



**TEKİRDAĞ İLİNDEKİ BAĞ ÜRETİM
ALANLARINDA *Grapevine fanleaf virus* (GFLV)
VE *Grapevine leaf roll associated-viruses* (GLRV3-
6)'LERİNİN SAPTANMASI ÜZERİNE
ARAŞTIRMALAR**

Mesout CHEKİM AMET

Yüksek Lisans Tezi

**BİTKİ KORUMA Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Havva İLBAĞI**

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEKİRDAĞ İLİNDEKİ BAĞ ÜRETİM ALANLARINDA *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) VE *Grapevine leaf roll associated-viruses* (GLRV3-6)'LERİNİN SAPTANMASI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Mesout CHEKİM AMET

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Havva İLBAĞI

TEKİRDAĞ-2021

Her hakkı saklıdır.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TEKİRDAĞ İLİNDEKİ BAĞ ÜRETİM ALANLARINDA *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) VE *Grapevine leaf roll associated-viruses* (GLRV3-6)'LERİNİN SAPTANMASI ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Mesout CHEKİM AMET

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Havva İLBAĞI

Tekirdağ ilindeki bağ üretim alanlarında verim ve kaliteyi olumsuz yönde etkileyen *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) ve *Grapevine leaf roll associated-viruses* (GLRV3-6)'lerin saptanması amacıyla 2018 yılı Temmuz ve Ağustos aylarında sürvey çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sürvey çalışmalarında Tekirdağ ili merkez ilçe Süleymanpaşa'dan 105 yaprak örneği, Şarköy ilçesinden 146, Malkara ilçesinden ise 5 yaprak örneği olmak üzere toplam 256 adet symptom gösteren yaprak örnekleri toplanmıştır. Böylece Sürveyler esnasında yapraklarda kızarma, sarılık, mozaik, nekroz, yelpaze yaprak oluşumu, geriye doğru kıvrılma, şekil bozukluğu ve bodurluk simptomları gibi tipik virüs hastalıkları belirtileri gösteren yaprak örnekleri toplanmış ve bu örneklerde *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine leaf roll associated-virus 3* (GLRV-3) ve *Grapevine leaf roll associated-virus 6* (GLRV-6) enfeksiyonları Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) testi ile araştırılmıştır. Ayrıca GFLV'yi saptamak amacıyla Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) testi uygulanmıştır. DAS-ELISA test sonuçlarına göre 256 adet symptom gösteren yaprak örneğinden 60 adedinde GLRaV-3 (% 23.44), 7 adet örnekte ise GFLV saptanmıştır. 1 örnekte ise GLRaV-3 ve GFLV'nin karışık enfeksiyonları belirlenmiştir. RT-PCR test sonuçlarına göre 256 örnekten 11 adedinin GFLV (% 4.3) ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Şarköy ilçesindeki enfeksiyon oranı % 33.56 iken Süleymanpaşa ilçesindeki enfeksiyon oranı % 2.95 olarak belirlenmiştir. Malkara ilçesinden alınan 5 adet yaprak örneğinde GFLV, GLRaV-3 ve GLRaV-6 virüsleri saptanmıştır. Toplam il düzeyindeki enfeksiyon oranı % 27.73 olarak tespit edilmiştir. Ancak GLRaV-6 virüsü testlenen örneklerin hiçbirinde saptanmamıştır.

Anahtar kelimeler: Bağ, DAS-ELISA, GFLV, GLRaVs, RT-PCR

2021, 48 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION on DETECTION of *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) and *Grapevine leaf roll associated-viruses* (GLRV3-6) in GRAPEVINE GROWING AREAS in TEKIRDAG

Mesout CHEKİM AMET

Tekirdağ Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Plant Protection

Supervisor: Prof.Dr. Havva ILBAGI

The survey studies have been performed to identify *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) and *Grapevine leaf roll associated-viruses* (GLRV3-6), which have caused yield and quality losses in grapevine areas of Tekirdag province from July to August in 2018. During the survey studies, 256 symptomatic leaf samples, including 105 leaf samples in Süleymanpaşa district, 146 leaf samples in Şarköy district, and 5 leaf samples in Malkara district of Tekirdag were collected. Collected leaf samples exhibiting typical symptoms of virus diseases such as; reddish, yellowing, mosaic, necrose, fan leaf formation, rolling back, leaf deformation, and stunting symptoms were tested by Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) method. Moreover, Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) method was applied to identify GFLV to samples. According to DAS-ELISA test, 60 leaf samples were found infected with GLRaV-3 (23.44%), and 7 samples had positive with GFLV from a total of 256 symptomatic leaf samples. However, one sample had mixed infection with GFLV and GLRaV-3. RT-PCR showed that the infection with GFLV of 11 leaf samples (% 4.3). While the infection rate in Şarköy district was 33.56%, the infection rate in Süleymanpaşa was determined as 20.95%. Five leaf samples collected from Malkara district were not found infected with GFLV, GLRaV-3 and GLRaV-6 viruses. The total infection rate in Tekirdag was 27.73%. However, none of the tested samples have been identified as GLRaV-6.

Key words: Grapevine, DAS-ELISA, GFLV, GLRaVs, RT-PCR

2021, 48 pages

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGE DİZİNİ	iv
ŞEKİL DİZİNİ	v
SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
TEŞEKKÜR	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
3. MATERYAL ve YÖNTEM	16
3.1. MATERYAL	16
3.1.1. Sürvey Çalışmaları	16
3.1.2. Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması	17
3.1.3. DAS-ELISA Testinde Kullanılan Materyaller	17
3.1.4. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Testinde Kullanılan Materyaller	17
3.2. YÖNTEM	18
3.2.1. Arazi Gözlemleri ve Enfekteli Bitki Materyalinin Elde Edilmesi	18
3.2.2. Serolojik Test Yöntemi (DAS-ELISA Testi)	19
3.2.3. Moleküler Test Yöntemi (RT-PCR Testi)	21
3.2.3.1. Total Nükleik asit Ekstraksiyonu	22
3.2.3.2. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Testi	22
3.2.3.2.1. Complementar DNA (cDNA) Sentezi	22
3.2.3.2.2. Polymerase Chain Reaction (PCR) Testi	23
3.2.3.4. %2'lik Agaroz Jelin Hazırlanması	23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	24
4.1. Arazi Çalışmalarına İlişkin Bulgular	24
4.2. DAS-ELISA Test Sonuçları	30
4.3. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Test Sonuçları	31
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	33
6. KAYNAKLAR	38
7. EKLER	43
8. ÖZGEÇMİŞ	48

ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge 1.1. 2018 yılında Dünya'daki üzüm üretim alanı ve miktarları (Anonim, 2018a).....	2
Çizelge 1.2.2018 yılı Türkiye'deki üzüm üretim alanı ve miktarları (Anonim, 2018b).....	2
Çizelge 3.1. Tekirdağ ili ve ilçelerindeki bağ üretim alanlarından toplanan örneklerin alındığı yer, çeşit adı ve örnek adedi.....	18
Çizelge 3.2. GFLV hastalığının PCR ile çoğaltımında uygulanan sıcaklık aralıkları	23
Çizelge 4.1. Tekirdağ ili bağ üretim alanlarından toplanan enfekteli yaprak örneklerine uygulanan DAS- ELISA ve RT-PCR test sonuçları	31



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 3.1. Tekirdağ ili ve ilçelerinde sürvey çalışmasının gerçekleştirildiği alanlar	16
Şekil 3.2. Porselen havanlarda ezilerek elde edilen bitki ekstraktları.....	20
Şekil 3.3 DAS-ELISA testinde ELISA platelerinin yıkanması işlemi	21
Şekil 4.1. Tekirdağ ili Şarköy ilçesindeki yol kenarındaki enfekteli bağ alanının görünümü .	24
Şekil 4.2. Tekirdağ ili Süleymanpaşa ilçesindeki Nusratlı Köyünde yapraklarda tipik sarılık ve kızarıklık belirtileri	25
Şekil 4.3. Tekirdağ ili Süleymanpaşa ilçesindeki Nusratlı Köyünden alınan asma çeşidindeki yaprak formu ve simetrisinin bozularak yaprağın yelpaze şeklinin olduğu tipik belirti	25
Şekil 4.4. Tekirdağ ili Süleymanpaşa ilçesindeki Nusratlı Köyünden alınan yaprak örneğinde kısa boğum oluşumu, sağdaki yaprak sağlıklı yaprak örneği.....	26
Şekil 4.5. Tekirdağ ili Süleymanpaşa ilçesindeki Nusratlı Köyündeki asma yapraklarında mozaik ve sarılık belirtileri.....	26
Şekil 4.6. Tekirdağ ili Süleymanpaşa ilçesindeki Nusratlı Köyündeki asma yapraklarında, yaprak formu ve simetrisinin bozularak yaprağın yelpaze şeklinin olduğu tipik belirti	27
Şekil 4.7. Tekirdağ ili Şarköy ilçesindeki sarılık belirtilerinin yoğun şekilde görüldüğü bağ alanı	28
Şekil 4.8. Tekirdağ ili Şarköy ilçesindeki bir üretici bağındaki omcada yapraklarda kızarma ve yaprak ayasının aşağı doğru kıvrılması.....	28
Şekil 4.9. Tekirdağ ili Şarköy ilçesi, Aşağı Kalamış köyündeki bir üretici bağındaki omcada tipik kızarma ve yaprak kıvrılma belirtileri.....	29
Şekil 4.10. DAS-ELISA testinde pozitif reaksiyon veren örneklerin görünümü.....	30

SİMGELER VE KISALTMALAR

BSA	Bovine serum albümin
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik asit
DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich-ELISA
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
g	Gram
HCl	Hidroklorik asit
KH ₂ PO ₄	Potasyum dihidrojen Fosfat
KCl	Potasyum klorür
lt	Litre
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
nm	Nanometre
NaCl	Sodyum Klorür
Na ₂ CO ₃	Sodyum Karbonat
NaHCO ₃	Sodyum bikarbonat
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	Disodyum hidrojen fosfat
NaN ₃	Sodyum azid
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PBST	Fosfat Tampon Çözeltilisi
GFLV	Grapevine Fanleaf Virus
GLRV3-6	Grapevine Leaf Roll Associated-Viruses
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
Taq	Taq polimeraz

TEŞEKKÜR

Bu araştırma konusunun belirlenmesinde, tezimin hazırlanmasında ve bana her konuda rehberlik eden danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Havva İLBAĞI'na, Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇITIR'a, çalışmalarım esnasında vermiş olduğu destekten dolayı Tekirdağ Bağcılık Araştırma İstasyonu M¼d¼rl¼đ¼ personeli Sayın Dr. Lerzan ÖZT¼RK'e sonsuz teőekk¼rlerimi sunarım. Eğitim hayatım boyunca benden desteklerini esirgemeyen beni yetiştiren her zaman yanımda olan aileme en içten teőekk¼rlerimi sunarım. Tez çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen kardeşim gibi bildiğim kuzenim ve aynı zamanda meslektaşım olan Ziraat M¼hendisi Murat CHEKİM AHMET'e teőekk¼r ederim.

Mesout CHEKİM AMET
Ziraat M¼hendisi

1. GİRİŞ

Dünya üzerinde çok geniş bir alana yayılmış olan asma türlerinden kültür asması *Vitis vinifera* L., çok eski bir tarihi geçmişe sahip olup yabani üzümlerin taze veya kuru olarak tüketilmesi, alkol, alkollü içki üretiminde değerlendirilmesi nedeniyle M.Ö. 5000-6000'li yıllarında (Cıralı Taş Devri), Kafkasya ve Anadolu'da kültüre alındığı ve zamanla buradan dünyanın hemen her yerine dağıldığı kabul edilmektedir (Çelik ve Odabaşı, 1998). Dünyada halen yetiştirilmekte olan üzüm çeşitlerinin % 90'ından fazlası bu türe ait çeşitler veya melezlerinden oluşmaktadır. Bugün itibariyle dünyada 10.000'nin üzerinde üzüm çeşidi belirlenmiştir. Arkeolojik araştırmalar sonucu toplu haldeki sıkma artığı üzüm çekirdeği kalıntılarının ortaya çıkarılması asırlar boyunca üzümün alkollü içkiler yapımında kullanıldığını kanıtlamaktadır. Radyokarbon tekniği ile yaşları belirlenen toplu haldeki üzüm çekirdekleri Anadolu'da şarabın günümüzden 10.000 yıl önceden bilindiğini ve üretildiğini göstermektedir (Ağaoğlu, 1999). Asmalar Rhamnales takımına bağlı olup, bu takımın üç familyasından (Rhamnaceae, Leeaceae ve Vitaceae) yalnızca Vitaceae familyasına ait bitkiler, bilinen anlamda asmaları tanımlamaktadır. Bu familyanın 12 cinsi ve yaklaşık 700 türü bulunmaktadır. Kültür asmalarının tümü *Vitis* cinsine aittir. Bu cinsi diğerlerinden ayıran en önemli özelliği, taç yapraklarının üst üste birleşerek çiçeği bir şapka şeklinde kapatması ve tozlanma döneminde alttan ayrılarak düşmesidir. *Vitis* cinsi iki seksiyondan (alt cins) oluşmaktadır. Bunlar, kromozom sayısı $2n = 38$ olan *Euvitis* ve 40 olan *Muscadina*'dır (Çelik ve Odabaşı, 1998). Bağcılık için yerkürenin en elverişli iklim kuşağı üzerinde bulunan Türkiye, kültür asması (*Vitis vinifera* L) ve bağcılık kültürünün anavatanı olması nedeniyle zengin bir gen potansiyeline sahiptir. İklim koşullarının uygun olması ve asmanın heterozigotik yapısından dolayı da çok geniş çeşit ve tip zenginliğine sahiptir. Üzümlerde çekirdeksizlik, erkencilik, geççilik, verim ve kalite yüksekliği çok önemli genetik karakterler olup, bu karakterler ilk defa Anadolu'nun lokal çeşitlerinde ortaya çıkmış ve yayılmıştır. Asma bitkisi ticari olarak meyve, anaç, süs bitkisi olarak kullanılan türlerdir. Meyve üretiminde ise sofralık, kurutmalık, şaraplık, meyve suyu, konserve, pekmez ve pestil gibi ürünler yapılmakta ve aynı zamanda uzun yıllar saklanabilen ürünler şeklinde değerlendirilmektedir. Kültür asması ılıman iklim bitkisi olup 30° ile 40° kuzey ve güney enlemleri arasında yer alan bölgeler en ideal yetişme alanlarıdır (Ağaoğlu, 1999). Kuzey yarım kürede bağcılık 100 ile 520 kuzey paralel daireleri arasında yapılmaktadır. Türkiye kuzey yarım kürede 360 ile 420 arasında bulunduğundan doğal şartları bakımından bağcılık için optimum olanaklara sahiptir (Oraman, 1965). Türkiye'de 1200'ün üzerinde üzüm çeşidi veya tipinin mevcut olduğu bilinmektedir.

Asmanın ekolojik istekleri dikkate alındığında, ülkemizin özellikle İç ve Doğu Anadolu Bölgelerinde yüksekliği 1500 m’yi aşan yöreler dışında kalan bütün bölgelerinde ekonomik olarak bağcılık yapılması mümkündür. Türkiye’de yıllık 1200-2600 mm yağış alan Doğu Karadeniz Bölgesinin sahil kesimi dışında, tamamıyla *Vitis vinifera* L. bağcılığı yapılmaktadır (Çelik ve Odabaşı, 1998). Türkiye, bağ alanı ve üzüm üretiminde dünyanın önemli ülkeleri arasında yer almaktadır. 2019 yılı verilerine göre Türkiye’deki üzüm üretimi 4,1 milyon ton olup bu üretimin 2,1 milyon tonu sofralık (% 50), 1,6 milyon tonu kurutmalık (% 39) ve 451 bin tonu şaraplık-sıralık (% 11) olarak gerçekleşmiştir (Anonim, 2018). Bir yandan yaş ve kuru üzüm olarak tüketilen, diğer yandan üzüm şirasının değişik şekillerde işlenmesiyle elde edilen şarap, alkol, sirke, pekmez, sucuk, pestil, bastık, vb. ürünler insan beslenmesinde kullanılmakta ve yarattığı katma değer ile ekonomiye katkı sağlamaktadır. Bağ üretimi yapmak için tarla, meyve ve sebze tarımı yapılamayan sırtlarda ve yamaç eğimli arazilerde de yapılabildiğinden bu gibi yerlerde, bağcılık o bölge için önemli bir istihdam kaynağı olmaktadır (Aktaş, 2002).

Çizelge 1.1. 2018 yılında Dünya’daki üzüm üretim alanı ve miktarları (Anonim 2018a)

Ülke	Alan (ha)	Üretim miktarı (ton)
İspanya	1.123.644	6.673.481
Çin	797.935	13.494.811
Fransa	752.837	6.198.323
İtalya	675.818	8.513.643
Türkiye	417.041	3.933.000
ABD	379.190	6.890.970
Diğer Ülkeler	3.011.193	3.011.193

Çizelge 1.2. 2018 yılı Türkiye’deki üzüm üretim alanı ve miktarları (Anonim, 2018b)

Şehir	Alan (ha)	Üretim miktarı (ton)
Manisa	807.387	1.234.577
Denizli	386.060	355.276
Mersin	210.593	292.823
İzmir	128.499	194.978
Gaziantep	173.616	143.625
Mardin	368.620	190.203
Diğer iller	2.095.635	1.521.518
Toplam	417.041	3.933.000

Bağ alanlarında üzüm verimini ve kalitesini düşüren en önemli faktörler bu kültür bitkisinin hastalık ve zararlılarıdır (Pearson ve Goheen, 1981). Dünyada bağ alanlarında 21

cinsine ait 58 farklı virüs türü tespit edilmiştir. Floksera başta olmak üzere bağ zararlıları, nematodlar ve *Xiphinema index* nematodu ile taşınan virüs hastalıkları ile bulaşık bağ alanları günden güne artmaktadır. Virüs hastalıkları ile mücadelenin zor olması ekonomik kayıpları daha da arttırmaktadır (Martelli ve Boudon-Padieu, 2006). Bu etmenlerin içinde özellikle Asma kısa boğum virüsü (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV), Asma yaprak kıvrılma virüsü (*Grapevine leafroll virus*, GLRV), Arabis mozayik virüsü (*Arabis mosaic virus*, ArMV), Asma flek virüsü (*Grapevine fleck virus*, GFkV) virüsleri ekonomik öneme sahiptir. Bu virüsler bitkilerde gelişme geriliğine, şiddetli enfeksiyonlar sonucu anormal meyve ve yeşil aksam oluşumuna neden olmakta hatta meyve oluşumunu tamamen engelleyebilmektedir. Asma yaprak kıvrılma virüsü (*Grapevine leafroll associated virus*, GLRaV), dünyada birçok bölgede üretimi yapılan asmanın en yaygın ve ekonomik olarak zarar veren viral hastalıklarından birisidir (Naidu, Rowhani, Fuchs, Golino ve Martelli, 2014). Bu virüs hastalığı, dünyada asma yetiştiriciliği yapılan bütün alanlarda görülmektedir. GFLV'nün neden olduğu kısa boğum hastalığı 1950'li yıllarda keşfedilen ve asmanın bilinen en eski virüs hastalıklarından birisidir. Tüm Dünya'da asma yetiştiriciliğinin yapıldığı her yerde görülebilmekle beraber Asya, Afrika, Avrupa, Yeni Zelanda, Avustralya, Kuzey ve Güney Amerika'da bu hastalığın varlığı bildirilmiştir. GFLV, toprak kökenli nematod türü *Xiphinema index* tarafından asmadan asmaya taşınmak suretiyle bu kültür bitkisinin dejenerasyonunda önemli bir patojendir (Hewitt, Raski ve Goheen, 1958). Türkiye'de ise Trakya Bölgesi bağ alanlarında GFLV ile enfekteli alanlarda *Xiphinema index* ve *Xiphinema pachtaicum* nematod türleri saptanmış ve bu alanlarda virüsle mücadele de radikal önlemlerin alınması gerektiği vurgulanmıştır. Ancak son yıllarda İran'ın Fars Bölgesi bağlarında Izadpanah, Zaki-Aghl, Zhang, Daubert ve Rowhani (2003) tarafından yapılan çalışmada köpekdişi ayrığı (*Cynodon dactylon* Persoon) GFLV'nin doğal konukçusu olarak saptanmıştır. Asma yaprak kıvrılma virüsü hastalığı ise tüm yerli Amerikan asmalarını, *Vitis vinifera* çeşitleri melezlerini ve anaçlarını etkilemektedir (Fuchs, Martinson, Loeb ve Hoch, 2009). GLRaVs 1'den 9'a kadar isimlendirilmiş olan bu virüslerden, GLRaV-2 *Closterovirus* cinsine, diğerleri ise *Ampelovirus* cinsine dahil olup vasküler (floem) dokuda buldukları bildirilmiştir (Martelli, 2011).

Yapılan çalışmalar sonucunda Türkiye'de bağları tehdit eden 15 virüs hastalığının varlığı ve bunlardan 3 virüs hastalığı için Zirai Mücadele Teknik Talimatı hazırlandığı bildirilmiştir (Akbaş, Kunter ve İlhan, 2007). Buna bağlı olarak Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın 2010 yılı "Meyve ve Asma Fidanı ile Üretim Materyallerinde, Bitki Sağlığı Standartları Talimatnamesi'ne göre sakınılması ve önlem alınması gereken 7 virüs ve virüs

benzeri hastalığın bulunduğu bildirilmiştir. Bu hastalıklar ve etmenleri; Kısa boğum hastalığı: *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), Bağlarda Arabis mozaik virüs hastalığı: *Arabis mosaic virus* (ArMV), Bağlarda Çilek latent halka leke virüs hastalığı: *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV): Bağlarda Domates halka leke virüs hastalığı: *Tomato ringspot virus* (ToRSV), Bağlarda Ahududu nekrotik halka leke virüs hastalığı: *Raspberry ringspot virus* (RpRSV), Asma yaprak kıvrılma virüs kompleksi: *Grapevine leafroll associated virus* (GLRaV 1-9) ve Asma A virüs hastalığı: *Grapevine vitivirus A* (GVA) olarak bildirilmiştir. Yaprak kıvrıcıklık hastalığı ilk olarak 19. yüzyıl ortalarında saptanmıştır. Hastalıkla ilgili ilk çalışmalarda asmada fizyolojik bir zarar etkisi gibi yaprakların erken zamanda kızarması olarak tarif edilmiş, Fransız ve İtalyan kaynaklarda kırmızılık anlamına gelen "Rugeau" veya "Rossore" olarak kullanılmıştır. Yaprak kıvrıcıklığının ekonomik anlamda önemi günden güne artış göstermiş ve asma virüs hastalıkları içerisinde en önemli virüs hastalıkları arasına girmiştir. Kaliforniya'da Emperor asma çeşidinden aşıyla taşınan hastalık, "Beyaz Emperor" olarak isimlendirilmesine karşın (Harmon ve Snyder, 1946), aynı hastalık yine Kaliforniya'da "yaprak kıvrıcıklığı" ismiyle değiştirilmiştir (Goheen ve Cook, 1959).

Bu tez çalışmasında Tekirdag ili Merkez Süleymanpaşa ilçesi, Şarköy ve Malkara ilçelerindeki bağ üretim alanlarında *Grapevine leafroll virus-3* (GLRV-3), *Grapevine leafroll virus-6* (GLRV-6) ve *Grapevine fanleaf virus* (GFLV)'nin bulunuşu ve yaygınlık durumu DAS-ELISA ve RT-PCR test yöntemleri ile araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Grapevine fanleaf virus (GFLV), Comoviridae familyası, Nepovirus cinsine mensup tek iplikçikli RNA genomuna sahiptir. 30 nm çapında polihedral partiküllere sahip olan virüs, % 42 nükleik asit, % 58 proteinden oluşan virionlardan ibarettir. İki parçalı segmentlerden oluşan GFLV genomunun RNA1 segmenti 7342 nükleotid, RNA2 segmenti ise 3774 nükleotid uzunluğundadır. Deneysel olarak hastalıklı bitki özsuyunun mekaniksel inokulasyonu ile duyarlı konukçulara taşınan GFLV, bitki dokularının birbirine teması ile taşınmamaktadır. Enfekteli omcalardan alınan çelik, aşı gözü, aşı kalemi ile sağlıklı anaçlara taşınmakta ancak tohumla ve polenle taşınmamaktadır. *Xiphinema index* (kamalı nematod) nematod türü ile taşındığı ve yayıldığı hastalığın ilk tanımlanmasından beri bilinmektedir. İndikatör bitkilerin dışında konukçu çevresi *Vitis* türleri ile sınırlıdır (Brunt vd.,1996).

Hewitt, Martelli, Dias ve Taylor (1970), GFLV'nün *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* ve soya fasülyesine deneysel olarak tohumla taşındığı bildirilmiştir. Ayrıca GFLV'nin deneysel olarak bulaştırılan otsu konukçuların ve asmaların polenlerinde bulunduğunu kanıtlamışlardır.

Asmada vejetatif ve generatif gelişmenin azalması sonucu GFLV ile enfekteli asma omcaları, olumsuz iklim faktörlerine daha duyarlı hale gelmektedir. Virüsle enfekteli üretim materyallerinde köklenme yeteneği ve aşılama başarısı da düşmektedir. Enfekteli omcalarda % 50-70 arasında verim azalması meydana gelmekte ve verim % 90-95 oranlarında düşmektedir. Konukçu çevresine bakıldığında GFLV, doğada sadece asma tür ve çeşitlerini enfekte etmektedir. Tüm *V. vinifera* çeşitleri virüse duyarlı olup tolerant olarak bilinen herhangi bir üzüm çeşidi yoktur. Amerika'dan Avrupa'ya getirilen bütün Amerikan asma türleri, *V. labrusca*, *V. riparia*, *V. rupestris*, *V. berlandieri*, *V. aestivalis* ve *V. candicans*'tan türetilmiş hibritleri yanında 7 familyaya mensup 30'dan fazla türden konukçu bitkiye GFLV deneysel olarak taşınmış olup bu bitkilerin tamamı hastalanmıştır (Vuittenez ve Martelli, 1988).

Martelli ve Taylor (1989)'a göre virüsün vektör nematod tarafından alınmasından sonra, başarılı bir şekilde sağlıklı bağ omcası köküne taşınması için, virionların yapışık olarak bulunduğu kütikula kaplı özefagus cidarından ayrılmaları gerektiği ileri sürülmüştür. Ancak beslenme sırasında nematodun styletini bitki kök hücresi duvarını delerek özofagus aracılığıyla basal bulb'ın ön kısmından nematodun enzimler içeren sindirim salgısının bitki hücresine enjekte edildiği sırada virionların cidardan koparak sağlıklı kök hücresine ulaştığı

düşünülmüştür. Bu olayın mekanizmasının detayları henüz tam olarak bilinmemesine rağmen, sindirim sıvısının lümen içindeki pH değerini değiştirerek, virionların tutunmasını ve kopmasını sağladığı tahmin edilmektedir.

Esmenjaud vd. (1993) tarafından yapılan çalışmada tarla ve sera koşullarında GFLV'nin nematod vektörü *Xiphinema index*'de varlığı Biotin-avidin (B-A) ELISA testi ile araştırılmıştır. 1'den 64'e kadar değişen sınırlarda ergin nematod vektörü ile yapılan örneklemelerin yapıldığı çalışmada, nematodtan ari asma ve incir bitkileri negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Negatif kontrollerde konukçu bitkinin önemli bir etkisinin ortaya çıkmadığı görülmüştür. *X. index* nematodunun tarla popülasyonlarında Champagne ve Languedoc asma çeşitlerinde GFLV ile enfeksiyonun daha fazla olduğu tespit edilmiştir. B-A ELISA testinin *X. index*'in erginlerinden alınan 10'dan daha az örneklemede güvenilir sonuç vermediği, ancak bazı popülasyonlarda artan sayıda absorban değerlerinin karşılaştırılabilir ölçüde farklılıklar ortaya çıkarabileceği bildirilmiştir.

Akbaş ve Erdiller (1993), Ankara ili'ne bağlı 8 ilçedeki bağ alanlarında yaptıkları çalışmalar sonucunda *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV) ve *Grapevine leaf roll associated virus* (GLRaV) virüsleri yanında GFLV'yi de saptamışlardır.

Yılmaz, Yurtmen, Çiğsar ve Özaslan (1997) Ege, Akdeniz, İç Anadolu, Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde bulunan bazı illerin bağlarında yapılan araştırmalar sonucunda özellikle yaygın olan virüs hastalıkları içerisinde *Grapevine fanleaf virus* (GFLV)'nin neden olduğu asma kısa boğum virüs hastalığının % 47'ye varan bulaşıklık oranı ile ilk sırada bulunduğu bildirilmiştir. Bağların en eski virüs hastalıklarından biri olan GFLV, özellikle sofralık çeşitlerde irili ufaklı tane oluşumu nedeniyle üzümün ticari değerinin düşmesine yol açarak % 80'lere varan oranlarda zarara neden olabilmektedir.

Ghomi, Bakhsh ve Pourrahim (2007) tarafından yapılan bir araştırmada ise İran'ın kuzey-doğusundaki bağ alanlarında mozaik, Z şeklinde anormal sürgün gelişimi, çift düğüm ve gelişme geriliği belirtileri gösteren 588 adet yaprak, sürgün ve yaprak saplarında GFLV ve Asma virüsü A (*Grapevine virus A*, GVA) enfeksiyonları araştırılmıştır. DAS-ELISA testi sonucunda 588 örnekten 78'inin en az bir virüs tarafından enfekte edildiği tespit edilmiştir. ELISA testleri, örneklerin sırasıyla % 7, % 6.6 ve % 3'ünde GFLV, GLRaV-3 ve GVA belirlenmiştir. Ayrıca asma dokularında GFLV'nin tespiti amacıyla gerçekleştirilen ELISA

testlerini doğrulamak için uygulanan RT-PCR testi ile GFLV'nin kılıf proteine özgü 321 bp'lik bir gen bölgesi çoğaltılmıştır. Ancak bazı örneklerde beklenmedik bir 150 bp'lik bandın varlığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, sağlıklı bitki materyalini doğrulamak için RT-PCR yönteminin hızlı ve hassas bir tespit yöntemi olarak gerekli olduğu bildirilmiştir.

Irimia, Ulea ve Bălău (2010) tarafından Dünya'da bağ yetiştirilen alanlarda görülen en önemli virüs hastalıklarından biri olan GFLV, ampelografik koleksiyonlardan alınan 36 asma çeşidindeki varlığı farklı virüslerin örnekleme stratejileri, DAS-ELISA, TAS- ve DAS-biotin metodu kullanılarak araştırılmıştır. DAS-ELISA testinde, testlenen 14 farklı asma çeşidinden 8 adet çeşidin GFLV ile enfekteli bulunduğu saptanmıştır. Buna karşılık TAS- ve DAS- biotin metodunda ise 22 şaraplık çeşitten 7 adedinin GFLV ile enfekteli olduğu belirlenmiştir.

GFLV ile bulaşık bağ omcalarında yaprak belirtileri, ilkbaharda erken dönemde gelişmekte ve vejetasyon dönemi boyunca görülmektedir. Ancak 30 °C'nin üzerindeki sıcaklık derecelerinde belirtiler maskelenmektedir. Salkımlarda ise daneler dökülmekte veya irili ufaklı daneler oluşmaktadır. Kalem, göz aşısı, *Xiphinema* spp. ve *Longidorus* spp. nematod türleri ile taşınmaktadır. Bu çalışmada; GFLV'nin üç farklı izolatının neden olduğu üç tip karakteristik belirtiden yelpaze yaprak oluşumu, boğum aralarında kısılma, yassılaşıma ve yapraklarda sarılık ve damar bantlaşması semptomları tanımlanmıştır (Oliver ve Fuchs, 2011).

Yine İran'da yapılan bir başka çalışmada farklı asma çeşitlerinde GFLV, DAS-ELISA ve RT-PCR test yöntemleri ile araştırılmıştır. 330 semptomatik asma örneğinin DAS-ELISA metodu ile testlenmesi sonucu 89 izolat içerisinde 16 izolatın GFLV ile enfekteli olduğu bulunmuştur. Sekiz izolatın CP ürünleri klonlanarak, nükleotid dizisi belirlenmiştir. Filogenetik sınıflandırmada, İran'a ait GFLV izolatlarının bağımsız bir evrime işaret eden ayrı bir küme oluşturduğu bildirilmiştir (Pashaei ve Doulati-Baneh, 2011).

Dünya çapında en yaygın bağ virüslerinden biri olan GFLV'nin asma çeşitlerinde saptanmasına yönelik yapılan bu diğer bir çalışmada ELISA ve kılıf proteine özgü rekombinant antikolar kullanılarak yapılan IC-RT-PCR testinde üç izolat için 1512 bp bant elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar rekombinant antikor uygulanmasının, bitki dokusundaki virüslerin hızlı tespiti için yararlı olabileceğini göstermiştir. Çünkü rekombinant antikorla birlikte yapılan IC-RT-PCR testi, asma ağaçlarında inhibitörlerin varlığından kaynaklanan sınırlamaların ve geleneksel olarak üretilen antikora karşı bitki özünde doğal proteinlerin varlığından

kaynaklanan belirsiz reaksiyonun üstesinden gelineceği bildirilmiştir (Sokhandan-Bashir, Akbar Behjatnia ve Jafari Joozani, 2013).

Tülek (2014) tarafından Trakya Bölgesi'nin Tekirdağ, Kırklareli ve Edirne illerinde, bağcılığın yoğun olarak yapıldığı ilçe ve köylerdeki bağ alanlarında yapraklarda sararma, mozaik, kıvrılma, renk değişimleri, boğum aralarında kısılma, zigzag dallanma, salkımlarda irili ufaklı meyve oluşumu, bodurlaşma gibi virüs belirtileri gösteren omcalardan alınan yaprak, sürgün, petioller ve kambiyumdan doku örneklerinde GFLV araştırılmış ve hastalığın varlığı 35 farklı örnekte saptanmıştır. Ayrıca sürvey yapılan alanlardan alınan toprak örneklerinin, morfolojik ve morfometrik ölçümleri sonucu GFLV enfekteli olarak saptanan omcaların 9 adedinin toprak örneğinde *Xiphinema index*'i tespit etmişlerdir. GFLV ile enfekteli olduğu belirlenen 13 omcanın toprak örneğinde ise *Xiphinema pachtaicum* nematod türü tanımlanmıştır. Trakya'daki üretici bağlarının yanında, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne bağlı Tekirdağ Bağcılık Araştırma İstasyonu'ndan alınan örneklerde ise GFLV ile enfekteli omcalara rastlanması bu omcaların bir kısmında ise vektör nematod *X. index*'e rastlanılmış olması mücadele için radikal önlemlerin alınmasının gerekliliği vurgulanmıştır.

Lyu vd. (2014), Çin'de *Grapevine leafroll-associated virus 7* (GLRaV-7)'nin yaygınlık ve dağılımını belirlemek amacıyla 213 asmadan örnek almışlardır. Çin'in 13 eyaletinde ve bölgesinden 92 bilenen çeşitten toplanan örnekler GLRaV-7'nin varlığını saptamak amacıyla RT-PCR testi ile testlenmiş ve DNA dizi analizleri yapılmıştır. Örneklerin % 40,4'ünde GLRaV-7 bulunmuştur. Çin'de asma yetiştirme alanlarında GLRaV-7'nin çok yaygın olduğu ve 50'den fazla üzüm çeşidinde bu virus hastalığı belirlenmiştir. Manicure Finger (% 100), Cabernet Sauvignon (% 83,3), Merlot (% 60), Fujimineri (% 60) and Red Globe (% 50) gibi bazı popüler üzüm çeşitleri yüksek enfeksiyon oranı göstermiştir.

Tarla ve Yılmaz (2015) tarafından Adana ve Mersin illerinde üzüm bağlarında yapılan bir çalışmada GFLV'nin varlığı serolojik ve biyolojik analizlerle belirlenmiştir. Toplam 384 asma numunesi içerisinde 63 bitkinin (% 16.4), DAS-ELISA testi sonucunda GFLV ile enfekte olduğu saptanmıştır. Buna ek olarak, otsu gösterge bitkileri olarak; biyolojik deneylerde *Nicotiana benthamiana* Domin., *N. tabacum* L., *N. rustica* L., *Chenopodium amaranthicolor* Coste et Reyn., *C. quinoa* Wild., *Cucumis sativus* L., and *Gomprena globosa* L. kullanılmış, ancak klorotik lokal lekeler sadece *Nicotiana benthamiana* Domin'de gözlemlendiği bildirilmiştir.

Önder, Akgül, Gümüş ve Paylan (2015), Ege Bölgesi bağ alanlarında 17 farklı asma çeşidinden *Grapevine fanleaf nepovirus* (GFLV)'ye benzer simptomlar gösteren toplam 423 yaprak ve sürgün örneğinde 423 örnekten 88'i GFLV ile enfekteli olarak tespit etmişlerdir. Bölge genelinde GFLV'nin yaygınlık oranı ise % 20,80 olarak belirlenmiştir.

Türkmen ve Ertunç (2019), Amasya ili Merkez ve Taşova ilçesi bağ alanlarında damar bantlaşması ve sarı beneklilik belirtisi gösteren yaprak örnekleri ile sürgün örneklerinde GFLV, ELISA ve RT-PCR yöntemiyle araştırılmıştır. 10 örnekte % 27.10 oranında GFLV ile enfekteli olduğu ve eylül ayında alınan örneklerde enfeksiyon oranının % 21,62 oranında yüksek enfeksiyon oranı saptanmıştır.

Bayan ve Yılar (2017) tarafından Kırşehir ili ve ilçelerinden 16 bağ alanından toplam 49 adet örnek tolanmıştır. Toplanan örneklerden izole edilen viral RNA'lar, iki aşamalı RT-PCR testinde virüse spesifik primer dizileriyle testlenmiştir. Yapılan RT-PCR analizi sonucunda 49 örneğin GRSPaV ile enfekteli olmadığı belirlenmiştir. Ancak 49 örnekten 5 adedinde ise GFLV bulaşıklığı olduğu moleküler test ile belirlenmiştir. GFLV'enfeksiyonunun Kaman ilçesinden alınan örneklerde yüksek oranda bulunurken (% 20), bunu sırasıyla Akçakent (% 10), Akpınar (% 8,3) ve Merkez (% 0) izlediğini bu sonuçlara dayalı olarak GFLV'nin Kırşehir il ve ilçelerinde daha yaygın olduğu belirlenmiştir.

Martelli vd. (2012), *Grapevine leafroll-associated viruses* (GLRaVs), Clostoreviridae familyasında yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili bir virus grubudur. Bu virüs hastalıklarından GLRaV-2 Clostorevirus cinsine mensup iken GLRaV-1, -3, -4, -5, -6, -8 ve -9 Ampelovirus cinsine mensuptur. Ancak GLRaV-7 herhangi bir cinse atanmamıştır. Son zamanlarda tanımlanmış olan GLRaV-Pr, GLRaV-De and GLRaV-Car ise aynı virüs grubu içerisinde yer almaktadırlar. GLRaV-4, -5, -6 ve -9 serolojik olarak birbirleriyle ilişkili olup biyolojik ve epidemiyolojik özellikleri benzerlik göstermektedir. GLRaV-Pr, GLRaV-De, GLRaV-Car virüsleri aynı genom yapısı ve büyüklüğüne sahiptir. Bu virüslerin hepsinin tek bir türün, GLRaV-4'ün genetik olarak farklı varyantları olduğu fikrini desteklemektedir.

Asma yaprak kıvrılma virüsüne ait ilk veriler 19. yüzyılın ortalarına dayanmaktadır. Başlarda fizyolojik bozukluklar olarak kabul edilmiş, Fransız ve İtalyan edebiyatında "Rugeau" veya "Rossore" olarak anılmış ve asma yapraklarında erken kızarmanın gözlemlendiği bildirilmiştir. Asma yaprak kıvrılma virüsü ekonomik önemi kısa boğum virüs hastalığından az olmakla birlikte asmada görülen en yaygın virüs hastalıklarındandır (Martelli, 2014).

Belli vd. (1994), *Grapevine leafroll associated closterovirus* (GLRaV)'u asmadan asmaya taşıma denemelerinde *Parthenolecanium corni* ve *Pulvinaria vitis*'i vektör olarak kullanmışlardır. 4 ay sonra *P. vitis* ile yapılan inokulasyonda inokule edilen 5 asmadan 2'sinde bazı yapraklarda belirgin kızarıklık ve kıvrılmanın görülmeye başlandığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları hibridizasyon ve PCR testlerinde simptom gösteren 2 asmadan ekstrakte edilen nükleik asitlerde GLRaV-III'ün varlığını ve vektörle taşınabildiğini teyit etmişlerdir.

Milkus ve Goodman (1999), Missouri'de virüs ve virüs benzeri hastalık etmenlerinin sürveyini gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar yapmış oldukları testler sonucunda GFLV, GFkV, GVA, GLRaV-1 ve GLRaV-3'ünü belirlemişlerdir. ELISA testleri sonucunda bazı Fransız hibritleri ve Amerikan çeşitlerinde GLRaV-3 ile % 100 oranında enfeksiyon saptamışlardır.

Monis ve Bestwick (1996), serada ve doku kültüründe yetiştirilen enfekteli bitkilerde, ELISA testi ile *Grapevine leafroll associated closterovirus* (GLRaV) -1, -2, -3 virüslerinin tespit edilmesinde en iyi bitki dokusunu ve örnekleme zamanını araştırmışlardır. Virüslerin bitki dokusunda düzensiz bir şekilde dağıldığını ve virüsün en yüksek titredeki değerinin genellikle bitkinin alt kısımlarında bulunduğunu bildirmişlerdir. Virüslerle ilişkili antijenleri yıl boyu alt gövde ve petiol örneklerinde belirlemişlerdir.

Krastanova vd. (2000), cDNA klonlarından *E. coli*'de çoğaltılan recombinant kılıf proteinlerin GLRaV-3'e spesifik poliklonal antiserum geliştirmek için yaptıkları çalışmada, western blot ve immunosorbent elektron mikroskopta sonuç elde etmişlerdir. Elde edilen bu antiserumun DAS-ELISA testindeki etkinliği antitadilerin farklı kombinasyonları ile karşılaştırılmıştır. ELISA testinin kaplama aşaması için kullanılan As163'un ve enzim konjugate aşamasında kullanılan monoklonal antitadi (MabNY1-1)'in en iyi sonucu verdiği görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda yaprak kıvrıcıklığı simptomları gösteren bağ alanlarında GLRaV-3'un varlığını kanıtlamada As163 ve Mab'in oldukça etkili olduğu ileri sürülmüştür.

Köklü ve Baloğlu (2000) tarafından Trakya Bölgesinde bazı üzüm çeşitlerini içeren 421 asma bitkisinde GLRaV 1, GLRaV 2, GLRaV 3 ve GLRaV 7 enfeksiyonlarını araştırmışlardır. GLRaVs için test edilen 421 bitkiden 268'i enfekteli bulunmuş, en yüksek enfeksiyon oranı GLRaV-1 (% 37,05)'de bulunmuş, bunu GLRaV-3 (% 33,01), GLRaV-2 (% 7,83) ve GLRaV-7 (% 4,03) virüsleri izlemiştir.

Çiğşar, Digiario ve Martelli (2002), Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu Bölgesinde (Adıyaman, Diyarbakır, Mardin, Şanlıurfa, Elazığ) ve İç Anadolu Bölgesinde (Nevşehir) virüs ve virüs benzeri hastalıkları belirlemek amacıyla survey çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Survey yapılan pek çok bölgede asma kısa boğum (yelpaze yapraklılık) belirtileri gözlemişler ve asma yaprak kıvrılması belirtilerinin Adıyaman, Şanlıurfa ve Elazığ'da özellikle Antep Karası, Humusi, Kohnu ve Siyah Kabarcık çeşitlerinde görüldüğünü bildirmişlerdir. Test ettikleri 535 örnekten 296'sının (% 55,3) enfekteli bulunduğunu, bunların % 11,4'ünün en az 1 virüs % 43,9'unun birden fazla virüs ile enfekteli olduğunu bildirmişlerdir. GVA'nın en yaygın virüs olduğunu (% 42,4), bunu GLRaV-1'in (% 38,5), GFLV'ün (% 10,7) ve GFkV'ün (% 7,1) izlediğini belirtmişlerdir. GLRaV-3 test edilen örneklerde % 2,4 oranında belirlenmiştir. GLRaV-2, GLRaV-6, GVB ve ArMV % 1'den daha düşük oranlarda belirlenmiş, GLRaV-7 ise bu çalışmada saptanmamıştır.

Herrera Guido ve Madariaga Mónica (2001), 1996-2000 yılları üretim mevsiminde GFLV, GLRV, *Tomato ringspot virus* (ToRSV) ve *Chery leaf roll virus* (CLRV)'lerini saptamak için survey çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. 33 bölgeden toplanan 16974 örnek DAS-ELISA test yöntemi ile testlenmiş ve araştırma yapılan bölgenin söz konusu virüs hastalıkları ile % 84.8 oranında enfekteli olduğunu bildirmişlerdir. Toplam yaygınlık oranının ise GFLV için % 0.2, ToRSV için % 8.6, CLRV için % 0.2 oranında olduğu tespit edilmiştir. Ancak virüs yaygınlık oranlarının % 0- 72.6 sınırları arasında değişkenlik gösterdiğine işaret etmişlerdir. Virüs yaygınlık oranlarının çoğaltım amacıyla kullanılan anaç materyallerde % 22.1 oranında olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın en belirgin sonucu olarak Orta Şili'deki en yaygın virüs ToRSV olarak bildirilmiştir.

Vingione, Meglioraldi, Cardoni ve Bablani (2003), asma hastalıkları ile ilişkili virüslerin Reggio Emilia bağlarındaki farklı virüslerin varlığı ve yaygınlığını belirlemek amacıyla yapılan bu çalışmada, spesifik bir hastalık belirtisine sahip olmayan 480 örnek 1998 yılından 2001 yılına kadar toplanmış ve *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine leafroll associated viruses* (GLRaV 1, GLRaV 3, GLRaV 6, GLRaV 7, GLRaV 2), *Grapevine virus A* (GVA) ve *Grapevine virus B* (GVB) enfeksiyonları açısından ELISA ile test edilmişlerdir. Örneklerin % 60'ı, özellikle GLRaV-1, GLRaV-3 ve GVA açısından pozitif bulunmuştur. Standart ve sertifikalı çeşitler arasında bir fark bulunmamış, ancak Ancellotta ve Lambrusco Salamino isimli iki çeşit arasında enfeksiyon oranlarında farklılıklar belirlenmiştir.

Buzkan ve Walker (2004) yaptıkları çalışmada asma örneklerinin mevsimsel olarak ve içerdiği fenolik bileşikler nedeniyle düşük virüs konsantrasyonlarının GFLV'nin saptanmasındaki olumsuzluğu engellemek için farklı ekstraksiyon metotlarının etkinliğini denemişlerdir. Bu amaçla nematod vektörü *Xiphinema index*'in ıslah programlarında kullanılan 5 farklı hibrit asma çeşitlerini kullanmışlardır. Silika partikül süspansiyonu ve fenol/kloroform metodu ile ekstrakte edilen RNA'ları cDNA ve spesifik primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Silika metodu kullanılarak çoğaltılan RNA örnekleri PCR'da pozitif sonuç verirken fenol/kloroform metoduna dayalı ekstraksiyondan elde edilen RNA'ların PCR testinde negatif sonuç verdiğini saptamışlardır. Etanol solüsyonu içeren silika metodunda silika partiküllerinin fenolik bileşikleri bağladığını bu nedenle bu metodun başarılı olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Kominek ve Bryxiova (2005), Karlstejn'den otuz yedi asma yaprağında yaprak kıvrılma belirtileri gösteren virüsleri incelemişlerdir. Bu amaçla GLRaV-1, GLRVa-3, GFkV ve GVA virüslerini DAS-ELISA, RT-PCR ve RNA probaları ile moleküler hibridizasyon kullanılarak test etmişlerdir. RT-PCR için kullanılan primerlerin hedeflenen genom bölgesinde değişiklik meydana geldiğinde, RT-PCR ile tespitin daha az güvenilir olmasına neden olma ihtimalini ortadan kaldıran ve potansiyel küçük dizi değişkenliğinin üstesinden gelebilen RNA probalarının GLRaV-1'nin tanısında daha güvenilir olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca araştırmacılar, DAS-ELISA testine göre çok sayıda GLRaV-1 ve GLRaV-3'nin karışık enfeksiyonlarını elde etmişlerdir. Buna karşın GLRaV-1, *Grapevine virus A* (GVA) ve *Grapevine fleck virus* (GFkV)'lerinin neden olduğu bir adet karışık enfeksiyon ve GLRaV-1, GLRaV-3 ve GFkV virüslerinin ise çoklu enfeksiyonlarının daha az olduğunu belirlemişlerdir.

Mahfoudhi, Habili, Masri ve Dhouibi (2007), dormant asma sürgünlerinden örnekler toplamışlar ve indirekt Biotin Stepravidin ELISA ile GLRaV-5'e özel antiserumlarla testlemişlerdir. Serolojik testler örneklerin % 47'sinin GLRaV-5 ile enfekteli olduğunu göstermiştir. GLRaV-5'in tanınması ve diğer asma yaprak kıvrılma virüslerinin belirlenmesi amacıyla şiddetli yaprak kıvrılması belirtileri gösteren asmalardan örnekler almışlar ve 6 adet örneğin RNA ekstraktlarını RT-PCR testine tabi tutmuşlardır. RT-PCR ve ELISA testlerinin karşılaştırmalı sonuçları 6 örnekten 1'inin GLRaV-5 ve 6 örnekten 5'inin ise GLRaV-9 ile enfekteli olduğunu bulunmuşlardır.

Romanazzi vd. (2007), 41 çeşide ait yaşlı ve genç bağlarda (2-6 yaş), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine fleck virus*

(GFkV), *Grapevine leafroll-associated virus 1, 2, 3 ve 7* (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3 ve GLRaV-7) virüslerini immünolojik testlere tabi tutmuşlardır. Yaşlı bağlarda bitkilerin yarısı GLRaV-1 ve GVA ile enfektelenmiş, bunu GFkV (% 24,4), GLRaV-3 (% 14,4) ve GFLV (% 11,1) izlemiştir. Ancak genç bağlarda 4 bitkiden sadece 1'i GFkV, GLRaV-3 ve GLRaV-1 ile enfekteli olarak bulunmuş, bunları GVA (%13,9) izlemiştir. Verdiccio'da en yüksek bulunma oranına GVA ve GFkV ile ulaşılmış (enfekteli bitkilerin % 28-29'u), GLRaV-3 (% 24), GLRaV-1 (% 18) ve GFLV (% 13)'nin düşük oranlarda bulunduğu belirlenmiştir.

Dida, Shehu ve Ruci (2017), Kosova'nın ekonomik potansiyele sahip bağ alanlarında gerçekleştirilen bu çalışmada asmada enfeksiyona neden olan viral hastalık etmenlerinden GFLV, ArMV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA ve GVB virüslerinin varlığı Vranac, Smederevka, Prokup, Afuzali, Grocaka, Demir Kapi, Plovdina, Melika, Zhillavka çeşitlerinde araştırılmıştır. Bu amaçla DAS-ELISA, Protein A-DAS ve Antijen direct binding-DASI metotları kullanılarak viral enfeksiyonların tanıları gerçekleştirilmiştir. Söz konusu virüslerin varlığı tüm çeşitlerde tespit edilmiş ve spesifik antibadiler kullanılarak bağ alanlarındaki virüslerin tanılanmasında kullanılabileceği ve bitki sağlığı ile ilgili çalışmalara yön verebileceği bildirilmiştir.

Akbaş, Kunter ve İlhan (2007) tarafından Orta Anadolu'da asma yaprak kıvrılmasının yaygınlık oranlarını belirlemek 9 ayrı önemli bağ alanlarında sürvey çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Toplam 622 bitkide *Grapevine leafroll-associated virus 1, 2, 3 ve 7* (GLRaV-1, -2, -3 ve -7) virüsleri araştırılmıştır. 41 çeşidin 27'sinde ve 622 örnekten 95'inde (% 15,27) en az 1 virüs ile enfeksiyon belirlenmiştir. Bu çalışmada GLRaV-1 en yaygın virüs (% 8,36) olarak belirlenmiş, bunu GLRaV-3 (% 5,78), GLRAV-7 (% 3,86) ve GLRAV-2 (% 2,41) izlemiştir.

Zimmerman, Bass, Legin ve Walter (2008), asma yaprak kıvrıcılığı ile enfekteli serolojik olarak bağlantılı olmayan GLRV-1, GLRV-2, GLRV-3 and GLRV-4'e ait dört farklı closterovirus benzeri partikülleri izole etmişlerdir. Bu partiküllere karşı üretilen poliklonal antibadiler enfekteli bitkilerin belirlenmesi ve karakterizasyonu için kullanılmıştır. Dört stereotipin kılıf proteinleri SDS-PAGE yöntemi ile karakterize edilmiştir. GLRV-1, GLRV-2, GLRV-3 ve GLRV-4'un kılıf proteinlerinin moleküler ağırlıklarının 39 Kd, 26 Kd, 43 Kd ve 36 Kd olan tek bir protein türünü içerdiğini kanıtlamışlardır. ELISA, Immuno elektron mikroskop ve Immunobloting denemeleri sonucu dört partikül arasında serolojik ilişki saptanmamıştır. Ancak Orta doğu ve Avrupa orijinli birçok bağ alanındaki *Vitis vinifera* Pinot

Noir çeşidinde GLRV-1, GLRV-2, GLRV-3 ve GLRV-4'lerinin yaprak kıvrılma belirtileri ve antijenik özellikleri açısından çok yakın benzerlikleri olduğunu kanıtlamışlardır. Bağ alanlarından toplanan belirsiz ve hastalıkla enfekteli asma örneklerinin de bu sonuçları doğruladığını özellikle GLRV-1 ve GLRV-3'nin en çok yaygın antijenik özelliklere sahip olduklarını tespit etmişlerdir.

Sahar, Youssef, Al-Dhaher ve Shalaby (2009), *Vitis vinifera* L. cv. Thompson çekirdeksiz üzüm çeşidinde GLRaV-1 ve GFLV'lerinin saptanmasında DAS-ELISA ve RT-PCR testini kullanmışlardır. Her iki metotla test edilen ve virüsten arı bitkiler 6 ay boyunca meristem uç kültürü kullanılarak üretilmiştir. Odunsu kısım için Benzilamin Purin (BAP) (1.5 mg L⁻¹) ile bitki köklenmesi için Indol Butirik Asit (IBA) (0.05 mg L⁻¹) ile büyüme sağlanmıştır. İklimlendirmeden önce bitkiler DAS-ELISA ve RT-PCR ile testlenmiş ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda RT-PCR ile virüs indekslemenin güvenilir bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Fiore, Prodan ve Pino (2009), Güney Amerika'da yapılan bu çalışmada, GFLV, GLRaV-1, -2 ve -3, GVA ve GFkV'leri ile doğal olarak enfektelenmiş asmalar yıl boyunca aylık gözleme tabi tutulmuştur. Eylül ayından nisan ayına kadar bitkinin değişik dönemlerinde yaprak, yaprak sapı, kabuk ve tomurcuktan alınan örnekler alınarak ELISA ve RT-PCR test metotları ile testlenmiştir. Odun ve kabuk kısmından alınan örneklerin araştırılan virüslerin tespitinde en iyi sonucu verdiğini tespit etmişlerdir.

Buzkan vd. (2010), Güneydoğu Anadolu'da yapmış oldukları çalışmada *Grapevine leafroll-associated virus-5* (GLRaV-5)'in sürveylerini gerçekleştirmişlerdir. GLRaV-5'in varlığını tespit etmek için karakteristik leafroll belirtileri gösteren bitkileri ve unlu bitleri *Planococcus ficus* (Signoret) kullanarak RT-PCR testi ile testlemişlerdir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda GLRaV-5 virüsünün varlığını ilk kayıt olarak saptamışlardır.

Kaya, Erilmez, Paylan ve Erkan (2012), 2009- 2011 yılları arasında Manisa ve İzmir illerinde yapmış oldukları sürvey çalışmalarında *Grapevine leafroll-associated virus-4* (GLRaV-4)'ünü saptamışlardır.

Jones, Rayapati ve Nita (2015), ABD'nin Virjinya eyaletinde ticari bağ alanlarında *Grapevine leafroll-associated virus-2* (GLRaV-2), *Grapevine leafroll-associated virus-3* (GLRaV3), *Grapevine fleck virus* (GFkV) ve unlu bitlerin varlığını tespit etmek amacıyla 2009-2011'de sürvey çalışmaları yapmışlar ve 77 bağ alanından 41 üzüm çeşidini kapsayan 415

örneği RT-PCR testi ile testlemişlerdir. GLRaV-2, GLRaV-3 ve GFkV sırasıyla % 8, % 25 ve % 1 enfeksiyon oranlarını belirlemişler ve bağların % 60'ının bu 3 virüsten en az biri ile enfekteli olduğunu bulmuşlardır.

Önder, Paylan ve Gümüş (2016), Ege Bölgesinde bağcılığın yoğun olarak yapıldığı illerde asma yaprak kıvrılma hastalığı ile ilişkili virüsleri (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-7, GLRaV-9, GLRaV-Pr ve GLRaV-De) saptanmış ve bu virüslere ait DNA dizilerinin referans izolatları ile yüksek oranda benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Erilmez ve Kaya (2016), asmadaki viral hastalıkların ajanlarını tespit etmek için kullanılan farklı yöntemlerin (DAS-ELISA ve RT-PCR) duyarlılığını karşılaştırmak için yaptıkları çalışmada, Manisa ve İzmir illerinde bulunan bağlarda örnekleme yaparak, virüs belirtileri gösteren asmalardan toplam 50 örnek almıştır. Taze yaprak dokusu, kök, ağaç kabuğu ve bir yaşındaki yeşil ağaç kabuğu dokusundan alınan örneklerde RNA ekstraksiyonları silika bazlı yöntem kullanılarak ekstrakte edilmiş ve elde edilen RNA'lar RT-PCR testi ile testlenmiştir. DAS-ELISA ve RT-PCR testinde GFkV, ArMV, GLRV 1, 2, 3 ve 4-9 virüslerinin varlığı kanıtlanmıştır.

Ömeroğlu (2016), Tekirdağ bağ alanlarındaki siyah üzüm çeşitlerinde yapraklarda kızarma ve geriye doğru kıvrılma, beyaz üzüm çeşitlerinde ise sararma ve geriye doğru kıvrılma şeklinde belirtiler gösteren 298 omcadan alınan örneklerde DAS-ELISA testi ile GFLaVs'leri araştırılmıştır. ELISA ile test edilen 298 bitki örneğinden 82'si GLRaV-1 (% 27,5), 56'sı GLRaV3 (%18,7), 8'i GLRaV-2 (% 2,6), 1'i GLRaV-5 (% 0,3) ile enfekteli bulunmuştur. Çalışmada örneklerin 20'si GLRaV-2 + GLRaV-3, 3'ü GLRaV-1 + GLRaV-2, 2'si GLRaV-2 + GLRaV3, 1'i GLRaV-1 + GLRaV-5, 2'si ise GLRaV-1 + GLRaV-2 + GLRaV-3 virüslerinin çoklu enfeksiyonları tespit edilmiştir. Örnek alınan ilçeler arasında en yüksek enfeksiyon oranı (% 62,2) Şarköy ilçesinde belirlenmiştir. Çeşitler dikkate alındığında toplamda en yüksek enfeksiyon % 90 oranında Yapıncak çeşidinde belirlenmiş, bunu % 86,7 ile Alfons lavelle çeşidi izlemiştir. Çalışma sonucunda sadece Chardonnay çeşidinde GLRaV ile pozitif sonuç elde edilmemiş, Şiraz çeşidinde ise sadece 1 adet enfekteli bitki belirlenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Sürvey Çalışmaları

Tekirdağ ili Merkez Süleymanpaşa ilçesi ile Şarköy ve Malkara ilçelerindeki bağ üretim alanlarında 2018 yılı Temmuz ve Ağustos aylarında sürvey çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Araştırma alanındaki bağ üretim alanlarının dışında sistemik virüs semptomları sergileyen ev bahçelerindeki asmalarda da gözlemler yapılmıştır. Bu kapsamda Tekirdağ ili Merkez Süleymanpaşa ilçesine bağlı Barbaros mahallesi, Naip ve Nusratlı köyleri ile Şarköy ilçesine bağlı Uçmakdere, İdebağları, Çınarlı, Kirazlı, Eriklice, Güzelköy, Yukarı kalamış, Aşağı kalamış, Çengelli, Yörgüç ve Yaya köyleri, Malkara ilçesi İbribey köyündeki bağ üretim alanları bu çalışmanın araştırma alanını oluşturmuştur.



Şekil 3.1. Tekirdağ ili ve ilçelerinde sürvey çalışmalarının gerçekleştirildiği alanlar

3.1.2. Hastalıklı Bitki Örneklerinin Toplanması

Çalışma alanını kapsayan Tekirdağ ilinin üç ayrı ilçesindeki bağ üretim alanları gezilerek; yapraklarda kızarma, sarılık, nekroz, geriye doğru kıvrılma, şekil bozukluğu ve bodurluk belirtileri sergileyen 256 adet asma yaprak örnekleri toplanmış ve hastalık belirtilerinin fotoğrafları çekilerek kayıt altına alınmıştır. Arazi çalışmaları esnasında toplanan enfekteli yaprak örnekleri etiketli polietilen torbalara konularak buz kutusu içerisinde Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Moleküler Fitopatoloji ve Viroloji Laboratuvarına getirilmiştir. Toplanan yaprak materyalleri serolojik ve moleküler testler uygulanıncaya kadar -20 °C'de çalışan derin dondurucuda muhafaza edilmişlerdir. Sürveyler esnasında toplanılan yaprak örnekleri serolojik ve moleküler testlerde materyal olarak kullanılmıştır.

3.1.3. DAS-ELISA Testinde Kullanılan Materyaller

Sürvey alanından toplanan 256 adet omcadan toplanan yaprak örnekleri DAS-ELISA testinde materyal olarak kullanılmıştır. DAS-ELISA testinde *Grapevine leafroll virus-3* (GLRaV-3), *Grapevine leafroll virus-6* (GLRaV-6) ve *Grapevine fan leaf virus* (GFLV) poliklonal antiserumlar, pozitif ve negatif kontroller (AGDIA), porselen havan ve havan eli, ELISA plate'leri, pipetler, ependorf tüpler, cam malzemeler kullanılmıştır.

3.1.4. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Testinde Kullanılan Materyaller

Çalışma materyalini oluşturan asma yaprak örneklerinden karakteristik virüs belirtileri sergileyen örnekler arasından GFLV için DAS-ELISA testinde negatif kontrollerin absorbans değerinin iki katına yakın absorbans değerleri veren enfekteli yaprak örnekleri RT-PCR testi için seçilmiştir. Böylece toplam 20 adet enfekteli yaprak örnekleri GFLV'nin DAS-ELISA testindeki sonuçlarını doğrulamak amacıyla RT-PCR testinde materyal olarak değerlendirilmişlerdir. Total nükleik asit izolasyonu Foissac, Svanella- Dumas ve Gentit (2001)'in önerdiği yöntemde kullanılan kimyasallar Invitrogen (CA, USA) firmasından temin edilmiştir. cDNA sentezi Fermentas (NY, USA) firmasından satın alınan cDNA sentez kiti ile gerçekleştirilmiştir. PCR işlemi için gerekli olan PCR bileşenleri ise yine Invitrogen (NY, USA) firmasından temin edilmiştir.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Arazi Gözlemleri ve Enfekteli Bitki Materyalinin Elde Edilmesi

Tekirdağ ili Merkez Süleymanpaşa ilçesi ile Şarköy ve Malkara ilçelerindeki bağ üretim alanlarında gerçekleştirilen sürvey çalışmalarında bağ üretiminin yapıldığı arazilere köşegenler doğrultusunda girilerek simptom gösteren omcalardan örnekler alınmıştır. Her omcadan 3-4 adet yaprak örneği alınıp tek bir örnek kodu verilerek polietilen torbalara konulmuş ve buz kutusu içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Toplanan enfekteli yaprak örnekleri -20 °C'de testleninceye kadar muhafaza edilmiştir. Bu kapsamda Tekirdağ ilinde en fazla üzüm üretiminin yapıldığı Şarköy ilçesi ve köylerinde ayrıca Merkez Süleymanpaşa ilçesine bağlı Barbaros mahallesi, Naip ve Nusratlı köylerindeki bağ alanlarında gelişme geriliği, bodurluk, kızarma, sarılık ve kısa meyve salkımı oluşturan belirtiler en yaygın belirtiler şeklinde gözlenmiştir. Gözlenen simptomlar doğrultusunda bağ alanlarından toplanan örneklerin dağılımı Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Buna göre Süleymanpaşa ilçesinden 105 yaprak örneği, Şarköy ilçesinden 146, Malkara ilçesinden ise 5 yaprak örneği olmak üzere toplam 256 adet simptom gösteren yaprak örnekleri toplanmıştır. Arazi çalışmaları esnasında örnek alınan arazilerde çeşit ismi bilinen örneklerin adları çizelgede gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Tekirdağ ili ve ilçelerindeki bağ üretim alanlarından toplanan örneklerin alındığı yer, çeşit adı ve örnek adedi

İlçe adı	Belde, köy adı	Çeşit adı	Toplanan Örnek adedi
Süleymanpaşa	Naip	-	4
Süleymanpaşa	Barbaros	-	2
Şarköy	Uçmamdere	Alphonse Lavellee	1
Şarköy	Çınarlı-Kirazlı	Red Globe-Alphonse Lavellee	22
Şarköy	Güzel köy	Merlot Şaraplık	12
Şarköy	Kirazlı	Cardinal	9
Şarköy	Uçmamdere	-	8
Şarköy	İdebağları	-	24
Şarköy	Eriklice	-	7
Şarköy	Aşağıkalamış	-	10
Şarköy	Yukarıkalamış	-	9
Şarköy	Çengelli	-	9
Şarköy	Yörgüç	-	15
Şarköy	Yayaköy	-	20
Malkara	İbribey	-	5

Süleymanpaşa	Nusratlı	Italia	5
Süleymanpaşa	Nusratlı	Gamay	6
Süleymanpaşa	Nusratlı	Kozak Siyahı	1
Süleymanpaşa	Nusratlı	Superior Seedless	2
Süleymanpaşa	Nusratlı	Hatun Parmağı	7
Süleymanpaşa	Nusratlı	Pinot Noir	3
Süleymanpaşa	Nusratlı	Hamburk Misketi	1
Süleymanpaşa	Nusratlı	Ata Sarısı	3
Süleymanpaşa	Nusratlı	Alicante Bouchet	2
Süleymanpaşa	Nusratlı	Ugni Blanc	1
Süleymanpaşa	Nusratlı	Manda Gözü	2
Süleymanpaşa	Nusratlı	Gewürztraminer	2
Süleymanpaşa	Nusratlı	Madame jean mathias	2
Süleymanpaşa	Nusratlı	Tekirdağ çekirdeksiz	1
Süleymanpaşa	Nusratlı	Zinfandel	2
Süleymanpaşa	Nusratlı	Semillon	1
Süleymanpaşa	Nusratlı	-	58
Toplam	15	20	256

3.2.2. Serolojik Test Yöntemi (DAS-ELISA Testi)

Sürvey alanından toplanan simptom gösteren 256 adet asma yaprak örnekleri DAS-ELISA testine tabi tutulmuştur. Toplanan yaprak örneklerinde; *Grapevine leafroll associated virus-3* (GLRaV-3), *Grapevine leafroll associated virus-6* (GLRaV-6) ve *Grapevine fan leaf virus* (GFLV) hastalıklarının varlığını saptamak üzere Clark ve Adams (1977)'in temel alındığı yöntemde gerçekleştirilen Double-antibody sandwich enzyime linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) testi, antiserumların temin edildiği AGDIA (Elkhart, Indiana – USA) firmasının önerdiği prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre;

- Kaplama tampon çözeltisi içerisinde 1/200 oranında seyreltilen γ -globulin, ELISA platelerinin her bir çukuruna 100 μ l konulmuş ve nemli bir kutu içerisine yerleştirilen plateler 37 °C'de çalışan inkübatörde 2 saat süre ile inkübe edilmiştir. Inkübasyondan sonra plateler içerisindeki sıvı boşaltılmış ve yıkama tampon çözeltisi (1x PBST) ile 2 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

- Çalışma materyali olarak toplanan asma yaprak örnekleri steril porselen havan içerisinde 1/10 oranında ekstraksiyon tampon çözeltisi eklemek suretiyle ezilmiş ve bitki

öz suları elde edilmiştir. Cam tüpler içerisine konulan ekstraktlar karıştırılmak suretiyle ELISA platelerinin her bir çukuruna 100 µl'lik miktarlarda ve iki tekerrürlü olacak şekilde konulmuştur (Şekil 3.2). Her bir virüse ait pozitif ve negatif kontroller de 100 µl'lik miktarlarda ELISA platelerinin sol çukuruna iki tekerrürlü olacak şekilde yerleştirilmiş ve ELISA plateler nemli bir kutu içerisine konularak +4 °C'de bir gece inkübe edilmişlerdir. İnkübasyondan sonra bitki ekstraktları boşaltılmış ve 5 kez yıkama tampon çözeltisi (1x PBST) ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Porselen havanlarda ezilerek elde edilen bitki ekstraktları

- Enzimle işaretli γ globulin (Konjugate) 1/100 oranında konjugat tamponu ile seyreltilmiş ve 100 µl'lik miktarlarda platelerin her bir çukuruna konulmuştur. Nemli kutu içerisine yerleştirilen plateler 37 °C'de çalışan inkübatörde 2 saat süre ile inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda plateler yıkama tampon çözeltisi (1x PBST) ile 5 kez yıkanmıştır.

- Substrat tamponu ile 1 mg/ml p-nitrophenyl phosphate 100 µl'lik miktarlarda platelerin çukurlarına konulmuş ve 37 °C'de inkübatöre edilmişlerdir.



Şekil 3.3 DAS-ELISA testinde ELISA platelerinin yıkanması işlemi

- Sonuçlar 60-120 dakika sonunda ilk olarak görsel daha sonra da ELISA okuyucusu (Thermo-Multiskan FC)'nda 405 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri okunarak değerlendirilmiştir.

-Ancak enfekteli olduğundan şüphe edilen asma yaprak örneklerindeki virüs konsantrasyonları düşük oranlarda olduğundan plateler buzdolabında + 4 °C'de 1 gece daha bekletilmiştir. Daha sonra ELISA okuyucusunda 405 nm dalga boyunda tekrar okutulmuş absorpsiyon değerleri kayıt altına alınmıştır. Negatif kontrol değerlerinin iki katından daha yüksek absorpsiyon değerleri pozitif olarak kabul edilmiştir.

3.2.3. Moleküler Test Yöntemi (RT-PCR Testi)

Yapraklarda kızarma, sarılık ve şekil bozukluğu semptomları sergileyen ve DAS-ELISA testinde pozitif reaksiyon veren ve ayrıca negatif reaksiyonun iki katına yakın absorpsiyon

değerine sahip 20 adet enfekteli yaprak örnekleri GFLV'nu saptamak amacıyla RT-PCR testine tabi tutulmuşlardır.

3.2.3.1. Total Nükleik asit Ekstraksiyonu

Virüs belirtisi sergileyen 20 adet enfekteli yaprak örneklerinin total nükleik asit ekstraksiyonları Foissac vd. (2001) tarafından önerilen yönteme göre yapılmıştır. Buna göre 100 mg bitki materyali 1ml ekstraksiyon tamponu ile steril havan içerisinde ezilerek homojenize edilmiştir. Steril eppendorf tüpler içerisinde 500 µl hacimdeki özsu konularak üzerlerine 100 µl miktarlarda % 10'luk Sodium lauryl sarcosyl solüsyonu ilave edilmiş ve tüpler ara sıra sallanmak üzere 10 dakika süreyle 70 °C'de inkübe edilmişlerdir. Daha sonra 5 dakika süreyle buza daldırılan tüpler soğutulmuştur. Tüpler 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra sıvı fazın 300 µl'si daha önceden hazırlanmış eppendorf tüplere transfer edilmiş ve içerisinde 150 µl ethanol, 25 µl silica süspansiyonu ve 300 µl 6 M Sodium iodine ilave edilmiştir. Karışım, sallayıcı platform üzerinde oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Tüpler 6000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı faz atılmış ve 500 µl yıkama tamponu ile oluşan pelletler yıkanmıştır. Tüpler 6.000 rpm'de 1 dakikalık santrifügasyona tabi tutulduktan sonra ikinci defa eppendorf tüplerdeki pelletler aynı hacimdeki yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Elde edilen pelletler, 150 µl RNase-free su ile çözündürüldükten sonra ve 4 dakika 70 °C'de inkübe edilmiştir. Tüpler 3 dakika 14.000 rpm de santrifüj edildikten sonra, sıvı faz yeni hazırlanan eppendorf tüplere transfer edilerek, pelletler atılmıştır. Elde edilen total nükleik asit, complemter DNA (cDNA) elde edilinceye kadar – 20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.3.2. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Testi

3.2.3.2.1. Complemter DNA (cDNA) Sentezi

cDNA sentezi, kitin satın alındığı firmanın (Fermentas) prosedürüne uygun olarak yapılmıştır. Nükleaz-free microsantrifüj tüp içerisinde aşağıdaki bileşenler eklenmiştir.

- 2 µl total RNA
- 1 µl reverse primer (100 pmol/µl)
- 9 µl RNase free su

eklenerek 12 µl'ye tamamlanmış ve elde edilen karışım vortekslenerek 65 °C'de 5 dakika inkübe edilmiş ve hızla buza daldırılarak soğutulmuştur.

- 4 µl 5X First strand buffer
- 1 µl Ribonukleaz inhibitör
- 2 µl dNTPs (10 mM)
- 1 µl Revers transkriptaz enzim

eklenmek suretiyle elde edilen 8 µl'lik hacimdeki bileşenler tüplere aktarılmış ve mikropipetle aşağı yukarı çekmek suretiyle karıştırılmıştır. 42 °C'de 1 saat süre ile inkube edilmiş ve daha sonra 70 °C'de 5 dakika bekletildikten sonra elde edilen cDNA, PCR işlemi yapılmıyaya kadar – 20 °C'de saklanmıştır.

3.2.3.3. Polymerase Chain Reaction (PCR) Testi

PCR reaksiyonu için PCR tüpleri içerisine her bir örneğe ait 2.5 µl 10x Reaction buffer, 3.75 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl dNTPs (10 mM), 1µl (F:5'-GAACTGGCAAGCTGTCGTAGAA-3'), 1 µl (R:5'-GCTCATGTCTCTCTGACTTTGACC-3') primerleri, 0.2 µl Tag DNA polymerase enzyme (MBI Fermentas), 2 µl cDNA ve 13.55 µl RNase free su eklenerek Thermo PCR aletine (Waltham-MA, USA) yerleştirilmiştir. GFLV genomunun kılıf protein gen bölgesine spesifik 350 nükleotidlik bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primer çifti I.D.T. (Iowa, USA) firmasından temin edilmiştir. PCR ile cDNA'nın çoğaltımı Çizelge 3.2.'de gösterilen sıcaklık aralıklarında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. GFLV hastalığının PCR ile çoğaltımında uygulanan sıcaklık aralıkları

Virüsün Adı	Uygulanan Sıcaklık Aralıkları			Beklenen fragment uzunluğu
	1 döngü	40 döngü	1 döngü	
GFLV	94 °C 1 dk	94 °C 30 sn 55 °C 30 sn 72 °C 30 sn	72 °C 7 dk	350 bp

3.2.3.4. % 2'lik Agaroz Jelin Hazırlanması

2 gr Agaroz, 100 ml 1x TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu içerisinde mikrodalga fırında 3-4 dakika süreyle ısıtılmıştır. Düz bir zemin üzerindeki jel tabağına yüklenecek örnek sayısına uygun jel tarağı yerleştirilmiştir. Hazırlanan jel, jel tabağına kabarcık oluşturmayacak şekilde dikkatle dökülmüştür. 20-30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra katılaştıran jel, içerisinde 1x TAE tamponu bulunan jel tankı içerisine yerleştirilmiştir. Parafilm üzerinde 5 µl yükleme tampon çözeltisi ve 10 µl PCR ürünü konularak karıştırılmış ve jelin çukurlarına yüklenmiştir. Jelin ilk çukuruna 3 µl DNA marker (100 bp) yüklendikten sonra 100 volt'luk bir akımda 40-50 dakika süre ile elektrofoze tabi tutulmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Arazi Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Tekirdağ ilinde bağ üretiminin yoğun olarak yapıldığı Süleymanpaşa, Şarköy ve Malkara ilçelerindeki bağ alanlarında ve bazı ev bahçelerindeki omcalarda gelişme geriliği, bodurluk, kızarma, sarılık, yaprak kenarlarında dişlilik, şekil bozuklukları ve kısa meyve salkımı şeklinde belirtiler en karakteristik belirtiler olarak dikkati çekmiştir. Şekil 4.1.'de görüldüğü üzere Tekirdağ ili Şarköy ilçesindeki yol kenarındaki tipik kızarma ve şekil bozukluğu gösteren virütik simptomların her bir omcayı etkilediği gözlenmiştir.



Şekil 4.1. Tekirdağ ili Şarköy ilçesinde yol kenarındaki enfekteli bağ alanının görünümü

Araştırma kapsamı içerisinde yer alan Tekirdağ ili Süleymanpaşa ilçesindeki Nusratlı köyünde omcalarda kısa boğum hastalığının karakteristik belirtilerinden sarılık, yaprakta dişliliğe neden olan yelpaze yaprak oluşumu, kısa boğum ve mozaik belirtilerinin en karakteristik belirtileri gözlemlenmiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6).



Şekil 4.2. Tekirdağ ili Süleymanpaşa ilçesindeki Nusratlı Köyünde yapraklarda tipik sarılık ve kızarıklık belirtileri



Şekil 4.3. Tekirdağ ili Süleymanpaşa ilçesindeki Nusratlı köyünden alınan asma çeşidindeki yaprak formu ve simetrisinin bozularak yaprağın yelpaze şeklinin oluştuğu tipik belirti



Şekil 4.4. Tekirdağ ili Süleymanpaşa ilçesindeki Nusratlı köyünden alınan yaprak örneğinde kısa boğum oluşumu, sağdaki yaprak sağlıklı yaprak örneği



Şekil 4.5. Tekirdağ ili Süleymanpaşa ilçesindeki Nusratlı köyündeki asma yapraklarında mozaik ve sarılık belirtileri

Tekirdağ ilinde şaraplık üzüm çeşitleri üretimi açısından önemli bir konuma sahip olan ve bağcılığın yoğun olarak yapıldığı Şarköy ilçesindeki bağ alanlarında söz konusu tipik virütik belirtilerden yelpaze yaprak oluşumu, kızarma ve yaprak ayasının aşağı doğru kıvrılması sonucu oluşan belirtiler bazı üretim alanlarında yaygın şekilde görülmüştür (Şekil 4.5, Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Tekirdağ ili Süleymanpaşa ilçesindeki Nusratlı köyündeki asma yapraklarında, yaprak formu ve simetrisinin bozularak yaprağın yelpaze şeklinin oluştuğu tipik belirti



Şekil 4.7. Tekirdağ ili Şarköy ilçesindeki sarılık belirtilerinin yoğun şekilde görüldüğü bağ alanı



Şekil 4.8. Tekirdağ ili Şarköy ilçesindeki bir üretici bağındaki omcada yapraklarda kızarma ve yaprak ayasının aşağı doğru kıvrılması

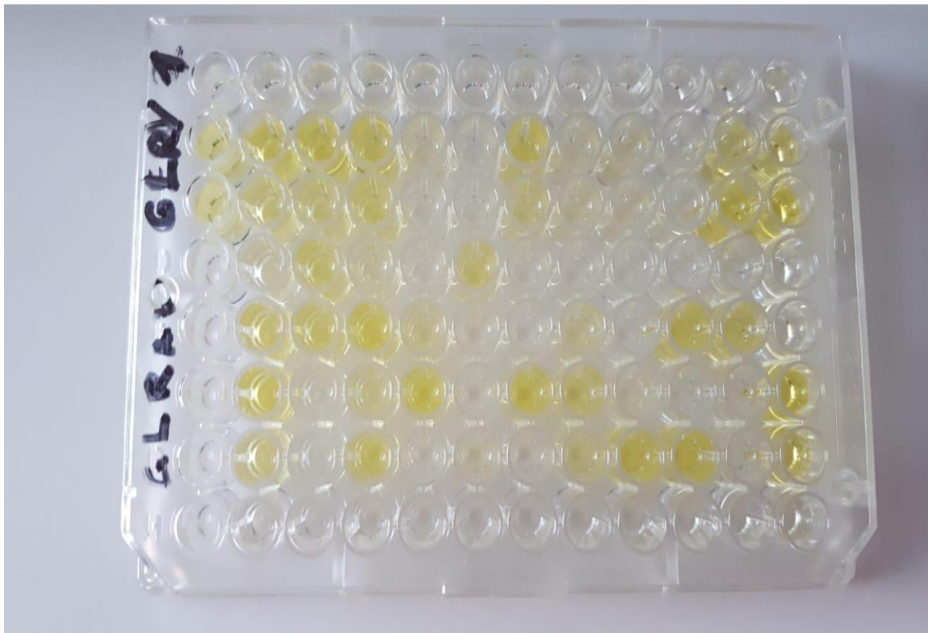


Şekil 4.9. Tekirdağ ili Şarköy ilçesi, Aşağı Kalamış köyündeki bir üretici bağındaki omcada tipik kızarma va yaprak kıvrılma belirtileri

Sürveyler esnasında karakteristik virüs belirtileri gözlenen bağ alanlarında verimin olağanüstü düştüğü gözlenmiş ve bazı bağ alanlarında omcalarda yapraklarda oldukça küçük, boğum araları kısa ve bodur omca oluşumu dikkati çekmiştir. Aynı zamanda sürvey alanı içerisinde yer alan arazilerde çoğunlukla küçük bağ alanlarının varlığı dikkati çekmiştir. Özellikle bazı ev bahçelerinde hobi amaçlı üzüm çeşidi yetiştiriciliğinin ilde yaygın hale geldiği gözlenmiştir.

4.2. DAS-ELISA Test Sonuçları

Tekirdağ ili merkeze bağlı Süleymanpaşa, Şarköy ve Malkara ilçeleri ve köylerindeki bağ üretim alanlarından toplanan toplam 256 adet simptomatik yaprak örneklerine uygulanan DAS-ELISA testi sonuçlarına göre 60 örneğin *Grapevine leafroll associated virus-3* (GLRaV-3) ile 7 örneğin ise *Grapevine fan leaf virus* (GFLV) ile enfekteli oldukları tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre ilçe bazında değerlendirildiğinde bağ üretimi açısından önemli bir konuma sahip olan Şarköy ilçesinden alınan toplam 146 örnekten 48 adet örnek GLRaV-3 ile enfekteli iken sadece Çınarlı-Kirazlıdan alınan 1 adet örneğin GFLV ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Tekirdağ ili Merkez Süleymanpaşa ilçesinde bulunan Nusratlı köyünden alınan toplam 105 adet örnekten 12 adedi GLRaV-3 ile enfekteli bulunurken 6 örneğin ise GFLV ile bulaşık olduğu tespit edilmiştir. Her iki virüs yönünden bulaşıklık çeşitler açısından değerlendirildiğinde 2 adet Pinot Noir, 2 adet Gamay, 1 adet Alicante Bouschet, 1 Zinfandel, 1 Semillon, 1 Red Globe-Alphonse, çeşit adı bilinmeyen 52 adet örnek GLRaV-3 ile enfekteli bulunmuştur. Bununla birlikte 1 adet Manda gözü, 1 Gevurztraminer, 1 Gamay, 1 Hatun Parmağı, 1 Red Globe-Alphonse, 2 adet adı bilinmeyen çeşidin ise GFLV ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Şarköy ilçesindeki enfeksiyon oranı % 33.56, Süleymanpaşa ilçesindeki enfeksiyon oranı % 17.14 olarak belirlenmiştir. Toplam il düzeyindeki enfeksiyon oranı ise % 26.17 olarak tespit edilmiştir. Malkara ilçesi, İbribey köyünden alınan 5 adet simptom gösteren örneklerde GFLV, GLRaV-3 ve GLRaV-6 virusleri saptanmamıştır. Ancak araştırma alanından toplanan 256 adet örneğin hiçbirinde GLRaV-6 saptanmamıştır.



Şekil 4.10. DAS-ELISA testinde pozitif reaksiyon veren örneklerin görünümü

4.3. Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Test Sonuçları

Yapraklarda kızarma, sarılık ve şekil bozukluğu semptomları sergileyen ve DAS-ELISA testinde GFLV için pozitif reaksiyon veren ve negatif reaksiyonun iki katına yakın absorbans değeri gösteren 20 adet enfekteli yaprak örneklerinin RT-PCR ile testlenmesi sonucunda 11 adet örneğin GFLV ile enfekteli olduğu saptanmıştır. GFLV'nin kılıf protein gen bölgesine spesifik 350 bp'lik bir fragment elde edilmiştir. Böylece RT-PCR testi sonuçlarına göre Nusratlı köyünden alınan 1'er adet Manda Gözü, Gewürztraminer, Hatun parmağı, Red Globe-Alphonse, Gamay çeşidi ile 6 adet adı bilinmeyen çeşide ait örneklerde GFLV saptanmıştır.

Çizelge 4.1. Tekirdağ ili bağ üretim alanlarından toplanan enfekteli yaprak örneklerine uygulanan DAS- ELISA ve RT-PCR test sonuçları

İlçe Adı	Mevki, köy adı	Çeşit adı	Virüs adı				Örnek Adedi	Enfekteli Örnek adedi
			GLRaV-3	GLRaV-6	GFLV	GLRaV3 +GFLV		
Şarköy	Uçmakdere	-	6				8	6
	Uçmakdere	Alphonse Lavellee					1	
	Çınarlı-Kirazlı	Red Globe Alphonse Lavellee	1		1		22	2
	Güzelköy	Merlot					12	
	Çınarlı-Kirazlı	Cardinal					9	
	İdebağları	-	9				24	9
	Eriklice	-	3				7	3
	Aşağıkalamış	-	7				10	7
	Yukarıkalamış	-	2				9	2
	Çengelli	-	4				9	4
	Yörgüç	-	5				15	5
Yayaköy	-	11				20	11	
Süleymanpaşa	Nusratlı	Manda Gözü			1		2	1
	Nusratlı	Gewürztraminer			1		2	1
	Nusratlı	Gamay	2		1		6	3
	Nusratlı	Hatunparmağı			1		7	1
	Nusratlı	-	5		6	1	58	11
	Nusratlı	Pinot Noir	2				8	2
	Nusratlı	Alicante Bouchet	1				2	1
	Nusratlı	Zinfandel	1				2	1
	Nusratlı	Semillon	1				1	1
	Nusratlı	Kozak Siyahı					1	
	Nusratlı	Superior Seedless					2	
	Nusratlı	Hamburk Misketi					1	
	Nusratlı	Ata Sarısı					3	
	Nusratlı	Ugni Blanc					1	

	Nusratlı	Madame jean mathias					2	
	Nusratlı	Tekirdağ Çekirdeksiz					1	
	Naip	-					4	
	Barbaros	-					2	
Malkara	İbribey	-					5	
Toplam	14	20	60	-	11	1	256	71



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bağ alanları ve üzüm üretiminde dünyanın önemli ülkeleri arasında yer alan Türkiye’de iklim koşullarının uygun olması ve heterozigot bir yapıya sahip olan asmanın çok geniş çeşit ve tip zenginliğine sahip olması nedeniyle bağcılık üretimi önem taşımaktadır. Nitekim ülkemiz kuzey yarım kürede 360 ile 420 arasında bulunduğundan doğal şartları bakımından bağcılık için optimum olanaklara sahiptir (Oraman, 1965). Şu ana kadar 1200’ün üzerinde üzüm çeşidi veya tipinin de mevcut olduğu bilinmektedir. Türkiye’de yıllık 1200-2600 mm yağış alan Doğu Karadeniz Bölgesinin sahil kesimi dışında *Vitis vinifera* L. bağcılığı yapılmakta olup, üreticinin istihdam kaynağı olması nedeniyle ekonomik açıdan da önem taşımaktadır (Çelik ve Odabaşı, 1998). Ancak üretimi bu denli önemli olan bağ alanlarında virüs hastalık etmenleri üzüm verim ve kalitesini düşüren önemli etmenler olarak karşımıza çıkmaktadır. Şu zamana kadar Türkiye’de bağları tehdit eden 15 virüs hastalığının ve bunlardan Zirai Mücadele Teknik Talimatı hazırlandığı bildirilmiştir (Akbaş vd., 2007). Buna bağlı olarak Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı’nın 2010 yılı “Meyve ve Asma Fidanı ile Üretim Materyallerinde, Bitki Sağlığı Standartları Talimatnamesine göre sakınılması ve önlem alınması gereken 7 virüs ve virüs benzeri hastalığın bulunduğu bildirilmiştir. Bu hastalık etmenlerinden; Kısa boğum virüs hastalığı: *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) ve Asma yaprak kıvrılma virüs kompleksi: *Grapevine leafroll associated viruses* (GLRaV 1-9) bu listede yer alan önemli viral hastalık etmenlerindedir. Asma yaprak kıvrılma virüsü (GLRaV)’ne ait ilk veriler 19. yüzyılın ortalarına dayanmakta olup, başlarda fizyolojik bozukluklar olarak kabul edilen bu hastalığın, kısa boğum virüs (GFLV) hastalığından kaynakladığı ve asmada görülen en yaygın virüs hastalıklarından biri olduğu bildirilmiştir (Martelli, 2014).

Trakya Bölgesi’nin Tekirdağ ili Merkez Süleymanpaşa ilçesi ile Şarköy ilçesi uygun iklim koşulları nedeniyle bağcılık üretiminde önemli bir yer tutmaktadır. Ancak virüs hastalıkları başta olmak üzere ve diğer patojenik etmenler ve zararlıların oluşturduğu verim ve kalite kayıpları bağcılığın eski cazibesini kaybetmesine neden olmaktadır. Bu tez çalışmasında Tekirdağ ili ve üç ilçesindeki bağ üretim alanlarında kapsamlı sürveyler yapmak suretiyle bağ virüslerinden önemli üç virüs hastalığı *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), *Grapevine leafroll associated virus-3* (GLRaV-3) ve daha önce ilde saptanmamış olan *Grapevine leafroll associated virus-6* (GLRaV-6) virüs hastalıkları araştırılmıştır. Sürvey çalışmalarında bağcılığın önem taşıdığı Tekirdağ ili Merkez Süleymanpaşa ve Şarköy ilçelerindeki bağ alanlarında karakteristik virüs simptomlarından gelişme geriliği, bodurluk, kızarma, sarılık,

yaprak kenarlarında dişlilik, yelpaze yaprak oluşumu, şekil bozuklukları ve kısa meyve salkımı şeklinde belirgin belirtiler görülmüştür (Şekil 4,2, 4,3,4.4, 4.5,4.6,4,7,4.8, 4.9). Aynı şekilde hobi amaçlı üzüm yetiştiriciliği yapılan ev bahçelerinde de aynı belirtilerin varlığı dikkati çekmiştir. GFLV'nin üç farklı izolasyonunun neden olduğu üç tip karakteristik belirtiden yelpaze yaprak oluşumu, boğum aralarında kısılma, yassılaşıma ve yapraklarda sarılık ve damar bantlaşması belirtileri Oliver ve Fuchs (2011) tarafından tanımlanmıştır. Trakya Bölgesi'nde yapılan önceki çalışmalarda da bağ alanlarında yapraklarda sararma, mozaik, kıvrılma, renk değişimleri, boğum aralarında kısılma, zigzag dallanma, salkımlarda irili ufaklı meyve oluşumu, bodurlaşma gibi virüs belirtilerinin yaygın şekilde görüldüğü bildirilmiş olup *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) ve bu virüsün vektörü nematod türlerinden *Xiphinema index* ve *Xiphinema pachtaicum* türleri Tülek (2014) tarafından tanımlanmıştır. Ayrıca Tekirdağ ili bağ üretim alanlarındaki siyah üzüm çeşitlerinde yapraklarda kızarma ve geriye doğru kıvrılma, beyaz üzüm çeşitlerinde sararma ve geriye doğru kıvrılma şeklinde belirtilerin *Grapevine leafroll associated virus-1* (GLRaV-1), GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-5, GLRaV-7 virüsleri DAS-ELISA test yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir (Köklü ve Baloğlu 2000; Ömeroğlu 2016). Ege Bölgesi'nde bağcılığın yoğun olarak yapıldığı illerde GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-7, GLRaV-9, GLRaV-Pr ve GLRaV-De saptanmıştır (Erilmez ve Kaya, 2016; Kaya vd., 2012; Önder vd., 2016). Güneydoğu Anadolu Bölgesinde GLRaV-5, Orta Anadolu Bölgesinde GLRaV-1, -2, -3 ve -7 virüsleri saptanmıştır (Akbaş vd., 2007; Buzkan vd., 2010).

Bağcılığın yoğun olduğu Tekirdağ ili ve üç ilçesinden toplanan 256 adet karakteristik virüs belirtileri gösteren örneklerde DAS-ELISA testi sonuçlarına göre 67 adet örneğin enfekteli olduğu saptanmıştır. Bu bağlamda 60 örneğin *Grapevine leafroll associated virus-3* (GFLV-3) ile 7 örneğin ise *Grapevine fan leaf virus* (GFLV) ile enfekteli oldukları tespit edilmiştir. 1 örnekte ise GLRaV-3 ve GFLV'nin karışık enfeksiyonları belirlenmiştir. Şarköy ilçesinden alınan toplam 146 örnekten 48 örnek GLRaV-3 ile enfekteli iken sadece 1 örneğin GFLV ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Tekirdağ ili Merkez Süleymanpaşa ilçesindeki Nusratlı köyünden alınan toplam 105 örnekten 12 adet örnek GLRaV-3 ile enfekteli bulunurken 6 adet örneğin ise GFLV ile bulaşık olduğu saptanmıştır. Toplam il düzeyindeki enfeksiyon oranı ise % 27.73 olarak tespit edilmiş olup, Şarköy ilçesindeki enfeksiyon oranı % 33.56 iken Süleymanpaşa ilçesindeki enfeksiyon oranı % 2.95 olarak belirlenmiştir. Malkara ilçesi, İbribey köyünden alınan 5 adet belirtiler gösteren örneklerde GFLV, GLRaV-3 ve GLRaV-6 virüsleri saptanmamıştır. Ege, Akdeniz, İç Anadolu, Güneydoğu Anadolu Bölgelerindeki bağ

alanlarında *Grapevine fanleaf virus* (GFLV)'nin neden olduğu asma kısa boğum virüs hastalığının % 47'ye varan bulaşıklık oranı ile ilk sırada bulunduğu bildirilmiştir (Yılmaz vd., 1997). Missouri'de yapılan bir çalışmada Fransız hibritleri ve Amerikan çeşitlerinde GLRaV-3'un % 100 oranında enfeksiyona neden olduğu tespit edilmiştir (Milkus ve Goodman 1999). Monis ve Bestwick (1996) GLRaV -1, -2, -3 virüslerinin tespit edilmesinde en iyi bitki dokusu ve örnekleme zamanının önem taşıdığını ve virüslerin bitki dokusunda düzensiz bir şekilde dağıldığını ve virüsün en yüksek titredeki değerinin genellikle bitkinin alt kısımlarında bulunduğunu bildirmişlerdir. Fiore vd. (2009) Güney Amerika'da yaptıkları çalışmada tarlada yetiştirilen sarmaşıklarda GFLV, GLRaV-1, -2 ve -3, GVA ve GFkV'lerini araştırdıkları çalışmada eylül ayından nisan ayına kadar bitkinin değişik dönemlerinde yaprak, yaprak sapı, kabuk ve tomurcuktan alınan örnekleri ELISA ve RT-PCR metotları ile testlemişlerdir. Odun ve kabuk kısmından alınan örneklerin araştırılan virüslerin tespitinde en iyi sonucu verdiğini bildirmişlerdir. Lyu vd. (2014) Çin'de GLRaV-7'nin yaygınlık oranı ve dağılımını belirlediği çalışmada GLRaV-7'nin çok yaygın olduğunu ve 50'den fazla üzüm çeşidinde bu virüs hastalığının bulunduğu işaret etmişlerdir. Vuittenez ve Martelli (1988) ise bağların en önemli viral hastalık etmenlerinden biri olan GFLV'nin Amerika'dan Avrupa'ya getirilen bütün Amerikan asma türlerinin hastalığa duyarlı olduğunu ve tüm *V. vinifera* çeşitlerinin virüse duyarlı olup tolerant olarak bilinen herhangi bir üzüm çeşidinin olmadığını bildirmiştir. Adana ve Mersin illerinde üzüm bağlarında GFLV'nin varlığı serolojik ve biyolojik analizlerle belirlenmiş ve DAS-ELISA testi sonucunda % 16.4 enfeksiyon oranı belirlenmiştir (Tarla ve Yılmaz, (2015). Ege Bölgesi bağ alanlarında GFLV'nin yaygınlık oranı ise % 20,80 olarak tespit edilmiştir (Önder vd., 2015). Türkmen ve Ertunç (2019) ise Amasya ili bağ alanlarında eylül ayında alınan örneklerde enfeksiyon oranının % 21.62 oranında yüksek enfeksiyona sahip olduğunu belirlemişlerdir. Kırşehir ili bağ alanlarından toplanan örneklerden izole edilen viral RNA'lar RT-PCR testine tabi tutulmuş ve 49 örnekten 5 adedinin GFLV ile bulaşık olduğu moleküler test ile belirlenmiştir (Bayan ve Yılar, 2017). Pashaei ve Doulati-Baneh (2011), GFLV ile enfekteli izolatların CP ürünlerini klonlayarak, nükleotid dizisini belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışmada İran'a ait GFLV izolatlarının bağımsız bir evrime işaret eden ayrı bir küme oluşturduğu bildirilmiştir. Ghomi vd. (2007) ise İran'ın kuzey-doğusundaki bağ alanlarında mozaik, Z şeklinde anormal sürgün gelişimi, çift düğüm ve gelişme geriliği belirtileri gösteren yaprak örneklerinde GFLV'nin tespiti amacıyla gerçekleştirilen ELISA testlerini doğrulamak için uygulanan RT-PCR testi ile GFLV'nin kılıf proteine özgü 321 bp'lik bir gen bölgesi çoğaltılmıştır. Bu sonuçlar, sağlıklı bitki materyalini doğrulamak için RT-PCR test yönteminin hızlı ve hassas bir tespit yöntemi olarak gerekli olduğunu bildirmişlerdir. GFLV'nin asma

çeşitlerinde saptanmasına yönelik yapılan çalışmada, kılıf proteine özgü rekombinant antikorlar kullanılarak yapılan IC-RT-PCR testinde üç izolat için 1512 bp bant elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar rekombinant antikor uygulanmasının, bitki dokusundaki virüslerin hızlı tespiti için yararlı olabileceğini göstermiştir (Sokhandan-Bashir vd., 2013). Buzkan ve Walker (2004) ise GFLV'nin belirlenmesindeki olumsuzluğu engellemek amacıyla dokudaki inhibitör bileşiklerini uzaklaştırmak için ekstraksiyon metodu geliştirmek amacıyla yaptıkları çalışmada, Silika metodu kullanılarak çoğaltılan RNA örnekleri PCR testinde pozitif sonuç verirken fenol/kloroform metoduna dayalı ekstraksiyondan elde edilen RNA kullanılarak yapılan PCR testinin negatif sonuç verdiğini bildirmiştir. Bu tez çalışmasında DAS-ELISA testinde saptanan GFLV sonuçlarını konfirme etmek amacıyla yapılan RT-PCR testinde ELISA testine ek olarak testlenen 20 yaprak örneğinden 11 örnek GFLV ile enfekteli bulunmuştur. Böylece DAS-ELISA testi ile 7 örnek GFLV ile pozitif reaksiyon verirken RT-PCR testi ile bu sonuç 11 enfekteli örneğe çıkmıştır. Bu durum RT-PCR testinin söz konusu virüslerin teşhisinde daha hassas ve güvenilir olduğu sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Böylece Tekirdağ ili bağ alanlarından toplanan 256 simptom gösteren yaprak örneklerinin GFLV ile enfeksiyon oranı % 4.3 olarak saptanmıştır. Ayrıca DAS-ELISA test metodu ile testlenen 256 enfekteli örneğin hiçbirinde GLRaV-6 tespit edilmemiştir. Aynı şekilde Vingione vd. (2003) ise Reggio Emilia bağlarındaki farklı virüslerin varlığı ve yaygınlığını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada GLRaV-6 virüsünü saptamamışlar ancak testlenen 480 adet örneğin % 60'ünün özellikle GLRaV-1, GLRaV-3 ve GVA açısından pozitif bulunduğunu tespit etmişlerdir. Standart ve sertifikalı çeşitler arasında bir fark bulunmamış, ancak Ancellotta ve Lambrusco Salamino isimli iki çeşit arasında enfeksiyon oranlarında farklılıklar görüldüğü bildirilmiştir. Ancak Çiğşar vd. (2002) Güneydoğu Anadolu Bölgesi (Adıyaman, Diyarbakır, Mardin, Şanlıurfa, Elazığ) ve İç Anadolu Bölgesi (Nevşehir) bağ üretim alanlarında GLRaV-6 virüsünü saptadıklarını bildirmiştir. GVA'nın en yaygın virüs olduğunu (% 42,4), bunu GLRaV-1'in (% 38,5), GFLV'nin (% 10,7) ve GFkV'nin (% 7,1) izlediğini belirtmişlerdir.

Tekirdağ ili bağ üretim alanlarında yapılan bu çalışmada GLRaV-3 ve GFLV virüslerinin varlığı ve enfeksiyon oranları belirlenmiş olup GLRaV-6 virüsü saptanmamıştır. Yerel üzüm çeşitleri Manda gözü, Hatun parmağı'nın yanısıra yabancı orijinli üzüm çeşitlerinde de her iki virüs hastalığı saptanmış olup şaraplık üzüm üretiminin daha yoğun yapıldığı Şarköy ilçesindeki enfeksiyon oranı Süleymanpaşa ilçesinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Özellikle vektör nematod türleri ile taşınan GFLV ile mücadelede önlemlerin öncelikle alınması gerektiğini ortaya koymaktadır. Nitekim toprak kökenli patojen ve zararlılarla

taşınan viral etmenlerle m¼cadelenin zor olması etkili m¼cadele y¼ntemlerinin izlenmesini gerekli kılmaktadır. Aynı Şekilde vekt¼r olabilecek unlu bitlerle m¼cadelenin de gerekliliği ortaya çıkmaktadır.



6. KAYNAKLAR

- Ağaoğlu, S. (1999). Bilimsel ve Uygulamalı Bağcılık. Rekmay Ltd.,Ankara Cilt: I, 205 s.
- Anonim (2018a). Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO). 2018. [Online]. Erişim adresi: <https://www.fao.org>. [Erişim tarihi: 2020].
- Anonim (2018b). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK). 2018. [Online]. <https://www.tarimorman.gov.tr>. [Erişim Tarihi: 2020].
- Akbaş, B. ve Erdiller, G. (1993). Researches on grapevine virus diseases and determination of their incidence in Ankara. *Journal of Turkish Phytopathology*, 22 (2-3), 55-64.
- Akbaş, B., Kunter, B. ve İlhan, D. (2007). Occurrence and distribution of *Grapevine leaf roll associated viruses* (1,2,3 and 7) in Turkey. *Journal of Phytopathology*, 155: 122-124.
- Aktaş, E. (2002). Bağcılığın Türkiye ekonomisindeki yeri. *Dünya Gıda Dergisi* sayı 2002-07. İstanbul. s:123.
- Bayan, Y. ve Yılar M. (2017). Molecular characterization of *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) and *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) vineyards in the Kırşehir. *International Journal of Scientific and Technological Research*, 3, 7.
- Belli, G., Fortusini, A., Casati, P., Belli, L., Bianco, P. A. ve Prati, S. (1994). Transmission of a *Grapevine leafroll associated* closterovirus by the scale insect *Pulvinaria vitis* L. *Rivista di Patologia Vegetale*, 4(3),105-108.
- Brunt, AA., Crabtree, K., Dallwitz, MJ., Gibbs, AJ. ve Watson, L. (1996). *Viruses of plants*. CAB International, 1484 p, Wallingford, UK.
- Buzkan, N. ve Walker A. (2004) A small-scale procedure for extracting nucleic acids from grapevine dormant cuttings infected with GFLV. *Asian Journal of Plant Sciences*, 3(3), 387-390.
- Buzkan, N., Karadağ, S., Kaya, A., Baloğlu, S., Minafra, A. ve Ben-Dov, Y. (2010). First report of the occurrence of *Grapevine leafroll-associated virus-5* in Turkish vineyards. *Journal of Phytopathology*, 158(6), 448-449.
- Clark, MF. & Adams, AN. (1977). Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen.Virology*, 34, 475-483.

- Çelik, H. ve Odabaş, F. (1998). Fidanlık şartlarında aşılama yoluyla aşılı asma fidanı üretiminde başarı üzerine aşı tipi ve aşılama zamanlarının etkileri. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 22 (3), 281-290.
- Çiğşar, İ., Digiario, M. ve Martelli, GP. (2002). Sanitary Status of Grapevine in South-Eastern and Central Anatolia (Turkey). *EPPO Bulletin*, 32, 471-475.
- Dida, L., Shehu, D. ve Ruci, T. (2017). ELISA Test for determination of grapevine viral infection in Rahovec, Kosovo. *International Refereed Journal of Engineering and Science (IRJES)*, 6(6), 97-101.
- Erilmez, S. ve Kaya, A. (2016). Comparison of DAS-ELISA and RT-PCR methods for the diagnosis of grapevine viruses. *Bitki Koruma Bülteni*, 56(1),1-14.
- Esmenjaud, D., Walter, B., Minot, J. C., Voisin, R. ve Cornuet, P. (1993). Biotin-Avidin ELISA detection of *Grapevine fanleaf virus* in the vector nematode *Xiphinema index*. *Journal of Nematology*, 25(3), 401-405.
- Fiore, N., Prodan, S. ve Pino, A.M. (2009). Monitoring grapevine viruses by elisa and rt-pcr throughout the year. *Journal of Plant Pathology*, 91,2.
- Foissac, X., Savalle-Dumas. L., Gentit, P., Dulucq, M.J. ve Canderesse, T. (2001). Polyvalent detection of fruit tree Tricho, Capillo and Faveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulturae*, 357,52-59.
- Fuchs, M., Martinson, TE., Loeb, GM. ve Hoch, HC. (2009). Survey for the three major leafroll disease -associated viruses in Finger Lakes vineyards in New York. *Plant Disease*, 93, 395,401.
- Ghomi, M E., Bakhsh, M S. ve Pourrahim. R. (2007). Study on the status of three grapevine viruses in North-Eastern vineyards of Iran. *Applied Entomology and Phytopathology*, 75(1), 33.
- Goheen, A.C. & Cook, J. A. (1959). Leafroll (red-leaf or rougeau) and its effects on vine growth, fruit quality, and yields. *American Journal of Enology and Viticulture*, 10(4), 173–181.
- Harmon, F.N. & Snyder F.E. (1946). Investigations on the occurrence, transmission, spread and effect of “white” fruit color in the Emperor grape. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science*, 47, 190-194.

- Herrera Guido, M. & Madariaga Mónica, V. (2001). Presence and incidence of grapevine viruses in the Central Zone of Chile. *Agricultura Técnica*, 61(4), 393-400.
- Hewitt, WB., Martelli, G., Dias, HF. ve Taylor, RH. (1970). *Grapevine fanleaf virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses, No 28.
- Hewitt, WB., Raski, DJ. ve Goheen, AC. (1958). Nematode vector of soil-borne *fanleaf virus of - grapevines*. *Phytopathology*, 48, 586-595.
- Irimia, N., Ulea E. ve Bălău, A.M. (2010). Detection of grapevine fan-leaf virus in some grapevine varieties using ELISA test. *Agronomie*, 53(1), 240-243.
- Izadpanah, K., Zaki-Aghl, M., Zhang, YP., Daubert, SD. ve Rowhani, A. (2003). Bermuda grass as a potential reservoir host for *Grapevine fanleaf virus*. *Plant Dis.*, 87,1179-1182.
- Jones, T J., Rayapati, N A. ve Nita, M. (2015). Occurrence of *Grapevine leafroll associated virus-2*, *-3* and *Grapevine fleck virus* in Virginia, U.S.A., and factors affecting virus infected vines. *European Journal of Plant Pathology*, 142(2),209-222.
- Kaya, A., Erilmez, S., Paylan, I. C. ve Erkan, S. (2012). First Report of *Grapevine leafroll-associated virus 4* in vineyards of Turkey. *Plant Disease*, 96(8),1230.
- Kominek, P. & Bryxiová, M. (2005). Comparison of three techniques for detection of *Grapevine leafroll-associated virus 1*. *Acta Virol.*, 49(1),37-43.
- Köklü, G. ve Baloğlu, S. (2000). Determination of incidence of *Grapevine leafroll associated viruses* in some grapevine varieties grown in Thrace region. *Journal of Turkish Phytopathology*, 29(2/3), 85-94.
- Krastanova, S., Ling, K.S., Zhu, H.Y., Xue, B., Burr, T.J. ve Gonsalves, D. (2000). Development of transgenic grapevine rootstocks with genes from *Grapevine fanleaf virus* and *Grapevine leafroll associated closteroviruses 2* and *3*. *Acta Hortic.*, 528,52.
- Lyu, M D., Li, X M., Guo, R., Li, M J., Liu, X M., Wang, Q. ve Cheng, Y Q. (2014). Prevalence and distribution of *Grapevine leafroll-associated virus 7* in China detected by an improved reverse transcription polymerase chain reaction assay. *Plant Pathology*, 63(5),1168- 1176.
- Mahfoudhi, N., Habili, N., Masri, S A. ve Dhouibi, M H. (2007). First report on the occurrence of *Grapevine leafroll-associated viruses 5* and *9* in Tunisian grapevines. *Plant Disease*, 91(10), 1359.

- Martelli, G. & Taylor, CE. (1989). Distribution of viruses and their nematode vectors. *Advances in Disease Vector Research*, 6,151-189.
- Martelli, GP. (2011). Grapevine closterovirus-, vitivirus- and foveavirus-induced diseases: Our status of knowledge. *Grapevine leafroll and vitivirus diseases seminar – a continued and increasing problem for vineyards*. 62nd Proceedings of the 17th Congress of ICVG. October 7–14. Davis, California, USA.
- Martelli, GP. & Boudon-Padieu, E. (2006). Directory of infectious diseases of grapevines and viroses and virus-like diseases of the grapevine: bibliographic report 1998-2004, Ciheamiamb. *Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches* 55, 279p, Bari, Italy.
- Martelli, GP. (2014). Directory of virus and viruslike diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology*, 96,51-70.
- Martelli, GP., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Agranowsky, AA., Al Rwahnih, M., Dolja, VV., Dovas, CI., Fuchs, M., Gugerli, P., Hu, JS., Jelkmann, W., Katis, NI., Maliogka, VI., Melzer, MJ., Menzel, W., Minafra, A., Rott, ME., Rowhani, A., Sabanadzovic, S. ve Salderelli, P. (2012). Taxonomic revision of the family Closteroviridae with special reference to the *grapevine leafroll-associated* member of the genus Ampelovirus and the putative species unassigned to the family. *Journal of Plant Pathology*, 94,7–19.
- Milkus, B N. & Goodman, R N. (1999). A survey of Missouri vineyards for the presence of five grape viruses. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1),133-134.
- Monis, J. & Bestwick, R K. (1996). Detection and localization of grapevine leafroll associated closteroviruses in greenhouse and tissue culture grown plants. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(2),199-205.
- Naidu, R., Rowhani, A., Fuchs, M., Golino, D. ve Martelli, G P. (2014). *Grapevine leafroll: a complex viral disease affecting a high-value fruit crop*. *Plant Disease*, 98(9),1172-1185.
- Oliver, JE. & Fuchs, MF. (2011). Fanleaf Degeneration/decline Disease of Grapevines. Cornell University – New York State Integrated Pest Management Fact Sheet. <https://hdl.handle.net/1813/43094>.
- Oraman, M.N. (1965). *Yeni Bağcılık*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 253, Ders Kitabı: 89. Ankara.

- Ömeroğlu, E. (2016). *Tekirdağ ili bağ alanlarında bazı üzüm çeşitlerinde asma yaprak kıvrılma virüsünün (GLRaVs) belirlenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi), Namik Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Tekirdağ.
- Önder, S., Akgül, D.S., Gümüş, M. ve Paylan, İ.C. (2015). Ege bölgesi'nde yetiştirilen üzüm çeşitlerinde *Grapevine fanleaf nepovirus* (GFLV)'nin yaygınlık durumu. Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 27, 627-636.
- Önder, S., Paylan, İ.C. ve Gümüş, M. (2016). *Grapevine fanleaf nepovirus* (GFLV)'ün tanılanmasında konvansiyonel RT-PCR ile Real-Time RT-PCR tekniklerinin karşılaştırılması, J. Turk. Phytopath., 45(2-3), 53-62.
- Pashaei, A. & Doulati-Baneh, H. (2011). Characterization of the full length coat protein gene of Iranian *Grapevine fanleaf virus* isolates, genetic variation and phylogenetic analysis Iranian Journal of Biotechnology, 9, 3.
- Pearson, RC. & Goheen, AC. (1981). Compendium of grape diseases. APS Press, 93 p, St. Paul MN, USA.
- Romanazzi, G., Murolo, S., Notte, P., Pizzichini, L., Stimuli, G., Talevi, S., Nardi, S., Virgili, S., Branzanti, M B. ve Savino, V. (2007). Incidence of grapevine viruses in vines of Marche region, Central-Eastern Italy. Italus Hortus, 14(3), 221-225.
- Sahar, A., Youssef., Al-Dhaher, M.M.A. ve Shalaby, A.A. (2009). Elimination of *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) and *Grapevine leaf roll-associated virus-1* (GLRaV-1) from infected grapevine plants using meristem tip culture. International Jurnal of Virology, 5 (2), 89-99.
- Sokhandan-Bashir, N., Akbar Behjatnia, S.A. ve Jafari Joozani,R.A. (2013). Detection of *Grapevine fanleaf virus* by immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) with recombinant antibody. Archives of Phytopathology and Plant protection, 47,17.
- Tarla, G. ve Yılmaz, MA. (2015). Detection of *Grapevine fanleaf virus* Using Serological and Biological Assays. Journal of Basic & Applied Sciences, 11, 343-347.
- Tülek, B. (2014). *Türkiye'nin trakya bölgesi bağlarında kısa boğum hastalığı grapevine fanleaf virus (GFLV)] ile vektör nematod xiphinema spp. İliőkilerinin araştırılması*. (Yüksek Lisans Tezi) Namik Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.

- Türkmen, Y. ve Ertunc F. (2019). Detection of Grapevine fanleaf virus infection in Amasya province, Turkey. International Molecular Plant Protection Congress, 10-13 April, Adana, Turkey.
- Vingione, M., Meglialdi, S., Cardoni, M. ve Bablani, A R. (2003). Investigation of the spread of viruses in vineyards in the Reggio Emilia Province. *Vignevini*, 30(9), 79-82.
- Vuittenez, A. & Martelli, GP. (1988). *Grapevine fanleaf virus* (GFLV). In: Smith, I.M. et al., Eds. *European Handbk. Pl. Dis.*, 27-28.
- Yılmaz, MA., Yurtmen, M., Cığsar, I. ve Ozaslan, M. (1997). A Survey of Grapevine Viruses in Turkey. Extended Abstracts 12th Meeting of the ICVG, Lisbon, Portugal.
- Zimmermann, D., Bass, P., Legin, R. ve Walter. B. (2008). Characterization and Serological Detection of Four Closterovirus-like Particles Associated with Leafroll Disease on Grapevine. *Journal of Plant pathology*, 130(3),205 – 218.



EK 1

DAS-ELISA Testlerinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

1. Fosfat tamponlu Tuz Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline) (PBS) pH:7.4

NaCl	8,0 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	2,9 g
KCl	0,2 g
NaN ₃	0,2 g

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre saf suda eritilip pH 0.1 M NaOH veya 0.1 M HCl ile ayarlanmış ve +4 °C'de saklanmıştır.

2. Kaplama Tampon Çözeltisi (Coating Buffer) pH: 9.6

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,93 g
NaN ₃	0,2 g
Bromocresol purple	5,0 mg

Yukarıda miktarları verilen kimyasallar 1 litre suda eritilip pH ayarlanmış ve +4 °C'de saklanmıştır.

3. Yıkama Tampon Çözeltisi (Washing Buffer) (PBST) pH: 7.4

Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS)	1 litre
Tween-20	0,5 ml

1 litre PBS tampon çözeltisi içerisine 0,5 ml Tween-20 ilave edilerek hazırlanmıştır. Kullanım süresince +4 °C'de saklanmıştır.

4. Ekstraksiyon Tampon Çözeltisi (Sample Extration Buffer) pH:7.3

PVP (Mw 10-40)	10 g
Tween-20	0,5 ml

1 litre yıkama tampon çözeltisi içerisine 10 g Polyvinylpyrrolidone (PVP-40) ve 0,5 ml Tween-20 ilave edilerek hazırlanmıştır.

5. Konjugat Tampon Çözeltisi (Enzyme Conjugate Buffer) pH: 7.4

PBST	1 litre
BSA	2 g
Congo Red	40 mg

1 litre PBST içerisine 2 g BSA ve 40 mg Congo Red ilave edilerek pH ayarlanıp +4 °C'de saklanmıştır.

6. Substrat Tampon Çözeltisi (Substrat Buffer) pH:9.8

Diethanolamine	97 ml
NaN	0,2 g

97 ml Diethanolamine 1 litre saf su içerisine ilave edildikten sonra 0,2 g NaN₃ eklenmiş ve pH: 9.8'e ayarlanmıştır. Çözelti +4 °C'de saklanmış ve kullanılmadan önce pH kontrol edilmiştir.

EK 2

Toplam Nükleik Asit Ekstraksiyonunda Kullanılan Tampon Çözeltiler

1. Ekstrasyon Tampon Çözeltisi (Grinding Buffer) pH:5.6-5.8

Guanidine, 4 M Thiocyanate, 0.2 M NaOAc (pH 5.2), EDTA 25 nM, 1.0 M KOAc, % 2.5 wt/vol PV-40, % 1 2-ME (mercaptoethanol)

Guanidine Thiocyanate	23.64 g
NaOAc	1.36 g
EDTA	0.465 gr
KOAc	4.9 g
PV-40	1.25 g
2-ME (Mercaptoethanol)	% 1

CH₃COOH ile pH ayarlanmıştır. Otoklav ile steril edilmiştir. Çalışma süresince ezme tamponu 4 °C'de saklanmıştır. % 1'lik Mercaptoethanol ekstraksiyondan hemen önce eklenmiştir. Ekstrasyon tamponu 50 ml'ye göre hazırlanmıştır.

2. Silika Süspansiyonu pH:2.0

Silica (Sigma % 12)	60 g
---------------------	------

Bir mezur kabındaki 500 ml saf su içerisinde 60 gr silica koyulmuş ve karıştırılmıştır. 24 saat beklenmiştir 470 ml üst sıvı atılmıştır (üst sıvının % 90'ı) ve 500 ml'ye tamamlanmıştır iyice karıştırılmıştır. 5 saat bekletilmiştir ve 540 ml üst sıvı (üst sıvının % 85'i atılmıştır) geriye kalan 60 ml bulamaç HCl ile pH'ı 2.0'ye ayarlanmıştır. Otoklav edilmiş ve karanlıkta oda sıcaklığında saklanmıştır.

3. Sodyum İyodid Solusyonu (NaI)

Na ₂ SO ₃	0.74 g
NaI (Sigma S8379)	36 g

40 ml kimyasal saf su içerisinde kimyasallar çözdürülmüştür. Daha sonra saf ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. Otoklav ile steril edilmiştir. Çalışma süresince 4 °C'de saklanmıştır.

4. Yıkama Tampon Çözeltisi (Washing Buffer 1X)

10.0 mM Tris-HCl pH 7.5 (1M), 0.5 mM EDTA (5M), 50.0 mM NaCl (0.5 M), Ethanol (%50)

Bileşimler eklendikten sonra saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra % 50 oranında etanol yani 100 ml saf etanol eklenerek 200 ml'ye tamamlanmıştır. Etanol eklemeyen önce otoklav ile sterilize edilmiştir ve 4 °C'de saklanmıştır.

