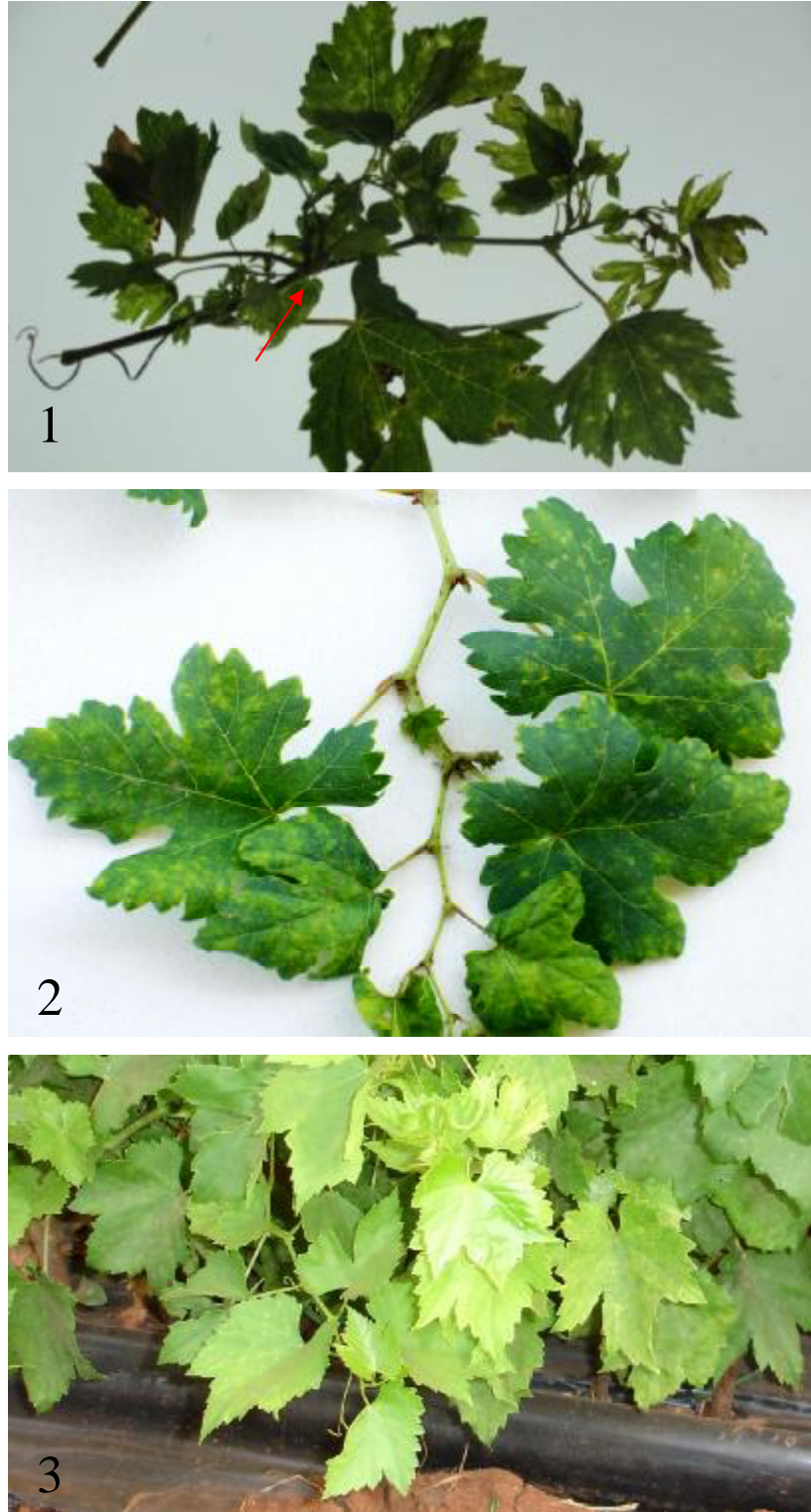
Dünya’da yapılan çalışmalarda başlangıçta damar bantlaşması simptomlarının GFLV’nin damar bantlaşma streyni tarafından neden olduğu düşünülmüştür (Hewitt ve ark., 1970; Vuittenez, 1970; Hewit ve Bovey, 1979). Ancak daha sonra damar bantlaşma simptomlarının, GFLV’ü tarafından neden olunan yelpaze yapraklılık dejenerasyonu ile ilişkili olarak üretim dönemi sonunda oluştuğu (Martelli ve Savino, 1988) ya da GFLV ve *Bağ sarı benek* hastalığının beraber bir infeksiyonu (Krake ve Woodham, 1983) sonucu meydana geldiği hipotezleri ortaya atılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda damar bantlaşma sendromunun GYSVd-1 ile GYSVd-2’nin GFLV arasındaki sinerjik bir reaksiyon sonucu oluştuğu belirlenmiştir. *Bağ sarı benek* hastalığı etmenlerinden en az birinin (GYSVd-1 ve GYSVd-2) damar bantlaşma sendromunda rol oynadığı belirtilmiştir

(Szychowski ve ark., 1995). Sörvey sırasında gözlenen damar bantlaşma belirtilerinin benzer şekilde olduğu ve damar bantlaşması gösteren 55 omcada aynı zamanda fl, bk, bs, zs ve ys belirtilerin de gözlemlendiği kaydedilmiştir.



Şekil 4.2. *Bağ sarı benek* hastalığına ait damar bantlaşması belirtileri (1,2), A; sağlıklı bağ yaprağı B; damar bantlaşması belirtisi gösteren bağ yaprağı (3)

Sörvey çalışması sırasında 55 omcada saptanan ve damar bantlaşması gösteren GFLV belirtilerine benzer 31 omcada yelpaze yapraklılık, 28 omcada boğum arası kısalması, 8 omcada bir boğumda birden fazla sürgün oluşumu, 10 omcada zigzag sürgün oluşumu ve 33 omcada ise yaprak sararması belirtilerini oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. *Bağ sarı benek* hastalığı ile bulaşık omcalarda beneklenme ile birlikte gözlenen viral infeksiyonlara ait belirtiler; 1) yelpaze yapraklılık ve bir boğumdan birden fazla sürgün oluşumu 2) zigzag sürgün oluşumu ve boğum arası kısalması, 3) yaprak küçülmesi ve sararması

Sörvey çalışmasında *Bağ sarı benek* hastalığı ile bulaşık bulunan 652 omcanın 116'sında gözlenen diğer bir simptom ise bodurluk ve buna bağlı olarak oluşan yaprak küçülmesi simptomudur (Şekil 4.4). Bu simptomları gösteren omcaların alındığı bağ alanlarının fıstık plantasyonlarının arasına dikili oldukça bakımsız ve 30 yaş üstü olduğu bu alanlarda budama-gübreleme gibi uygulamaların da yapılmadığı saptanmıştır.



Şekil 4.4. Bağlarda gözlenen bodurluğa bağlı yaprak küçülmesi simptomları

Gaziantep ili ilçe düzeyindeki BSB hastalığının dağılımında Çizelge 4.2'ye göre ilk ilçe olan Araban ilçesinde en fazla yetiştirilen çeşit Dımışkı olup GYSVd-1 ve 2'nin karakteristik simptomu olan sarı beneklenme ve damar bantlaşması simptomu bu çeşitte toplam 17869 omcadan 41 tanesinde belirlenmiş ve bulaşıklık oranı % 0.23 olarak bulunmuştur. Bu bölgede sörveylenen diğer çeşit Hönüsü olup bulaşıklık oranı % 0.10 olarak belirlenmiştir. Araban ilçesinde GYSVd-1 ve 2'nin toplam bulaşıklık oranı % 0.17 olarak saptanmıştır.

Gaziantep ilinin İslahiye ilçesi 60000 da ile en fazla bağ alanına sahip ilçesidir. İslahiye ilçesinde saf bağcılık yapılmaktadır. Bu ilçede en fazla yetiştirilen çeşit Hönüsü çeşidi olup GYSVd-1 ve 2'nin karakteristik simptomu olan damar bantlaşması ve sarı beneklenme simptomu bu çeşidin 34 omcasında belirlenmiş ve bulaşıklık oranı % 0.02 olarak bulunmuştur. Diğer bir çeşit, bu yörede uzun süreden beri yetiştirilen Sultani çekirdeksiz çeşidi olup bulaşıklık oranı % 0.03 olarak belirlenmiştir. İslahiye ilçesinde GYSVd-1 ve 2'nin en yoğun bulaşık olduğu çeşidin % 0.09 oranı ile Dökülgen çeşidi olduğu bu sörveyde tespit edilmiştir. Son olarak en

az yetiştiriciliği yapılan üzüm çeşidi Dımışk1 olup bulaşıklık oranı % 0.08 olarak saptanmıştır. Yapılan sörvey sonucunda bu ilçedeki GYSVd-1 ve 2 ile toplam bulaşıklık oranı % 0.05'tir. Gaziantep ilinin İslahiye ilçesinin bağ alanları açısından GYSVd-1 ve 2 viroidleri ile bulaşıklık oranı en düşük ilçesi olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.2. Gaziantep ili bağ alanlarında ilçelere ve çeşitlere göre elde edilen sörvey sonuçları

İlçe adı	Çeşit adı	Sörvey alanındaki omca sayısı	Bulaşık omca sayısı	Bulaşıklık oranı (%)	Bulaşıklık oranı (%)
Araban	Dımışk1	17869	41	0.23	0.17
	Hönüsü	14195	15	0.11	
İslahiye	Hönüsü	131262	34	0.03	0.04
	S.çekirdeksiz	39245	13	0.03	
	Dökülgen	15364	14	0.09	
	Dımışk1	8350	7	0.08	
Karkamış	Dımışk1	47261	27	0.06	0.06
	Besni	3674	4	0.11	
Nizip	Dımışk1	32398	29	0.09	0.08
	Besni	26052	19	0.07	
	Dökülgen	5010	3	0.06	
Nurdağı	Dımışk1	835	0	0	0
	Kabarcık	668	0	0	
Oğuzeli	Dımışk1	14529	24	0.17	0.14
	Dökülgen	9185	11	0.12	
	Hönüsü	2004	2	0.01	
	Muhammediye	2839	2	0.07	
Şahinbey	Dımışk1	120908	98	0.08	0.08
	Dökülgen	40915	27	0.07	
	Hönüsü	35237	37	0.11	
Şehitkamil	Dımışk1	60955	65	0.11	0.14
	Hönüsü	57281	94	0.16	
	Dökülgen	47428	67	0.14	
Yavuzeli	Dımışk1	32899	16	0.05	0.05
	Hönüsü	2004	3	0.15	
<b>TOPLAM</b>		<b>766363</b>	<b>652</b>	<b>0.08</b>	<b>0.08</b>

Karkamış ilçesinde en fazla yetiştirilen bağ çeşidi Dımışkı olup GYSVd-1 ve 2'nin karakteristik simptomları bu çeşitte toplam 47261 omcanın 27'sinde hastalık belirlenmiş ve bulaşıklık oranı % 0.06 olarak bulunmuştur. Bu bölgede sövreylenen diğer bir çeşit Besni çeşidi olup sövreylenen toplam 3674 omcanın 4 tanesinde sarı benek simptomuna rastlanmış olup bulaşıklık oranı % 0.11 olarak gözlenmiştir. Bu ilçedeki GYSVd-1 ve 2 ile toplam bulaşıklık oranının % 0.08 olduğu saptanmıştır.

GYSVd-1 ve 2'ye ait simptomlar Nizip ilçesinde en fazla yetiştirilen çeşit olan Dımışkı çeşidinde toplam 32398 omcada 29 omca olarak bulunmuş ve bulaşıklık oranı % 0.09 olarak belirlenmiştir. Bu bölgede sövreylenen diğer bir çeşit Besni olup toplam 19 bulaşık omca gözlenerek % 0.07 oranında bulaşıklık belirlenmiştir. Bu ilçede en az yetiştirilen çeşit Dökülgen'de ise sövreylenen 5010 omcada 3 omca bulaşık bulunmuş ve bulaşıklılık oranı % 0.06 olarak saptanmıştır. Sonuç olarak Nizip ilçesinde GYSVd-1 ve 2 ile bulaşıklık oranı % 0.07 olarak belirlenmiştir.

Nurdağı ilçesinde ise Dımışkı ve Kabarcık üzüm çeşitleri mevcut olup, sövrey sırasında bu çeşitlerde GYSVd-1 ve 2 viroidlerinin karakteristik simptomu olan damar bantlaşması ve sarı beneklenme simptomlarına sövreylenen omcalarda rastlanmamıştır.

Oğuzeli ilçesinde en yoğun yetiştirilen bağ çeşidi Dımışkıdır. Bu çeşitte bağ sarı benek hastalığı toplam 14529 omcanın 24'ünde gözlenmiş ve bulaşıklılık oranı % 0.16 olarak belirlenmiştir. Bu bölgede sövreylenen diğer çeşitler; Dökülgen'de bulaşıklılık oranı % 0,12, Hönüsü'de % 0.10 ve Muhammediye'de ise % 0.07 olarak bulunmuştur. Oğuzeli ilçesinde GYSVd'lerinin en fazla olduğu çeşit % 0.16 oranı ile Dımışkı, en düşük olduğu çeşit ise % 0.07 oranı ile Muhammediye çeşididir. Toplam bulaşıklık oranı % 0.11 olarak belirlenmiştir.

Şahinbey ilçesinde Dımışkı çeşidinde GYSVd'lerinin karakteristik simptomu, toplam 120908 omcadan 98'inde gözlenmiştir. Bulaşıklık oranı bu çeşit için % 0.08 olarak bulunmuştur. Bu bölgede sövreylenen diğer çeşit Dökülgen olup bulaşıklılık oranı % 0.06 ve Hönüsü'de ise % 0.10 olarak belirlenmiştir. Şahinbey ilçesinde toplam bulaşıklık oranı % 0.08 olarak saptanmıştır.

Şehitkamil ilçesinde GYSVd-1 ve 2'nin karakteristik simptomsu olan sarı benek ve damar bantlaşması simptomsu Dımışkı çeşidinde toplam 60955 omcanın 65'inde belirlenmiştir. Hastalık yüzdesi % 0.10 olarak bulunmuştur. Bu bölgede sörveylenen diğer çeşitlerden Hönüsü'de bulaşıklılık oranı % 0.16 ve Dökülgen'de ise % 0.14 olarak bulunmuş olup GYSVd'lerin en yoğun olduğu çeşit % 0.16 ile Hönüsü olarak belirlenmiştir. İlçede toplam bulaşıklık oranı ise % 0.13 olarak tespit edilmiştir.

Dımışkı çeşidi Yavuzeli ilçesinde en fazla yetiştirilen çeşit olarak belirlenmiştir. GYSVd'lerinin karakteristik simptomsu toplam 32899 omcada 16 omca olarak gözlenmiş ve bulaşıklılık oranı % 0.05 olarak bulunmuştur. Bölgenin sörveylenen diğer çeşidi Hönüsü olup bulaşıklılık oranı % 0.15 olarak bulunmuştur. Toplam sörveylenen 34903 omca için GYSVd-1 ve 2 viroidlerinin makroskopik simptomsuna dayalı bulaşıklık oranı % 0.10 olarak belirlenmiştir.

Gaziantep ili bağ alanlarında GYSVd-1 ve 2'nin makroskopik simptomsu göre bulaşıklık oranları çeşit bazında incelendiğinde, en fazla bulaşıklık oranı % 0.23 ile Araban ilçesinde Dımışkı çeşidindedir. Bunu % 0.16 ile Şehitkamil ilçesinde Hönüsü ve yine aynı oran ile Oğuzeli ilçesinde Dımışkı çeşitleri izlemektedir. En düşük bulaşıklık oranının İslahiye ilçesinde % 0.02 ile Hönüsü ve % 0.03 ile Sultani çekirdeksiz çeşitlerinde olduğu saptanmıştır.

Gaziantep ili ve ilçelerinin sarı beneklenme hastalığı açısından bulaşıklık oranları incelendiğinde, Nurdağı ilçesinde % 0, İslahiye ilçesinde % 0.05, Nizip ilçesinde % 0.07, Karkamış ilçesinde % 0.08, Şahinbey ilçesinde % 0.08, Yavuzeli ilçesinde % 0.10, Oğuzeli ilçesinde % 0.11, Şehitkamil ilçesinde % 0.13 ve Araban ilçesinde % 0.16 olarak bulaşıklık belirlenmiştir.

Sonuç olarak Gaziantep ili bağ alanlarında yaklaşık 4500 da alanda 766363 omca GYSVd-1 ve 2 viroidlerinin karakteristik simptomsu olan damar bantlaşması ve sarı beneklenme açısından sörveylenmiş 652 omca bulaşık bulunmuş ve bu hastalık için toplam bulaşıklık oranı % 0.08 olarak tespit edilmiştir.

Gaziantep ili bağ alanlarında makroskopik simptomsu açısından *Bağ sarı benek* hastalığı ile olan bulaşıklık oranının düşük olmasının sebebi, bitki içerisindeki viroid konsantrasyonunun düşük olabileceği, bununla birlikte iklimsel faktörlerin viroid

konsantrasyonunun artışında etken olması ve yayılmanın çoğunlukla çoğaltma materyali ile olması ve etkili herhangi bir vektörün olmaması olarak düşünülebilir. Ayrıca üretim materyalinin alındığı ana kaynakların belirli oranda temiz olması da bu düşüklüğe bir neden olabilir. Bugüne kadar hastalığın mekanik yada vektörlerle taşınmamasının (Randles, 2003), hastalığın yayılmamasında etkili olduğu düşünülmüştür. Ayrıca bulaşıklık oranının fazla olduğu Araban ve Şehitkamil gibi ilçelerde genelde 25-30 yıllık bağ alanları mevcut olup fıstık bahçelerinin arasına dikim yapılan sulamasız alanlardır. Bu alanların aksine İslahiye ve Nizip gibi 10-15 yaşlarında sulanan, daha bakımlı, saf bağ alanlarında hastalık daha az gözlemlenmiştir.

#### **4.1.2 Gaziantep İli Organik Bağ Alanlarında Elde Edilen Simptomatolojik Bulgular**

Gaziantep ili organik bağ alanlarından Oğuzeli ilçesinde (Çizelge 4.3) Dımışkı çeşidinde yapılan makroskobik gözlemlerde toplam 15 omcanın sarı beneklenme ve damar bantlaşması simptomlarını sergilediği belirlenerek bulaşıklık oranı % 1.5 olarak bulunmuştur. Diğer çeşitler olan Dökülgen ve Muhammediye çeşitlerinde *Bağ sarı benek* hastalığı için herhangi bir simptome rastlanmamıştır.

Nizip ilçesinin Turnalı mevkiinde bulunan organik bağ parselinde Boğazkere, Öküzgözü, Şiraz ve Cabernet Sauvignon çeşitleri mevcut olup toplam 27900 omca bulunduğu belirlenmiştir. Bu alanda yüksek telli sistem, damla sulamanın kullanıldığı modern bağcılık sisteminin uygulandığı gözlenmiştir. Bu alanda Boğazkere, Öküzgözü, Şiraz ve Cabernet Sauvignon çeşitlerinde herhangi bir sarı beneklenme ya da damar bantlaşması belirtilerine ait makroskobik simptome rastlanmamıştır.

Çizelge 4.3. Gaziantep ili organik bağ alanlarında *Bağ sarı benek* hastalığının sörvey sonuçları

Organik bağ alanı ilçe adı	Çeşit	Toplam omca sayısı	GYSVd-1 ve 2 semptomlarını gösteren omca sayısı	Bulaşıklık oranı(%)
Oğuzeli	Dımışkı	1000	15	1.5
	Dökülgen	20	0	0
	Muhammediye	5	0	0
Nizip (Turnalı mevki)	Boğazkere	9000	0	0
	Öküzgözü	6400	0	0
	Şiraz	12500	0	0
	Cabernet Sauvignon	2500	0	0
Nizip (Günaltı mevki)	Boğazkere	5000	0	0
	Öküzgözü	5000	6	0.12
	Şiraz	5000	0	0
	Cabernet Sauvignon	5000	0	0
Karkamış	Horoz karası	480	0	0
	Hönüsü	320	0	0
<b>TOPLAM</b>		<b>52225</b>	<b>21</b>	<b>0.04</b>

Nizip ilçesinde bir diğer organik bağ alanı Günaltı mevkiinde *Bağ sarı benek* hastalığı için yapılan incelemede sadece Öküzgözü çeşidinde 6 omcada yalnız sarı beneklenme semptomu gözlenerek bulaşıklık oranı % 0.12 olarak belirlenmiştir. Diğer çeşitlerde herhangi bir semptomla rastlanmamıştır.

Karkamış ilçesindeki organik bağ alanı Horoz karası ve Hönüsü çeşitleri ile kurulmuştur. 480 adet Horoz karası omcası ile 320 adet Hönüsü omcası, *Bağ sarı benek* hastalığı açısından incelenmiş ve herhangi bir sarı beneklenme veya damar bantlaşması semptomuna rastlanmamıştır.

Sonuç olarak Gaziantep ili organik yetiştiricilik yapılan bağ alanlarında 52225 omca *Bağ sarı benek* hastalığı açısından incelenmiş, 21 omca sarı beneklenme ve/veya damar bantlaşması semptomları gözlenmiştir. Buna göre yapılan bu çalışmada bulaşıklık oranı % 0.04 olarak tespit edilmiştir.

Gaziantep ili organik veya organik olmayan bağ alanlarında *Bağ sarı benek* hastalığı için elde edilen bulaşıklık oranları organik yetiştiricilikte % 0.04 olup

organik olmayan yetiştiricilikte % 0.08 olarak belirlenmiştir. Bu orana göre organik yetiştiricilik yapan bağ alanlarında *Bağ sarı benek* hastalığının daha az görüldüğü tespit edilmiştir.

Dünyada sürgün ucu aşılama ya da doku kültürünün farklı teknikleri ile viroidlerden arı bağ çubuklarının elde edildiği bilinmektedir (Duran-Vila ve ark., 1988; Wan Chow Wah ve Symons, 1997).

İncelenen bu 4 organik bağ alanında mevcut olan çeşitlerden Öküzgözü, Boğazkere çeşitlerinin İzmir'den, Dımışkı, Dökülgen, Hönüsü, Muhammediye, Horoz karası çeşitlerinin Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nden ve Şiraz ve Cabernet Sauvignon çeşitlerinin ise Fransa'dan getirildiği belirlenmiştir. Elde edilen bu fidanlardan sadece Fransa'dan sağlanan fidanlar virüs ve viroidlerden arındırılmış sertifikalı fidan olduğu belirlenmiştir. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nden alınan fidanların sadece sıcaklık uygulaması yapılarak üretildiği bu işlemlerin ise virüs ve viroidlerden arındırmaya yeterli olmadığı (Haididi ve ark., 2003) bilinmektedir. *Bağ sarı benek* hastalığı ile makroskobik olarak bulaşık bulunan çeşitlerden Dımışkı çeşidinin Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nden, Öküzgözü çeşidinin ise İzmir'den alındığı tespit edilmiştir. Sertifikasyon programının önemi dünyada bir çok ülkenin tarım politikalarında kabul edilmesine rağmen, ülkemizde tarım kapsamında henüz gelişmiş bir sertifikasyon programının bulunmaması hem yeni kurulan bağ alanlarının bulaşık olmasına hemde birim alandan elde edilen verimin düşük olmasına neden olmaktadır.

#### **4.1.3. Gaziantep İli Bağ Fidanı Üretim Alanından Elde Edilen Simptomatolojik**

##### **Bulgular**

Gaziantep ilinde bağ fidan üretiminin resmi olarak sadece Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nde yapıldığı Tarım İl Müdürlüğü tarafından belirtilmiştir. Bu çalışmada Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nde 2006 yılında üretilen 54500 adet bağ fidanı (Anonim, 2006) *Bağ sarı benek* hastalığının karakteristik semptomu olan sarı beneklenme ve damar bantlaşması semptomları açısından Haziran-Eylül ayları arasında makroskobik olarak incelenmiştir.

Bu fidanlığın 2006 yılı bağ fidan üretim miktarı, *Bağ sarı benek* hastalığı için yapılan makroskobik incelemeler Çizelge 4.4'de verilmiştir. 2006 yılı verilerine göre, Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nde fidanı en çok üretilen üzüm çeşitleri Dökülgen ve Hönüsü olup her birinden 7000'er adet fidan üretilmiştir. Yapılan sörvey çalışmasında Dökülgen çeşidinde 24 ve Hönüsü çeşidinde 30 adet fidanın GYSVd-1 ve 2 viroidlerinin oluşturduğu beneklenme simptomunu gösterdiği belirlenmiştir. Makroskobik simptomlara dayanarak bulaşıklık oranı Dökülgen için % 0.34 Hönüsü için ise % 0.43 olarak belirlenmiştir.

İkinci sırada en fazla üretimi yapılan çeşitler ise Sergi karası ve Horoz karası çeşitleridir. Fidanlıkta sörveyi yapılan 6000 adet fidanda Sergi karası çeşidinden 6, Horoz karası çeşidinden 4 fidan makroskobik olarak *Bağ Sarı benek* hastalığı ile bulaşık bulunmuştur.

Fidanlıkta yetiştirilen 3000 adet Dımışkı, Sultani çekirdeksiz, Besni ve Kabarcık çeşidinde sarı benek simptomsu, Dımışkı çeşidinde 22 fidanda, Sultani çekirdeksizde 18, Besni çeşidinde 2 fidanda ve Kabarcık çeşidinde 32 fidanda belirlenmiştir.

Hatunparmağı çeşidinde 2500 adet fidan incelenmiş ve bunlar içerisinde 35 fidanda makroskobik olarak *Bağ sarı benek* hastalığının oluşturduğu beneklenme simptomları gözlemlenmiştir.

Fidanlıkta 2000'er adet üretilen diğer çeşitlerden Öküzgözü, Boğazkere, Yalova incisi, Ata sarısı, İtalya, Kilis karası, Trakya ilkeren çeşitleri de *Bağ Sarı benek* hastalığı açısından makroskobik olarak incelenmiştir. Buna göre hastalığın en yoğun makroskobik simptomları 40 fidan ile Öküzgözü çeşidinde görülmüştür. Diğer çeşitlerde 21 fidan ile Yalova incisi, 12 fidan ile Kilis karası çeşidi, 8 fidan ile Ata sarısı, 7 fidan ile Boğazkere, 5 fidan ile İtalya ve 2 fidan ile Trakya ilkeren çeşidinin hastalık ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir.

Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nde *Bağ sarı benek* hastalığı için yapılan bu araştırmada bu hastalığın karakteristik simptomsu olan sarı beneklenme ve damar bantlaşmasının en çok görüldüğü çeşit % 2 ile Öküzgözü çeşidi olup, bunu sırasıyla % 1.4 ile Hatunparmağı, % 1.07 ile Kabarcık ve % 1.05 ile Yalova incisi çeşitlerinin

izlediği tespit edilmiştir. Diğer çeşitlerde bulaşıklık oranının % 1'den az olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.4. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü asma fidanlığı üretim kapasitesi ve *Bağ sarı benek* hastalığı için yapılan araştırma sonuçları

Sörveylenen Bağ fidanı çeşitleri	Toplam fidan sayısı	Sarı beneklenme hastalığı belirtilen simptomları	Sarı beneklenme hastalığı bulaşıklık oranı (%)
Dökülgen	7000	24	0.34
Hönüsü	7000	30	0.43
Sergi Karası	6000	6	0.10
Horoz karası	6000	4	0.07
Dımışkı	3000	22	0.73
Sultani çekirdeksiz	3000	18	0.60
Besni	3000	2	0.06
Kabarcık	3000	32	1.07
Hatunparmağı	2500	35	1.40
Öküzgözü	2000	40	2.00
Boğazkere	2000	7	0.35
Yalova İncisi	2000	21	1.05
Ata sarısı	2000	8	0.40
İtalya	2000	5	0.25
Kilis karası	2000	12	0.60
Trakya İlkeren	2000	2	0.10
<b>TOPLAM</b>	<b>54500</b>	<b>268</b>	<b>0.49</b>

Sonuç olarak Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nde toplam 54500 adet fidan makroskobik olarak kontrol edilmiş ve toplam 268 fidanda belirtilen simptomlar belirlenmiştir. Buna göre bulaşıklık oranı toplam fidan üretiminde % 0.49 olarak bulunmuştur. Bu bulaşıklılığın nedenini araştırmak amacıyla Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nde bulunan damızlık bloklarının *Bağ sarı benek* hastalığı açısından incelenmiştir.

Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'ndeki damızlık parselinde bulunan, yörede en fazla yetiştiriciliği yapılan 5 çeşit; Dımışkı, Hönüsü, Dökülgen, Sultani çekirdeksiz, Besni ve 4 anacın; 1103 P, 140 Ru, 99 R, 110 R damızlık blokları *Bağ sarı benek* hastalığı açısından incelenmiştir. İncelenen damızlık omcalarda sarı

beneklenme ve damar bantlaşması semptomları araştırılmıştır. Toplam 89 damızlık omca hastalık açısından tek tek gözlenmiştir (Çizelge 4.5).

Gaziantep ilinde en fazla yetiştiriciliği yapılan 5 çeşit olan Dımışkı, Hönüü, Dökülgen, Sultani çekirdeksiz, Besni çeşitlerinin damızlık parselinde bulunan 69 omcasında *Bağ sarı benek* hastalığının herhangi bir sarı benek ve damar bantlaşması semptomuna rastlanmamıştır. Ancak bu çeşitlerden 5'er örnek sPAGE analizinde incelenmiştir.

Çizelge 4.5. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nde incelenen damızlık bloğu çeşit adı, toplam omca adedi, makroskobik gözlem sonuçları

<b>Damızlık bloğunda yer alan çeşitler</b>	<b>Toplam omca sayısı</b>	<b>Damar bantlaşması ve sarı benek gösteren omca sayısı</b>
Dımışkı	20	0
Dökülgen	20	0
Hönüsü	19	0
Sultani çekirdeksiz	5	0
Besni	5	0
1103 P	5	0
140 Ru	5	0
99 R	5	0
110 R	5	0
<b>TOPLAM</b>	<b>89</b>	<b>0</b>

Gaziantep ilinde bağ yetiştiriciliğinde en çok tercih edilip yetiştirilen 1103 P, 140 Ru, 99 R ve 110 R anaçlarının hiçbirinde beneklenme ve damar bantlaşması semptomu gözlenmemiştir. Ancak herhangi bir semptomolojik bulguya rastlanmasa da sPAGE analizinde kullanılmak üzere her bir çeşitten 5'er adet olmak üzere anaçlardan toplam 20 örnek laboratuvar çalışması için alınmıştır.

Sonuç olarak Gaziantep ilinde en fazla yetiştiriciliği yapılan 5 çeşit olan Dımışkı, Hönüü, Dökülgen, Sultani çekirdeksiz ve Besni damızlık bloklarının makroskobik olarak semptom göstermediği ancak 2006 yılında bu çeşitlerden üretilen fidanlarda sarı benek semptomları geliştiği belirlenmiştir. Bu çeşitlerden Dımışkı'da % 0.73, Hönüü'de % 0.43, Dökülgen'de % 0.34, Sultani çekirdeksiz'de % 0.60 ve

Besni çeşidinde % 0.06 oranında bulaşıklık oranı saptanmıştır. Bunun nedeni araştırıldığında Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nden alınan bilgilere göre fidan üretiminde sadece damızlık bloklarının kullanılmadığını bunlarla birlikte Gaziantep'teki bazı bağ alanlarından bağ çubuğu alınarak fidan üretildiği belirtilmiştir. Bulaşıklığın nedeninin üretim alanı dışından getirilen ancak herhangi bir testleme yapmaksızın üretime alınan çeşitlerden olduğu düşünülmektedir.

Bağcılığın anavatanı olan ülkemizde virüs ve viroidlerden arındırılmamış, sertifikasız ve kontrolsüz koşullarda fidan üretimi yapıldığı, bunun modern sistemlerin kullanıldığı dünya bağcılığına oranla birim alandan daha düşük verim almamıza ve dış pazarlarda rekabet gücümüzün azalmasına neden olduğu açıktır.

#### **4.2. Sörvey Çalışması Sonucu Toplanan Örneklerin sPAGE Analiz Bulguları**

##### **4.2.1 Gaziantep İli Bağ Alanlarından Toplanan Örneklerin sPAGE Analiz Bulguları**

Sörveylenen Gaziantep ili bağ alanlarında GYSVd-1 ve GYSVd-2'nin karakteristik belirtileri olan sarı beneklenme ve damar bantlaşması gösteren toplam 100 omcadan yaprak örnekleri alınmıştır. Toplanan 100 omcadan alınan yaprak örnekleri nükleik asit ekstraksiyonu (Szychowski ve ark., 1988) yapılarak purifiye edilmiştir. Purifiye edilen örnekler -20 °C'de stoklanmıştır. Stoklardan alınan 100 örnek ardışık poliakrilamid jel elektroforez (sPAGE) analizi (Semancik ve Harper, 1984) ile incelenmiştir.

Analiz sonucunda 100 örnekten 67'sinin GYSVd-1 ve/veya GYSVd-2 ile bulaşık olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.6).

sPAGE analizinde bulaşık bulunan 67 örnekten 46 tanesinin çift bant yani GYSVd-1 ve 2'nin her ikisi ile de bulaşık, 21 tanesinin ise tek bant içerdiği belirlenmiştir. Tek bant içeren örneklerden 12 tanesinin GYSVd-1 ile 9 tanesinin ise GYSVd-2 ile bulaşık olduğu saptanmıştır (Şekil 4.5). Bununla birlikte poliakrilamid jel üzerinde bağ sarı benek hastalığını oluşturan viroidler dışında diğer bağ viroidlerinin varlığı da gözlenmiştir. Bunlardan birisinin GYSVd'den daha yüksek sayıda nükleotid içerdiği ve CEVd-g veya AGVd olabileceği, diğerinin ise bağ sarı

benek viroidlerinden daha az sayıda nukleotid sayısı içerdiği ve HSVd-g'ine yakın olduğu gözlenmiştir.

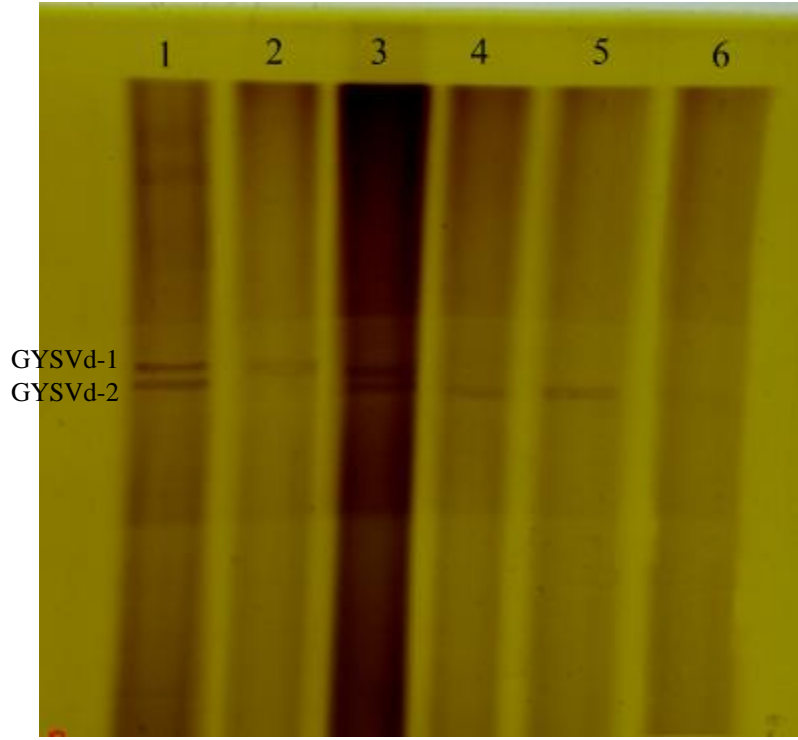
Çizelge 4.6. Gaziantep ili bağ alanlarından toplanan örneklerin GYSVd-1 ve 2 açısından sPAGE analiz sonuçları

İlçe adı	Çeşit adı	Bulaşık omca sayısı	Toplanan örnek sayısı	sPAGE sonucu (pozitif / negatif sayısı)	sPAGE pozitif (çift bant/ tek bant)
Araban	Dımaşkı	41	2	2 / 0	1 / 1
	Hönüsü	15	2	2 / 0	2 / 0
İslahiye	Hönüsü	34	16	11 / 5	6 / 5
	S.çekirdeksiz	13	5	4 / 1	3 / 1
	Dökülgen	14	2	2 / 0	2 / 0
	Dımaşkı	7	1	1 / 0	1 / 0
Karkamış	Dımaşkı	27	6	5 / 1	3 / 2
	Besni	4	1	0 / 1	0 / 0
Nizip	Dımaşkı	29	4	2 / 2	1 / 1
	Besni	19	3	2 / 1	2 / 0
	Dökülgen	3	1	1 / 0	1 / 0
Nurdağı	Dımaşkı	0	1	0 / 1	0 / 0
	Kabarcık	0	1	0 / 1	0 / 0
Oğuzeli	Dımaşkı	24	2	2 / 0	1 / 1
	Dökülgen	11	1	1 / 0	1 / 0
	Hönüsü	2	1	1 / 0	1 / 0
	Muhammediye	2	1	0 / 1	0 / 0
Şahinbey	Dımaşkı	98	15	9 / 6	6 / 3
	Dökülgen	27	5	3 / 2	1 / 2
	Hönüsü	37	4	2 / 2	0 / 2
Şehitkamil	Dımaşkı	65	8	5 / 3	4 / 1
	Hönüsü	94	7	4 / 3	3 / 1
	Dökülgen	67	6	3 / 3	2 / 1
Yavuzeli	Dımaşkı	16	4	4 / 0	4 / 0
	Hönüsü	3	1	1 / 0	1 / 0
<b>TOPLAM</b>		<b>652</b>	<b>100</b>	<b>67/33</b>	<b>46/21</b>

sPAGE analizi sonucunda pozitif sonuç veren 67 örnekten 10 örnek polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analiz çalışmalarına alınmıştır.

Çin'de 2002-2005 yıllarında bağlarda yapılan benzer bir sörvey çalışmasında toplanan 70 omcadan alınan yaprak örneğinden 29'unun sadece GYSVd'leri ile ve

ayrıca 23'ünün de HSVd-g ve GYSVd'leri ile karışık infeksiyon oluşturduğu bildirilmiştir. 70 örneğin 52'sinde GYSVd'lerinin olduğu ve bulaşıklık oranının % 74 olarak saptandığı belirtilmiştir (Li ve ark., 2005).



Şekil 4.5. Gaziantep bağ alanlarında *Bağ sarı benek* hastalığı ile simptomolojik olarak bulaşık bulunan omcalardan alınan örneklerin GYSVd-1 ve 2 viroidleri açısından sPAGE analizi sonuçları 1) GYSVd-1 ve 2 ile bulaşık pozitif kontrol, 2) GYSVd-1 ile bulaşık Dımışkı çeşidi, 3) GYSVd-1 ve 2 ile bulaşık Dımışkı çeşidi 4,5) GYSVd-2 ile bulaşık Dökülgen çeşitleri, 6) negatif kontrol bağ

Sonuç olarak Gaziantep ilinde yapılan sörvey çalışmasında alınan 100 örnek sPAGE analizinde incelenerek 67 örnek GYSVd'ler ile bulaşık olarak saptanmıştır. 100 örnekten 33 örnekte hiçbir viroid bandına rastlanmamıştır. Bunun nedeninin purifikasyon hatalarından kaynaklanabileceği gibi bazı örneklerin hemen purifikasyonları yapılamayıp -20 °C'de bekletildikten sonra yapılmasından da kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda purifikasyon öncesi viroidlerin -20 °C'de uzun süre bekletilmesi sonucunda kayıpların olduğu bildirilmiştir (Önelge, 1994).

#### 4.2.2. Gaziantep İli Organik Bağ Alanlarından Toplanan Örneklerin sPAGE

##### Analiz Bulguları

Gaziantep Tarım il ve Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden alınan bilgilere göre Gaziantep ilinin 4 organik bağ üretim alanından *Bağ sarı benek* hastalığının karakteristik simptomsu olan sarı beneklenme ve damar bantlaşması simptomsu sergileyen, ancak simptomsu olmayan omcalar dışında organik üretim yapılan ve herhangi bir simptom geliştirmeyen omcalarından toplam 52 omca ardışık poliakrilamid jel elektroforez yöntemi ile viroidler açısından incelenmiştir (Çizelge 4.7).

Oğuzeli ilçesindeki Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nün organik bağ alanlarında yer alan 1000 omcada yapılan gözlemler sonucunda Dımışkı çeşidinde toplam 15 omcanın GYSVd'lerinin karakteristik simptomsunları sergilediği gözlenmiş ve bu omcaların 5'inden yaprak örnekleri alınarak purifiye edilmiştir. Purifiye edilen örnekler sPAGE analizine alınarak jel üzerinde GYSVd-1 ve GYSVd-2 için 366 ve 361 nükleotid sayıları hizasında viroid bantları elde edilmiştir. Diğer çeşitler Dökülgen ve Muhammediye çeşitleri olup herhangi bir hastalık simptomsu göstermese de Dökülgen çeşidinden ve Muhammediye çeşidinden yaprak örnekleri alınarak sPAGE analizi yapılmış fakat jel üzerinde hiçbir viroid bandına rastlanmamıştır.

Nizip ilçesinde Turnalı mevkiinde organik bağ yetiştiricilik alanında Boğazkere, Öküzgözü, Şiraz ve Cabernet Sauvignon çeşitlerinde simptom görülmesiz alınmış 5 örneğin sPAGE analizi sonucunda herhangi bir viroid bandına rastlanmamış olup örnekler sağlıklı olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 4.7. Gaziantep ili organik bağ alanlarında *Bağ sarı benek* hastalığının sPAGE yöntemi ile elde edilen sonuçları

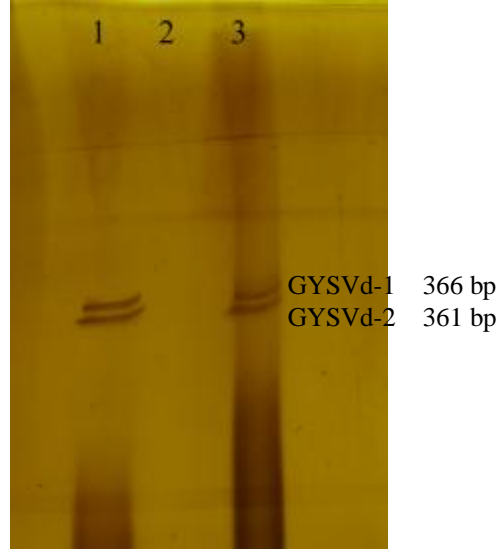
Organik bağ üretimi yapılan ilçeler	Organik bağ çeşitleri	Toplam omca sayısı	Bulaşık omca sayısı	sPAGE için alınan örnek sayısı	sPAGE sonucu (pozitif/negatif) sayısı
Oğuzeli	Dımışkı	1000	15	5	5/0
	Dökülgen	20	0	2	0/2
	Muhammediye	5	0	1	0/1
Nizip (Turnalı mevki)	Boğazkere	9000	0	5	0/5
	Öküzgözü	6400	0	5	0/5
	Şiraz	12500	0	5	0/5
	Cabernet Sauvignon	2500	0	5	0/5
Nizip (Günaltı mevki)	Boğazkere	5000	0	5	0/5
	Öküzgözü	5000	6	5	2/3
	Şiraz	5000	0	5	0/5
	Cabernet Sauvignon	5000	0	5	0/5
Karkamış	Horoz karası	480	0	2	0/2
	Hönüsü	320	0	2	0/2
<b>TOPLAM</b>		<b>52225</b>	<b>21</b>	<b>52</b>	<b>7/45</b>

Nizip ilçesinde, Günaltı mevkiinde 100 dönüm üzerine kurulmuş olan diğer organik bağ alanında Öküzgözü çeşidinde 6 omcada genç yapraklarda damar bantlaşma belirtileri belirlenmiş ve ardışık poliakrilamid jel elektroforez yöntemiyle 5 örneğin incelenmesi sonucunda 2 örneğin GYSVd-1 ve 2 ile bulaşıklık olduğu belirlenmiş olup 366 ve 361 seviyelerinde bantlar oluşturduğu saptanmıştır (Şekil 4.6). Ayrıca aynı bağ alanında bulunan Boğazkere, Şiraz ve Cabernet Sauvignon çeşitlerinde makroskopik olarak *Bağ sarı benek* hastalığı belirtilerine rastlanmasa da sPAGE analizine alınmış fakat hiçbir viroid bandına rastlanmamıştır.

Karkamış ilçesinde 4 dönüm üzerinde kurulu organik bağ alanında Horoz Karası ve Hönüsü çeşitleri GYSVd'i açısından sPAGE analizi ile incelenmiş ancak hastalığa ait herhangi bir viroid bandına rastlanmamıştır.

Gaziantep ilinde yetiştiriciliği yapılan 4 organik bağ alanındaki Öküzgözü ve Dımışkı çeşitlerinde makroskopik olarak damar bantlaşması ve sarı beneklenme

simptomları belirlenmiş bununla birlikte bu örneklerin sPAGE analizinde GYSVd-1 ve 2'ye ait viroid bantları saptanarak *Bağ sarı benek* hastalığı ile bulaşık olduğu kanıtlanmıştır.



Şekil 4.6. Organik bağ üretim alanından alınan örneklerle yapılan sPAGE analizi 1; GYSVd-1 ve 2 ile infekteli pozitif bağ, 2; Negatif kontrol bağ, 3; GYSVd-1 ve 2 ile infekteli Öküzgözü çeşidi

#### 4.2.3. Gaziantep İli Bağ Fidanı Üretim Alanından Toplanan Örneklerin sPAGE

##### Analiz Bulguları

Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nde yörede en fazla üretimi yapılan 5 çeşit olan Dımışkı, Hönüsü, Dökülgen, Sultani çekirdeksiz, Besni ve 4 anaç olan 1103 P, 140 Ru, 99 R ve 110 R damızlık bloklarından her bir çeşit ve anaçtan symptom göstermeksizin toplanan 45 örnek sPAGE analiz yöntemi ile incelenmiştir (Çizelge 4.8). sPAGE analizi sonucunda damızlık bloklarından alınan örneklerin hiçbirinde viroid bandına rastlanmamıştır. sPAGE analizinde negatif sonuç alınan bu örneklerin arazide de *Bağ sarı benek* hastalığı için karakteristik symptomlar olan sarı beneklenme ve damar bantlaşması symptomlarını göstermediği de belirlenmiştir. Jel üzerinde hiçbir viroid bandı görülmemesi bu damızlık bloklarının temiz olabileceği sonucunu ortaya koymaktadır.

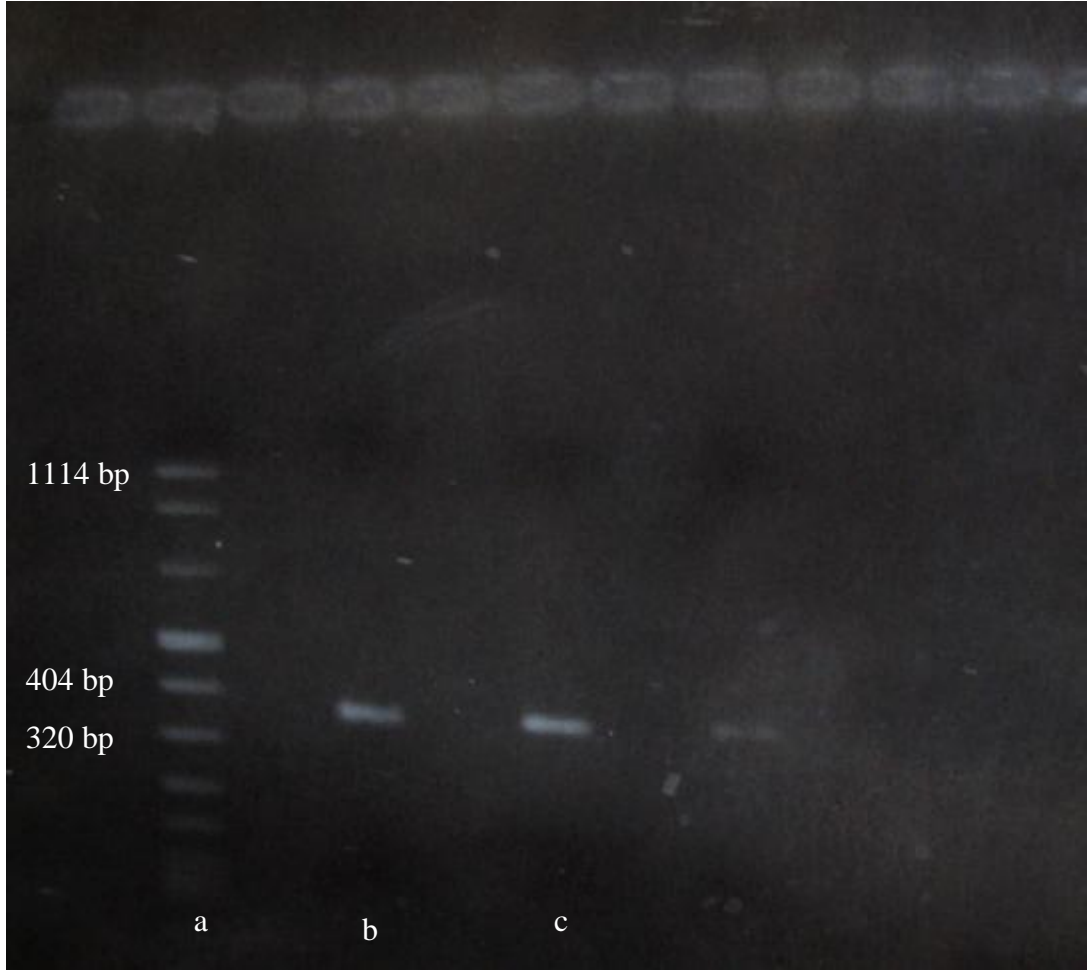
Çizelge 4.8. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nde incelenen damızlık bloğu çeşit adı, toplam omca adedi, sPAGE analizine alınan örnek sayısı ve sonuçları

Çeşit adı	Toplam omca sayısı	sPAGE analizine alınan örnek sayısı	sPAGE analiz sonuçları (pozitif/negatif)
Dımışkı	20	5	0/5
Dökülgen	20	5	0/5
Hönüsü	19	5	0/5
Sultani çekirdeksiz	5	5	0/5
Besni	5	5	0/5
1103 P	5	5	0/5
140 Ru	5	5	0/5
99 R	5	5	0/5
110 R	5	5	0/5
<b>TOPLAM</b>	<b>89</b>	<b>45</b>	<b>0/45</b>

### 4.3. sPAGE Analiz Sonuçları Pozitif Çıkan Örneklerin RT-PCR Analiz Bulguları

Gaziantep ili bağ alanlarında GYSVd-1 ve GYSVd-2'nin karakteristik belirtileri olan sarı beneklenme ve damar bantlaşması belirtileri gösteren omcalardan alınan 100 örnekten (Çizelge 4.1) sPAGE analizinde pozitif çıkan 67 örneğin 10'u RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction) analizine alınmıştır. Bu 10 örnekten 6 tanesi sPAGE analizinde GYSVd-1 ve 2'nin bantlarını, diğer 4 örnekten 3 tanesi GYSVd-1'in, 1 tanesi ise GYSVd-2'nin viroid bantı oluşturan örneklerden seçilmiştir.

sPAGE analizinde çift bant oluşturan 6 örnek bu viroidler için spesifik primerlerin kullanıldığı RT-PCR analizinde GYSVd-1 ve GYSVd-2 viroidlerinin her ikisi için de pozitif sonuç verip % 2'lik agar jel üzerinde 366 ve 361 baz seviyelerinde bant oluşturduğu gözlemlenmiştir. sPAGE analizinde tek bant oluşturan 4 örnekten 3'ü sadece GYSVd-1 için ve 1 örnek ise GYSVd-2 için pozitif sonuç vermiştir (Şekil 4.7). GYSVd-1 için tek bant oluşturan 3 örneğin baz seviyeleri 366 olarak diğer GYSVd-2 için tek bant oluşturan 1 örneğin baz seviyesinin de 361 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.9).



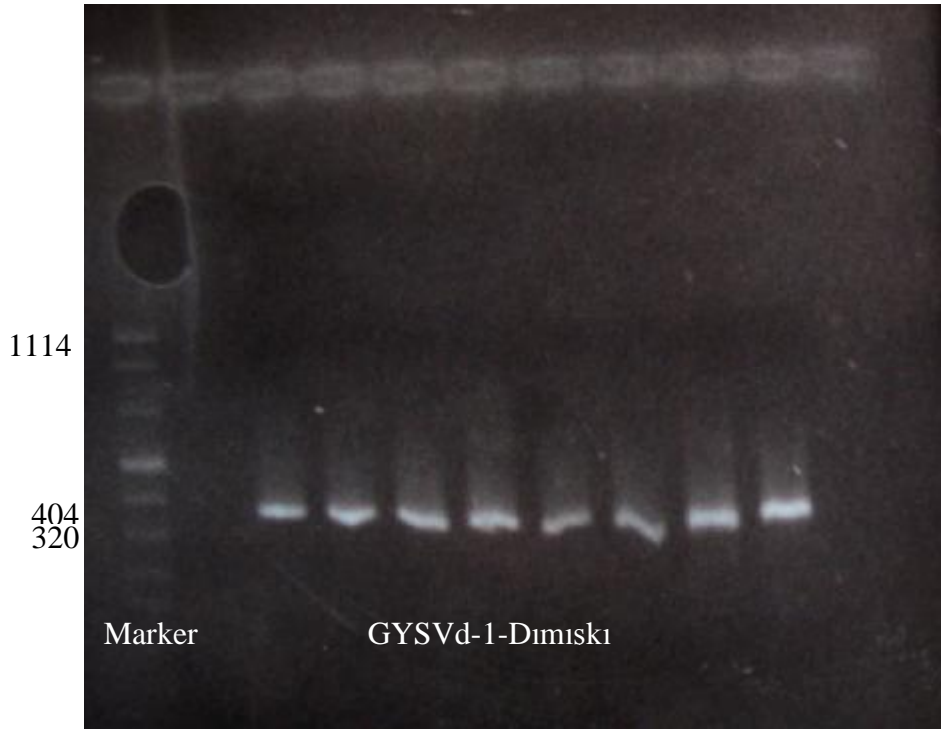
Şekil 4.7. RT-PCR analizi ile sPAGE analizi sonucu pozitif çıkan örneklerin GYSVd-1 ve 2 açısından sonuçları a; DNA Marker, b; GYSVd-1 ile bulaşık Dımışkı çeşidi, c; GYSVd-2 ile bulaşık Dımışkı çeşidi

sPAGE analizi sonucunda GYSVd-1 yada GYSVd- 2 veya her ikisi ile de bulaşık olan ve RT-PCR analizine alınan 10 örneğin, GYSVd-1 için 366, GYSVd-2 için 361 ve her ikisi için ise hem 366 hem de 361 baz seviyelerinde bant oluşturduğu gözlenmiş olup bu örneklerin *Bağ sarı benek* hastalığını taşıdığı RT-PCR analizi sonucunda belirgin bir şekilde ortaya konulmuştur.

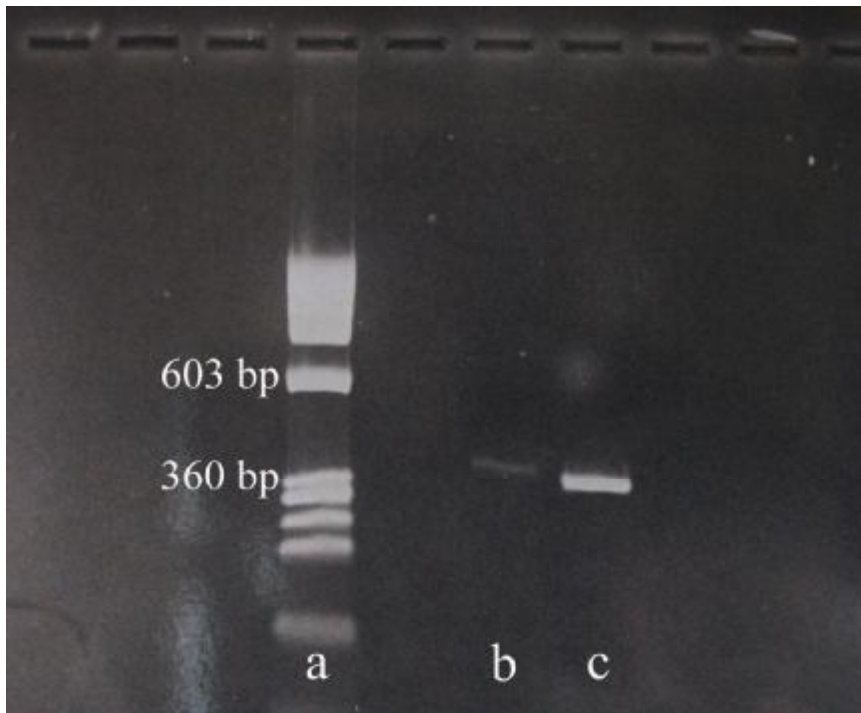
Çizelge 4.9. sPAGE analizi sonucu pozitif çıkan örneklerden seçilen 10 örneğin RT-PCR analiz sonuçları

Örnek no	Çeşit adı	sPAGE analiz sonuçları	Sahip olduğu viroidler	Baz seviyeleri	Nükleik asit dizilimine alınan örnekler
1	Dımışkı	Çift viroid bandı	GYSVd-1 ve GYSVd-2	366 ve 361	Alınmadı
2	Dımışkı	Çift viroid bandı	GYSVd-1 ve GYSVd-2	366 ve 361	Alınmadı
3	Dökülgen	Çift viroid bandı	GYSVd-1 ve GYSVd-2	366 ve 361	Alınmadı
4	Dökülgen	Çift viroid bandı	GYSVd-1 ve GYSVd-2	366 ve 361	Alınmadı
5	Hönüsü	Çift viroid bandı	GYSVd-1 ve GYSVd-2	366 ve 361	Alınmadı
6	Sultani çekirdeksiz	Çift viroid bandı	GYSVd-1 ve GYSVd-2	366 ve 361	Alınmadı
7	Dımışkı	Tek viroid bandı	GYSVd-1	366	<b>Alındı (GYSVd-1)</b>
8	Dımışkı	Tek viroid bandı	GYSVd-2	361	<b>Alındı (GYSVd-2)</b>
9	Dökülgen	Tek viroid bandı	GYSVd-1	366	Alınmadı
10	Hönüsü	Tek viroid bandı	GYSVd-1	366	Alınmadı

RT-PCR analizlerinde tek bant oluşturan GYSVd-1 ve GYSVd-2 ile infekteli oldukları saptanan Dımışkı çeşidinden birer örnek saflaştırmaya alınmak amacıyla 200 µl olacak şekilde çoğaltılmıştır (Şekil 4.8). Çoğaltılan viroidler tekrar % 2'lik düşük ısıda çözünen (low melt agar) agar üzerinde yürütülmüştür. Ethidium bromid ile boyanan jelde viroid bantları belirledikten sonra bu kısım jel üzerinden kesilerek Roche firmasının PCR Ürünü Yüksek Oranda Saflaştırıcı Purifikasyon Kiti (High Pure PCR Product Purification Kit) ile purifiye edilmiştir (Şekil 4.9). Purifiye edilen PCR ürünleri nükleik asit dizilimlerinin belirlenmesi amacıyla Iontek firmasına gönderilmiştir.



Şekil 4.8. RT-PCR sonucunda pozitif bulunan GYSVd-1-Dımışkı örneğinin PCR’da çoğaltılması



Şekil 4.9. Saflaştırma sonucu elde edilen viroid bantları a; DNA Marker, b; GYSVd-1-Dımışkı örneğinin saflaştırılmış 366 bp sahip viroid bandı, c; GYSVd-2-Dımışkı örneğinin saflaştırılmış 361 bp sahip viroid bandı

#### 4.4. RT-PCR Analiz Sonuçları Pozitif Çıkan İki Örneğin Nükleik Asit Dizilimlerinin Belirlenmesi

Yapılan RT-PCR analizinden biri GYSVd-1 ile diğeri GYSVd-2 ile bulaşık olan iki Dımışkı örneği saflaştırılarak nükleik asit dizilimleri belirlenmek üzere Iontek firmasına gönderilmiştir. Iontek firmasından gelen GYSVd-1-Dımışkı örneğinin 366 nükleotid içerdiği ve 59 Adenin (A), 115 Sitozin (C), 108 Guanin (G) ve 84 Timin (T) bazından oluştuğu belirlenmiştir. (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. GYSVd-1-Dımışkı örneğinin nükleik asit dizilimi

366 nükleotid 59 A, 115 C, 108 G, 84 T	
1	TCTCCGGATC TTCTTGCTTG TGGTTCCTGT GGTTTCACCT CGGAAGGCCG CCGCGGACCT
61	GCAAAGAAGA AGATAGGGGC AGAGGGGGAG TGAGCCTCGT CGTCGACGAA GGGGTGCACT
121	CCGAGTGCCT GAGCTGGTCG ACGTCCAGCT CCCTCGGGAC CTGCTGCTCT GGGCGGAAGA
181	GTCTTCTGAC ACTTCTAGCC TATTCACGTT CGCGTCCTTG AGGCCTGGCG TAACGCGGCT
241	CTTGCCACCA GGTCGCCTCC GCTAGTCGAG CGGACTTGGT CTCTCCGCC AAAAGCCCTT
301	TTTCTTTCTG ATCAGCTTGT TCCAACGCGC CCCGCGAGTG CAATCCCCGG AACCCCCGCT
361	AAGAGG

Iontek firmasında dizilimi belirlenen diğer bağ viroidi GYSVd-2-Dımışkı örneğinin 62 Adenin (A), 111 Sitozin (C), 109 Guanin (G) ve 79 Timin (T) bazından oluştuğu ve toplam 361 nükleotide sahip olduğu belirtilmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. GYSVd-2-Dımışkı örneğinin nükleik asit dizilimi

361 nükleotid 62 A, 111 C, 109 G, 79 T	
1	TCTCCGGATC TTCTTGCTTG TGGTTCCTGG TTTCACCTCG GAAGGCCGCC GCGGTCCTGC
61	AAAGAAGAAG ATAGGGGCAG AGGGGAGTGG AGCCTCGTCG TCGACGAAGG GGTGCACTCC
121	GAGTGCCTGA GCTTGGTCGA CGTCCAGCTC CTCGGGCCGC ACCGGAGCGC CTAGAAAAGG
181	TCCTCGGACT TTCTTCTATC TCCGAAGCCG GTTTGAGGCC CGGCGAAACG CGGGCCTGTC
241	TCCTAAGATG CCTCCGCTAG TCGAGCGGAC TTGGCCTCTT CCGCCGAGG ACCTTTTCTT
301	TCTGATCTTG CTTGTTCCAA CGAGCCCCGC GAGTGGAATC CCCGGAACCC CTGCGAAAAG

Sonuç olarak Gaziantep ili bağ alanlarından seçilen iki Dımışkı çeşidinde *Bağ sarı benek* hastalığının karakteristik semptomu olan sarı beneklenme ve damar bantlaşması semptomu gösteren, sPAGE ve RT-PCR analizlerinde biri GYSVd-1 diğeri GYSVd-2 viroidine ait bant oluşturan örnekler nükleotid sayıları farklı olan gen bankası verilerinde bulunan GYSVd-1 ve -2 viroidleriyle karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmada bazı nükleotidlerin farklı olduğu farklılığın genellikle primer bölgesinde ve viroidin uç kısımlarda yer aldığı belirlenmiştir.

Gaziantep ili bağ alanlarında Dımışkı çeşidinde bulunan GYSVd-1 izolatu gen bankasında bulunan Avustralya izolatu olan 367 nükleotide sahip GYSVd-1.001, Güney Avustralya izolatu olan 368 nükleotide sahip GYSVd-1.002 ve lokal izolatu olan 366 nükleotide sahip GYSVd-1.015 izolatları ile karşılaştırılmış ve viroidlerin değişken ve terminal bölgelerinde farklılıkların bulunduğu diğer bölgelerinin ise hemen hemen aynı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Dımışkı çeşidinde bulunan GYSVd-1 viroidinin nükleotid dizilim karşılaştırması

1 GYSVd-1.001	TCTGGGATCTTTTGCTTGCTGTTCTGCTGGTTCCTGCTGGAGGCTGGCTGGGCTGCA-AAGAAGAAGATAGGGG
2 GYSVd-1-Dımışkı	TCTGGGATCTTTTGCTTGCTGTTCTGCTGGTTCCTGCTGGAGGCTGGCTGGGCTGCA-AAGAAGAAGATAGGGG
3 GYSVd-1.002	TCTGGGATCTTTTGCTTGCTGTTCTGCTGGTTCCTGCTGGAGGCTGGCTGGGCTGCA-AAGAAGAAGATAGGGG
4 GYSVd-1.015	TCTGGGATCTTTTGCTTGCTGTTCTGCTGGTTCCTGCTGGAGGCTGGCTGGGCTGCA-AAGAAGAAGATAGGGG
1 GYSVd-1.001	CAGAGGGGGAGTGAGCTGTGTGAGAAGGGGTGACTGAGTGTGAGTGGTGAAGTCTCTGGG
2 GYSVd-1-Dımışkı	CAGAGGGGGAGTGAGCTGTGTGAGAAGGGGTGACTGAGTGTGAGTGGTGAAGTCTCTGGG
3 GYSVd-1.002	CAGAGGGGGAGTGAGCTGTGTGAGAAGGGGTGACTGAGTGTGAGTGGTGAAGTCTCTGGG
4 GYSVd-1.015	CAGAGGGGGAGTGAGCTGTGTGAGAAGGGGTGACTGAGTGTGAGTGGTGAAGTCTCTGGG
1 GYSVd-1.001	CAAGCTGCTTGGGGGAAGAGTCTTGAACAATTAGTAATTAAGTGTGAGGCTGGGTAAAGGG
2 GYSVd-1-Dımışkı	CC-TGCTGCTTGGGGGAAGAGTCTTGAACAATTAGTAATTAAGTGTGAGGCTGGGTAAAGGG
3 GYSVd-1.002	CAAGCTGCTTGGGGGAAGAGTCTTGAACAATTAGTAATTAAGTGTGAGGCTGGGTAAAGGG
4 GYSVd-1.015	CAAGCTGCTTGGGGGAAGAGTCTTGAACAATTAGTAATTAAGTGTGAGGCTGGGTAAAGGG
1 GYSVd-1.001	CTTTGCAAGGAIGCTGGTAGTGAGGGAATTGGTCTTGGCAAGCTTTTTTTTAAATGAGTT
2 GYSVd-1-Dımışkı	CTTTGCAAGGAIGCTGGTAGTGAGGGAATTGGTCTTGGCAAGCTTTTTTTTAAATGAGTT
3 GYSVd-1.002	CTTTGCAAGGAIGCTGGTAGTGAGGGAATTGGTCTTGGCAAGCTTTTTTTTAAATGAGTT
4 GYSVd-1.015	CTTTGCAAGGAIGCTGGTAGTGAGGGAATTGGTCTTGGCAAGCTTTTTTTTAAATGAGTT
1 GYSVd-1.001	GTTCAAAGGCTGGAGTCAATCTGGAACTGGTAAGAGG
2 GYSVd-1-Dımışkı	GTTCAAAGGCTGGAGTCAATCTGGAACTGGTAAGAGG
3 GYSVd-1.002	GTTCAAAGGCTGGAGTCAATCTGGAACTGGTAAGAGG
4 GYSVd-1.015	GTTCAAAGGCTGGAGTCAATCTGGAACTGGTAAGAGG

Diğer izolat, Gaziantep ili bağ alanlarında Dımışkı çeşidinde bulunan GYSVd-2 olup gen bankasında bulunan Avustralya izolatı olan 361 nükleotide sahip GYSVd-2.001, Çin izolatı olan 362 nükleotide sahip GYSVd-2.003 ve yine Çin izolatı olan 363 nükleotide sahip GYSVd-2.005 izolatları ile karşılaştırılmıştır. Nükleotid farklılıklarının viroidlerin değişken ve terminal bölgelerinde bulunduğu diğer bölgelerinin ise benzer olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.13).

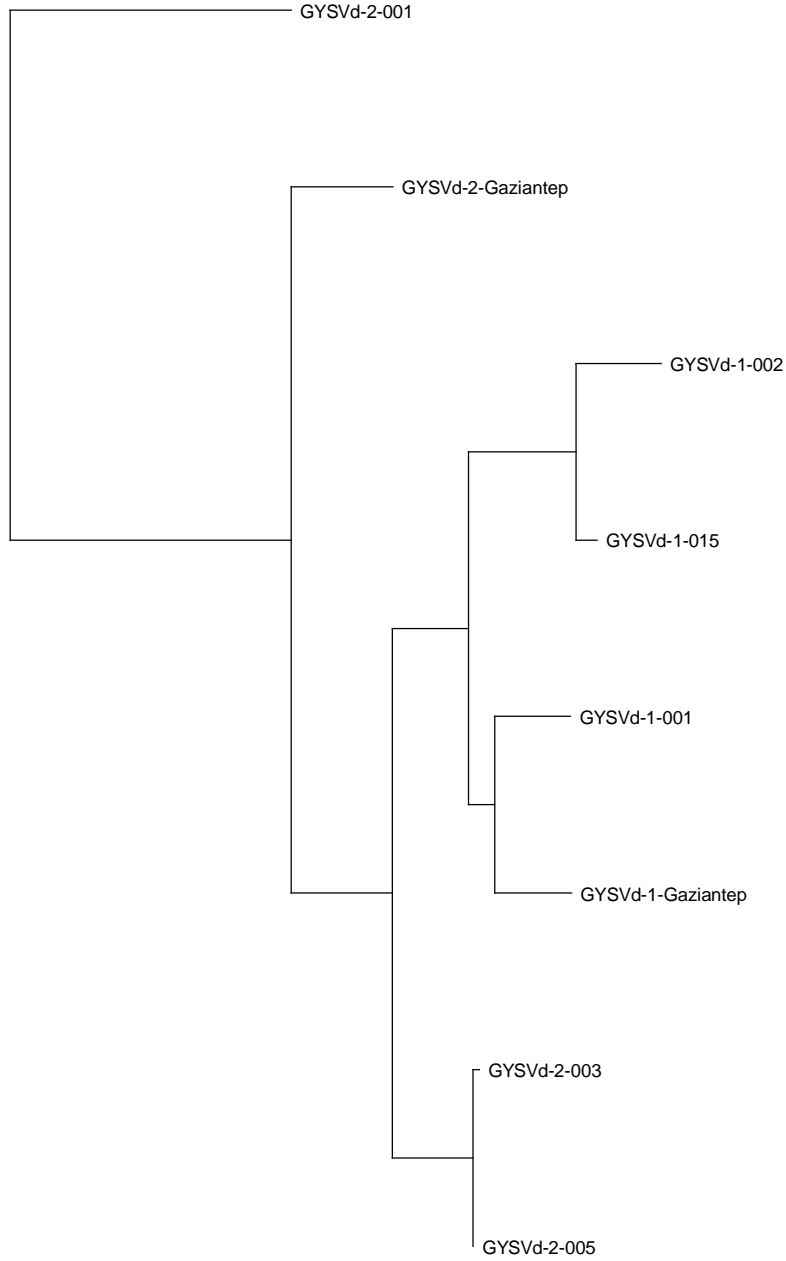
Gaziantep bölgesinde Dımışkı çeşidinden elde edilen GYSVd-1 ve GYSVd-2 viroidlerinin gen bankasından elde edilen diğer viroidlerle karşılaştırılarak soy ağacının belirlenmesi “Clustal W” programına göre gerçekleştirilmiş (Thompson ve ark., 1994) ve Çizelge 4.14’de belirtilmiştir.

Gen bankasından alınan diğer izolatlar ile yapılan karşılaştırma sonucunda GYSVd-1-Dımışkı izolatının % 97 oranında Avustralya izolatı ile benzerlik gösterdiği, GYSVd-2’nin ise % 98 oranında yine Avustralya izolatı ile benzerlik oluşturduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.13. Dımışki çeşidinde bulunan GYSVd-2 viroidinin nükleotid dizilim karşılaştırması

1 GYSVd-2.001	---- GGAT ATTT TTGCGT TGTGTTA A C T GGAAGG C T G GGA TG AGAGAAAAGAAGAAGGG
2 GYSVd-2.003	T T CCGAT ATTT TTGCGT TGTGTTA A C T GGAAGG C T G GGA TG AGAGAAAAGAAGAAGGG
3 GYSVd-2.005	T T CCGAT ATTT TTGCGT TGTGTTA A C T GGAAGG C T G GGA TG AGAGAAAAGAAGAAGGG
4 GYSVd-2-2-Dımışki	-- T T CCGAT TT TIG TTGCGT TGTGTTA A C T GGAAGG C T G GGA TG AAAGAAGAAGATAGGG
1 GYSVd-2.001	AGAGGGGAATGAG C T GT GT GA GAAGGGGTG A TT GAAGAG TGG -- GT GT GG T C C T GA
2 GYSVd-2.003	AGAGGGGAATGAG C T GT GT GA GAAGGGGTG A TT GAAGAG TGG -- GT GT GG T C C T GA
3 GYSVd-2.005	AGAGGGGAATGAG C T GT GT GA GAAGGGGTG A TT GAAGAG TGG -- GT GT GG T C C T GA
4 GYSVd-2-2-Dımışki	AGAGGGGAGTG -GAG C T GT GT GA GAAGGGGTG A T C GAGT C TGAG TTGT GA GT C AG T C TGGG
1 GYSVd-2.001	G A CCGAG GC -TAGAAAAGG T C T GGA TTT TT TAT T C GAAG GGTTCAGG C C G GAAA G C GGG C T
2 GYSVd-2.003	G A CCGAG GC -TAGAAAAGG T C T GGA TTT TT TAT T C GAAG GGTTCAGG C C G GAAA G C GGG C T
3 GYSVd-2.005	G A CCGAG GC -TAGAAAAGG T C T GGA TTT TT TAT T C GAAG GGTTCAGG C C G GAAA G C GGG C T
4 GYSVd-2-2-Dımışki	G A CCGAG GC TAGAAAAGG T C T GGA TTT TT TAT T C GAAG GGTTCAGG C C G GAAA G C GGG C T
1 GYSVd-2.001	GT T C TAAGATG C T C G TAGT GAG GGA TTGG C T T T G C GAGGA C TTTT TTT TAAT TTG TTGTT
2 GYSVd-2.003	GT T C TAAGATG C T C G TAGT GAG GGA TTGG C T T T G C GAGGA C TTTT TTT TGAT TTG TTGTT
3 GYSVd-2.005	GT T C TAAGATG C T C G TAGT GAG GGA TTGG C T T T G C GAGGA C TTTT TTT TGAT TTG TTGTT
4 GYSVd-2-2-Dımışki	GT T C TAAGATG C T C G TAGT GAG GGA TTGG C T T T G C GAGGA C TTTT TTT TGAT TTG TTGTT
1 GYSVd-2.001	AA GAG C C G GAGTGGAA T C C C GGA C C C T G C AAAAAGG T C T
2 GYSVd-2.003	AA GAG C C G GAGTGGAA T C C C GGA C C C T G C AAAAAGG -----
3 GYSVd-2.005	AA GAG C C G GAGTGGAA T C C C GGA C C C T G C AAAAAGG -----
4 GYSVd-2-2-Dımışki	AA GAG C C G GAGTGGAA T C C C GGA C C C T G C AAAAAG -----

Çizelge 4.14 Gaziantep ili bağ alanlarında Dımışkı çeşidinden elde edilen ve nükleotid dizilimleri belirlenen GYSVd-1 ve GYSVd-2 viroidlerinin soy ağacı



## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Gaziantep ili bağ alanlarında *Bağ sarı benek* hastalığı (BSB) ve bu hastalığı oluşturan GYSVd-1 ve GYSVd-2 viroid etmenlerinin araştırıldığı bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Gaziantep ili bağ alanlarında *Bağ sarı benek* hastalığının varlığı ve yaygınlık oranını belirlemek amacıyla yürütülen sörvey çalışmasında 766363 adet omca incelenmiştir. Sörveyde *Bağ sarı benek* hastalığının karakteristik semptomu olan sarı beneklenme ve damar bantlaşması semptomları makroskopik olarak gözlenmiştir. Gaziantep ili bağ alanlarında Dımışkı, Dökülgen, Hönüsü, Sultani çekirdeksiz, Muhammediye ve Besni çeşitlerinde olmak üzere toplam 652 omca bu semptomlarla bulaşık bulunmuş ve bulaşıklık oranı % 0.08 olarak tespit edilmiştir.

2. Gaziantep ilinde organik bağ yetiştiriciliği yapılan alanlarda toplam 52225 omca *Bağ sarı benek* hastalığının spesifik semptomu olan sarı beneklenme ve damar bantlaşması açısından incelenmiştir. Bu omcalardan Öküzgözü ve Dımışkı çeşitlerinde bulunan toplam 21 omca makroskopik olarak sarı beneklenme ve damar bantlaşması semptomları ile bulaşık bulunmuştur. Buna göre organik bağ alanlarında *Bağ sarı benek* hastalığının bulaşıklık oranı % 0.04 olarak saptanmıştır.

3. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nde 2006 yılında üretilen tüm asma fidanları *Bağ sarı benek* hastalığı açısından incelenmiştir. İncelenen 54500 asma fidanından en çok semptom gösteren bağ çeşitleri sırasıyla Öküzgözü, Hatunparmağı, Kabarcık, Yalova incisi, Dımışkı, Sultani çekirdeksiz, Kilis karası, Hönüsü, Boğazkere, Dökülgen, İtalya, Sergi karası, Trakya ilkeren, Horoz karası ve Besni olmak üzere toplam 268 adet fidan makroskopik olarak sarı beneklenme semptomu ile bulaşık bulunmuştur. Fidanlıktaki *Bağ sarı benek* hastalığının bulaşıklık oranı % 0.49 olarak saptanmıştır.

Gaziantep ili bağ alanları, organik bağ yetiştiriciliği yapılan alanlar ve fidanlıklar olmak üzere BSB hastalığı semptomatolojik olarak saptanmış olup yaygınlık oranını artırmamak için geleneksel yöntem olan bu alanlarda bulunan omcalardan kesilip alınabilen çoğaltma materyalleri yerine virüs ve viroidlerden

arındırılmış sertifikalı fidan ile bağ tesisi kurulması önerilmektedir. Ayrıca bu alanlar içinde mekanik yollar ile bulaşmayı engellemek için kullanılan mekanik aletlerin % 1'lik Hypoklorit çözeltisi içinde dezenfekte edilip öylece kullanılması da dikkat edilecek önemli bir durumdur.

4. Fidanlıktaki damızlık bloklarından yörede en fazla yetiştiriciliği yapılan 5 çeşit (Dımışkı, Dökülgen, Hönüsü, Sultani çekirdeksiz ve Besni) ve 4 anacın (1103 P, 140 Ru, 99 R ve 110 R) BSB hastalığı açısından makroskobik olarak hastalık belirtilerinin gözlemleri yapılmış fakat bu hastalığa ait herhangi bir simptome rastlanmamıştır.

Damızlık bloklarının olduğu alanlar bitki hastalık ve zararlılarından korunmuş, hijyen kurallarına uygun, uluslararası standartlarda hazırlanmış kontrollü koşullarda tutulması ve bakımlarının yapılması önerilmektedir.

5. Gaziantep ili bağ alanlarından alınan ve sPAGE analizi sonucunda gümüş nitrat ile boyanarak incelenen 100 asma örneğinin 67'sinde GYSVd'lerine ait viroid bantları gözlenmiştir. Bunlardan Dımışkı, Dökülgen, Hönüsü ve Sultani çekirdeksiz çeşitlerinde olmak üzere toplam 67'sinin 46'sı çift viroid bandı (GYSVd-1 ve 2), 21'inde ise tek viroid bandının (GYSVd-1 veya GYSVd-2) varlığı belirlenmiştir.

6. Gaziantep ili organik bağ alanlarından makroskobik olarak simptom gösteren yada göstermeyen çeşitlerden alınmak üzere toplam 52 omcadan yapılan sPAGE analizi sonucunda 7 örneğin çift viroid bandı (GYSVd-1 ve 2) oluşturduğu belirlenmiştir. Bu 7 örneğin 5'inin Dımışkı, 2'sinin de Öküzgözü çeşidine ait olduğu saptanmıştır.

7. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü bağ damızlık bloklarından yörede en fazla yetiştiriciliği yapılan 5 çeşit olan Dımışkı, Dökülgen, Hönüsü, Sultani çekirdeksiz ve Besni ve 4 anaç olan 1103 P, 140 Ru, 99 R ve 110 R alınan toplam 45 örnek sPAGE analiz yöntemi ile incelenmiş fakat yapılan sPAGE analizi sonucunda hiçbir viroid bandına rastlanmamış ve bu çeşitlerin bağ viroidleri açısından temiz olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada bazı simptomatolojik olarak tespit edilen BSB hastalığı ile bulaşık omcaların sPAGE analizinde negatif sonuç vermelerinin bitki özsuyu

kayıplarının olduğu düşünülmektedir. Bununda alınan örneklerin 10 gr üzerinden çalışılıp, buzdolabında bir hafta bile bekletilmeden hemen çalışılması ve bitki dokularının önceden sıvı azot ile ezilmeden direk ekstrakte edilmesi gibi hususların göz önünde bulundurulması analizin daha sağlıklı sonuçlar ortaya koyması açısından önerilmektedir.

8. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nde üretilen fidanların simptomolojik olarak BSB hastalığı ile bulaşık olmasının nedeni ise damızlık bloklarından alınan bağ çubuklarının fidan üretimine yeterli kaynak sağlayamaması sonucu dışardan temin edilen ve testlenmeden kullanılan bağ fidanlarının olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle dışardan alınan bağ çubuklarının en azından kaynağının virüs ve viroidler açısından testlenmesi önerilmektedir. Ayrıca en güvenli yöntem olan sürgün ucu aşılama ve diğer yöntemleri kullanılarak virüs ve viroid hastalıkları açısından testlenmiş sertifikalı damızlık blokların fidan üretim ihtiyacını karşılayacak şekilde çoğaltılması gerekmektedir.

9. RT-PCR analizine alınan 10 bağ örneğinin analizi sonucunda 6 tanesinin GYSVd-1 ve GYSVd-2 viroidleri ile bulaşık olduğu ve 366 ile 361 nükleotid sayıları hizasında band oluşturduğu belirlenmiştir. RT-PCR analizi ile incelenen 4 örneğin ise 3 tanesinin GYSVd-1 (366 baz seviyesi) ile 1 tanesinin de GYSVd-2 (361 baz seviyesi) ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir.

10. RT-PCR analizi sonucu Dımışkı örneklerinden seçilen iki örnekten biri GYSVd-1 ve diğeri GYSVd-2 ile infekteli bulunan örneklerin nükleotid dizilimlerini belirlemek için Iontek firmasına gönderilmiş ve GYSVd-1-Dımışkı viroidinin 366, GYSVd-2-Dımışkı viroidinin ise 361 nükleotid dizilimine sahip olduğu belirlenmiştir. Nükleotid diziliminin Dımışkı -GYSVd-1 için 63 Adenin (A), 114 Sitozin (C), 107 Guanin (G) ve 83 Timin (T) bazından, Dımışkı-GYSVd-2 için ise 65'i A, 112'si C, 107'si G ve 77'si T bazlarını içerdiği belirlenmiş ve soy ağacı çıkarılmıştır.

Ülkemizde Gaziantep ili bağ alanlarında ilk kez *Bağ sarı benek* hastalığını oluşturan etmenlerden *Bağ sarı benek viroidi-1* (GYSVd-1) ve *Bağ sarı benek viroidi-2*'nin (GYSVd-2) varlığı saptanmıştır. Ayrıca Gaziantep ili bağ

alanlarında mevcut olan GYSVd-1 ile GYSVd-2'nin nükleotid dizilimleri belirlenmiş ve soy ağacı çıkarılmıştır.

## KAYNAKLAR

- ANONİM, 2005. Gaziantep Tarım İl Müdürlüğü verileri.
- ANONİM, 2006. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü verileri.
- ANONİM, 2007a. FAO Statistic. ([www.fao.org](http://www.fao.org)) 23, Ağustos, 2007.
- ANONİM, 2007b. TÜİK verileri ([www.tuik.gov.tr](http://www.tuik.gov.tr)) 23, Ağustos, 2007.
- BARBORA, D.J., MORTON, A. and ADAMS, A.N., 1990. Assessment of UK. hops for the occurrence of hop latent and hop stunt viroids. *Ann. Appl. Biol.* 116: 265-272.
- BORA, T. ve KARACA, İ., 1970. Bitki hastalıklarının sörveyi. Kültür bitkilerinde hastalığın ve zararın ölçülmesi. Ege Üniversitesi Matbaası, Bornova, 167: 8-43.
- BUSSIERE, F., OULLET, J., COTE, F., LEVESQUE, D., and PERREAULT, J.P., 2000. Mapping in solutions shows the peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in complex, branched secondary structure. *J. Virol.*, 74: 2647-2654.
- CRAMER, H.H., 1967. Plant protection and world crop protection advisory. Dept. of Fab. Bayer AG leverkusen, 524.
- DIENER, T.O., 1971. Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid III. Subcellular location of PSTVd-RNA and the question of whether virions exist in extracts or *in situ*, *Virology*, Jan; 43(1): 75-89.
- DIENER, T.O., 1987. The viroids. Plenum Publishing Corporation, New York. 344.
- DIENER, T.O., and RAYMER, W.B., 1967. Potato Spindle Tuber Virus: A plant virus with properties of nucleic acids. *Science*, 158: 378-381.
- DING, B. and OWENS, R.A., 2003. Movement. In: Viroids A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik, Eds. Csiro Publishing: Australia. Pages 49-55.
- DURAN-VILA, N., FLORES, R. and SEMANCIK, J.S., 1986. Characterisation of viroid-like associated with the Citrus Exocortis Syndrome. *Virology*, 150: 74-84.
- DURAN-VILA, N., JUÁREZ, J., and ARREGUI, J.M., 1988. Production of viroid-free grapevines by shoot tip culture. *Am. J. Enol. Viticult.*, 39: 217-220.
- FADDA, S., 2003. Impacts des cultures anciens sur les communautés de coleopteres et d'orthopteres de la plaine de Crau (Bouches-du- Rhone, France) M. S. Thesis, Université d'Axis-Marseille III.

- FLORES, R., DURAN-VILA, N., PÁLLAS, V. and SEMANCIK, J.S., 1985. Detection of viroid and viroid-like RNAs from grapevines. *J. Gen. Virol.*, 66: 2095-2102.
- FLORES, R., RANGLES, J.W., and BAR-JOSEPH, M., 2005. [www.thesis.library.adelaide.edu.au/uploads/approved/adt.](http://www.thesis.library.adelaide.edu.au/uploads/approved/adt.)
- FLORES, R., RANGLES, J.W., BAR-JOSEPH, M., and DIENER, T.O, 2000. Subviral agents: Viroids in virus taxonomy, 1009-1024 p.
- GARCÍA-ARENAL, F., PALLÁS, V. and FLORES, R., 1987. The sequence of viroid from grapevine closely related to severe isolates of Citrus exocortis viroid. *Nucl. Acids Res.*, 15: 4203-4210.
- GAZEL, M., 2002. Doğu Akdeniz Bölgesi bağ alanlarındaki viroidlerin araştırılması. Çukurova Üniv. Fen Bil. Enst., Doktora tezi, Adana, Türkiye. 90 s.
- GAZEL, M. and ONELGE, N., 2002. Detection of viroids in grapevine rootstocks by sequential polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Turk. Phytopathol.*, 31, 3, 167-172.
- GIERSON, D., 1982. Gel Electrophoresis of RNA. In "Gel electrophoresis of nucleic acids. A Practical Approach" IRL Pres. 1-38.
- GOTTWALD, T.R., 1993. CTV Epidemiology and disease survey strategies in; Citrus tristeza virus and Toxoptera citricidus in Central America: Development of management strategies and use of biotechnology for control. 2nd Citrus tristeza virus workshop, Maracay, Venezuela, September, 1992, IFAS, University of Florida, 106-109.
- GROSS, J.H., DOMDEY, H., LOSLOW, C., JANK, P. RABA, M., ALBERTY, H., and SÄNGER, H.L., 1978. Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature*, 273: 203-208.
- GÜLLÜ, M., 1989. Doğu Akdeniz Bölgesi Navel grubu portakal ve Satsuma mandarin ağaçlarında yaygın virüs ve virüs-benzeri hastalıkların sorveyi ve indekslenmesi üzerine çalışmalar. Çukurova Üniv. Fen Bil. Enst., Doktora tezi, Adana, Türkiye, 266s.
- HADIDI, A., and CANDRESSE, T., 2003. Polymerase chain reaction. in: Viroids A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik, Eds. Csiro Publishing: Australia. Pages 115-125.
- HADIDI, A., FLORES, R., RANGLES, J.W. and SEMANCIK, J.S., 2003. Viroids. Eds. Csiro Publishing: Australia. 370 p.

- HADIDI, A., TERAJ, Y., POWELL, C.A., SCOTT. S.W., DESVIGNES. J.C., IBRAHIM, L.M., and LEVY, L., 1992. Enzymatic cDNA amplification of hop stunt viroid variants from naturally infected fruit crops. *Acta Hort.*, 309: 339-344.
- HADIDI, A. and YANG, X., 1990. Detaction of pome fruit viroids by enzymatic cDNA amplification. *J. Virol. Methods*, 30: 261-270.
- HADIDI A., YANG, X., and HAMMOND, R.W., 1991. Polymeras chain reaction (PCR) amplification and nucleotide sequeence of apple scar skin viroid, *Phytopathology*, 81: 1246.
- HANOLD, D., and RANGLES, J.W., 1991. Coconut cadang-cadang disease and its viroid agent. *Plant Dis.*, 75: 330-335.
- HANOLD, D., SEMANCIK, J.S., and OWENS, R.A., 2003. Polyacrylamide gel electrophoresis. in: *Viroids* A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik, Eds. Csiro Publishing: Australia. Page 95-103.
- HERNANDEZ, C., and FLORES, R., 1992. Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self cleave in vitro via hammerhead structures. *Proc. Natl. Sci. USA*, 89: 3711-3715.
- HEWITT, W.B., and BOVEY, R., 1979. The viroses and virus-like diseases of the grapevine. A bibliographic report, 1971-1978. *Vitis*, 18: 316-376.
- HEWITT, W.B., MARTELLI, G.P., DIAS, H.F., and TAYLOR, R.H., 1970. Fanleaf virus of grapevine. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses* no.28.
- HULL, R., 2002. *Matthews plant virology* (4<sup>th</sup> edition). Academic press: San Diego, CA.
- IGLOI, G.L., 1983. A silver stain for the detection of nanogram amounts of RNA following two dimensional electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 134: 184-188.
- KEESE, P., and SYMONS, R.H., 1985. Domains in viroids: Evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc. Natl. Sci. USA*, 82: 4582-4586.
- KEESE, P., and SYMONS, R.H., 1987. Physical-chemical properties: molecular structure (XXXX and secondary). In: *The viroids*. T.O. Diener, ed. Plenum Pres: New York. 37-62 p.

- KOLTUNOW, A.M., KRAKE, L.R., JOHNSON, S.D., and REZAIAN, M.A., 1989. Two related viroids cause grapevine yellow speckle disease independently. *J. Gen. Virol.*, 70: 3411-3419.
- KOLTUNOW, A.M., KRAKE, L.R., and REZAIAN, M.A., 1988. Hop stunt viroid in Australian grapevine cultivars: potential for hop infection. *Aust. Plant Pathol.*, 17: 7-10.
- KOLTUNOW, A.M., and REZAIAN, M.A., 1988. Grapevine yellow speckle viroid: structural features of a new viroid group. *Nucl. Acids Res.*, 16: 849-864.
- KOLTUNOW, A.M., and REZAIAN, M.A., 1989a. Grapevine viroid IB, a new member of the apple scar skin viroid group contains the left terminal region of tomato planto macho viroid. *Virology*, 170: 575-578.
- KOLTUNOW, A.M., and REZAIAN, M.A., 1989b. A scheme for viroid classification. *Intervirology*, 30: 194-204.
- KRAKE, L.R., and WOODHAM, R.C., 1983. Grapevine yellow speckle agent implicated in aetiology of vein banding disease. *Vitis*, 22: 40-50.
- LI, S., GUO, R., TSUJI, M., and SANO, T., 2005. First reports of two grapevine viroids in China and the possible detection of a third. *New disease reports*. [www.bspp.org.uk/ndr/jan2006/2005-101.asp](http://www.bspp.org.uk/ndr/jan2006/2005-101.asp).
- LITTLE, A., and REZAIAN, M.A., 2003. Grapevine viroids. In: *Viroids* A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik, Eds. Csiro Publishing: Australia. 195-207p.
- MARTELLI, G.P., 1999. Infectious diseases and certification of grapevines. *Proceedings of the Mediterranean Network on Grapevine Closteroviruses 1992-1997 and the Viruses and Virus-like Diseases of the Grapevine: Bibliographic Report, 1985-1997. Series: B Studies and Research Number: 29 CIHEAM / EC-DG.I.*
- MARTELLI, G.P., and SAVINO, V., 1988. Fanleaf degeneration. In: R.C. Pearson and A.C. Goheen (Eds.): *Compendium of grape diseases*. APS Pres, St. Paul, Minnesota. 48-49.
- MINAFRA, A., MARTELLI, G.P., and SAVINO, V., 1990. Viroids of grapevine in Italy. *Vitis*, 29: 173-182.
- NAVARRO, B., and FLORES, R., 1997. Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 94: 11262-11267.

- ÖNELGE, N., 1994. Biological Indexing and Biochemical Studies on Citrus Viroids. Ph. D. thesis. University of Cukurova, Adana, Turkey, 109 s.
- ÖNELGE, N., ve GAZEL, M., 2001. Doğu Akdeniz bölgesine bağlarda bulunan viroidlerin araştırılması. Türkiye 9. Fitopatoloji Kongresi, Bildiriler, Trakya Üniversitesi basım evi, Edirne. 214-221.
- PALUKAITIS, P., and SYMONS, R.H., 1980. Purification and characterisation of the circular form of chrysanthemum stunt viroid. *J. Gen. Virol.*, 46: 477-489.
- RANDLES, J.W., 2003. Economic impact of viroid diseases. in: Viroids A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik, Eds. Csiro Publishing: Australia Pages 3-15.
- RANDLES, J.W., and RODRIGUEZ, M.J.B., 2003. Coconut cadang-cadang viroid. in: Viroids A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik, Eds. Csiro Publishing: Australia Pages 233-242.
- REZAIAN, M.A., 1990. Australian grapevine viroid – evidence for extensive recombination between viroids. *Nucl. Acids. Res.*, 10: 5587-5598.
- 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.
- REZAIAN, M.A., KRAKE, L.R., and GOLINO, D.A., 1992. Common identity of grapevine viroids from USA and Australia revealed by PCR analysis. *Intervirology*, 34: 38-43.
- RIESNER, D. and GROSS, H.J., 1985. Viroids. *Ann. Rev. Biochem.*, 54: 531-564.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., and MANIATIS, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SAMMONS, D.W., ADAMS, L.P., and NISHAZAVA, E.E., 1981. Ultrasensitive silver-based colour staining of polypeptides in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 2: 135-141.
- SÄNGER, H.L., KLOTZ, G., RIESNER, D., GROSS, H.J., and KLEINSCHMİDT, A.K., 1976. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 73: 3852-3856.
- SANO, T., CANDRESSE, T., HAMMOND, R.W., DIENER, T.O., and OWENS, R.A., 1992. Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 89: 10104-10108.

- SANO, T., OHSHIMA, K., HATAYA, T., UYEDA, I., SHIKATA, E., CHOU, T., MESHI, T., and OKADA, Y., 1985. A viroid-like RNA isolated from grapevine has high sequence homology with hop stunt viroid. *J. Gen. Vir.*, 66: 333-338.
- SANO, T., OHSHIMA, K., HATAYA, T., UYEDA, I., SHIKATA, E., CHOU, T., MESHI, T., and OKADA, Y., 1986. A viroid resembling hop stunt viroid in grapevines from Europe, the United States and Japan. *J. Gen. Vir.*, 67: 1673-1678.
- SARPKAYA, K., 2003. Gaziantep ili ve ilçelerinde bağ virüs hastalıklarının serolojik yöntemlerle saptanması. Çukurova Üniversitesi, Doktora tezi, Adana, Türkiye. 56s.
- SCHUMACHER, J., RANGLES, J.W., and RIESNER, D., 1983. A Two Dimensional Electrophoretic Technique for Detection of Circular Viroids and Virosoids. *Analytical Biochemistry*, 135: 288-295.
- SEMANCIK, J.S., 1986. Separation of viroid RNAs by cellulose chromatography indicating conformational distinctions. *Virology*, 155: 39-45.
- SEMANCIK, J.S., 1987. Viroids and viroid-like pathogens. CRC Publishing Fla., Pp. 127-161.
- SEMANCIK, J.S., and HARPER, K.L., 1984. Optimal conditions for cell-free synthesis of Citrus Exocortis Viroid and the question of specificity of RNA polymerase activity. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 81: 4429-4433.
- SEMANCIK, J.S., RIVERA-BUSTAMANTE, R., and GOHEEN, A.C., 1987. Wide spread occurrence of viroid-like RNAs in grapevine. *Am. J. Enol. Viticult.*, 38: 35-40.
- SEMANCIK, J.S., ROISTACHER, C.N., and DURAN-VILA, N., 1988a. A viroid RNA Associated with Cachexia (Xyloporosis) Disease of Citrus. In. *Proc. 10th Conf. IOCV, IOCV, Riverside*, 126-136.
- SEMANCIK, J.S., ROISTACHER, C.N., RIVERA-BUSTAMANTE, R., and DURAN-VILA, N., 1988b. Citrus cachexia viroid. A new viroid of citrus. Relationship to viroids of the exocortis diseases complex. *J. Gen. Virol.*, 69: 3059-3068.
- SEMANCIK, J.S., and SZYCHOWSKI, J.A., 1992. Relationships among the viroids derived from grapevines. *J. Gen. Virol.*, 73: 1465-1469.

- SEMANCIK, J.S., SZYCHOWSKI, J.A., RAKOWSKI, A.G., and SYMONS, R.H., 1994. A stable 436 nucleotide variant of citrus exocortis viroid produced by terminal repeats. *J. Gen. Virol.*, 75: 727-732.
- SEMANCIK, J.S., and WEATHERS, L.G., 1972. Exocortis disease: evidence for a new species of infectious low molecular weight RNA in plants. *Nature*, 237: 242-244.
- SHIKATA, E., SANO, T., and UYEDA, I., 1984. An infectious low molecular weight RNA was detected in grapevines by molecular hybridization with hop stunt viroid cDNA. *Proc. Japan Acad. Sci.*, 60B: 202-205.
- SINGH, R.P., 1988. Occurrence, diagnosis and eradication of the potato spindle tuber viroid in Canada. *Viroids of plant and their detection. International Seminar, 12-20 August 1986. Warsaw, Poland.* Pp. 37-50.
- SINGH, R.P., READY, K.F.M., and NIE, X., 2003. Biology. In: *Viroids* A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik, Eds. Csiro Publishing: Australia. Pages 30-49.
- STELLMACH, G., and GOHEEN, A.C., 1988. Other Virus and Virus-like diseases. In: *Compendium of Grape Diseases*. APS Press, St. Paul, Minnesota, 53-54.
- SZYCHOWSKI, J.A., GOHEEN, A.C., and SEMANCIK J.S., 1988. Mechanical transmission and rootstock reservoirs as factors in the widespread distribution of viroids in grapevines. *Am. J. Enol. Viticult.*, 39: 213-216.
- SZYCHOWSKI, J.A., MCKENRY, M.V., WALKER, M.A., WOLPERT, J.A., CREDI, R., and SEMANCIK, J.S., 1995. The vein-banding disease syndrome: A synergistic reaction between grapevine viroids and fan leaf virus. *Vitis*, 34: 229-232.
- TAYLOR, R.H., and WOODHAM, R.C., 1972. Grapevine yellow speckle a newly recognized graft-transmissible disease of *Vitis*. *Aust. J. Agric. Res.*, 23: 447-452.
- THOMPSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J., 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of the progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucleic acids Research* 22:4673-4680.
- VISVADER, J.E., and SYMONS, R.H., 1985. Eleven new sequence variants of citrus exocortis viroid and the correlation of sequence with pathogenicity. *Nucl. Acids Res.*, 13: 2907-2920.

- VUITTENEZ, A., 1970. Fanleaf of grapevine In: FRAZTER, N.W. (Ed.): Virus disease of small fruits and grapevines, Univ. Calif. Div. Agric., Berkeley, 217-228.
- WAN CHOW WAH, Y.F., and SYMONS, R.H., 1997. A high sensitivity RT-PCR assay for the diagnosis of viroids in grapevines in the field and tissue culture. J. Virol. Methods, 63: 57-69.
- YAMAMOTO, H., KAGAMI, Y., KUROKAWA, M., NISHIMURA, S., and KUBO, 1973. Studies on hop stunt disease in Japan. Rep. Res. Lab. Brew. Co., 16: 49.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1970 yılında İstanbul'da doğdum. Orta ve lise eğitimimi Kahramanmaraş Lisesi'nde tamamladım. 1988 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümünü kazandım ve 1992 yılında Ziraat Mühendisi olarak mezun oldum. 1992-1995 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalında Yüksek Lisans'ımı tamamladım. 1995-1997 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Anabilim Dalında Doktora Yeterlilik aşamasını tamamladım. 1995-1997 yılları arasında Gazi Üniversitesi, Kırşehir Meslek Yüksekokulu, Seracılık Bölümünde Uzman olarak çalıştım. Evliyim ve iki oğlum var.

## **EKLER**

### **EK 1**

#### **Nükleik Asit Ekstraksiyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler**

##### **STE X10 Tampon Çözeltisi pH 7.2 (0.5 lt)**

NaCl	1 M
Tris	0.5 M
EDTA	10 mM

##### **TAE X 10 Tampon Çözeltisi**

Tris	400 mM
Sodyum Asetat	200 mM
Sodyum EDTA	10 mM

##### **TAE Tampon Çözeltisi (Stok G) pH 6.5**

Tris	120 mM
Sodyum Asetat	60 mM
Sodyum EDTA	3 mM

##### **TBE X 10 Tampon Çözeltisi (Denaturing Buffer) pH 8.3**

Tris	225 mM
Sodyum Asetat	5 mM
Borik Asit	22 mM

##### **TKM X 10 Tampon Çözeltisi pH 7.4**

Tris	10 mM
KCl	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	0.1 mM

##### **EM-1 Tampon Çözeltisi**

% 1 SDS  
0.4 M Tris-HCl, pH 8.9  
5 mM EDTA pH 7.0

% 4 merkaptoetanol

### **EM-2 Tampon Çözeltisi**

0.5 M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>

% 1 SDS

% 4 merkaptoetanol

### **%1'LİK SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) Çözeltisi**

SDS	1 g
dH <sub>2</sub> O	100 ml

### **EDTA Tampon Çözeltisi pH 7**

EDTA	0.1 M
------	-------

### **STE-Ethanol (%35)**

10 X STE	63.2 ml
%95 Etanol	368 ml
Destile Su	568.8 ml

### **STE-Etanol (%30)**

10 X STE	68.5 ml
%95 Etanol	315 ml
Destile Su	616.5 ml

## **EK 2**

### **sPAGE Analizinde Kullanılan Tampon Çözeltiler**

#### **%5 Native Jel**

12 ml H<sub>2</sub>O  
10 ml Stok C  
2.4 ML Stok B

5 ml Stok A  
0.48 ml Stok E

#### **Stok A**

Akrilamid 30 g  
Bisakrilamid 0.75 g  
100 ml dH<sub>2</sub>O

#### **Denaturing Jel pH 6.5**

14.4 g. Üre  
7 ml H<sub>2</sub>O  
3 ml Stok G  
5 ml Stok A

2.5 ml Stok B  
0.5 ml Stok E

#### **Stok G pH 6.5**

Tris 120 mM  
Sodyum Asetat 60 mM  
Sodyum EDTA 3 mM

#### **Stok B**

2 ml TEMED (tetramethylethylenediamine)  
100 ml dH<sub>2</sub>O

**Stok E**

Amonyum persülfat	2.5 g
dH <sub>2</sub> O	25 ml

**Stok C**

30 ml Stok D alınır ve 100 ml'e destile suyla tamamlanır.

**Gümüş Nitrat Solüsyonu (12 mM AgNO<sub>3</sub>)**

AgNO <sub>3</sub>	0.41 g
Destile	200 ml

**Hidroksit Solüsyon**

KOH	41 g
HCHO	7.5 ml
Destile Su	100 ml

### **EK 3**

#### **Nükleik Asit Saflaştırmasında Kullanılan Çözeltiler**

##### **Yapıştırma Çözeltisi**

3 M guanidiniye-thiocyanate,

10 mM Tris-HCL

%5 ethanol (v/v)

pH 7,5 (25°C)

##### **Yıkama Çözeltisi**

40 ml (200 ml) ethanol p.a.

20mM NaCL, 2mM Tris-HCl, pH 7,5 (25°C)

##### **Ayrıştırma Çözeltisi**

1 mM Tris-HCL pH 8,5 (25°C)