



**T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÜLKEMİZDE YETİŞEN KÜLTÜR VE YABANI MAVİYEMİŞ
BİTKİLERİNDEKİ “BLUEBERRY MOSAIC ASSOCIATED VIRUS”
İZOLATLARININ KISMİ SEKANS ANALİZLERİ**

HATİCE ASİL

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
TEMMUZ-2019**



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÜLKEMİZDE YETİŞEN KÜLTÜR VE YABANI MAVİYEMİŞ
BİTKİLERİNDEKİ “BLUEBERRY MOSAIC ASSOCIATED VIRUS”
İZOLATLARININ KISMİ SEKANS ANALİZLERİ

HATİCE ASİL

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
TEMMUZ-2019

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÜLKEMİZDE YETİŞEN KÜLTÜR VE YABANI MAVİYEMİŞ
BİTKİLERİNDEKİ “BLUEBERRY MOSAIC ASSOCIATED VIRUS”
İZOLATLARININ KISMİ SEKANS ANALİZLERİ**

HATİCE ASİL

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN danışmanlığında hazırlanan bu tez 19/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN
Başkan

Prof. Dr. Mona GAZEL
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Eminur ELÇİ
Üye

Kod No:

Prof. Dr. Erdal SERTKAYA
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 18.YL. 092

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

19.07.2019

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

HATİCE ASİL

ÖZET

ÜLKEMİZDE YETİŞEN KÜLTÜR VE YABANI MAVİYEMİŞ BİTKİLERİNDEKİ “BLUEBERRY MOSAIC ASSOCIATED VIRUS” İZOLATLARININ KISMİ SEKANS ANALİZLERİ

Ülkemizde maviyemişlerde virüs hastalıkları ile ilgili çalışmalar son yıllarda başlamış olup en yaygın virüs blueberry mosaic associated virus (BIMaV) olarak tespit edilmiştir. Bu çalışma kapsamında ülkemizde Rize, Trabzon, Samsun, Giresun ve Mersin illerinden toplanan yabancı ve kültüre alınmış *Vaccinium* türlerinde BIMaV'nin farklı gen bölgelerinin genomik analizlerinin yapılması ve farklı *Vaccinium* türlerinden elde edilecek olan izolatların benzerlik ve farklılıklarının genomik düzeyde tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla Samsun'dan 5, Giresun'dan 24, Trabzon'dan 48, Rize'den 50, Ordu'dan 7, Mersin'den 2 maviyemiş (*Vaccinium spp.*) örneği toplanmış ve BIMaV'nin RNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimini (RdRp) kodlayan RNA1, hareketlilik proteini (MP) kodlayan RNA2 ve nükleoproteini (NP) kodlayan RNA3 gen bölgelerini çoğaltan primerlerle RT-PCR analizleri yapılmıştır. RNA3 genine spesifik primer çifti kullanılarak testlenen toplam 136 maviyemiş örneğinin 39 tanesinin BIMaV ile enfekteli olduğu ve testlenen örneklerde enfeksiyon oranının % 28,67 olduğu belirlenmiştir. Testlenen örneklerin 16 tanesi yabancı maviyemiş örneği olup bunların 10 tanesi BIMaV ile enfekteli bulunmuştur. Bu durumda kültüre alınan maviyemişlerde enfeksiyon oranı % 24,16 olarak saptanırken yabancı maviyemiş bitkilerinde % 62,5 olarak belirlenmiştir. Aynı örnekler RNA1 ve RNA2 gen bölgelerine spesifik primer çiftleri kullanılarak testlendiğinde sadece Rize ilinden toplanan 7 kültüre alınmış maviyemiş örneğinde virüsün RNA1, 8 örnekte ise RNA2 bölgeleri çoğaltılarak sekans analizleri yapılmış diğer illerden toplanan örneklerde bu gen bölgeleri çoğaltılamamıştır. Mersin ilinden alınan örneklerde ise her üç primer çifti ile de BIMaV tespit edilememiştir. BIMaV önemli verim kayıplarına yol açan virüslerden birisi olması nedeniyle bu virüsle ilgili çalışmalara devam edilmesi ve bu çalışma kapsamında elde edilen ön veriler kullanılarak daha detaylı çalışmaların yapılması önerilmektedir.

2019, 42 sayfa

Anahtar Kelimeler: Maviyemiş, blueberry mosaic associated virus, genetik çeşitlilik, RT-PCR

ABSTRACT

PARTIAL GENOMIC ANALYSIS OF BLUEBERRY MOSAIC ASSOCIATED VIRUS ISOLATED FROM WILD AND CULTIVATED BLUEBERRY PLANTS IN TURKEY

Virus diseases of blueberries have recently been started in Turkey and the most common virus has been detected as blueberry mosaic associated virus (BIMaV). In this study, partial genomic analysis of BIMaV collected from wild and cultivated *Vaccinium* species grown in Rize, Trabzon, Samsun, Giresun and Mersin and their genomic similarity and differences were studied. For this purpose, 5 samples from Samsun, 24 from Giresun, 48 from Trabzon, 50 from Rize, 7 from Ordu and 2 from Mersin were collected and RT-PCR analysis were performed by using three different primer pairs amplifying RNA1 (RNA dependent RNA polymerase-RdRp), RNA2 (Movement protein-MP) and RNA3 (Nucleoprotein-NP) of BIMaV. Thirty nine samples among tested 136 samples were found infected by BIMaV by using RNA3 gene-specific primer pairs and the infection rate was found as 28,67%. Among tested 16 wild blueberry samples, 10 were infected by BIMaV with the infection rate of 62,5% whereas it was only 24,16% in cultivated blueberries. When the same samples were tested with the RNA1 and RNA2 genes-specific primers of BIMaV, expected size PCR products were obtained from 8 and 10 cultivated blueberry samples collected from Rize province, respectively. The amplified PCR products of these samples were sequenced and characterized as BIMaV. The samples collected other provinces were not found positive for RNA1 and RNA2 of BIMaV whereas Mersin samples were negative for all three primer pairs. Due to BIMaV cause important yield losses in blueberries, the studies on this virus should continue and the primary data obtained in this study should be developed and more detailed studies should be organized.

2019, 42 pages

Key words: Blueberry, blueberry mosaic associated virus, BIMaV, genetic diversity, RT-PCR

TEŐEKKÖR

Yüksek lisans tez konusunun belirlenmesinde, araştırılması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmaya yönlendiren ve her türlü yardımı esirgemeyen saygıdeğer danışman Hocam Prof. Dr. Kadriye ÇAĞLAYAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez konusunun belirlenmesinde ve çalışmaların takip edilmesinde her türlü yardımı esirgemeyen Hocam Prof. Dr. Mona GAZEL'e, çalışma konusunda yardımcı olan Ziraat Yüksek Mühendisi Bahar Tunç'a ve isimlerini burada zikredemediğim ama yardımını esirgememiş tüm arkadaşlarıma ve çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen, her zaman arkamda olan babam Mehmet ASİL'e, annem Ayşe ASİL'e ve abim Caner ASİL'e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	5
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	8
3.1. Materyal	8
3.1.1. Arazi Çalışmaları ve Örnekleme.....	8
3.2. Yöntem.....	8
3.2.1. Moleküler Çalışmalar.....	8
3.2.1.1. Maviyemiş Örneklerinden Nükleik Asit (NA) İzolasyonu	8
3.2.1.1.1. Silika Yöntemiyle RNA Ekstraksiyonu (Rott ve Jelkmann, 2001).....	9
3.2.1.1.2. Morante-Carriel Yöntemiyle RNA Ekstraksiyonu (Morante-Carriel ve ark., 2014)	11
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) Analizleri	11
3.2.2.1. Reverse Transkripsiyon (RT; Reverse Transcription)	11
3.2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	11
3.2.2.3. Blueberry mosaic associated virus (BMaV)'un PCR analizleri.....	12
3.2.2.4. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Jel Elektroforez	14
3.2.2.5. DNA Dizileme ve BLAST Analizleri	14
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	16
4.1. Arazi Çalışmaları	16
4.2. PCR Analizleri (Polymerase Chain Reaction; PCR)	17
4.2.1. Maviyemiş örneklerinden RNA İzolasyonu.....	17
4.2.2. Sistem Kurma Çalışmaları ve RT-PCR Analizleri.....	20
4.2.2.1. Sistem Kurma (Optimizasyon) Çalışmaları	20
4.2.2.2. RT-PCR Analizleri.....	21
4.2.2.3. BMaV'nin Genetik Çeşitlilik Çalışmaları	26
4.2.3. Filogenetik Analizler.....	29
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	34
KAYNAKÇA.....	36
ÖZGEÇMİŞ	39
EKLER.....	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Blueberry mosaic associated virus'un genom organizasyonu. RdRp: RNA'ya bağlı RNA polimeraz; MP: Hareketlilik proteini; NP: Nukleokapsid Proteini	3
Şekil 4.1.	Rize-İkizdere maviyemiş plantasyonlarında yapraklarda pembemsi-kırmızı lekeler	16
Şekil 4.2.	Rize-İkizdere maviyemiş plantasyonlarında yapraklarda damar açılmaları, mozaikleşme ve klorotik lekeler	17
Şekil 4.3.	Silika yöntemi kullanılarak Trabzon ilinden toplanan maviyemişlerden izole edilen RNA'lardan TS184 no'lu örneğin spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD)	18
Şekil 4.4.	Silika yöntemi kullanılarak Trabzon ilinden toplanan maviyemişlerden izole edilen RNA'lardan TS186 no'lu örneğin spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD)	18
Şekil 4.5.	Morante-Carriel RNA Ekstraksiyon yöntemi kullanılarak Giresun ilinden toplanan maviyemişlerden izole edilen RNA'lardan TS141 no'lu maviyemiş örneğinin spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD)	19
Şekil 4.6.	Morante-Carriel RNA Ekstraksiyon yöntemi kullanılarak Giresun ilinden toplanan maviyemişlerden izole edilen RNA'lardan 309 no'lu maviyemiş örneğinin spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD)	19
Şekil 4.7.	Morante-Carriel RNA Ekstraksiyon yöntemi kullanılarak Giresun ilinden toplanan maviyemişlerden izole edilen RNA'lardan 310 no'lu maviyemiş örneğinin spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD)	19
Şekil 4.8.	Blueberry mosaic associated virus RNA1 (RdRp) gen bölgesi için spesifik F/R primer çifti kullanılarak pozitif kontroller ile optimizasyon amacıyla yapılan RT-PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); TS236 ve TS239: Rize-İkizdere maviyemiş örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su Kontrol	21
Şekil 4.9.	Blueberry mosaic associated virus RNA 2 (MP) gen bölgesi için B1MaV 725F/1767R primer çifti kullanılarak pozitif kontroller ile optimizasyon amacıyla yapılan RT-PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); TS236: Rize-İkizdere maviyemiş örneği, +C: Pozitif kontrol, W: Su Kontrol	21
Şekil 4.10.	Rize'den toplanan kültüre alınmış maviyemiş örneklerinden blueberry mosaic associated virus'un RNA1 (RdRp) gen bölgesi için B1MaV F/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 340, 341, 342, 352, 353, 354, 357, 359 : Rize maviyemiş örnekleri; +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol	27
Şekil 4.11.	Rize ilinden toplanan kültüre alınmış toplanan maviyemiş örneklerinde blueberry mosaic associated virus RNA 2 (MP) gen bölgesi için	

- BIMaV725F/1767R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); TS231, TS232, TS235, 340, 342, 347, 352, 354, 357, 359: Rize maviyemiş örnekleri; +C: Pozitif kontrol; W: Su Kontrol 28
- Şekil 4.12. Giresun Samsun, Ordu ve Rize illerinden toplanan yabancı ve kültüre alınmış toplanan maviyemiş örneklerinde blueberry mosaic associated virus RNA 3 (NP) gen bölgesi için BIMaV F/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); TS127, TS128, TS129: Samsun maviyemiş örnekleri, TS224, TS227, TS228, TS229, TS236, TS237, TS238, TS241, TS248, TS249, TS250, 297: Rize maviyemiş örnekleri, 300, 306: Giresun maviyemiş örnekleri, 311, 312: Ordu maviyemiş örnekleri, +C : Pozitif kontrol (doğrudan cDNA), W: Su Kontrol 29
- Şekil 4.13. Blueberry mosaic associated virus'un RNA1 (RdRp) gen bölgesi için BIMaV F/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda elde edilen ürünlerinin sekans analizine göre çizilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde, MEGA X yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendrogramda bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir..... 30
- Şekil 4.14. Blueberry mosaic associated virus'un RNA2 (MP) gen bölgesi için spesifik 725F/1767R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda elde edilen ürünlerinin sekans analizine göre çizilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde, MEGA X yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendrogramda bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir..... 31
- Şekil 4.15. Blueberry mosaic associated virus'un RNA3 (NP) gen bölgesi için spesifik F/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda elde edilen ürünlerinin sekans analizine göre çizilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde, MEGA X yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendrogramda bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir..... 33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Blueberry mosaic associated virus'un 3 farklı gen bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan primer dizileri ve çoğaltılacak PCR ürünlerinin baz büyüklükleri.....	12
Çizelge 3.2. Blueberry mosaic associated virus'un RNA1 gen bölgesinin çoğaltılmasında uygulanan PCR koşulları	13
Çizelge 3.3. Blueberry mosaic associated virus'un RNA2 gen bölgesinin çoğaltılmasında uygulanan PCR koşulları	13
Çizelge 3.4. Blueberry mosaic associated virus'un RNA3 gen bölgesinin çoğaltılmasında uygulanan PCR koşulları	14
Çizelge 4.1. Bazı maviyemiş örneklerinden iki farklı izolasyon yöntemiyle ekstrakte edilen RNA'ların nanodrop ölçüm değerleri.....	20
Çizelge 4.2. Karadeniz Bölgesinde farklı illerden ve Mersin'den toplanan yabancı ve kültüre alınmış maviyemiş bitki örneklerinin blueberry mosaic associated virus'un 3 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak RT-PCR analiz sonuçları	22
Çizelge 4.2. (devam) Karadeniz Bölgesinde farklı illerden ve Mersin'den toplanan yabancı ve kültüre alınmış maviyemiş bitki örneklerinin blueberry mosaic associated virus'un 3 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak RT-PCR analiz sonuçları.....	23
Çizelge 4.2. (devam) Karadeniz Bölgesinde farklı illerden ve Mersin'den toplanan yabancı ve kültüre alınmış maviyemiş bitki örneklerinin blueberry mosaic associated virus'un 3 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak RT-PCR analiz sonuçları.....	24
Çizelge 4.2. (devam) Karadeniz Bölgesinde farklı illerden ve Mersin'den toplanan yabancı ve kültüre alınmış maviyemiş bitki örneklerinin blueberry mosaic associated virus'un 3 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak RT-PCR analiz sonuçları.....	25
Çizelge 4.3. Maviyemiş plantasyonlarında B1MaV tespit edilen iller, testlenen örnek sayısı ve enfeksiyon oranları (%)	26

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

bp	:Baz Çifti
cm	:santimetre
°C	:Sıcaklık
da	:Dekar
g	:Gram
kb	:kilo baz
M	:Molar
mM	:Mili molar
mg	:Miligram
ml	:Mililitre
µl	:Mikrolitre
µg	:Mikrogram
ng	:Nanogram
pmol	:Piko mol

KISALTMALAR

ABD	:Amerika Birleşik Devletleri
Ark	:Arkadaşları
cDNA	:Complementer deoksiribonükleik asit
d ₂ O	:Çift distile su
Dk	:Dakika
DNA	:Deoksiribonükleik Asid
EDTA	:Ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr	:Ethidium Bromid
ETOH	:Ethanol
H ₂ O	:Su
LiCl	:Lithium Chloride

NaCl	:Sodium Chloride
NGS	:Yeni nesil dizileme
PCR	:Polymerase Chain Reaction
rpm	:Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
TAE	:Tris asetat EDTA
TE	:Tris EDTA
TÜBİTAK	:Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
TÜİK	:Türkiye İstatistik Kurumu
UV	:Ultraviyole
V	:Volt
BSSV	:Blueberry shoestring virus
BRRSV	:Blueberry red ring spot virus
BIMaV	:Blueberry mosaic associated virus
BIScV	:Blueberry scorch virus
BIShV	:Blueberry shock virus
BLMoV	:Blueberry leaf mottle virus
ArMV	:Arabis mosaic virus
SLRSV	:Strawberry latent ringspot virus
TRSV	:Tobacco ringspot virus
ToRSV	:Tomato ringspot virus
MiLBVV	:Mirafiori lettuce big-vein virus
LRNV	:Lettuce ring necrosis virus
CPsV	:Citrus psorosis virus
RdRp	:RNA' ya bağlı RNA polimeraz
MP	:Hareketlilik proteini
NP	:Nukleokapsid Proteini

1. GİRİŞ

Maviyemiş bitkisi *Plantae* (Bitkiler) alemi, *Magnoliophyta* (Kapalı tohumlular) bölümü, *Magnoliopsida* (İki çenekliler) sınıfı *Ericales* takımı, *Ericaceae* (Fundagiller) familyası, *Vaccinium* cinsine giren bir bitkinin bu cinse giren çok sayıda türü bulunmakta olup en önemlileri *Vaccinium corymbosum*, *Vaccinium myrtilloides* ve *Vaccinium ashei reade* (Gümüş ve ark., 2009)'dir. Bu bitki ülkemizin farklı yörelerinde farklı isimlerle anılır. Ardahan'da mosi, Rize'de likapa, Trabzon'da ligarba, Karakavı'da çalıçileği, Rize Pazar ilçesinde kaskanaka, Rize Ardeşen ilçesinde çera (çela), Artvin'de morsvi, mahabak, mesi; Giresun'da çalı çiçeği, Ordu'da cırtlık çileği, Yozgat'ta köpek üzümü, diğer bölgelerde ise ayı üzümü, çay üzümü veya çoban üzümü olarak isimlendirilen bu bitki literatürü "maviyemiş" olarak girmiştir (Çelik, 2012). Bu üzüm sü meyve puslu veya parlak mavi rengi ile "Mavi Altın (bluegold)" olarak da nitelendirilmektedir. İliman iklim kuşağına adapte olmuş bir meyve olup, botanik anlamda "gerçek üzümler" grubuna girer (Çelik, 2004). Bu bitki ilk olarak 1900'lü yıllarda ABD'de yetiştirilmeye başlanmıştır. Maviyemiş üzerindeki çalışmalar İngilizlerin Amerika kıtasına yerleşmelerinden sonra başlamıştır. Doğal floradaki yaban mersinlerini gören yerli halkın bunları toplayarak yediklerini fark eden İngilizler 300 yıla yakın bir süre, bu meyvenin az miktarda kültürünü ve ıslahını yapmışlardır. Taze tüketimde gıda endüstrisinde çok yaygın olmasına rağmen ülkemizde maalesef yetiştiriciliği yaygın değildir. 2000'li yıllarda Türkiye'ye egzotik bir tür olarak girmiştir. İslahı yapılan türler: Yüksek çalı formlular ve Alçak çalı formlular olmak üzere iki tiptir. Yüksek çalı formlu maviyemiş (*Vaccinium corymbosum*), Alçak çalı formlu maviyemiş (*Vaccinium angustifolium*), Tavşan gözlü maviyemiş (*Vaccinium ashei reade*), Kafkas yaban mersini (*Vaccinium arctostaphylos*), Adi yaban mersini (*Vaccinium myrtillos*) ve Bataklık yaban mersini (*Vaccinium uliginosum*) en önemli türlerdir. Dünyada maviyemiş üretiminin en fazla olduğu ülkeler sırasıyla ABD, Kanada, Polonya, Almanya, Fransa, Meksika, Hollanda, İspanya ve İsveç'dir (FAO, 2016). Ülkemizde ise 2013 yılında 485 dekar alandan 170 ton üretim yapılırken 2018 yılında 990 dekar alandan 375 ton elde edilmiştir (TÜİK, 2019).

Maviyemişte görülen viral hastalıklar; maviyemiş ayakkabı bağı virüsü (blueberry shoestring virus) (BSSV), maviyemiş kırmızı halkalı leke virüsü (blueberry red ringspot

virus) (BRRSV), maviyemiş mozaikle ilişkili virüs (blueberry mosaic associated virus) (BIMaV), maviyemiş yanıklık virüsü (blueberry scorch virus) (BIScV), maviyemiş şok virüs (blueberry shock virus) (BIShV), maviyemiş yaprak beneklenme virüsü (blueberry leaf mottle virus) (BLMoV), arabis mozaik virüsü (arabis mosaic virus) (ArMV), çilek latent halkalı leke virüsü (strawberry latent ringspot virus) (SLRSV), tütün halkalı leke virüsü (tobacco ringspot virus) (TRSV) ve domates halkalı leke virüsü (tomato ringspot virus) (ToRSV)'dir. Bu virüslerin yanı sıra maviyemiş bodurlaşma fitoplazması (blueberry stunt phytoplasma) da önemli bir hastalıktır (Tzenatakis ve Martin, 2017). Bu bitkide görülen virüslerin bir kısmı geniş konukçu dizisine sahip olan ArMV, SLRSV, TRSV ve ToRSV gibi virüslerken bir kısmı ise sadece *Vaccinium* türlerinde görülen ve konukçusunun adı ile anılan BLMoV, BIScV, BIShV, BSSV, BRRSV ve BIMaV'dir.

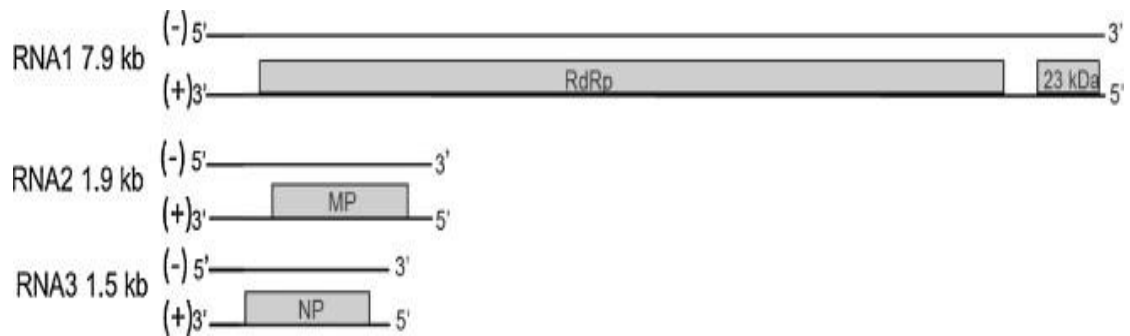
BIMaV'nin neden olduğu mozaik hastalığı, maviyemişlerin en önemli viral hastalıklarından birisidir. Bu virüs, maviyemiş yapraklarında mozaik şeklinde açık yeşil, sarı veya pembemsi lekeler oluşturur (Caruso ve Ramsdell, 1995). BIMaV'nin taşınmasına yönelik son yıllara değin net bir bilgi bulunmamakla birlikte dahil olduğu *Ophiovirus* cinsi tüm virüsler toprak kökenli fungus *Olphidium spp.* ile taşındığı için bu virüsün de potansiyel vektörünün bu fungus cinsi olduğu düşünülmekteydi. Son yıllarda yapılan bir çalışmada bu hipotez kanıtlanmış olup, BIMaV ile enfekteli maviyemişlerin bulunduğu bahçelerden alınan toprak örneklerine tuzak bitki olarak marul, havuç, brokoli ve hıyar bitkileri ekildiğinde 8 hafta sonra sadece marul bitkilerinin köklerinde *Olphidium* cinsi funguslara ait dinlenme sporları gözlenmiştir. *Olphidium virulentus* olarak teşhis edilen bu fungusla yapılan deneysel taşıma çalışmalarında bu fungusun BIMaV'nin olası vektörü olabileceği bildirilmiştir (Shands ve ark., 2017). BIMaV ne küsküt ne de mekanik inokulasyon yöntem ile taşınmamakta olup sadece aşı ile taşınabilmektedir.

Son yıllarda özellikle "Yeni nesil dizileme (NGS)" teknolojisinin viroloji alanında yoğun olarak kullanılmasıyla etiyojisi bilinmeyen birçok hastalığın etmeni tanımlanmıştır ve bunlardan birisi de BIMaV'dir. NGS analizleriyle tüm genomu analiz edilmiş olan bu virüsün genom yapısının *Ophioviridae* familyasına bağlı virüslere çok benzediği saptanmıştır. Bu familyaya bağlı 6 adet tek sarmallı ve negatif polariteli RNA virüsü bulunmaktadır: Marul iri damar virüsü (mirafiori lettuce big-vein virus) (MiLBVV), marul halkalı nekroz virüsü (lettuce ring necrosis virus) (LRNV), turunçgil

kavrama virüsü (citrus psorosis virus) (CPsV), lale hafif benekli mozaik virüsü (tulip mild mottle mosaic virus) (TMMMV), düğün çiçeği beyaz benek virüsü (ranunculus white mottle virus) (RWMV) ve frezya latent virüsü (freesia sneak virus) (FreSV). Bu virüsler içinde ilk üç virüsün tüm genomu bilinmekte olup BİMaV izolatları kullanılarak yapılan filogenetik analizlerde bu virüsün en yakın ilişkili olduğu virüs CPsV olarak tespit edilmiştir. BİMaV'nin segmentli genomu 3 parçalı RNA'dan oluşur ve bu özelliği ile CPsV'ye benzemektedir ancak bağlı oldukları familyanın tip virüsü olan LRNV ve MİLBVV'de RNA 4 parçalıdır. Bu farklı genomik özellikleri nedeniyle LRNV, MİLBVV ile birlikte gruplanmış ve *Ophioviridae* familyası içinde farklı bir cinsde dahil olurken CPsV ve BİMaV aynı familya içinde farklı bir cinsde dahil edilmiştir (Thekke-Veetil ve ark., 2016).

Ophiovirüs cinsine giren virüslerin morfolojik yapısı yılan benzeri görünümünden dolayı bu isimle adlandırılmıştır (Yunancada "ophio=yılan" anlamına gelmektedir). Bu cins içine giren virüslerin nükleoprotein kompleksleri ipliğimsi yapıdadır (Milne ve ark., 1996) ve Tenuivirüsler ile *Bunyaviridae* üyelerinde gözlenen yapılara benzeyen şekildedir (Ward, 1993).

BİMaV, 11.467 nükleotit uzunluğunda, 3 tane negatif-anlamli RNA'dan oluşan bölünmüş bir genoma sahiptir. RNA1, 7.963 nükleotit uzunluğunda olup 2 ORF kodlamaktadır. Bunlardan birisi 272 kDa büyüklüğünde RdRp genini diğeri ise 107 nükleotit uzunluğunda intergenik bir bölge ile ayrılan 23 kDa'lık küçük bir proteini kodlar. RNA2, 1.934 nükleotit uzunluğundadır ve 58 kDa moleköl ağırlığı ile hareketlilik proteinini kodlamaktadır. RNA3 ise 1.570 nükleotit uzunluğundadır ve 50 kDa'lık nükleoproteini kodlamaktadır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Blueberry mosaic associated virus'un genom organizasyonu. RdRp: RNA'ya bağlı RNA polimeraz; MP: Hareketlilik proteini; NP: Nükleoprotein

Bu çalışma kapsamında ülkemizde B1MaV'nin ilk kez ve en yaygın tespit edildiği Rize ilinin yanı sıra Trabzon, Samsun, Giresun, Ordu ve Mersin illerinden toplanan yabani ve kültüre alınmış *Vaccinium* türlerinde B1MaV'nin farklı gen bölgelerinin genomik analizlerinin yapılması ve farklı *Vaccinium* türlerinden elde edilecek olan izolatların benzerlik ve farklılıklarının genomik düzeyde tespit edilmesi amaçlanmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Türkiye’de çilek dışındaki üzüksü meyve yetiştiriciliğinin geçmişi çok eskilere dayanmamaktadır. Ülkemiz florasında doğal olarak yetişen birçok üzüksü meyve türünün kültür formlarının ilk adaptasyon çalışmalarına 1960’lı yılların sonunda başlanmıştır. Ancak, üretilen yaş üzüksü meyvelerin pazarlanmalarındaki sorunlar nedeniyle üretimlerine ve araştırmalara uzun bir ara verilmiştir. 1980’li yılların sonuna doğru Bursa ve çevresinde ahududu üretimi, Bulgaristan’dan gelen soydaşlarımız tarafından başlatılmıştır. 1995 yılında Karadeniz Bölgesi Doğal Ahududu Seleksiyonu Projesi, 1996’da da ülkesel çapta uygulanan “Frenk üzümü, Ahududu ve Böğürtlen Çeşitlerinin Islahı” projesi ile araştırma boyutundaki çalışmalar yeniden devreye sokulmuştur (Ağaoğlu ve ark., 2003).

Maviyemiş üretimi dünyada oldukça yaygın olup üretim 210.000 ton civarındadır (Çelik, 2003). Türkiye’de özellikle Karadeniz ve Marmara Bölgesinde yabani olarak yetişen *Vaccinium* cinsi içinde yer alan birçok tür bulunmaktadır (*Vaccinium vitis-idea*, *Vaccinium myrtillus*, *Vaccinium uliginosum* ve *Vaccinium arctostaphylos*). Bu cins içine giren meyveler dünyada “blueberry=maviyemiş” olarak adlandırılırken ülkemizde “likapa, göğen, çay üzümü, ayı üzümü, yaban mersini” gibi yerel isimlerle anılmaktadır (Turkben ve ark., 2008). Ülkemizde maviyemiş yetiştiriciliği konusunda resmi kayıtlar bulunmamakla birlikte Ateş ve Çelik (2012) tarafından Karadeniz Bölgesi başta olmak üzere yetiştiriciliğin yapıldığı 21 ildeki (Ordu, Giresun, Trabzon, Rize, Artvin, Gümüşhane, Bartın, Bolu, Bursa, Çanakkale, Düzce, İstanbul, Karabük, Kastamonu, Kırklareli, Kocaeli, Sakarya, Samsun, Sinop, Yalova, Zonguldak) tarım kuruluşlarıyla yapılan anket sonucunda elde edilen verilere Türkiye’de 2018 yılında 990 dekar alandan 375 ton maviyemiş üretilmektedir (TÜİK, 2019).

Son yıllarda dünya çapında 40’tan fazla virüsün üzüksü meyvelerde enfeksiyon yaptığı bildirilmektedir (Martin ve ark., 2004). Maviyemiş bitkilerinde görülen virüslerin bir kısmı geniş konukçu dizisine sahip olan virüslerken, arabis mosaic virus (ArMV), strawberry latent ringspot virus (SLRSV), tobacco ringspot virus (TRSV) ve tomato ringspot virüs (ToRSV) gibi bir kısmı ise sadece *Vaccinium* türlerinde görülen ve konukçusunun adı ile anılan blueberry leaf mottle virus (BLMoV), blueberry scorch virüs (BIScV), blueberry shock virus (BIShV), blueberry shoestring virus (BSSV),

blueberry red ringspot virus (BRRSV) ve blueberry mosaic associated virus (BIMaV)'dur. Maviyemiş bitkisinde görülen en önemli virüs hastalıklarından birisi BRRSV ile ilişkili olan kırmızı halkalı leke hastalığıdır ve bu hastalık ABD (Hutchinson ve Vaney, 1954), Japonya (Isogai ve ark., 2009), Çek Cumhuriyeti (Pribylova ve ark., 2010), Slovenya (Plesko ve ark., 2010), Polonya (Kalinowska ve ark., 2011) ve Kore'de (Cho ve ark., 2012) saptanmıştır. Bu hastalığın en belirgin simptomsu yaprak ve gövdede görülen kırmızı yuvarlak halkalı lekelerdir. Meyvelerde ise benzer lekeler erken dönemde görülmesine karşın olgunlaşma ile birlikte kaybolur (Ramsdel ve ark., 1987). Bu virüsün üç izolatının (ABD, Çek Cumhuriyeti ve Polonya) tam genom sekansı yayınlanmış ve amino asit sekanslarında yüksek derecede homoloji (%98) saptanmıştır. Bu durum üç ülkede tanımlanan izolatların orijinlerinin aynı oldukları fikrini güçlendirmektedir (Kalinowska ve ark., 2012). BIMaV, *Ophiovirus* cinsine ait son yıllarda saptanmış olan önemli bir virüstür. Bu virüs ilk kez 1950 yılında Amerika'da saptanmıştır. Ülkemizde ise Karadeniz Bölgesinden toplanan farklı maviyemiş türlerinde saptanmıştır (Çağlayan ve ark., 2015). BIMaV, yapraklarda mozaik şeklinde açık yeşil, sarı veya pembemsi lekeler oluşturur. BLSvV, ilkbaharda genç sürgünlerde geriye doğru ölüm ve çiçeklerde yanıklığa neden olur ve bakteriyel kanser görünümü ile karıştırılabilir. BLSvV'de ilk enfeksiyonu izleyen ilkbahar aylarında bitki enfekteli olduğu halde simptom göstermeyebilir. Her iki virüs de bazı çeşitlerde latenttir (Ramsdell, 1987). BSSV, afitle taşınan bir virüstür ve en belirgin simptomları gövdede ve çiçeklenme döneminde çiçek petal yapraklarında uzun kırmızı çizgiler, yapraklarda kıvrılma ve verimde azalmadır.

Son yıllarda özellikle "Yeni nesil dizileme (NGS)" teknolojisinin viroloji alanında yoğun olarak kullanılmasıyla etiyojisi bilinmeyen birçok hastalığın etmeni tanımlanmıştır ve bunlardan birisi de BIMaV'dir. NGS analizleriyle tüm genomu analiz edilmiş olan bu virüsün genom yapısının *Ophioviridae* familyasına bağlı virüslere çok benzediği tespit edilmiştir. Bu familyaya bağlı 6 adet tek sarmallı ve negatif polariteli RNA virüsü bulunmaktadır. mirafiori lettuce big-vein virus (MiLBVV), lettuce ring necrosis virus (LRNV), citrus psorosis virus (CPsV), tulip mild mottle mosaic virus (TMMMV), ranunculus white mottle virus (RWMV) ve freesia sneak virus (FreSV). Bu virüsler içinde ilk üç virüsün tüm genomu bilinmektedir ve BIMaV izolatları kullanılarak yapılan filogenetik analizlerde bu virüsün en yakın ilişkili olduğu virüs

CPsV olarak tespit edilmiştir. B1MaV'nin segmentli genomu 3 parçalı RNA'dan oluşur ve bu özelliği ile CPsV'ye benzemektedir ancak bağlı oldukları familyanın tip virüsü olan LRNV ve MiLBVV'de RNA 4 parçalıdır. Bu farklı genomik özellikleri nedeniyle LRNV, MiLBVV ile birlikte gruplanmış ve *Ophioviridae* familyası içinde farklı bir cinse dahil olurken CPsV ve B1MaV aynı familya içinde farklı bir cinse dahil edilmiştir (Thekke-Veetil ve ark., 2016).

Ülkemizde maviyemişlerde virüs hastalıkları ile ilgili çalışmalar son yıllarda başlamış olup en kapsamlı çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenen 213O042 no'lu Türkiye-Slovenya İkili İşbirliği projesi ile yapılmış ve ülkemizde gerek yabancı popülasyon gerekse ticari yetiştiricilik açısından maviyemiş yetişen önemli illerde survey çalışmaları yürütülmüştür. Bu çalışma sonucunda toplanan örnekler BRRSV, B1MaV, BLMoV, B1ScV, B1ShV ve BSSV için DAS-ELISA ve/veya PCR yöntemleri ile testlenmiştir. Testlenen örneklerde DAS-ELISA yöntemi ile hiçbir virüs saptanamazken PCR analizleri ile testlenen 157 örneğin 23'ünde blueberry mosaic associated virus tespit edilmiştir (Gazel ve ark., 2015). Ayrıca tespit edilen bütün virüslerin kısmi sekans analizleri yapılarak NCBI Gen bankasındaki uygun sekanslarla kıyaslanmış ve filogenetik analizleri yapılmıştır. B1MaV filogenetik analizlerinde ise Türk B1MaV izolatlarının kendi içinde büyük benzerlik gösterdiğini ancak diğer bütün ülkelere ait izolatlardan oldukça farklı olduğunu ortaya çıkarmıştır (Çağlayan ve ark., 2015; 2016; 2017 (a) ve (b); Gazel ve ark., 2015; Elçi ve ark., 2015).

Vaccinium türlerinde son yıllarda saptanan yeni virüslerin ülkemizdeki durumunu araştırmak amacıyla bir yüksek lisans tezi kapsamında (MKÜ-BAP-18.YL.025) Karadeniz Bölgesinden 102, Bursa ilinden 20 olmak üzere toplam 122 maviyemiş örneği toplanmıştır. Toplanan *Vaccinium* örnekleri blueberry latent virus (BBLV) ve blueberry fruit drop associated virus (BFDAV)'e karşı testlenmiş ve herhangi bir pozitif sonuç elde edilememiştir (Açioğlu , 2018).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Arazi Çalışmaları ve Örnekleme

Bu çalışma kapsamında ülkemizde Giresun, Samsun, Ordu, Rize, Trabzon ve Mersin illerinde maviyemiş yetiştirilen alanlarda ilkbahar mevsiminde virüs hastalıkları surveyi yapılmıştır. Survey çalışmalarında her ildeki damızlık parseller, fidanlıklar, ticari bahçeler ve doğal bitki popülasyonları ziyaret edilerek tipik semptom gösteren bitkilerin yanı sıra latent enfeksiyonlar için semptomsuz bitkilerden de örnek alınmıştır. Bu çalışma kapsamında Samsun'dan 5, Giresun'dan 24, Trabzon'dan 48, Rize'den 50, Ordu'dan 7, Mersin'den 2 örnek alınarak toplamda 136 maviyemiş örneği toplanmıştır. Bu 136 tane *Vaccinium* türlerinden 16 tanesi yabancı maviyemiş örneği, 120 tanesi ise kültüre alınmış maviyemiş örnekleridir. Semptomlar kaydedilerek her bir bitkinin dört farklı yöneyinden yaprak ve 10-15 cm uzunluğunda sürgün örnekleri alınarak uygun koşullarda laboratuvara getirilmiş ve testleninceye kadar +4 °C'de saklanmıştır. Örnekler kayıt altına alınarak semptomolojik açıdan karakteristik olanlar numaralandırılarak fotoğraflanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Moleküler Çalışmalar

3.2.1.1. Maviyemiş Örneklerinden Nükleik Asit (NA) İzolasyonu

Maviyemiş bahçelerinden toplanan örneklerden RNA izolasyonu için Silika RNA protokolü ve Morante-Carriell RNA protokolü kullanılmıştır. Nükleik asit (NA) izolasyonlarında ilkbahar döneminde toplanan yaprak ve sürgünlerden 0,5 gr yabancı ve kültüre alınmış maviyemiş örnekleri sıvı azot içinde ezildikten sonra izole edilen RNA'lar PCR çalışmalarında kullanılmaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.1.1.1. Silika Yöntemiyle RNA Ekstraksiyonu (Rott ve Jelkmann, 2001)

- 50 mg bitki dokusu üzerine 1000 µl silica ekstraksiyon buffer ve 1 µl B-mercaptoethanol eklenerek iyice karıştırılmıştır.
- Sıvı fazdan 600 µl çekilerek yeni ependorf tüpe konulmuştur ve üzerine 600 µl 5,8 molarlık potasyum asetat eklenmiştir. Tüpler ters-düz edilip 13.000 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüj edilmiştir.
- Üstteki sıvı fazdan 750 µl alınarak yeni bir tüpe konulmuştur ve üzerine 750 µl % 100 isopropanol eklenmiştir. Tüpler -20 °C'de en az yarım saat bekletilmiş ve ardından 13.000 rpm'de 30 dakika süre ile santrifüj yapılmıştır.
- Sıvı faz atılarak pellet üzerine 500 µl yıkama tampon çözeltisi eklenerek tüpler vortexlenmiş ve pellet çözündürülmüştür. Tüplere 20 µl silica eklenmiş ve 10.000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüj yapılmıştır.
- Tüplerdeki sıvı faz atılarak, pellet 500 µl washing buffer (yıkama tampon çözeltisi) ile yıkandırılmış ve çözündürülmüştür.
- Tüpler 13.000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüj yapılmış, sıvı faz atılmıştır ve pellet oda sıcaklığında iyice kurutulmuştur (alkol kokusu kalmayana kadar).
- Pelletin üzerine 150 µl TE buffer eklenmiş ve pellet çözündürülmüştür ve tüpler oda sıcaklığında 5 dakika süreyle bekletilmiştir.
- Tüpler 13.000 rpm'de 2 dakika süreyle santrifüj yapılmış ve tüplerden 100 µl sıvı faz alınarak üzerine 8 µl sodium asetat ve 200 µl % 100 ethanol eklenmiştir.
- Tüpler 20 °C'de 30 dakika süreyle inkübe edilmiş ve ardından 10 dakika +4 °C'de 12.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Tüpler sıvı faz atılmıştır.
- Pellet üzerine 200 µl % 70'lik ethanol eklenmiş ve tüpler -20 °C'de 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir.
- Tüpler vortexlenmiş ve +4 °C'de 3 dakika süreyle 12.000 rpm'de santrifüj yapıp, sıvı faz atılmıştır (bu aşama 2 defa tekrarlanır).
- Pellete dokunmadan sıvı faz atılıp pellet 20 dk süreyle oda sıcaklığında kurutulmuştur (alkol kokusu kalmayana kadar).
- Pellet 80 µl TE buffer ile çözündürülmüştür.
- Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları ölçülmüş ve moleküler analizlerde

kullanılıncaya kadar -80 °C’de saklanmıştır.

3.2.1.1.2. Morante-Carriell Yöntemiyle RNA Ekstraksiyonu (Morante-Carriell ve ark., 2014)

Yıkama Aşamasında;

- 150 mg bitki dokusu üzerine 1,5 ml’lik washing buffer (yıkama tampon çözeltisi) eklenmiştir. Havanda ezilerek 2 ml’lik ependorf tüpe aktarılmış ve vortexlenmiştir.
- Ependorf tüpler 5600 rpm’de 15 dk süreyle +4 °C’de santrifüjlenerek üst kısım atılmıştır.

İzolasyon Aşamasında;

- Önceden 65 °C’de ısıtılmış izolasyon buffer (her bir örnek için 1,5 ml) eklenerek vortexlenmiştir.
- Ependorf tüpler 65 °C’de 10 dk inkübe edilmiştir (her 2 dk da bir karıştırılmıştır).
- Örnekten 1 ml çekilerek yeni ependorf tüpe aktarılmıştır. Üzerine eşit hacimde Chloroform İsoamilalkol (24:1) eklenerek karıştırılmıştır (beyaz olana kadar).
- Tüpler 6.700 rpm’de 10 dk süreyle +4 °C’de santrifüjlenmiştir.
- Üst kısım dikkatlice yeni ependorf tüplere alınmıştır. Yine eşit hacimde Chloroform İsoamilalkol (24:1) eklenerek iyice karıştırılmıştır.
- Tüpler 10.000 rpm’de 10 dk süreyle +4 °C’de santrifüjlenmiştir.
- Üst kısım yeni bir ependorf tüpe alınmıştır. Üzerine 0,1 hacim sodium asetat (NaOAc) (3M, pH:5,2) ile 0,6 hacim isopropanol eklenerek karıştırılmıştır.
- Tüpler -80 °C’de 30 dk veya -20’de 1 saat süreyle inkübe edilmiştir.
- Tüpler 14.000 rpm de 20 dk süreyle +4 °C’de santrifüjleme yapılmıştır.

Saflaştırma Aşamasında;

- Pelletin üzerine 100 µl d₂H₂O eklenerek pellet çözüldürülmüştür. Üzerine 0,3 hacim 10 M LiCl eklenerek buzun üzerinde 90 dk süreyle inkübe edilmiştir (bu işlem 2 defa tekrarlanmıştır).
- Tüpler 14.000 rpm’de 30 dk süreyle +4 °C’de santrifüjlenmiştir.

- Alternatif olarak bir kez LiCl eklendikten sonra 1 gece +4 °C'de inkübe edilmiştir.
- Tüpler 14.000 rpm'de 30 dk süreyle +4 °C'de santrifüjlenmiştir.
- Santrifüjden sonra sıvı faz dökülmüştür.
- Pellet üzerine 100 µl d₂H₂O eklenerek pellet çözündürülmüştür.
- Üzerine 0,1 hacim NaoAc (3M) ve 2 hacim soğuk etanol (%96) eklenerek karıştırılmıştır.
- Tüpler 14.000 rpm'de 20 dk süreyle +4 °C'de santrifüjlenmiştir.
- Pellet 200 µl %70'lik soğuk alkolle yıkanmıştır.
- Kısa bir santrifüj yapılarak alkol dökülmüştür.
- Tüpler 20 dk süreyle oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.
- Pellet 40 µl d₂H₂O'da çözündürülmüştür.
- Elde edilen RNA'ların konsantrasyonları ölçülmüş ve moleküler analizlerde kullanılmaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) Analizleri

3.2.2.1. Reverse Transkripsiyon (RT; Reverse Transcription)

RNA virüslerinin PCR ile testlenmesinde ilk aşama olarak, RNA'lardan cDNA elde edilmiştir. Her bir örnek için 1 µl Random hexamer primer, 6,5 µl d₂H₂O ve 5 µl RNA karışımı hazırlanarak PCR tüplerine konulmuştur. PCR cihazında 94 °C'de 5 dakika ve buz üzerinde 5 dakika bekletildikten sonra her bir tüp içine 4 µl 5xRT tamponu, 2 µl d₂H₂O, 0,5 µl dNTP (10 mM) ve 1 µl RT enziminden eklenmiştir. Tüpler PCR cihazında 42 °C'de 1 saat 72 °C'de 10 dakika tutularak cDNA aşaması tamamlanmıştır.

3.2.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bu çalışma kapsamında *Vaccinium spp.*'nin testlendiği blueberry mosaic associated virus'un 3 farklı gen bölgesi için kullanılan primer baz dizileri çizelge 3.1'de verilmiştir. BIMaV RNA1, BIMaV RNA2, BIMaV RNA3 gen bölgelerinin

çoğaltılmasında kullanılan PCR karışımı ve koşulları birbirinden farklı olduğu için ayrı ayrı PCR analizine tabii tutulmuştur.

Çizelge 3.1. Blueberry mosaic associated virus'un 3 farklı gen bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan primer dizileri ve çoğaltılacak PCR ürünlerinin baz büyüklükleri

PRİMER ADI	PRİMER DİZİLİMİ	UZUNLUK (bp)	REFERANS
RNA1 F	CCATGTCTTCTACTCTTTCTCC	756	Thekke-Veetil ve ark., 2014
RNA1 R	GAAATTA GATTTTGTAACAATGCA GG		
RNA2 F	CCCCGGA TTGTTCCCGAACCTT	401	Thekke-Veetil ve ark., 2014
RNA2 R	ATTCTGA CCA CCCC GG TCTTGT		
RNA2 2F	TTCGA TCCCA GCCCTCTCCC	1281	Gauthier ve ark., 2015
RNA2 2R	AGGCAA A GGGAA A GAAATTCA GGTGTC		
RNA2 725 F	CAGAACCTGTATCAAGCATAG	1042	Rou mi, 2019 (Yayımlanmamış veriler)
RNA2 1767 R	GATTGGAA CCA TCTCTGCAAAG		
RNA3 F	GCCCTTGTC AATTTCA GTGTAA	350	Isogai ve ark., 2016
RNA3 R	CAAGCGGAAACACAAGGAAA		

3.2.2.3. Blueberry mosaic associated virus (BIMaV)'un PCR analizleri

BIMaV RNA1 (RdRp: RNA'ya bağlı RNA polimeraz) gen bölgesi için PCR analizlerinde spesifik primerler kullanılarak PCR karışımı, 16,8 µl d₂H₂O, 2,5 µl 10XB, 0,5 µl dNTP (10 mM), 2 µl MgCl₂ (25 mM), virüse özgü 0,5 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl), 0,2 µl Taq-DNA polymerase ve 2 µl cDNA olacak şekilde hazırlanmıştır. Primerlerin hedef DNA'ya bağlanma (annealing) ve uzama (extension) süre, sıcaklık ve döngü sayıları: PCR cihazı 1 döngü 94 °C'de 3 dakika; 35 döngü 94 °C'de 20 saniye, 50 °C'de 20 saniye, 72 °C'de 1 dakika ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika olarak programlanmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Blueberry mosaic associated virus'un RNA1 gen bölgesinin çoğaltılmasında uygulanan PCR koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	94 °C	3 dakika	1
Denatürasyon	94 °C	20 saniye	
Bağlanma	50 °C	20 saniye	35
Uzama	72 °C	1 dakika	
Son Uzama	72 °C	10 dakika	1

BIMaV RNA2 (MP: Hareketlilik proteini) gen bölgesi için PCR analizlerinde spesifik primerler kullanılarak PCR karışımı, 16,8 µl d₂H₂O, 2,5 µl 10XB, 0,5 µl dNTP (10 mM), 2 µl MgCl₂ (25 mM), virüse özgü 0,5 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl), 0,2 µl Taq-DNA polymerase ve 2 µl cDNA olacak şekilde hazırlanmıştır. Primerlerin hedef DNA'ya bağlanma (annealing) ve uzama (extension) süre ve sıcaklık döngüleri ise; PCR cihazı 1 döngü 94 °C'de 3 dakika; 35 döngü 94 °C'de 30 saniye, 54 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 1 dakika ve 1 döngü 72 °C'de 10 dakika olarak programlanmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Blueberry mosaic associated virus'un RNA2 gen bölgesinin çoğaltılmasında uygulanan PCR koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	94 °C	3 dakika	1
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	
Bağlanma	54 °C	1 dakika	35
Uzama	72 °C	1 dakika	
Son Uzama	72 °C	10 dakika	1

BIMaV RNA3 (NP: Nukleokapsid Proteini) gen bölgesi için PCR analizlerinde spesifik primerler kullanılarak PCR karışımı, 17,4 µl d₂H₂O, 2,5 µl 10XB_{(NH₄)SO₄}, 1 µl dNTP (10 mM), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), virüse özgü 0,2 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl), 0,3 µl Taq-DNA polymerase ve 2 µl cDNA olacak şekilde hazırlanmıştır. Primerlerin hedef DNA'ya bağlanma (annealing) ve uzama (extension) süre ve sıcaklık döngüleri ise; PCR cihazı 1 döngü 94 °C'de 3 dakika; 40 döngü 94 °C'de 20 saniye, 55 °C'de 20 saniye, 72 °C'de 1 dakika ve 1 döngü 72 °C'de 7 dakika olarak programlanmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. Blueberry mosaic associated virus'un RNA3 gen bölgesinin çoğaltılmasında uygulanan PCR koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	94 °C	3 dakika	1
Denatürasyon	94 °C	20 saniye	
Bağlanma	55 °C	20 saniye	40
Uzama	72 °C	1 dakika	
Son Uzama	72 °C	7 dakika	1

3.2.2.4. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi: Jel Elektroforez

PCR ürünlerinin görüntülenmesi için %1'lik Agaroz jel elektroforez işlemi yapılmıştır. 1 gr Agaroz, 100 ml 1xTAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu içerisinde mikrodalga fırında çözündürülüp tarak yerleştirilmiş ve jel tepsinine düz bir zemin üzerinde dökülerek agarozun polimerizasyonu için 20 dk süre ile bekletilmiştir. Jelin polimerizasyonundan sonra tarak dikkatli bir şekilde alınıp jel elektroforez tankına yerleştirilmiştir. 1xTAE tamponu tankın içerisine jeli kapatacak şekilde döküldükten sonra jel çukurlarına DNA marker ile beraber PCR ürünleri jel çukurlarına yüklenmiştir. Yükleme tamamlandıktan sonra elektroforez güç kaynağı ile elektroforez tankına 150 V'luk elektrik akımı yaklaşık 50 dakika süreyle uygulanmıştır. Ethidium Bromid (EtBr) 0,5 µg/ml konsantrasyonda 100 ml suya karıştırılmış ve jel bu karışım içerisinde 5-6 dakika tutularak boyanmıştır. Jel UV ışıkta görüntülenip oluşan bantların büyüklüğüne göre sonuçlar değerlendirilmiştir. Testlenen örnekler kullanılan pozitif kontrollerle karşılaştırılmış ve beklenen düzeyde bant oluşturanlar pozitif, oluşturmayanlar negatif kabul edilerek jel görüntüleme cihazında fotoğraflanmıştır.

3.2.2.5 DNA Dizileme ve BLAST Analizleri

PCR ile çoğaltılan her bir izolata ait PCR ürünü DNA fragmentlerinin baz dizileri tayin edilmek üzere baz dizisi tayin eden firmaya (Medsantek, İstanbul) gönderilmiş ve sonuçlar on-line olarak alınmıştır. Alınan baz dizileri, NCBI database da kayıtlı diğer izolatlara ile karşılaştırması yapılarak Basic alignment search (BLAST) aracılığı ile benzerlikler kontrol edilmiştir. Çoklu baz dizisi karşılaştırmaları MEGA X programı

(Kumar ve ark., 2018) kullanılarak Neighbour-Joining metodu (Saitou ve Nei, 1987) ile gerçekleştirilmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Arazi Çalışmaları

Bu çalışma kapsamında Samsun'dan 5, Giresun'dan 24, Trabzon'dan 48, Rize'den 50, Ordu'dan 7, Mersin'den 2 örnek alınarak toplamda 136 maviyemiş örneği (*Vaccinium spp.*) toplanmıştır. Toplanan 136 tane *Vaccinium* türlerinden 16 tanesi yabani maviyemiş örneği, 120 tanesi ise kültüre alınmış maviyemiş örnekleridir. *Vaccinium* türlerinde gözlenen en yaygın simptomlar; yaprak ve sürgünlerde damar açılmaları, mozaikler, klorotik lekeler, damarlarda pembemsi-kırmızı lekeler ve gelişme geriliğidir (Şekil 4.1, 4.2). Örnekleme yapılırken gerek virüs benzeri simptom gösteren gerekse simptomsuz *Vaccinium* bitkilerinden tesadüfi olarak örnekler alınmıştır.



Şekil 4.1. Rize-İkizdere maviyemiş plantasyonlarında yapraklarda pembemsi-kırmızı lekeler



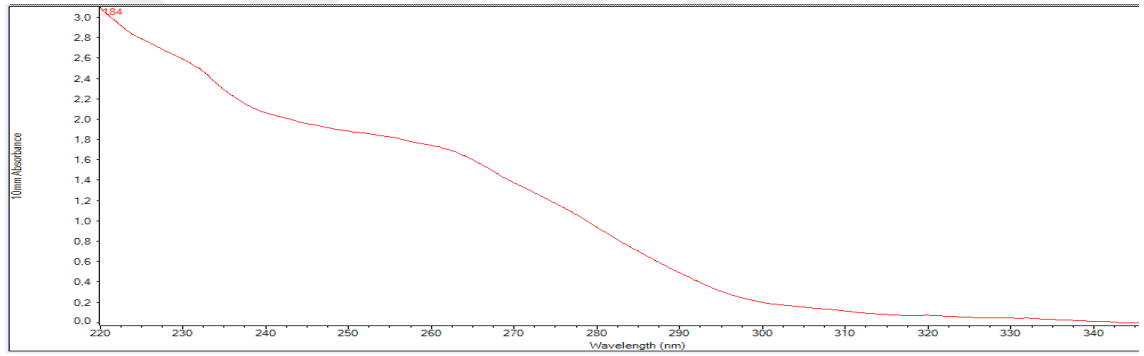
Şekil 4.2. Rize-İkizdere maviyemiş plantasyonlarında yapraklarda damar açılmaları, mozaikleşme ve klorotik lekeler

4.2. PCR Analizleri (Polyme rase Chain Reaction; PCR)

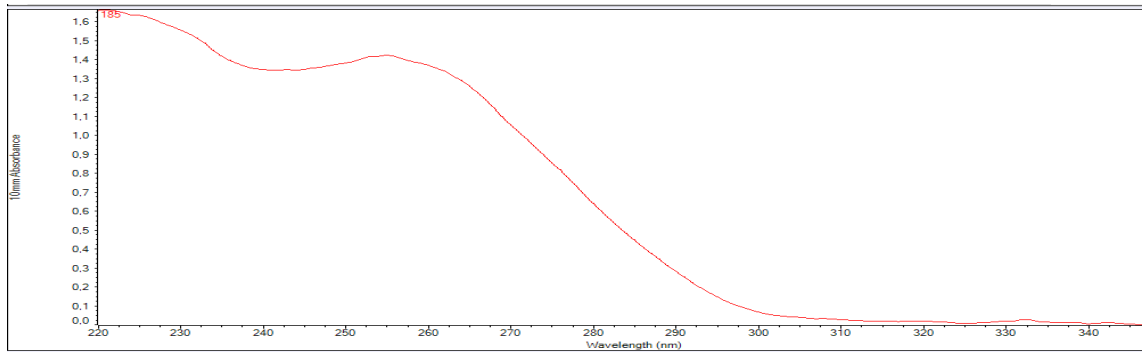
4.2.1. Maviyemiş örneklerinden RNA İzolasyonu

Maviyemiş örneklerinden RNA izole etmek için Silika RNA protokolü (Rott ve Jelkmann, 2001) ve Morante-Carriel RNA protokolü kullanılmıştır (Morante-Carriel ve

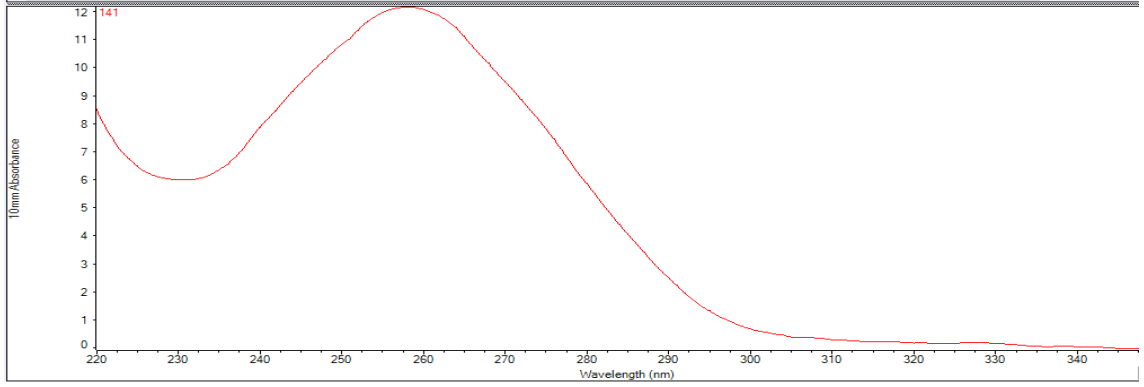
ark., 2014). Bu yöntemlerle yapılan izolasyonlarda RNA kalitesini belirlemek amacıyla nanodrop spektrofotometre ölçümleri yapılmıştır. Nanodrop spektrofotometre ölçümlerine göre Silika yöntemi ile ekstraksiyonu yapılan örneklerden iyi kalitede RNA elde edilmezken (Şekil 4.3; 4.4), Morante-Cariel RNA ekstraksiyon yöntemi ile yapılan örneklerden daha kaliteli RNA'lar elde edilmiştir (Şekil 4.5; 4.6; 4.7). Testlemede kullanılan bu örneklerin bazılarının nanodrop değerleri çizelge 4.1'de verilmiştir. Çizelge 4.1'de de görüldüğü gibi Morante-Cariel yönteminde gerek RNA konsantrasyonu gerekse RNA kalitesi "Silika" yöntemine göre daha yüksek bulunmuştur. Bu yöntemin diğer yöntemlere göre avantajı CTAB (Cetyltrimethylamonium bromide) temelli bir ekstraksiyon yöntemi olması ve iki kez 10 M lityum klorür ile çöktürülmesidir. Böylece saf, parçalanmamış ve yüksek miktarda RNA elde edilmesi mümkün olabilmektedir.



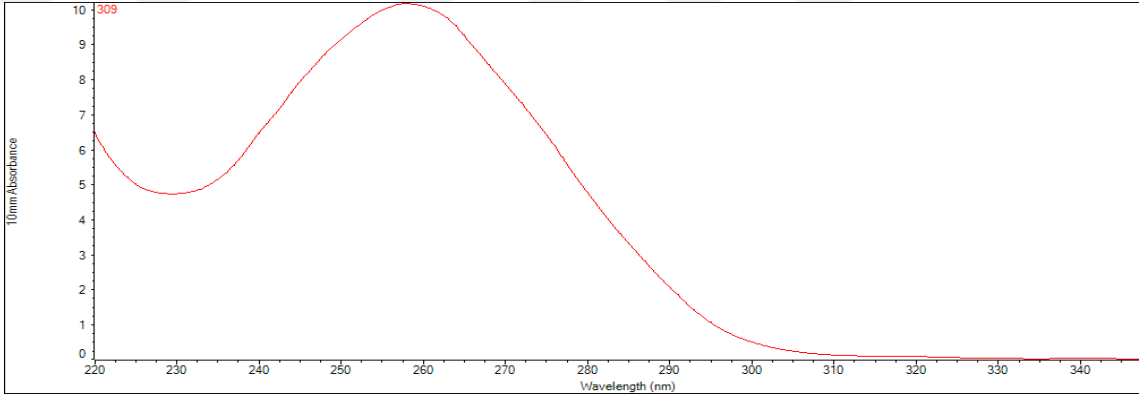
Şekil 4.3. Silika yöntemi kullanılarak Trabzon ilinden toplanan maviyemişlerden izole edilen RNA'lardan TS184 no'lu örneğin spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD)



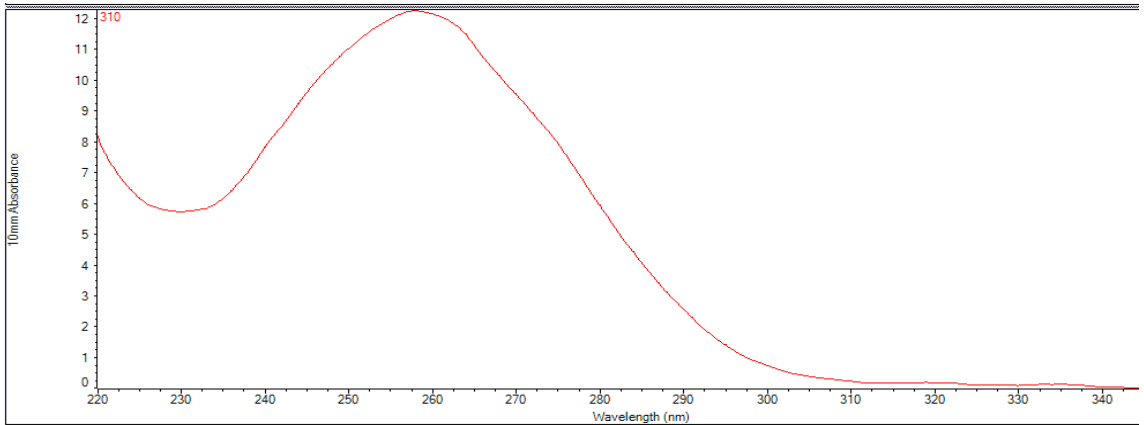
Şekil 4.4. Silika yöntemi kullanılarak Trabzon ilinden toplanan maviyemişlerden izole edilen RNA'lardan TS186 no'lu örneğin spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD)



Şekil 4.5. Morante-Carriell RNA ekstraksiyon yöntemi kullanılarak Giresun ilinden toplanan maviyemişlerden izole edilen RNA'lerden TS141 no'lu maviyemiş örneğinin spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD)



Şekil 4.6. Morante-Carriell RNA ekstraksiyon yöntemi kullanılarak Ordu ilinden toplanan maviyemişlerden izole edilen RNA'lerden 309 no'lu maviyemiş örneğinin spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD)



Şekil 4.7. Morante-Carriell RNA ekstraksiyon yöntemi kullanılarak Ordu ilinden toplanan maviyemişlerden izole edilen RNA'lerden 310 no'lu maviyemiş örneğinin spektrofotometre ölçümü (NanoDrop 2000c, Thermo Sci, ABD)

Çizelge 4.1. Bazı maviyemiş örneklerinden iki farklı izolasyon yöntemiyle ekstrakte edilen RNA'ların nanodrop ölçüm değerleri

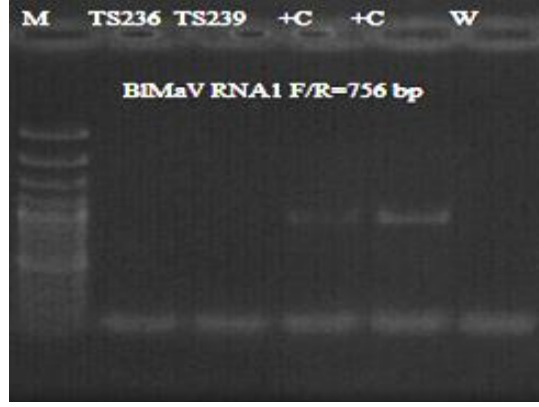
Örnek Numarası	Ekstrasyon Yöntemi	Konsantrasyon Ng/ µl	260/ 280	260/ 230
TS184	Silika	63,1	1,86	1,07
TS186	Silika	54,8	1,76	0,78
TS141	Morante-Carriel	482,5	2,06	2,02
309	Morante-Carriel	404	2,12	2,14
310	Morante-Carriel	485,6	2,05	2,13

4.2.2. Sistem Kurma (Optimizasyon) Çalışmaları ve RT-PCR Analizleri

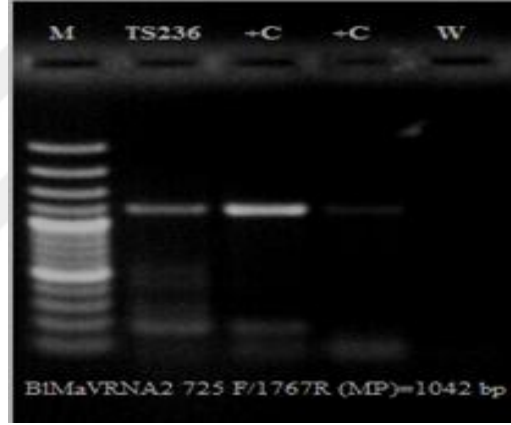
4.2.2.1. Sistem Kurma Çalışmaları

Bu çalışma kapsamında toplanan *Vaccinium* örneklerinden izole edilen RNA'lar RT-PCR yöntemi ile testlenmeden önce her bir gen bölgesi için BIMaV'nin pozitif kontrolü kullanılarak sistem kurma çalışmaları yapılmıştır. Sistem kurma çalışmalarında RNA1 (RdRp) gen bölgesi için "BIMaV F/R" primer çifti kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmalarında bağlanma (annealing) sıcaklığı öncelikle 55 °C ve 58 °C olarak testlenmiştir fakat beklenen seviyede (756 bp) bant elde edilememiştir. Ancak bağlanma sıcaklığı 50 °C'ye düşürüldüğünde beklenen seviyede (756 bp) amplifikasyon elde edilmiştir (Şekil 4.8).

BIMaV RNA 2 (MP) gen bölgesi için ise sırasıyla BIMaV F/R, BIMaV 2F/2R ve BIMaV 725F/1767R primer çiftleri kullanılarak pozitif kontroller ile yapılan optimizasyon çalışmalarında kullanılan BIMaV F/R, BIMaV 2F/2R primerlerinde bağlanma (annealing) sıcaklığı 58 °C, 60 °C, 63 °C, 72 °C'de testlenmiş ancak sadece BIMaV 725F/1767R primer çifti kullanılarak yapılan optimizasyon çalışmalarında beklenen seviyede (1042 bp) bant elde edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. Blueberry mosaic associated virus RNA1 (RdRp) gen bölgesi için spesifik F/R primer çifti kullanılarak pozitif kontroller ile optimizasyon amacıyla yapılan RT-PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); TS236 ve TS239: Rize-İkizdere maviyemiş örnekleri, +C: Pozitif kontrol, W: Su Kontrol



Şekil 4.9. Blueberry mosaic associated virus RNA 2 (MP) gen bölgesi için spesifik 725F/1767R primer çifti kullanılarak pozitif kontroller ile optimizasyon amacıyla yapılan RT-PCR analiz sonuçları. M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); TS236: Rize-İkizdere maviyemiş örneği, +C: Pozitif kontrol, W: Su Kontrol

4.2.2.2. RT-PCR analizleri

Bu çalışma kapsamında toplanan *Vaccinium* örneklerinden izole edilen RNA'lar, optimizasyon çalışmaları sonucunda tespit edilen en iyi primer çiftleri ve uygun PCR koşulları kullanılarak RT-PCR yöntemi ile test edilmiştir. Toplanan örneklerin tamamı blueberry mosaic associated virus'un RNA1 (RdRp), RNA2 (MP), RNA3 (NP) gen bölgelerini çoğaltan BIMaV RNA1 F/R, BIMaV RNA2 725F/1767R, BIMaV RNA3 F/R primer çiftleri kullanılarak testlenmiş ve sonuçlar çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Karadeniz Bölgesinde farklı illerden ve Mersin'den toplanan yabancı ve kültüre alınmış maviyemiş bitki örneklerinin blueberry mosaic associated virus'un 3 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları

No	Örnek no	Bitki Adı	Bölge Adı	BIMaV RNA1 Gen Bölgesi F/R Prime ri	BIMaV RNA2 Gen Bölgesi 725F/ 1767R Prime ri	BIMaV RNA3 Gen Bölgesi F/R Prime ri
1	TS125	Maviyemiş	Samsun	-	-	-
2	TS127	Maviyemiş	Samsun	-	-	+
3	TS128	Maviyemiş	Samsun	-	-	+
4	TS129	Maviyemiş	Samsun	-	-	+
5	TS131	Maviyemiş	Samsun	-	-	-
6	TS132	Maviyemiş	Giresun	-	-	-
7	TS133	Maviyemiş	Giresun	-	-	-
8	TS134	Maviyemiş	Giresun	-	-	-
9	TS136	Maviyemiş	Giresun	-	-	-
10	TS137	Maviyemiş	Giresun	-	-	-
11	TS138	Maviyemiş	Giresun	-	-	-
12	TS139	Maviyemiş	Giresun	-	-	-
13	TS140	Maviyemiş	Giresun	-	-	-
14	TS141	Maviyemiş	Giresun	-	-	-
15	TS142	Maviyemiş	Giresun	-	-	-
16	TS143	Maviyemiş	Giresun	-	-	-
17	TS144	Maviyemiş	Giresun	-	-	-
18	TS145	Maviyemiş	Giresun	-	-	-
19	TS146	Maviyemiş	Giresun	-	-	-
20	TS147	Maviyemiş	Giresun	-	-	-
21	TS148	Maviyemiş	Giresun	-	-	-
22	TS149	Maviyemiş	Giresun	-	-	-
23	TS150	Maviyemiş	Giresun	-	-	-
24	TS153	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
25	TS154	Maviyemiş	Trabzon	-	-	+
26	TS155	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
27	TS156	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
28	TS157	Maviyemiş	Trabzon	-	-	+
29	TS162	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
30	TS164	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
31	TS165	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
32	TS166	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
33	TS167	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
34	TS173	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
35	TS180	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
36	TS181	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-

Çizelge 4.2. (devam) Karadeniz Bölgesinde farklı illerden ve Mersin’den toplanan yabancı ve kültüre alınmış maviyemiş bitki örneklerinin blueberry mosaic associated virus’un 3 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları

No	Örnek no	Bitki Adı	Bölge Adı	BIMaV RNA1 Gen Bölgesi F/R Primeri	BIMaV RNA2 Gen Bölgesi 725F/1767R Primeri	BIMaV RNA3 Gen Bölgesi F/R Primeri
37	TS182	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
38	TS183	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
39	TS184	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
40	TS185	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
41	TS186	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
42	TS187	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
43	TS188	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
44	TS190	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
45	TS191	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
46	TS192	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
47	TS193	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
48	TS195	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
49	TS196	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
50	TS197	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
51	TS198	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
52	TS199	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
53	TS200	YabancıMaviyemiş	Trabzon	-	-	-
54	TS201	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
55	TS202	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
56	TS203	YabancıMaviyemiş	Trabzon	-	-	+
57	TS205	YabancıMaviyemiş	Trabzon	-	-	-
58	TS206	YabancıMaviyemiş	Trabzon	-	-	-
59	TS210	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
60	TS211	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
61	TS212	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
62	TS213	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
63	TS214	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
64	TS215	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
65	TS216	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
66	TS127	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
67	TS218	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
68	TS219	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
69	TS220	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
70	TS221	YabancıMaviyemiş	Trabzon	-	-	+
71	TS223	Maviyemiş	Trabzon	-	-	-
72	TS224	YabancıMaviyemiş	Rize	-	-	+

Çizelge 4.2. (devam) Karadeniz Bölgesinde farklı illerden ve Mersin’den toplanan yabancı ve kültüre alınmış maviyemiş bitki örneklerinin blueberry mosaic associated virus’un 3 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları

No	Örnek no	Bitki Adı	Bölge Adı	BIMaV RNA1 Gen Bölgesi F/R Primeri	BIMaV RNA2 Bölgesi 725F/1767R Primeri	BIMaV Gen RNA3 Gen Bölgesi F/R Primeri
73	TS225	Maviyemiş	Rize	-	-	-
74	TS226	Maviyemiş	Rize	-	-	-
75	TS227	Maviyemiş	Rize	-	-	+
76	TS228	Maviyemiş	Rize	-	-	+
77	TS229	Maviyemiş	Rize	-	-	+
78	TS230	YabancıMaviyemiş	Rize	-	-	-
79	TS231	YabancıMaviyemiş	Rize	-	-	-
80	TS232	Maviyemiş	Rize	-	+	+
81	TS233	Maviyemiş	Rize	-	-	+
82	TS234	Maviyemiş	Rize	-	-	-
83	TS235	Maviyemiş	Rize	-	+	+
84	TS236	Maviyemiş	Rize	-	+	+
85	TS237	Maviyemiş	Rize	-	-	+
86	TS238	Maviyemiş	Rize	-	-	-
87	TS239	Maviyemiş	Rize	-	-	+
88	TS240	Maviyemiş	Rize	-	-	+
89	TS241	Maviyemiş	Rize	-	-	+
90	TS242	Maviyemiş	Rize	-	-	-
91	TS243	YabancıMaviyemiş	Rize	-	-	+
92	TS244	YabancıMaviyemiş	Rize	-	-	+
93	TS245	YabancıMaviyemiş	Rize	-	-	+
94	TS246	YabancıMaviyemiş	Rize	-	-	-
95	TS247	YabancıMaviyemiş	Rize	-	-	+
96	TS248	YabancıMaviyemiş	Rize	-	-	+
97	TS249	YabancıMaviyemiş	Rize	-	-	+
98	TS250	YabancıMaviyemiş	Rize	-	-	+
99	295	Maviyemiş	Mersin	-	-	-
100	296	Maviyemiş	Mersin	-	-	-
101	297	Maviyemiş	Rize	-	-	+
102	298	Maviyemiş	Giresun	-	-	-
103	300	Maviyemiş	Giresun	-	-	+
104	303	Maviyemiş	Giresun	-	-	-
105	304	Maviyemiş	Giresun	-	-	-
106	305	Maviyemiş	Giresun	-	-	-
107	306	Maviyemiş	Giresun	-	-	+
108	309	Maviyemiş	Ordu	-	-	-

Çizelge 4.2. (devam) Karadeniz Bölgesinde farklı illerden ve Mersin’den toplanan yabani ve kültüre alınmış maviyemiş bitki örneklerinin blueberry mosaic associated virus’un 3 farklı gen bölgesini çoğaltan primer çiftleri kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonuçları

No	Örnek no	Bitki Adı	Bölge Adı	BIMaV RNA1 Gen Bölgesi F/R Primeri	BIMaV RNA2 Bölgesi 725F/1767R Primeri	BIMaV Gen RNA3 Gen Bölgesi F/R Primeri
109	310	Maviyemiş	Ordu	-	-	-
110	311	Maviyemiş	Ordu	-	-	+
111	312	Maviyemiş	Ordu	-	-	+
112	314	Maviyemiş	Ordu	-	-	-
113	316	Maviyemiş	Ordu	-	-	-
114	317	Maviyemiş	Ordu	-	-	-
115	340	Maviyemiş	Rize	+	+	+
116	341	Maviyemiş	Rize	+	-	+
117	342	Maviyemiş	Rize	+	+	+
118	343	Maviyemiş	Rize	-	-	-
119	344	Maviyemiş	Rize	-	-	-
120	345	Maviyemiş	Rize	-	-	-
121	346	Maviyemiş	Rize	-	-	-
122	347	Maviyemiş	Rize	-	+	-
123	348	Maviyemiş	Rize	-	-	-
124	349	Maviyemiş	Rize	-	-	-
125	350	Maviyemiş	Rize	-	-	-
126	351	Maviyemiş	Rize	-	-	-
127	352	Maviyemiş	Rize	+	+	+
128	353	Maviyemiş	Rize	+	-	+
129	354	Maviyemiş	Rize	+	+	+
130	355	Maviyemiş	Rize	-	-	-
131	356	Maviyemiş	Rize	-	-	-
132	357	Maviyemiş	Rize	+	+	+
133	358	Maviyemiş	Rize	-	-	-
134	359	Maviyemiş	Rize	+	+	+
135	360	Maviyemiş	Rize	-	-	-
136	361	Maviyemiş	Rize	-	-	-

Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi bu çalışma kapsamında Samsun’dan 5, Giresun’dan 24, Trabzon’dan 48, Rize’den 50, Ordu’dan 7, Mersin’den 2 örnek alınarak toplamda 136 maviyemiş örneği blueberry mosaic associated virus’un farklı gen bölgelerini çoğaltan primerlerle testlenmiş ve en fazla pozitif örnek virüsün nükleoproteinini çoğaltan ve tanı primeri olarak kullanılan (BIMaV F/R) primer çifti ile elde edilmiştir.

RNA3 genine spesifik primer çifti kullanılarak testlenen 136 maviyemiş örneklerinden 39 tanesinin BIMaV ile enfekteli olduğu ve testlenen virüsün % 28,67 oranında yaygın olduğu belirlenmiştir. Testlenen 136 tane *Vaccinium* türlerinden 16 yabancı maviyemiş örneğinden 10 tanesinde, 120 kültüre alınmış maviyemiş örneğinden ise 29 tanesinde bulaşık tespit edilmiştir. Yapılan RT-PCR analizlerinde Mersin örneklerinde BIMaV tespit edilemezken testlenen örneklerde Giresun ve Trabzon illerinde % 8,33, Ordu ilinde % 28,57, Rize ilinde % 56 ve Samsun ilinde ise % 60 oranında bulaşık tespit edilmiştir (Çizelge 4.3). Testlenen örneklerin 16 tanesi yabancı maviyemiş örneği olup bunların 10 tanesi BIMaV ile enfekteli bulunmuştur. Bu durumda kültüre alınan maviyemişlerde enfeksiyon oranı % 24,16 olarak saptanırken yabancı maviyemiş bitkilerinde %62,5 olarak belirlenmiştir. Bazı illerden az sayıda örnek temin edilmiş olması nedeniyle enfeksiyon oranının yüksek olarak görülmesi o illerin BIMaV ile çok bulaşık olduğu anlamına gelmemesi gerektiği gözden uzak tutulmamalıdır.

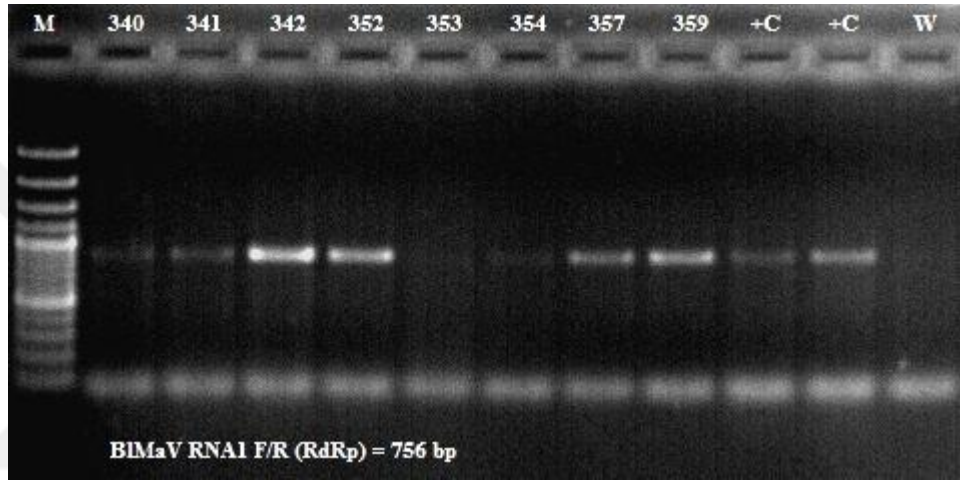
Çizelge 4.3. Maviyemiş plantasyonlarında blueberry mosaic associated virus tespit edilen iller, testlenen örnek sayısı ve enfeksiyon oranları (%)

ÖRNEK İLLER	TOPLANANAN TESTLENEN SAYISI	ENFEKTELİ ÖRNEK/ ÖRNEK ENFEKSİYON ORANI (%)
Giresun	2/24	83,3
Ordu	2/7	28,57
Samsun	3/5	60
Rize	28/50	56
Trabzon	4/48	83,3
Mersin	0/2	0
Toplam	39/136	28,67

4.2.2.3. BIMaV'nin Genetik Çeşitlilik Çalışmaları

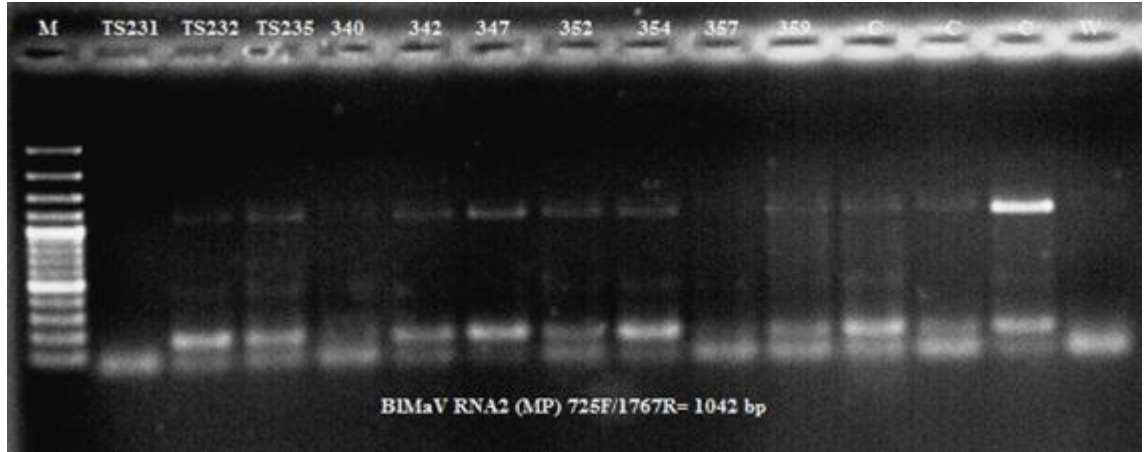
BIMaV'nin genel tanı primerinin yanı sıra tüm yabancı ve kültüre alınmış maviyemiş örnekleri virüsün 3 farklı gen bölgesini çoğaltan primerlerle testlenmiştir. Bu amaçla yapılan RT-PCR analizlerinde farklı illerden toplanan maviyemiş örnekleri BIMaV RNA1 (RdRp) gen bölgesi için "BIMaV F/R" primer çifti ile testlendiğinde Samsun, Giresun, Ordu, Trabzon ve Mersin maviyemiş örneklerinin hiçbirisinde amplifikasyon gözlenmezken pozitif kontrollerde beklenen düzeyde bant elde edilmiştir. BIMaV RNA1 (RdRp) gen bölgesi için "BIMaV F/R" primer çifti ile testlenen yabancı

maviyemiş örneklerinden hiçbirisinde amplifikasyon gözlenmemiştir. Sadece Rize ilinden toplanan 50 kültüre alınmış maviyemiş örneğinin 8 tanesinde (340, 341, 342, 352, 353, 354, 357, 359 no'lu örnekler) ise bu primer çifti kullanılarak beklenen düzeyde (756 bp) amplifikasyon meydana gelmiştir (Şekil 4.10). Beklenen düzeyde amplifikasyon elde edilen 8 örnekten en iyi çoğalma gösteren 7 örnek (340, 341, 342, 352, 353, 354, 357 no'lu örnekler) sekans analizlerine gönderilmiş ve gelen sekans sonuçlarının blueberry mosaic associated virus'un RNA1 gen bölgesine ait olduğu görülmüştür.



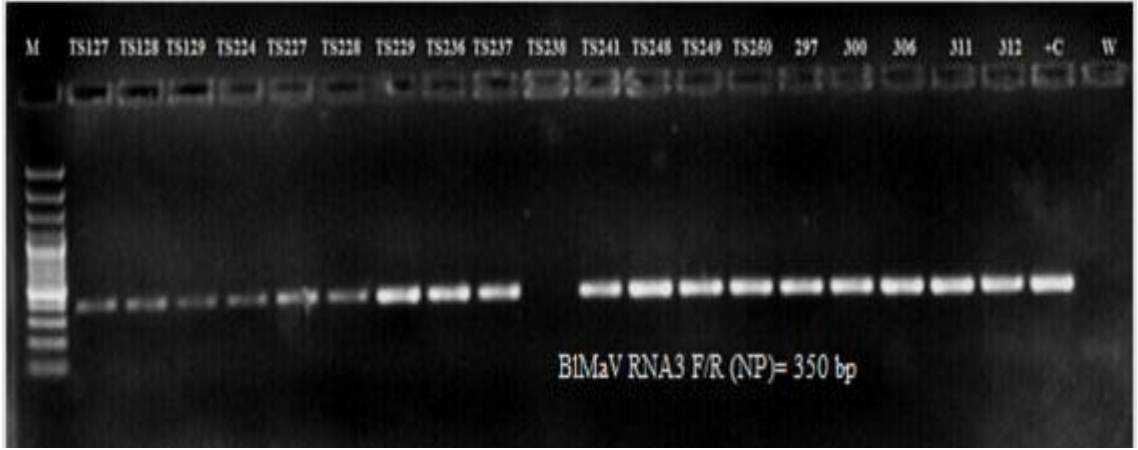
Şekil 4.10. Rize'den toplanan kültüre alınmış maviyemiş örneklerinden blueberry mosaic associated virus'un RNA1 (RdRp) gen bölgesi için BIMaV F/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#321 MBI Thermo Sci, ABD); 340,341,342,352,353,354,357,359,359: Rize maviyemiş örnekleri; +C: Pozitif kontrol, W: Su kontrol

BIMaV RNA2 (MP) gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan "BIMaV 725F/1767R" primer çifti ile yapılan RT-PCR analizlerinde de sadece Rize ilinden toplanan 50 kültüre alınmış maviyemiş örneğinin 10 tanesinde (TS232, TS235, TS236, 340, 342, 347, 352, 354, 357, 359 no'lu örnekler) beklenen düzeyde (1042 bp) amplifikasyon meydana gelmiştir (Şekil 4.11). Beklenen düzeyde amplifikasyon elde edilen 10 örnekten en iyi çoğalma gösteren 8 örnek (TS232, TS235, TS236, 340, 342, 352, 354, 359 no'lu örnekler) sekans analizlerine gönderilmiş ve gelen sekans sonuçlarının blueberry mosaic associated virus'un RNA 2 gen bölgesine ait olduğu görülmüştür.



Şekil 4.11. Rize ilinden toplanan kültüre alınmış maviyemiş örneklerinde blueberry mosaic associated virus'un RNA 2 (MP) gen bölgesi için BIMaV725F/1767R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); TS231, TS232, TS235, 340, 342, 347, 352, 354, 357, 359: Rize maviyemiş örnekleri, +C: Pozitif kontrol; W: Su Kontrol

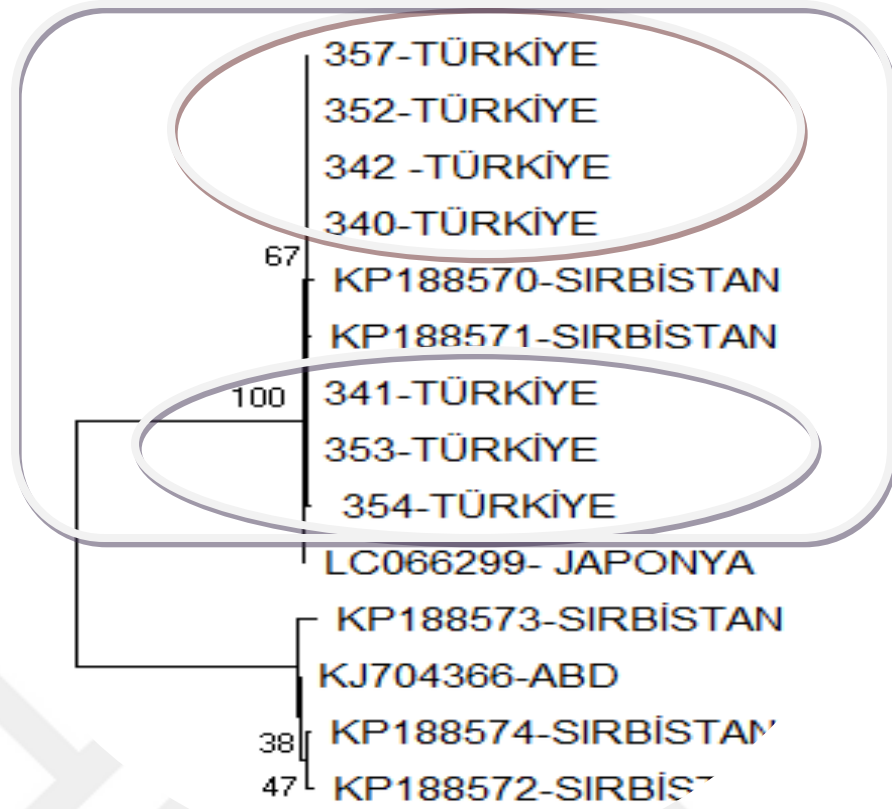
RNA3 (NP) gen bölgesi virus tespiti için "BIMaV F/R" primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizlerinde ise 5 Samsun örneğinden 3 tanesinde (TS127, TS128, TS129 no'lu örnekler), 24 Giresun örneğinden 2 tanesinde (300, 306 no'lu örnekler), 7 Ordu örneğinden 2 tanesinde (311, 312 no'lu örnekler), 48 Trabzon örneğinden 4 tanesinde (TS154, TS157, TS203, TS221 no'lu örnekler), 50 Rize örneğinden 28 tanesinde (TS224, TS227, TS228, TS229, TS232, TS233, TS235, TS236, TS237, TS239, TS240, TS241, TS243, TS244, TS245, TS247, TS248, TS249, TS250, 297, 340, 341, 342, 352, 353, 354, 357, 359 no'lu örnekler) beklenen düzeyde (350 bp) amplifikasyon meydana gelmiştir (Şekil 4.12). Beklenen düzeyde amplifikasyon elde edilen 39 örnekten en iyi çoğalma gösteren 27 tanesi (TS127, TS128, TS129, TS154, TS157, TS203, TS224, TS227, TS228, TS229, TS232, TS233, TS236, TS237, TS239, TS241, TS243, TS248, TS249, 340, 341, 342, 352, 353, 354, 357, 359 no'lu örnekler) sekans analizine gönderilmiş ve gelen sekans sonuçlarının blueberry mosaic associated virus'un RNA3 gen bölgesine ait olduğu görülmüştür. Amplifikasyon görülen 39 örnekten 10 tanesi yabancı maviyemiş, 29 tanesi ise kültüre alınmış maviyemiş örnekleridir.



Şekil 4.12. Giresun, Samsun, Ordu ve Rize illerinden toplanan yabancı ve kültüre alınmış maviyemiş örneklerinde blueberry mosaic associated virus RNA3 (NP) gen bölgesi için BIMaV F/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Marker (SMO#321 MBI, Thermo Sci, ABD); TS127, TS128, TS129: Samsun maviyemiş örnekleri, TS224, TS227, TS228, TS229, TS236, TS237, TS238, TS241, TS248, TS249, TS250, 297: Rize maviyemiş örnekleri, 300, 306: Giresun maviyemiş örnekleri, 311, 312: Ordu maviyemiş örnekleri, +C : Pozitif kontrol (doğrudan cDNA), W: Su Kontrol

4.2.3. Filogenetik Analizler

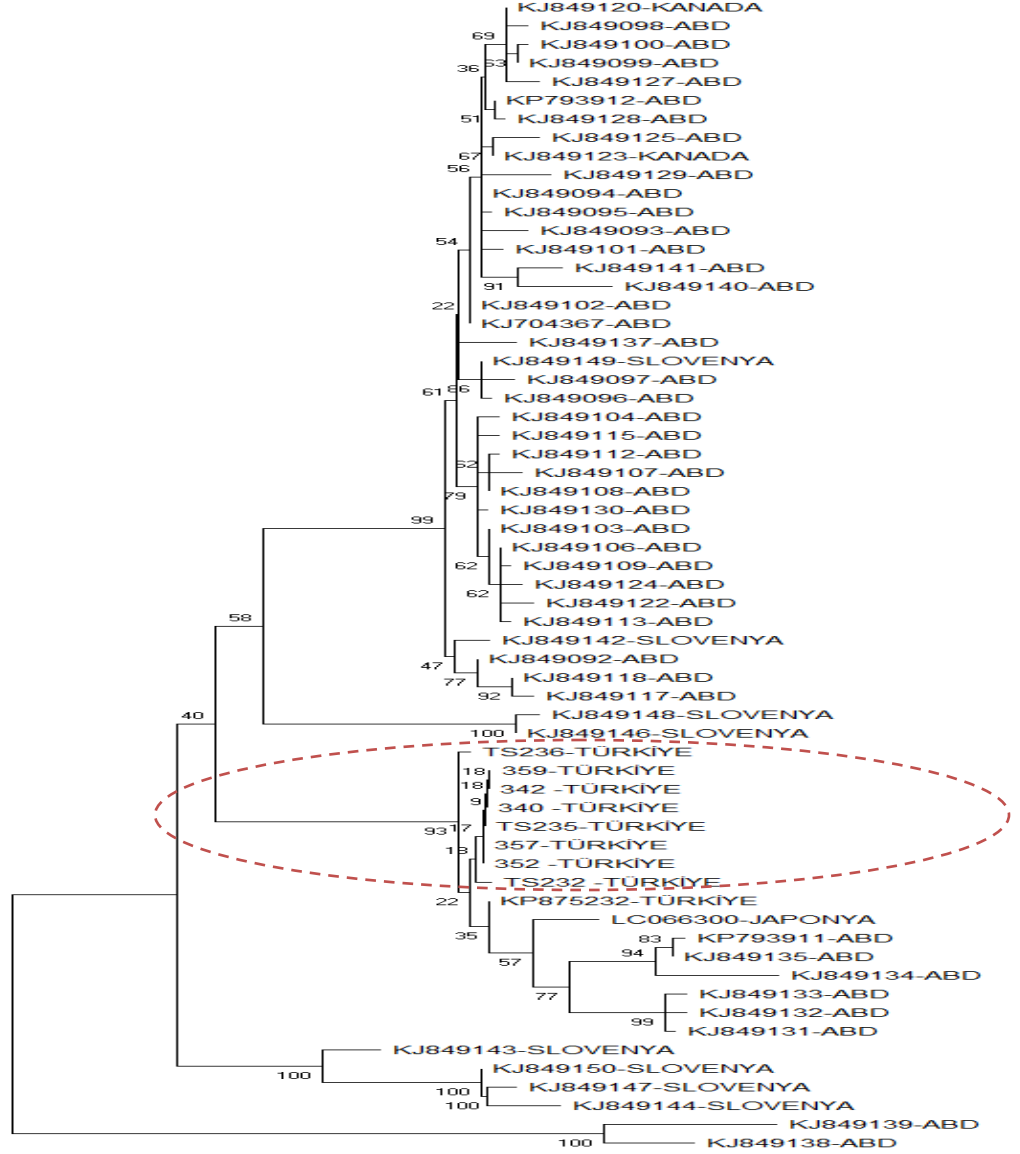
Bu çalışma kapsamında BIMaV'nin RNA1 gen bölgesi için spesifik F/R primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizlerinde pozitif kontrollerle aynı seviyede bant veren (756 bp) 7 kültüre alınmış maviyemiş örneğinin (340, 341, 342, 352, 353, 354, 357 no'lu örnekler) sekans analizi yapılmıştır. Örnek sekansları NCBI veri tabanında kayıtlı diğer sekanslarla Clustal W yöntemi kullanılarak hizalanmıştır. Hizalanan tüm nükleotid dizileri NJ (Neighbor Joining) yöntemi kullanılarak Mega X yazılımı ile analiz edilmiştir. BIMaV izolatlarına ait NJ dendrogramı incelendiğinde, BIMaV Türkiye izolatlarının birbirine çok benzediği, aynı grup içerisinde yer aldığı ve en yakın homolojiyi % 99,861 benzerlik oranıyla Sırbistan izolatları (KP188570 ve KP188571), en uzak homolojiyi ise % 88,178 benzerlik oranı ile farklı bir grup içerisinde yer alan farklı bir Sırbistan izolatı (KP188573) ile gösterdiği saptanmıştır (Şekli 4.13). Bu dendrogramdan da anlaşılacağı gibi aynı ülkeden elde edilen farklı izolatlar farklı genomik yapı gösterebilmektedir ancak bu durum ülkemiz BIMaV izolatları için geçerli değildir. Bunun nedeni söz konusu izolatların aynı coğrafik bölgeye ait (Rize-İkizdere) ve aynı bahçeden toplanan örneklerden elde edilmesi olarak düşünülmektedir.



Şekil 4.13. Blueberry mosaic associated virus'un RNA1 (RdRp) gen bölgesi için BIMaV F/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda elde edilen ürünlerinin sekans analizine göre çizilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde, MEGA X yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendrogramda bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir

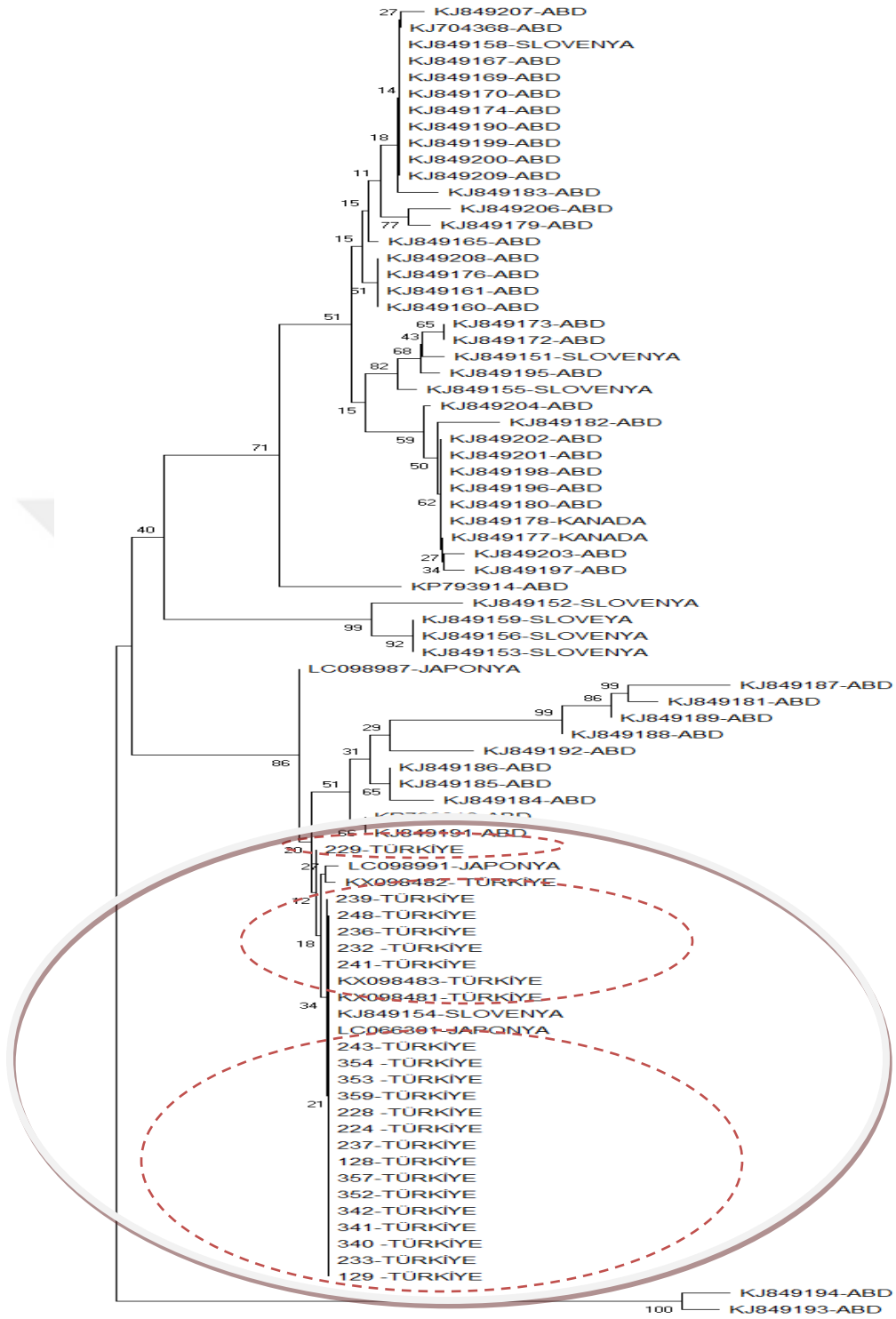
BIMaV'nin RNA2 (MP) gen bölgesi için spesifik 725F/1767R primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizlerinde pozitif kontrollerle aynı seviyede bant veren (1042 bp) 8 kültüre alınmış maviyemiş örneklerinin (TS232, TS235, TS236, 340, 342, 352, 354, 359 no'lu örnekler) sekans analizi yapılmıştır. Örnek sekansları NCBI veri tabanında, diğer sekanslarla birlikte Clustal W yöntemi kullanılarak hizalanmıştır. Hizalanan tüm nükleotid dizileri NJ (Neighbor Joining) Mega X yazılımı ile analiz edilmiştir. BIMaV RNA2 gen bölgesi sekanslarının aynen RNA1 geninde olduğu gibi birbirleriyle oldukça benzer sekans dizilimine sahip oldukları ve filogenetik ağaçta aynı grupta yer aldığı belirlenmiştir. BIMaV izolatlarına ait NJ dendrogramı incelendiğinde, BIMaV Türkiye izolatlarının aynı grup içerisinde yer aldığı ve en yakın homolojiyi % 99,334 benzerlik oranıyla Japonya izolatı (LC066300), en uzak homolojiyi ise % 91,825

benzerlik oranı ile farklı grup içerisinde yer alan ABD izolatu ile (KJ849139) gösterdiği saptanmıştır (Şekli 4.14).



Şekil 4.14. Blueberry mosaic associated virus'un RNA2 (MP) gen bölgesi için spesifik 725F/1767R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda elde edilen ürünlerinin sekans analizine göre çizilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde, MEGA X yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendrogramda bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir

BIMaV'nin RNA3 gen bölgesi için spesifik F/R primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizlerinde pozitif kontrollerle aynı seviyede bant veren (350 bp) 27 yabancı ve kültüre alınmış maviyemiş örneklerinin (TS127, TS128, TS129, TS154, TS157, TS203, TS224, TS227, TS228, TS229, TS232, TS233, TS236, TS237, TS239, TS241, TS243, TS248, TS249, 340, 341, 342, 352, 353, 354, 357, 359 no'lu örnekler) sekans analizi yapılmıştır. Sekans analizi sonucunda anlamlı gelen 21 yabancı ve maviyemiş örneğinden (TS128, TS129, TS224, TS228, TS229, TS232, TS233, TS236, TS239, TS241, TS243, TS237, TS248, 340, 341, 342, 352, 353, 354, 357, 359 no'lu örnekler) elde edilen sekanslara göre BIMaV'nin RNA3 gen bölgesi için filogenetik ağaç çizilmiştir. Örnek sekansları NCBI veri tabanında, diğer BIMaV izolatlarının dizileriyle birlikte Clustal W yöntemi kullanılarak hizalanmıştır. Hizalanan tüm nükleotid dizileri NJ (Neighbor Joining) yöntemi kullanılarak Mega X yazılımı ile analiz edilmiştir. BIMaV RNA3 gen bölgesi sekanslarının birbirleriyle oldukça benzer sekans dizilimine sahip oldukları ve filogenetik ağaçların aynı grupta yer aldığı belirlenmiştir. BIMaV izolatlarına ait NJ dendrogramı incelendiğinde, BIMaV Türkiye izolatlarının aynı grup içerisinde yer aldığı ve en yakın homolojiyi % 100 benzerlik oranıyla Japonya izolatı (LC098987), en uzak homolojiyi ise % 91,111 benzerlik oranı ile farklı grup içerisinde yer alan ABD izolatı ile (KJ849193) gösterdiği saptanmıştır (Şekli 4.15).



Şekil 4.15. Blueberry mosaic associated virus'un RNA3 (NP) gen bölgesi için spesifik F/R primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda elde edilen ürünlerinin sekans analizine göre çizilen filogenetik ağaç. Filogenetik analizde, MEGA X yazılımında yer alan Neighbor-joining (NJ) yöntemi kullanılmıştır. Dendrogramda bootstrap (seç-bağla tahmin testi) değerleri, dallarda yüzde olarak gösterilmiştir

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırma, ülkemizde son yıllarda popülaritesi yüksek olan ve yetiştiriciliği yaygınlaşan maviyemiş bitkilerinden (*Vaccinium spp.*) izole edilen blueberry mosaic associated virus izolatlarının kısmi sekanslarının karşılaştırmalı genomik analizlerinin araştırılmasına yönelik ilk çalışmadır. Bu çalışma kapsamında Karadeniz Bölgesinde Samsun'dan 5, Giresun'dan 24, Trabzon'dan 48, Rize'den 50, Ordu'dan 7 örnek alınmış ayrıca Mersin ilindeki seralarda saksıda yetiştirilen maviyemişler'den 2 örnek alınarak toplamda 136 maviyemiş örneği son yıllarda tanımlanmış olan "blueberry mosaic associated virus" için RT-PCR analizleri ile testlenmiş, üç farklı gen bölgesini RNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimini (RdRp) kodlayan RNA1, hareketlilik proteini (MP) kodlayan RNA2 ve nükleoproteini (NP) kodlayan RNA3 gen bölgelerini çoğaltan primerlerle RT-PCR analizleri yapılmıştır. Toplanan 136 tane *Vaccinium* türlerinden 16 tanesi yabancı maviyemiş örneği, 120 tanesi ise kültüre alınmış maviyemiş örnekleridir. Yapılan bu çalışma kapsamında sadece Karadeniz Bölgesi Rize ilinden toplanan maviyemiş örneklerinin 7 tanesinde RNA1, 8 örnekte RNA2, 27 örnekte ise RNA3 gen bölgesi başarıyla çoğaltılarak seçilen izolatların sekans analizleri yapılmıştır. RNA3 genine spesifik primer çifti kullanılarak testlenen toplam 136 maviyemiş örneğinin 39 tanesinin B1MaV ile enfekteli olduğu ve testlenen örneklerde enfeksiyon oranının % 28,67 olduğu belirlenmiştir. Testlenen örneklerin 16 tanesi yabancı maviyemiş örneği olup bunların 10 tanesi B1MaV ile enfekteli bulunmuştur. Bu durumda kültüre alınan maviyemişlerde enfeksiyon oranı % 24,16 olarak saptanırken yabancı maviyemiş bitkilerinde % 62,5 olarak belirlenmiştir. Aynı örnekler RNA1 ve RNA2 gen bölgelerine spesifik primer çiftleri kullanılarak testlendiğinde sadece Rize ilinden toplanan 8 kültüre alınmış maviyemiş örneğinde virüsün RNA1, 10 örnekte ise RNA2 bölgeleri çoğaltılarak sekans analizleri yapılmış diğer illerden toplanan örneklerde bu gen bölgeleri çoğaltılamamıştır. En yaygın B1MaV enfeksiyonu Rize İkizdere ilçesindeki ülkemizin ilk ticari maviyemiş bahçesinde saptanmış olup virüsün 3 farklı gen bölgesini içeren B1MaV izolatları da sadece bu bahçeden elde edilen izolatlarda saptanmıştır. Bu bahçe ülkemizde ticari anlamda tesis edilmiş olan ilk bahçe olması ve Polonya'dan ithal edilen fidanlarla kurulmuş olması

nedeniyle virüs enfeksiyonunun en yüksek bu bahçede tespit edilmiş olması sürpriz bir sonuç olmamıştır. Ülkemizde en yaygın maviyemiş plantasyonları Karadeniz Bölgesinde kurulmuş olup bölge üreticileriyle yapılan görüşmelerde bu bölgedeki bahçe ve fidanlıklar için üretim materyallerinin Rize-İkizdere'de Polonya'dan ithal edilen bahçeden sağlandığı bildirilmiştir. Bu nedenle Karadeniz Bölgesindeki tüm illerde farklı oranlarda B1MaV enfeksiyonu tespit edilmiştir. Bu bölgedeki maviyemiş bitkilerinin tamamının orijinal kaynağının aynı olması nedeniyle bu bitkilerden elde edilen B1MaV izolatları arasında genomik yapıları bakımından bir farklılığa rastlanmamıştır. Yapılan filogenetik analizler sonucunda Türk B1MaV izolatlarının RNA'ya bağlı RNA polimeraz, hareketlilik ve nükleoprotein gen bölgelerine ait diziler birbirine çok benzediği için filogenetik ağaçta hep aynı grupta toplanmıştır. Bununla birlikte bazı Türk B1MaV izolatları yüksek bootstrap değerleri ile bazı Sırp ve Japon izolatları ile yakın homoloji göstererek aynı kümede sınıflandıkları fakat ABD'ye ait izolatlardan oldukça farklılık gösterdiği saptanmıştır. Bu durum B1MaV izolatları arasında coğrafik farklılığın bir işareti olarak değerlendirilmiştir.

B1MaV önemli verim kayıplarına yol açan virüslerden birisi olması nedeniyle bu virüsle ilgili çalışmalara devam edilmesi ve bu çalışma kapsamında elde edilen ön verilerin göz önünde bulundurularak geliştirilmesi önerilmektedir.

KAYNAKÇA

- Acioğlu ve ark., 2018. yüksek lisans tezi. *Rubus* ve *Vaccinium* türlerinde yeni giriş yapan virüslerin moleküler yöntemlerle tanınması ve karakterizasyonu
- Ağaoğlu, S., Çelik, M., Atila, S., 2003. Bazı Ahududu Çeşitlerinin Ayaş (Ankara) Koşullarına Adaptasyonu Üzerine Ön Değerlendirmeler. Ulusal Kivi ve Üzüksü Meyveler Sempozyumu, **Bildiri Kitabı**, 319-324, Ordu.
- Ateş, S., Çelik, H., 2012. Dünya ve Türkiye Maviyemiş Üretim Potansiyeli. IV. Ulusal Üzüksü Meyveler Semp. 3-5 Ekim, Akdeniz Üniv., Antalya. **Bildiriler Kitabı**
- Caruso, F.L., D.C. Ramsdell, 1995. Compendium of blueberry and cranberry diseases. St. Paul, MN: **APS Press**. 87p.
- Cho, I.S., Chung, B.N., Cho, J.D., Choi, G.S. 2012. First report of Blueberry red ringspot virus *infecting* highbush blueberry in Korea. **Plant Dis**. 96:1074.
- Çağlayan, K., Gazel, M., Elçi, E., Çelik, H., Gündüz, K., Mavric, I., Grubar, B., Marn, M.V., 2015. Large scale survey on virus diseases of *Rubus* and *Vaccinium* species in Turkey. 23. International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops [ICVF]. (2015), **Morioka Japan**, s 66. Sözlü-özet
- Çağlayan, K., Çelik, H., Gazel, M., Elçi, E., Gündüz, K., Grubar, B., Marn, M. V. 2016. Occurrence of *Vaccinium* viruses in Black Sea region of Turkey. XI. International *Vaccinium* Symposium, **Orlando-Florida, U.S.A**, 10-14 April, 2016, p,17
- Çağlayan, K., Gazel, M., Elçi, E., Plesko, I. M., Virscek Marn, M., (2017a). Viruses Infecting Small Fruits in Turkey. **International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies, Cappadocia-Turkey**, 15-17 May, 2017, p,1154.
- Çelik, H., 2003. Bazı yüksek yaban mersini çeşitlerinin Rize'deki performanslarının saptanması üzerine araştırmalar-1. In: **Ulusal Kivi ve Üzüksü Meyveler Sempozyumu, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Ordu Ziraat Fakültesi** (23-25 Ekim 2003), pp 454- 460.
- Çelik, H. 2004. Türkiye için yeni bir meyve: LİKAPA Üzüksü Meyvelerin Kralıdır, **Hasad Aylık Gıda, Tarım ve Hayvancılık Dergisi**, 20(235): 42-51.
- Çelik, H, 2012. Yüksek boylu Maviyemiş yetiştiriciliği. **Mesleki kitaplar serisi III.**, İstanbul.
- Elçi, E., Gazel, M., Pleško, I.M., Marn, M.V., Çağlayan, K., (2015b). RNA2 Sequences of Raspberry Bushy Dwarf Virus (RBDV) Isolates from *Rubus* spp. in Turkey. 23. International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops [ICVF]. 8-12 Haziran 2015, Morioka Japan,
- Ellis R, Jacobson DM, Horvitz H. poster-özet 1991. Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**. 1991 Sep;129(1):79-94.
- FAO (2016) FAO (Dünya Tarım Örgütü WebSayfası) <http://www.fao.org>.
- Gauthier, Nicole & Polashock, James & Thekke-Veetil, Thanuja & Martin, Robert & Julie Beale, Miss. (2015). First Report of Blueberry Mosaic Disease Caused by Blueberry Mosaic Associated Virus in Kentucky. **Plant Disease**. 99. 10.1094/PDIS-09-14-0946-PDN
- Gazel, M., Elçi, E., Çelik, H., Gündüz, K., Plesko, I.M, Marn, M.V., Çağlayan, K., 2015. The presence of Blueberry mosaic associated virus in *Vaccinium* spp. in

- Turkey. 23. **International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops [ICVF]**. 8-12 Haziran 2015, Morioka Japan, s 100. poster-özet
- Gümüş C, Ölmez Z, Hangişi Ölmez G, Kalender Ç., 2009. Artvin’de yaban mersini (*Vaccinium sp., Likapa*) yetiştiriciliği eğitimi konulu AB projesinin tanıtımı ve projenin yürütülmesinde karşılaşılan güçlükler ve sorunlar (in Turkish). **II.Ormancılıkta Sosyo-Ekonomik Sorunlar Kongresi**, 19-21 Şubat, Isparta, 81-88
- Hutchinson, M.T., Varney, E.H., 1954. Ringspot-A virus disease of cultivated blueberry. **Plant Disease Report** 38:260–262.
- Isogai, M., Ishii, K., Umemoto, S., Watanabe, M., Yoshikawa, N., 2009. First report of blueberry red ringspot disease caused by Blueberry red ringspot virus in Japan. **J Gen Plant Pathol** 75:140–143.
- Isogai, M., Matsushashi, Y., Suzuki, K., S.Y., M.W., N.Y., (2016). Occurrence of blueberry mosaic associated virus in highbush blueberry trees with blueberry mosaic disease in Japan. **Journal of General Plant Pathology**. 82 (3): 177-179
- Kalinowska, E., E. Paduch-Cichal, M. Chodorska, 2011. First report of Blueberry red ringspot virus in highbush blueberry in Poland. **J. Plant Pathol**.
- Kalinowska, E., E. Paduch-Cichal and M. Chodorska, 2012. Molecular characterization of Polish Blueberry red ringspot virus isolate. **Virus Genes** 44 (2), 309-311.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution** 35:1547-1549
- Mackenzie, D.J, Mclean, M.A., Mukerji, S., Green, M. 1997. Improved RNA extraction for woody plants for the detection of viral pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. **Plant Disease**, 81: 222-226.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: **Cold Spring Harbor Laboratory**.
- Martin, R.R., Tzanetakis, I.E., Gergerich, R., Fernandez, G. and Pesic, Z. 2004. Blackberry yellow vein associated virus: a new crinivirus found in blackberry. **Acta Hort.** 656:137-142.
- Martin, R.R., 2004. Recommended procedures for detection of viruses of small fruit crops. **Acta Hort.** 656:199-207.
- Milne, R.G., Djelouah, K., Garcia, L.M., Dal Bo, E., Grau, O., 1996. Structure of citrus psorosis-associated virus particle: implication for diagnosis and taxonomy. In: Graca.J.V., da Moreno, P., Yokomi, R.K.(Eds.), **Proceedings of the 14th Confence of the International Organization of Citrus Virologist. University of California, Riverside, CA, USA**, pp. 189-197.
- Morante-Carriel, J., Sellés-Marchart, S., Martínez-Márquez, A., Martínez-Esteso, M.J., Luque, I., Bru-Martínez, R., 2014. RNA isolation from loquat and other recalcitrant woody plants with high quality and yield. **Anal Biochem**. 452:46–53.
- Plesko, M.I., M.M. Virscek, D. Koron, 2010. Detection of Blueberry red ringspot virus in highbush blueberry cv. ‘Coville’ in Slovenia. Biotic and abiotic stress prevention on integrated berry fruits production 9–11th March 2009 (**Sofia-Bulgaria, 2010**) Abs. 34.
- Poudel, B., and Tzanetakis, I.E., 2013. Population structure of Blackberry chlorotic

- ringspot virus. **Arch. Virol.** 158:667-672.
- Pribylova, J., Špak, J., Kubelkova, D., Petrzik, K., 2010. First report of Blueberry red ringspot virus in highbush blueberry in the **Czech Republic**. **Plant Dis.** 94:1071.
- Ramsdell, D.C., 1987. In: **Virus Diseases of Small Fruits**; ed. R.H. Converse. U.S. Dep. Agric. Hdbk No. 631, p. 112.
- Ramsdell, D.C., Kim, K.S., Fulton, J.P., 1987. Red Ringspot of Blueberry, in **Virus Diseases of Small Fruits**, Agriculture Handbook. No. 631, ed. by **R.H. Converse (The United States Department of Agriculture, USA, 1987)**, pp. 121–123.
- Retamales, J.B. and Hancock, J.F., 2012. Blueberries. **Crop production science in horticulture series**, no:21, USA.
- Rott ME, Jelkmann W (2001) Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: Adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR) and modification of an RNA extraction protocol. **European Journal of Plant Pathology** 107:411-420.
- Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution** 4:406-425.
- Shands, A.C.; Crandall, S.G.; Miles, T.D. 2017. First report of the ability of *Olpidium virulentus* to vector Blueberry mosaic associated virus (BIMaV) on southern highbush blueberry. **Plant Dis.** 101: 1683.
- Tamura K. and Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution** 10:512-526.
- Thekke-Veetil, T., Polashock, J.J., Marn, M.V., Plesko, I.M., Schilder, A.C., Keller, K.E., Martin, R.R., Tzanetakis, I.E. 2014. Population Structure of Blueberry Mosaic Associated Virus: Evidence of Genetic Exchange in Geographically Distinct Isolates. **Virus Research.** 201:79-84.
- Thekke-Veetil, T. Ho, K.E. Keller, Martin, Tzanetakis, 2016. A new ophiovirus is associated with blueberry mosaic disease.. **Acta horticulturae**; 189:92-6
- Thekke Veetil, T., Polashock, J.J., Keller, K.E., Martin, R.R., Ho, T., Tzanetakis, I.E. 2016. Blueberry mosaic associated virus – A putative, new member of Ophioviridae. **Acta Horticulturae.** 1117:103-110.
- Tzanetakis, I., Martin, R.R. 2017. Disease caused by viruses in blueberries. In: Polashock, J.J., Caruso, F.L., Averill, A.L., Schilder, A.C., editors. **Compendium of Blueberry, Cranberry, and Lingonberry Diseases and Pests. 2nd edition.** St. Paul, MN: APS Press. 60-78.
- Turkben, C., Barut, E., Incedayı, B. (2008). Investigations on Population of Blueberry (*Vaccinium myrtillus L.*) in Uludag (Mount Olympus) in Bursa, Turkey. **Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 21 (1), 41-44.
- TÜİK 2019. Türkiye İstatistik Kurumu WebSayfası. Bitkisel Üretim İstatistikleri <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>.
- Ward, C.W., 1993. Progress towards a higher taxonomy of viruses, **Res.Virol.** 144.419-453

ÖZGEÇMİŞ

Yazar 1995 yılında Hatay ili Kırıkhan ilçesinde doğdu. İlk ve orta okul Kırıkhan Mehmet Akif ilköğretim okulunda, Lise eğitimini Kırıkhan lisesinde tamamladı. 2013 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki koruma bölümünü kazandı ve 2017 yılında aynı bölümden mezun oldu. 2017 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.



EKLER

SİLİKA RNA EXT. BUFFER (1000 ml) (Rott ve Jelkmann, 2001)

24,2 g Tris- Base

12,66 g LiCl

15 g SDS 2,92 g EDTA veya 3,72 g EDTA*2H₂O

10 g Sodium Deoxycholate 10 ml NP- 40

% 1 β-MCE (kullanılmadan hemen önce eklenmelidir)

5,8 M POTASYUM ASETAT (pH:6.5) (100 ml)

60 ml 5 M Potasyum Asetat (pH:7.5)

28,5 ml H₂O

11,5 ml Glicial asetic asit

1 M Katı Potasyum Asetat

SİLİKA WASHİNG BUFFER (1000 ml) (Rott ve Jelkmann, 2001)

10 mM Tris- HCl (pH:7.5)

1 ml 0,5 M EDTA

1 ml 5M NaCl

500 ml % 100 EtOH

479 ml sterile H₂O

TE BUFFER (pH:8) (1000 ml) (Rott ve Jelkmann, 2001)

10 ml 1 M Tris- HCl (pH:8)

2 ml 0,5 M EDTA

Sterile H₂O ile tamamlanır.

MORANTE-CARRIEL VE ARK. (2014)'NIN RNA EKST. BUFFER

WASHING BUFFER (100 ml)

Tris- HCl (pH:7.5)	0,1 M
Sorbitol	0,35 M
PEG	% 10
Mercaptoethanol	% 2

ISOLATION BUFFER (100 ml)

Tris- HCl (pH:7.5)	0,3 M
EDTA	25 mM
M NaCl	2 M
CTAB	% 2
PVP	% 2
Spermidine	% 0,005

SAFLAŞTIRMA BUFFER (100 ml)

LiCl	10 M
Sodium Asetat	3 M

% 70'lik ve %96'lık Soğuk Ethanol kullanılmıştır.

AGAROS JEL ELEKTROFOREZ (MANIATIS ve ark., 1982)

TAEX50 (100 ml)

0,5 M EDTA pH:8

10 ml 0,6 Glacial acetic acide

5,71 ml Trizma base

24,2 g çözelti 100 ml d₂H₂O'ya tamamlanıp otoklavlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

PCR ürününün yükleme ortamı (15 ml 6X stok için)

Bromophenol blue 15 ml

Glycerol 18 g

TAEX50 6 ml

Hazırlanan ortam -20 °C'de saklanmıştır.

Ethidium Bromide çözeltisi (1 mg/ml 200 ml stok için)

0,5X TAE 200 ml

Ethidium bromide 200 µl

Koyu renkli bir kap içinde karanlık ortamda oda sıcaklığında saklanmıştır. 5-10 kullanımdan sonra çözelti tazelenmiştir.

%1 Agarose Jel Elektroforezi

1 g agaroz, 100 ml 0,5XTAE içinde mikrodalga fırında eritilmiştir. Yaklaşık 40 °C sıcaklığa geldikten sonra, elektroforez ünitesinin jel tepsisine dökülüp taraklar yerleştirildikten sonra agarozun donması beklenmiştir (15-20 dakika). 0.5XTAE ortamı içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir.