



**T.C.**

**ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**ÇANAKKALE İLİ BAĞ ALANLARINDA GRAPEVİNE FANLEAF  
VİRUS'UN TESPİTİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**AYŞENUR ŞİRİN**

**Tez Danışmanı**

**Prof. Dr. SAVAŞ KORKMAZ**

**ÇANAKKALE – 2023**





T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

**ÇANAKKALE İLİ BAĞ ALANLARINDA GRAPEVINE FANLEAF VIRUS'UN  
TESPİTİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYŞENUR ŞİRİN

Tez Danışmanı

Prof. Dr. SAVAŞ KORKMAZ

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FYL-2021-3747

ÇANAKKALE – 2023



T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



Ayşenur ŞİRİN tarafından Prof. Dr. Savaş KORKMAZ yönetiminde hazırlanan ve 13/07/2023 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus’un Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Bitki Koruma Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri**

**İmza**

Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

.....

(Danışman)

Doç. Dr. Mustafa USTA

.....

Doç. Dr. Ali KARANFİL

.....

Tez No : .....

Tez Savunma Tarihi : 13/07/2023

.....  
Prof. Dr. Ahmet Evren ERGİNAL

Enstitü Müdürü

.../.../2023

## ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Ayşenur ŞİRİN

13/07/2023

## TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleŐtirilmesinde, çalıŐmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Savaş KORKMAZ'a, çalışma sũresince benden yardımlarını, bilgisini ve tecrũbesini esirgemeyen hocam Doç. Dr. Ali KARANFİL'e, arazi ve laboratuvar çalıŐmalarını beraber yũrũttũęũm çalışma arkadaŐım Yũksek Lisans Őęrencisi Merve SARI'ya, tezin savunulması sırasındaki değerli katkılarından dolayı Doç. Dr. Mustafa USTA'ya teŐekkũrlerimi sunarım. Ayrıca hayatımın her evresinde bana destek olan babam Hũseyin ŞİRİN'e, annem Hatice ŞİRİN'e ve karŐılaŐtıęım tũm zorlukları benimle birlikte gũęũsleyen Mert ŐİMŐEK'e sonsuz teŐekkũr ederim.

Ayşenur ŞİRİN  
anakkale, Temmuz 2023

## ÖZET

### ÇANAKKALE İLİ BAĞ ALANLARINDA GRAPEVINE FANLEAF VIRUS'UN TESPİTİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Ayşenur ŞİRİN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

13/07/2023, 45

Bağ alanlarında üzüm verimini ve kalitesini düşüren en önemli faktörlerin başında hastalık ve zararlılar gelmektedir. Hastalıklar içerisinde ise virüslerin ekonomik düzeyde önemli sorun oluşturduğu bilinmektedir. Virüs hastalıkları ile mücadelenin zor olması ekonomik kayıpları daha da arttırmaktadır. Bugüne kadar ülkemizde yapılan çalışmalar kapsamında bağ üretim alanlarında birçok farklı virüs hastalığı enfeksiyonu tespit edilmiştir. Enfeksiyonu tespit edilen bu virüs hastalıklarından bir tanesi de grapevine fanleaf virus (GFLV)'dur. GFLV ile ilgili olarak ülkemizde çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen, çalışmaların büyük bir kısmı virüsün tespitine yönelik olmuş ve teşhis için çoğunlukla biyolojik yöntemler ya da ELISA testi kullanılmıştır. Virüsün moleküler karakterizasyonuna yönelik bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışma ile Çanakkale ili bağ üretim alanlarında GFLV'nin mevcut durumunun tespiti ve elde edilen belirli sayıda GFLV izolatlarının moleküler olarak kılıf protein gen bölgesine göre karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda Çanakkale ili ve ilçeleri bağ üretim alanlarında virüs ve virüs benzeri symptom gösteren 60bitkiden örnekler alınarak GFLV spesifik primer çifti ile ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) kullanılarak testlenmiştir. Testlemeler sonucunda GFLV ile enfekteli olarak bulunan örneklerden elde edilen 4 izolat seçilerek kendi içlerinde ve dünya izolatları ile göstermiş oldukları benzerlik ve filogenetik ilişkileri araştırılmıştır. Gerçekleştirilen testlemeler sonucunda toplanılan örneklerin 34'ünde GFLV enfeksiyonu tespit edilmiştir. Toplanılan örneklerdeki GFLV enfeksiyon oranı ise %56.66 olmuştur. Enfekteli örneklerde en dikkat çeken symptom tipi yapraklardaki sarımtrak klorozlar ve yaprak deformasyonları olarak belirlenmiştir. Moleküler karakterizasyon çalışmaları

sonucunda ise Türk ve dünya izolatlarının birbirleri ile %85 ve üzeri sekans benzerliği gösterdiği saptanmıştır. Filogenetik analizler sonucunda ise Türk izolatlarının iki farklı gruba dağılım gösterdiği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Bağ, GFLV, RT-PCR, Sekanslama





## ABSTRACT

### **DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF GRAPEVINE FANLEAF VIRUS IN VINEYARD GARDENS OF ÇANAKKALE PROVINCE**

Ayşenur ŞİRİN

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Plant Protection

Supervisor

Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

13/07/2023, 45

Diseases and pests are among the most important factors that lead to a reduction in the yield from grape production areas and quality of the grapes from these areas. Among such diseases, viruses are known to pose a significant economic problem. It is difficult to control plant virus related diseases. Due to these difficulties, yield losses increase. Within the scope of studies carried out in our country to date, many different viral disease infections have been detected in vineyard production areas. One of these viral diseases, whose infection has been detected, is grapevine fanleaf virus (GFLV). Although many studies on GFLV have been done in our country, most of the studies focused on the detection of the virus and biological methods or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests were mainly used for diagnosis. No studies have been conducted to date concerning the molecular characterization of the virus. Determining the current status of GFLV in the vineyard production areas of Çanakkale Province and performing a molecular characterization of a certain number of GFLV isolates according to the coat protein gene region were the aims of this study. In this context, samples were taken from 60 plants presenting virus and virus-like symptoms in the vineyard production areas of Çanakkale province and its districts. Samples were tested using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using a GFLV specific primer pair. Similarities and phylogenetic relationships between local samples and world isolates were investigated. As a result of the tests that were performed, GFLV infection was detected in 34 of the collected samples. The GFLV infection rate in the collected samples was 56.66%. The most striking symptom type in these samples was yellowish

chlorosis and leaf deformations. As a result of molecular characterization studies, it was determined that Turkish and world isolates showed 85% or more sequence similarity with each other. As a result of phylogenetic analysis, it was determined that Turkish isolates could be distributed into two different groups.

**Keywords:** Vineyard, GFLV, RT-PCR, Sequencing



# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

JÜRİ ONAY SAYFASI.....	i
ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii

## BİRİNCİ BÖLÜM

### GİRİŞ

1

## İKİNCİ BÖLÜM

### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

7

2.1. Dünyada GFLV ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	7
2.2. Ülkemizde GFLV ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	14

## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### MATERYAL ve YÖNTEM

20

3.1. Arazi Çalışmaları.....	20
3.2. Virüs Tanılama Çalışmaları.....	20
3.2.1 Total RNA İzolasyonu.....	20
3.2.2 Denatürasyon Aşaması.....	21
3.2.3 Ters Transkripsiyon Aşaması (RT).....	22
3.2.4 PCR Aşaması (Amplifikasyon).....	22
3.2.5 Agaroz Jel Elektroforezi.....	23
3.3. Biyoinformatik Analizler.....	23

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM  
ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Arazi ve Virüs Tanılama Çalışmaları.....	27
4.2. Biyoinformatik Analizler.....	32

BEŞİNCİ BÖLÜM  
SONUÇ ve ÖNERİLER

KAYNAKÇA .....	40
EKLER .....	I
EK 1. Çanakkale İli Grapevine Fanleaf Virus İzolatının (GFLV-8) Nükleotit Sekans Dizilimleri.....	I
EK 2. Çanakkale İli Grapevine Fanleaf Virus İzolatının (GFLV-11) Nükleotit Sekans Dizilimleri.....	I
EK 3. Çanakkale İli Grapevine Fanleaf Virus İzolatının (GFLV-17) Nükleotit Sekans Dizilimleri.....	II
EK 4. Çanakkale İli Grapevine Fanleaf Virus İzolatının (GFLV-19) Nükleotit Sekans Dizilimleri.....	II
EK 5. Çanakkale İli Grapevine Fanleaf Virus İzolatının (GFLV-8) Amino Asit Sekans Dizilimleri.....	III
EK 6. Çanakkale İli Grapevine Fanleaf Virus İzolatının (GFLV-11) Amino Asit Sekans Dizilimleri.....	III
EK 7. Çanakkale İli Grapevine Fanleaf Virus İzolatının (GFLV-17) Amino Asit Sekans Dizilimleri.....	III
EK 8. Çanakkale İli Grapevine Fanleaf Virus İzolatının (GFLV-19) Amino Asit Sekans Dizilimleri.....	IV
ÖZGEÇMİŞ .....	V

## SİMGELER VE KISALTMALAR

RT-PCR	Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
BAP	Bilimsel Araştırma Projeleri
GFLV	Grapevine fanleaf virus
CP	Kılıf Protein
bç	Baz Çifti
OLRV	Olive latent ringspot virus
CTAB	Cetyltrimethyl Ammonium Bromide



## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo No</b>	<b>Tablo Adı</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 1</b>	Dünyada üzüm üretim miktarı ve bağ alanları	2
<b>Tablo 2</b>	Türkiye 2019, 2020 ve 2021 yılları üzüm üretim miktarları ve bağ alanları	3
<b>Tablo 3</b>	İllere göre üzüm üretim miktarları	4
<b>Tablo 4</b>	Moleküler çalışmalarda kullanılan primer çiftleri	22
<b>Tablo 5</b>	Biyoinformatik analizlerde kullanılan bazı grapevine fanleaf virus (GFLV) izolatlarına ait bilgiler	25
<b>Tablo 6</b>	Çanakkale ili ve ilçeleri bağ üretim alanlarından toplanılan ve grapevine fanleaf virus (GFLV) ile enfekteli bulunan örnek sayıları ve GFLV enfeksiyon oranı	28

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Grapevine fanleaf virus'ün genom yapısı	5
Şekil 2	Agaroz jel elektroforezinde kuyucuklara RT-PCR ürünlerinin yüklenmesi	23
Şekil 3	Grapevine fanleaf virus izolatlarının nükleotit düzeyinde çoklu dizi karşılaştırmaları	26
Şekil 4	Grapevine fanleaf virus izolatlarının amino asit düzeyinde çoklu dizi karşılaştırmaları	26
Şekil 5	Grapevine fanleaf virus ile enfekteli asma bitkilerinde gözlenen belirtiler	30
Şekil 6	Toplanılan örneklerin RT-PCR ile testlenilmesine ait jel fotoğrafları	31
Şekil 7	Grapevine fanleaf virus izolatlarının RT-PCR ile kılıf protein genlerinin çoğaltılmasını gösteren agaroz jel elektroforez sonucu	32
Şekil 8	Grapevine fanleaf virus izolatlarının nükleotit düzeyinde birbirleri ile göstermiş oldukları sekans benzerlik oranları	34
Şekil 9	Grapevine fanleaf virus izolatlarının amino asit düzeyinde birbirleri ile göstermiş oldukları sekans benzerlik oranları	35
Şekil 10	Grapevine fanleaf virus izolatlarının nükleotit düzeyinde birbirleri ile göstermiş oldukları filogenetik ilişkiler	36

## BİRİNCİ BÖLÜM

### GİRİŞ

Asma (*Vitis vinifera*) anavatanı Kafkasya Anadolu olup tarihi M.Ö. 5000-3500'lere dayanan, dünyada ılıman iklim kuşağında yetişen önemli bir kültür bitkisidir. Jeolojik ve arkeolojik çalışmalar asmanın milyonlarca yıllık bir geçmişe sahip olduğunu ve dünyanın her yerinde yetiştiriciliğinin yapıldığını ortaya koymuştur. Yapılan kazı çalışmaları sonucunda yaklaşık 10.000 yıl önceye ait bulunan Pres artığı üzüm çekirdekleri üzümün asırlarca alkollü içecek yapımında kullanıldığının kanıtıdır. Anadolu'da bağcılık faaliyetleri de bu dönemlerde başlamıştır. Hititler döneminde kaya resimlerinde üzüm figürünün kullanılması Anadolu'da bağcılığın ne kadar önemli olduğunun kanıtlarındandır. Bunun yanında M.Ö. 1800-1550 yıllarında dini törenlerde ve bazı toplantılarda üzüm ve şarabın tanrılara adak olarak sunulduğuna dair bulunan kalıntılarda Anadolu'da bağcılığın çok uzun bir geçmişinin olduğunu göstermektedir. Asma ilk olarak M.Ö. 6000'li yıllarda kültüre alınmıştır. Ülkemizde asma gen kaynaklarının belirlenmesi ve korunmasına yönelik çalışmalar 1965 yılında başlatılmıştır (Tekdal ve Sarlar, 2016).

Anadolu coğrafyasında asma, binlerce yıldır kültüre alınan ve ürünleri tüketilen bitkiler arasında yer almıştır. Meyve üretiminde taze tüketim amacıyla sofralık olarak, şaraplık olarak, ayrıca kurutmalık, meyve suyu, pestil, pekmez ve konserve gibi ürünlerin yapımında da kullanılmaktadır. Asma meyvesi ve ürünleri besin içeriği bakımından oldukça zengindir. Yapılan araştırmalar sonucunda A, B, B2 ve C vitaminlerini bünyesinde bulundurmaktadır. Bunun yanında insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri bulunmaktadır. Asma ekonomik açıdan da önemli bir bitkidir. Ülkemizde en fazla ihraç edilen ürünler arasında yer almaktadır (Çelik, 2014).

Asma, Rhamnales takımının üç familyasından birisi olan Vitaceae familyası içerisinde bulunan bir bitkidir. Vitaceae familyası içerisinde 12 cinsi ve 700'e yakın türü barındırmaktadır. Kültür asmaları *Vitis* cinsinde bulunmaktadır.



Dünyada FAO 2020 yılı verilerine göre 6.950.930 da alanda 78.034.332 ton üzüm üretimi yapılmıştır. Üzüm üretiminde birinci sırada 14.843.091 ton üretim ile Çin, ikinci sırada 8.222.360 ton üretim ile İtalya, üçüncü sırada 6.817.770 ton üretim ile İspanya bulunmaktadır. Bunları Fransa, Amerika Birleşik Devletleri, Türkiye, Hindistan ve Şili takip etmektedir. Ülkemiz 4.208.908 ton üretim ile dünyada 6. sırada yer almaktadır. Bağ alanları bakımından birinci sırada 1.123.644 da alan ile İspanya, ikinci sırada Çin, üçüncü sırada Fransa bulunmaktadır. Bunları İtalya, Türkiye, Amerika, Şili ve Hindistan takip etmektedir (Tablo 1). Ülkemiz 417.041 da bağ alanı ile 5. sırada yer almaktadır. Dünyada 2020 yılı kuru üzüm ihracat oranlarına bakıldığında toplam ihracat miktarının (808 milyon ton) yaklaşık olarak %32'sini ülkemiz gerçekleştirmiştir (FAOSTATS, 2020).

Tablo 1

Dünyada üzüm üretim miktarı ve bağ alanları

No	Ülkeler	Üretim miktarı (ton)	Bağ alanı (da)
1	Çin	14.843.091	797.935
2	İtalya	8.222.360	675.818
3	İspanya	6.817.770	1.123.644
4	Fransa	5.388.679	752.837
5	Amerika	5.388.679	379.190
6	Türkiye	4.208.900	417.041
7	Hindistan	3.125.001	139.000
8	Şili	2.772.560	142.256
Toplam		78.034.332	6.950.930

Bağcılık faaliyeti ülkemiz ekonomisinde önemli bir yere sahiptir. Türkiye' de 2019 yılında 4.054.387 da alanda 4.100.000 ton, 2020 yılında 4.009.979 da alanda 4.208.908 ton, 2021 yılında neredeyse 4 milyon da alandan 3.67 milyon ton üzüm üretimi yapılmıştır (Tablo2). 2021 yılında gerçekleştirilen üretiminin 1.85 milyon tonluk kısmı sofralık olarak yaş üzüm, 1.43 milyon tonluk kısmı kuru üzüm veyaklaşık 383 bin tonluk kısmı da şaraplık üzüm olarak değerlendirilmiştir (TÜİK, 2021).

Tablo 2

Türkiye 2019, 2020 ve 2021 yılları üzüm üretim miktarları ve bağ alanları

Yıl	Bağ alanı (da)	Üretim miktarı (ton)
2019	4.054.387	4.100.000
2020	4.009.979	4.208.908
2021	3.902.211	3.670.000

Ülkemizde üzüm üretimi bakımından Manisa 1.308.370 ton üretim ile birinci sırada, Mersin 343.308 ton üretim ile ikinci sırada, Denizli 324.974 ton üretim ile üçüncü sırada yer almaktadır. Bunları Mardin, İzmir, Gaziantep, Diyarbakır, Nevşehir, Hatay, Konya, Kahramanmaraş, Kilis ve Çanakkale takip etmektedir (Tablo 3). Çanakkale’ de 2021 yılında 45.655 da alanda 38.600 tonluk üzüm üretimi yapılmıştır. Çanakkale üzüm üretimi bakımından 13. sırada yer alıp ülkedeki üzüm üretiminin %1.05’ ini karşılamaktadır. Ülkemiz dünyada kuru ve yaş üzüm ihracatında önemli bir yere sahiptir (Semerci vd., 2015).

Tablo 3

İllere göre üzüm üretim miktarları

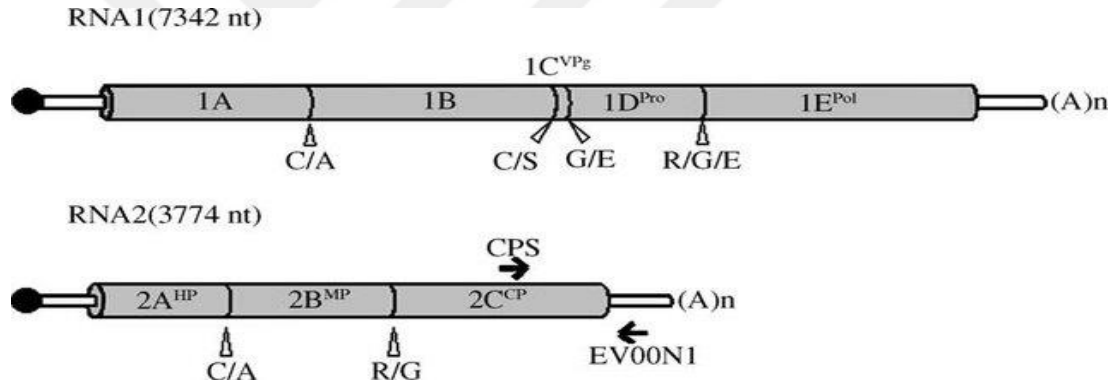
İller	Üretim miktarı (ton)
Manisa	1.308.370
Mersin	343.308
Denizli	324.974
Mardin	165.210
İzmir	133.576
Gaziantep	126.229
Diyarbakır	100.727
Nevşehir	90.751
Hatay	85.879
Konya	81.183
Kahramanmaraş	59.995
Kilis	51.685
Çanakkale	38.600
Toplam	3.670.000

Asma vejetatif yollar ile çoğaltılan bir bitkidir ve çok fazla sayıda zararlı ve patojenler bu kültür bitkisine zarar vermektedir (Türkmen, 2020). Bu patojen ve zararlılar bağ alanlarında önemli ölçüde verimde azalmalara, ürün kayıplarına ve asmalarda ömrün kılmasına sebep olmaktadır. Asmada birçok bitkide olduğu gibi hastalık ve zararlılar önemli kayıplara neden olmaktadır. Bu hastalık ve zararlılardan bazılarını örnek olarak bağ antraknozu (*Elsinoeampelina*), bağ mildiyözü (*Plasmoparaviticola*), kurşuni küf (*Botrytis cinerea*), bağ küllemesi (*Uncinulanecator*) ve salkım güvesi (*Lobesia botrana*) verilebilir.

Bunların dışında bağlarda önemli derecede ekonomik kayba neden olan bir diğer hastalık grubunu ise virüsler oluşturmaktadır. Çok sayıda viral etmenin ülkemiz bağ alanlarında enfeksiyonları bugüne kadar yapılan çalışmalar ile bildirilmiştir. Ülkemiz ve

dünyada bağ alanlarında enfeksiyona neden olan virüslerden bir tanesi de grapevine fanleaf virus (GFLV)'dir.

Asmanın en eski viral hastalığı olarak bilinen GFLV 1950'li yıllarda keşfedilmiştir. Dünyada asma yetiştiriciliğinin yapıldığı her yerde görülen ve ekonomik açıdan önemli bir virüstür. GFLV'nin konukçuları *Vitis vinifera* ve hibrit asma anaçları olarak bilinmektedir. Tüm *Vitis vinifera* çeşitleri GFLV'ye karşı duyarlı olup dayanıklı olarak bilinen tek bir çeşit bulunmamaktadır. GFLV, Secoviridae familyasından Nepovirus cinsine ait bir virüstür. Partikülleri 30 nm çapındadır. Segmentli bir genom yapısına sahip olan GFLV, RNA1 ve RNA2 olmak üzere iki parçalı bir genom içermektedir (Şekil 1). Viroinları +(ss)RNA yapısındadır.



Şekil 1. Grapevine fanleaf virus'ün genom yapısı (Demangeat vd., 2004)

Virüsün belirtileri iki farklı tipte görülmektedir. Bu belirtilerden ilki şekil bozukluklarıdır. Asma yapraklarının şeklinde bozulmalar, büzüşmeler ve dişlenmeler görülmektedir. Yapraktaki şekil bozukluklarının yanında nadir olarak klorotik beneklenme görülebilir. Sürgünlerde de anormal dallanmalar, çift boğum oluşumu, boğum aralarının kısalması, yassılaşımlar ve zigzag büyüme gibi deformasyonlar oluşmaktadır. Salkımlarda ise küçülme ve azalma görülmektedir. Normalden küçük tane tutumuna neden olabilmektedir. En tipik belirtilerinden biri ise yapraklarda sarı mozaik oluşumudur. Bahar mevsimi ile birlikte yapraklarda parlak sarımsı renk değişimleri görülür. Damarlarda veya damarlar arasında büyük lekeler görülebilir. Yazın artan sıcaklıklar ile beraber bu lekeler maskelenir. Bu iki tip belirtinin yanında damarlarda bantlaşmalar da görülmektedir

(Stellmach, 1973). GFLV üretim materyallerinden kalem, anaç, mekanik yollar ve vektörler ile taşınmaktadır. GFLV'nin vektörü Longidoridae familyasına ait kamalı nematodlar olarak adlandırılan *Xiphinema index* ve *X. italiae*'dir (Tülek, 2014).

GFLV ile ilgili ülkemizin bağ üretim alanlarında etmenin tanısına bazılarında da moleküler karakterizasyonuna yönelik bir çok çalışma yapılmıştır. Ancak Çanakkale ilinde hastalığın varlığına ve genetik çeşitliliğinin belirlenmesine yönelik gerçekleştirilmiş bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bağlamda bu çalışma kapsamında Çanakkale ili ve ilçelerinde GFLV benzeri belirti gösteren asmalardan örneklemeler yapılmıştır. Bu örnekler RT-PCR yöntemi ile gen spesifik primer çiftleri kullanılarak GFLV enfeksiyonu açısından testlenmiştir. Testlemeler sonucunda elde edilen izolat sayısına bağlı olarak 4 izolatın kılıf protein (Coat protein; CP) genine göre genetik çeşitliliğine yönelik analizler gerçekleştirilmiştir.

## İKİNCİ BÖLÜM

### ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Asmaların en önemli virüs hastalıklarından biri olan grapevine fanleaf virus (GFLV) ilk olarak 1840'lı yıllarda Cazalis-Allut (1865) tarafından Fransa'da tanımlanmıştır. 1900'lü yılların başlarında Petri (1918) etmenin hastalıklı bağ toprağından bulaştığını deneysel olarak göstermiştir. İzleyen yıllarda hastalık etmeni başta Avrupa, Asya, Afrika, Güney ve Kuzey Amerika, Avustralya ve Yeni Zelanda olmak üzere dünya da bağcılık yapılan bir çok kıta ve ülkede tespit edilmiştir (Bovey vd., 1990; Martelli ve Savino, 1990). Hewitt vd., (1958) ise GFLV'nin arazi koşullarında asmadan asmaya ektoparazit bir nematod olan *Xiphinema index* ile taşındığını saptamıştır. 1950'lerin sonlarından ve 1960'ların başından itibaren GFLV'nin ve nematod vektörünün keşfinden bu yana, etmenin taşınması, biyolojik ve serolojik özelliklerinin belirlenmesi, genom yapısı ve ekspresyonu ile ilgili bir çok çalışma yapılmış ve aynı zamanda mücadele yöntemleri hakkında yeni stratejiler geliştirilmeye başlanmıştır (Martelli vd., 2003). Ülkemizde ise bağ virüsleri ile ilgili ilk gözlemler 1940'lı yılların ortalarında yapılmıştır (Akdoğan, 1965). Bu yıllarda Trakya bağlarında fizyolojik belirtiler şeklinde ortaya çıkan semptomların daha sonra soysuzlaşma (GFLV) hastalığı ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Daha sonraki yıllarda 1960'larda Ege Bölgesi bağlarında (Kaşkaloğlu, 1965), 1970'lerde ise Akdeniz Bölgesi bağlarında (Tekinel vd., 1972) GFLV semptomolojik olarak gözlenmiştir. GFLV ile ilgili çalışmalar 1990'lı yıllardan itibaren virüsün biyolojik ve serolojik teşhisine yönelik olarak hız kazanmıştır.

#### 2.1. Dünyada GFLV ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Walker vd. (1985) yaptıkları bir çalışmada GFLV'ye karşı dayanıklı olan asma ırklarını belirlemeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla bağ alanlarından Vitis türlerini, çeşitlerini ve melezlerini içeren 173 adet asma örneğini toplamışlardır. Bu örnekleri enfekteli kalemler üzerine aşılamışlar ve ELISA testi ile testlenmişlerdir. Bu çalışma sonucunda, *V. rotundifolia* çeşidi olan Bountiful, VR hibritlerinden ve Ortadoğu'dan bir *V. vinifera* jenerasyonu GFLV'ye dayanıklı bulunmuştur. Ayrıca bu çalışma sonucunda GFLV'nin konukçusu olan *V. vinifera* asmaları virüse karşı hassas olduğu tespit edilmiştir.

Rowhani (1992), grapevine fanleaf virus'un (GFLV) ELISA ile tasında mevsimsel farklılıkların, konukçu genotipinin, virüs izolatlarının ve farklı doku örneklerinin etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar GFLV'nin serolojik olarak üç farklı izolatını (yelpaze yaprak deformasyonu, damar bantlaşması ve sarı mozaik) iki farklı asma çeşidine inokule ederek ELISA testlerinde kullanmışlardır. Testleme çalışmalarında inokule edilen bitkilerin sürgün uçları, olgun yaprakları ve kambiyal dokuları kullanılmıştır. Aynı zamanda GFLV ile enfekteli asma bitkilerinin durgun döneminde farklı dokular (kabuk, kambiyal doku, inaktif tomurcuklar, uyanmış sürgünler, kökler ve kallus) alınarak testleme çalışmalarına dahil edilmiştir. GFLV testlemelerinde virüs izolatları ve farklı konukçular açısından bir fark görülmemiştir. Ancak farklı mevsimlerde yapılan testlemelerde önemli farklar oluşmuştur. Enfekteli sürgünlerden alınan örneklerle yapılan çalışmalarda en yüksek konsantrasyona Mayıs ayında ulaşılırken en düşük konsantrasyon değeri ise Eylül ayında görülmüştür. Olgun yapraklarda ise en yüksek değer yine Mayıs ayında görülürken mevsim sonlarına doğru bu değerler azalmıştır. Kambiyal dokularda ise genellikle yüksek değerler görülürken mevsimsel olarak bu değerlerde çok fazla bir değişkenlik gözlenmemiştir. GFLV ile enfekte olmuş dormant sürgünler test edildiğinde, indüklenmiş aktif olarak büyüyen dokular en yüksek ELISA değerlerine ulaşmıştır.

Rowhani vd. (1993), yaptıkları çalışmada bugün virüslerin varlığının tespit edildiği çalışmalarda başarıyla kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) metodunu enfekteli asma dokularından GFLV varlığını tespit etmek amacı ile geliştirmişlerdir. Gerçekleştirdikleri bu yöntem ile GFLV'in tanısı mümkün olmuştur.

Anfoka vd. (2004), Ürdün'de asmaların yaygın olarak yetiştirildiği bölgelerde GFLV ve grapevine leaf-roll associated virus-3 (GLRaV-3)'ü, DAS-ELISA ile tespit etmişlerdir. Spesifik primer çiftleri kullanarak, GLRaV-3'ün RNA-bağımlı RNA polimeraz (RdRp) geni ve GFLV'nin kılıf proteini (CP) geni bölgelerini Immunocapture-RT-PCR ile semptomatik asma dokularından amplifiye etmişlerdir. Klonlama ve sekanslamadan sonra, amplifiye edilen bölgelerin sekansları Genbank'a yüklenmiştir. Yapılan benzerlik analizleri sonucunda, Ürdün GFLV izolatının (GFLV-JOR) CP geninin, dünyanın farklı bölgelerinden 11 GFLV izolatı ile %82 ile %88 arasında sekans benzerliğine sahip olduğunu, GLRaV-3'ün

(GLRaV-3-JOR) RdRp geninin ise Brezilya, ABD, Çek Cumhuriyeti ve Çin izolatlar arasında yüksek bir sekans benzerliği (%95-99) gösterdiğini saptamışlardır.

Fattouch vd. (2005), yaptıkları çalışmada Tunus'un Kuzey bölgesinde bulunan ve doğal yollarla enfekte olmuş *Vitis vinifera* türü asmalarda GFLV'nin genetik çeşitliliğini araştırmışlardır. Bu bölgede *V. vinifera* türü asmalardan örnekler toplamışlar ve bu örnekleri DAS-ELISA yöntemi ile testlemişlerdir. Testlemeler sonucunda 20 örneğin GFLV ile enfekteli olduğunu bulmuşlardır.

Pourrahim vd. (2007), İran'ın kuzey doğusunda bulunan iki farklı bölgeden elde edilen beş farklı grapevine fanleaf virus (GFLV) izolatını, örtü proteini (CP) gen dizilerine dayalı olarak karakterize etmişlerdir. Tüm izolatların CP geni kendi spesifik primerleri kullanılarak RT-PCR ile amplifiye edilmiş ve 1500 bp'lik bir amplikon elde edilmiştir. Bu 5 izolat için nükleotid dizileri belirlenmiş ve bu izolatların İran'ın farklı bölgelerinden elde edilen yedi izolat ve GenBank'ta bulunan bazı diğer egzotik izolatlarla CP gen dizileri karşılaştırılmıştır. Analizler sonucunda bu izolatların GenBank'tan elde edilen egzotik GFLV izolatlarının CP gen bölgeleriyle %83.7-87.5 homolojiye ve kuzeybatı İran'dan gelen diğer izolatlarla %83.0-87.1 homolojiye sahip olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen GFLV izolatları kendi arasında %98.6 ile %100 arasında bir benzerlik göstermiştir. Oluşturulan filogenetik ağaçta ise iki ana grup oluşmuştur. Birinci ana grupta dünya izolatları yer alırken ikinci ana grupta ise İran izolatlarının kümelendiği görülmüştür.

Bashir ve Hajizadeh (2007), İran'ın Kuzey batısındaki bağ alanlarında 2003-2004 yılı ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde yaptıkları bir çalışmada tipik olarak GFLV benzeri semptom gösteren asma bitkilerinden toplam 134 örnek almışlar ve bu örnekleri ELISA yöntemi ile testlemişlerdir. Testlemeler sonucunda 134 örneğin 31'i grapevine fanleaf virus ile enfekteli olarak bulunmuştur. Enfekteli bulunan örnekler virüsün kılıf protein gen bölgesi için geliştirilen iki primer seti ile RT-PCR yöntemi kullanılarak test edilmiş ancak bazı izolatlar beklenen büyüklükte bant oluştururken bazı izolatlar negatif sonuç vermiştir. Pozitif sonuç veren izolatlar içinden toplam 5 izolat seçilerek kılıf protein gen bölgesi çoğaltılarak klonlanmış ve nükleotid dizileri elde edilmiştir. Bu beş izolat kendi arasında nükleotid



düzeyinde %84-95 oranında, Genbank'tan elde edilen dünya izolatları ile %84-91 oranında bir benzerlik gösterdiği görülmüştür.

Bashir vd. (2007), İran'ın kuzeybatı bölgesindeki üzüm bağlarından alınan 126 asma örneğini ELISA ile testlemişler ve toplam 33 örneği GFLV ile enfekteli bulmuşlardır. Enfekteli bulunan örnekler içinden 8 izolat seçilerek virüsün kılıf protein geni ve RNA 2'nin 3' kodlanmayan bölgesine karşılık gelen gen bölgesi RT-PCR ile analiz edilmiştir. Analizler sonucunda seçilen üç izolattın (B5, S1 ve SH3) PCR ürünleri klonlanmış ve her izolattan üç klonun nükleotid dizileri belirlenmiştir. Dizilemeler sonucunda, S1 izolatından 1623 bp ve B5 ve SH3 izolatlarından 1629 bp'lik bir DNA fragmentinin çoğaltıldığı görülmüştür. Nükleotid dizi analizlerinde her izolattan klonlar arasında %99'un üzerinde ve farklı izolatlardan klonlar arasında %83-93 arasında bir benzerlik olduğu görülmüştür. İran izolatları ile daha önceden GenBank'ta bulunan dünya izolatları arasında ise benzerlik oranı %83-94 arasında bulunmuştur. CP dizilerine dayanan filogenetik analizlerde, S1 ve SH3 izolatlarının ayrı bir küme oluşturduğu, ancak B5 izolatının daha önce bildirilen GFLV izolatları ile aynı grup içinde yer aldığı görülmüştür.

Liebenberg vd. (2009), Güney Afrika'nın Batı Cape Bölgesi'nde doğal yollarla enfekte olmuş asmalarda GFLV'nin genetik çeşitliliğini araştırmışlar ve ayrıca GFLV'nin tespitinde kullanılan üç yöntemin bazı özelliklerini analiz etmişlerdir. Araziden toplanan örnekleri DAS ELISA yöntemi ile testlenmişler ve testlemeler sonucunda 12 örneği GFLV ile enfekteli bulmuşlardır. Pozitif bulunan örnekleri GFLV'nin kılıf protein gen bölgesi kullanılarak RT-PCR yöntemi ile testlemişlerdir. Sekans analizleri sonucunda izolatların Güney Afrika'daki farklı GFLV izolatları ile nükleotid düzeyinde %86-99, amino asit düzeyinde %94-99 oranında benzerlik gösterdiğini görmüşlerdir. Ayrıca RT-PCR yönteminin teşhis için en güvenilir yöntem olduğu belirtilmiştir.

Eichmeier vd. (2010), Çek Cumhuriyeti'nin Güney Moravia bölgesinden doğal yollarla enfekte olmuş asmalarda ve Bari'de bulunan asmalarda GFLV'nin genetik çeşitliliğini karakterize etmişlerdir. Bu bölgelerde bulunan asmalardan yapılan örnekleme sonucunda Güney Moravia'dan 4 örnek, Bari'den ise 2 örnek GFLV ile enfekteli

bulunmuştur. Enfekteli bulunan örnekler GFLV'nin kılıf proteini gen bölgesi kullanılarak RT-PCR ile testlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda Çek izolatları arasında belirgin bir benzerlik ve dünya izolatları ile yüksek oranda farklılıklar gösterdiği görülmüştür.

Cepin vd. (2010), asma yaprağı dejenerasyonu hastalığının etmeni olan grapevine fanleaf virus'ün (GFLV) spesifik tanısı ve nispi miktar tayini için TaqMan® tek adımlı ters transkripsiyon gerçek zamanlı PCR (RT-qPCR) testini geliştirmişlerdir. Testlemeler, GFLV'nin RNA2 molekülünün 2AHP geninde bulunan koruyucu bir bölge hedef alınarak yapılmıştır. Araştırmacılar testin özgüllüğünü, çok çeşitli coğrafi bölgelerden elde edilen GFLV izolatları ve asmaları enfekte eden diğer virüsler üzerinde değerlendirmiştir. GFLV tanısı için geliştirilen testin duyarlılığı, geleneksel ELISA'nın duyarlılığından yaklaşık 1000 kat daha yüksek bulunmuştur. Reaksiyon başına GFLV'nin 10 genom kopyası kadar düşük konsantrasyonlar, RT-qPCR etkin ve hızlı olarak tanılanmıştır. Bu yeni yöntem GFLV için güvenilir bir tanımlama yöntemi olarak değerlendirilmiş ve durgun dönemdeki floem kazımları da dahil olmak üzere farklı asma çeşitlerinde GFLV'nin teşhisi için başarıyla uygulanabileceği belirtilmiştir.

Fiore vd. (2011), Şili'de Atacama bölgesinde bulunan bağlardaki virüslerin varlığını belirlemeyi amaçlamışlardır. Virüs ve virüs benzeri simptomlar gösteren bitkilerden 1000 örnek alınmıştır. Alınan bu örnekler RT-PCR yöntemi ile testlenmiştir. Bu çalışma sonucunda GLRaV-2 %46,8, GFkV için %30,7, grapevine virus A (GVA) için %12,3 GFLV için %9,6, GLRaV-3 %9,1 ve GLRaV-1 için %8,8 oranında pozitif örnek saptanmıştır.

Sokhandan-Bashir vd. (2011), İran'da bir çalışma yürütmüşler ve tipik simptom gösteren 330 asma yaprağı örneğini DAS-ELISA yöntemi ile testlemişlerdir. Testlemeler sonucunda 330 örneğin 89'u grapevine fanleaf virus (GFLV) ile enfekteli olarak bulunmuştur. Enfekteli bulunan örneklerden 16'sı GVFL'nin örtü protein geninin tamamını içeren bölgesi RT-PCR ile çoğaltılmış ve 8 örnek ise klonlanmış ve sekanslanmıştır. Sekanslanan izolatlar kendi arasında nükleotid düzeyinde %92 ile % 98 arasında bir benzerlik göstermişlerdir. Filogenetik çalışmalarda ise B-5 izolatı dışındaki İran izolatlarının diğer ülkelerin izolatlarından farklı olarak ayrı bir grup oluşturduğu görülmüştür.

Palomares-Rius vd. (2012), İspanya'nın güneyindeki Endülüs bölgesinde 74 üzüm bağında GFLV'nin varlığını ve RNA2 üzerindeki kılıf proteini (CP) geninin genetik değişkenliğini araştırmışlardır. Araştırmada GFLV ile ortalama enfeksiyon oranı %24.3 olarak bulunmuş ve enfekteli bitkilerde genel olarak gelişmede bir gerileme, yelpaze yaprağı deseni ve sarı mozaik semptomları gözlenmiştir. Ayrıca GFLV ile enfekteli bitkilerin kök bölgelerinden alınan toprak örneklerinde virüse vektörlük yapan *Xiphinema index*'i ve aynı zamanda potansiyel vektör adayları olan ve *X. italiae*'nin varlığı belirlenmiştir. Enfekteli bitki ve nematod vektörlerinden RT-PCR ile beklenen boyutta (555 bp) kısmi CP gen ürünü başarıyla elde edilmiştir. Kısmi GFLV CP geninin toplam 135 klonu, tek zincirli konformasyonel polimorfizm kullanılarak dizi varyasyonu için analiz edilmiş ve 12 farklı haplotip modeli içerdiği görülmüştür. Dizi analizleri sonucunda GFLV haplotiplerinin, haplotipler içindeki dizi değişkenliği ve aynı dizili haplotip modelinde bazı varyantların diğerlerinden daha fazla olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, güney İspanya'daki GFLV'nin, dünyanın diğer asma yetiştirilen bölgelerinde bildirildiği gibi, bir "quasispecies" olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmanın, İspanya'da Endülüs bölgesinde GFLV'nin moleküler çeşitliliği üzerine ilk bilgiler olduğu belirtilmiştir.

Sokhandan-Bashir ve Melcher (2012), İran'da yaptıkları bir çalışmada optimize ettikleri bir ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) protokolü ile RNA2 geni üzerinde bulunan hypothetical protein (2AHP) bölgesini çoğaltmışlardır. Çoğaltılan bölgenin sekans analizleri sonucunda 2AHP bölgesi gen dizisinin gen bankasından elde edilen diğer ülkelerin GFLV izolat/streynleri ile %82-86 arasında bir benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir. İran izolatlarına en az benzeyen izolatın %82 benzerlik ile CAZINA1 (ABD) olurken, en yakın izolatın ise %86 benzerlik ile Vol51C4 (Slovenya) olduğu görülmüştür. Filogenetik analizlerde ise İran izolatının dünyanın diğer bölgelerinden elde edilen izolatlar ile ayrı bir grup oluşturduğu ve bu çalışma ile ilk kez 2AHP genine dayalı İran GFLV izolatının karakterizasyonunun yapıldığı bildirilmiştir.

Zarghani vd. (2013), GFLV'nin İran izolatlarının genomik RNA2 segmentini karakterize etmek için, farklı lokasyonlardaki enfekteli bağlardan yaprak örnekleri toplamışlardır. RT-PCR çalışmaları sonucunda RT-PCR ürünlerinin profilleri temelinde klonlama ve dizileme için dört izolat seçilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucu sekans verilerine

göre İran GFLV izolatlarının RNA2 genomunun daha önce açıklanan tüm GFLV izolatlarınınki ile karşılaştırıldığında en kısa genoma sahip olduğu belirlenmiştir. GFLV RNA2'nin tam uzunluktaki nükleotid dizilerine dayanan filogenetik ağaçta, Macar izolatu hariç tüm GFLV izolatlarının iki grup halinde kümelenildiği, İran izolatlarının ise ayrı bir küme oluşturduğu görülmüştür.

Zhou vd. (2015), Çin'de yaptıkları bir çalışmada GFLV enfeksiyonu varlığını ve genetik çeşitliliğini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda elde ettikleri izolatların hareket proteini (MP) ve kılıf proteini (CP) PCR ürünleri klonlanmış ve sekanslanmıştır. Benzerlik analizlerinde her iki proteinin gerek nükleotit gerekse amino asit düzeyinde benzerlik oranları %94.9 ile %100 arasında gerçekleşmiştir. Filogenetik analizlerde ise Çin GFLV izolatları Genbank'ta rapor edilen izolatlardan farklı bir grup oluşturmuştur.

Krebelj vd. (2015), farklı sezonlarda bitki dokularında GFLV'nin konsantrasyonları ile ilişkili bir çalışma yürütmüşlerdir. Araştırmacılar çalışma kapsamında, genç yaprakların tüm vejetatif dönemi boyunca yüksek virüs konsantrasyonuna sahip olduğunu, olgun yapraklar, dallar ve çiçek/meyve kümelerinin sadece vejetatif dönemin başlangıcında yüksek konsantrasyon içerdiğini diğer zamanlarda bu konsantrasyonun düştüğünü saptamışlardır. Bununla birlikte, meyveler olgunlaştıktan sonra tohumların yüksek virüs içeriğini koruduğunu belirtmişlerdir. Floem dokuları ile yapılan çalışmalarda ise bu dokuların vejetatif periyot sırasında düşük konsantrasyona sahip olduğunu, vejetatif periyodun başında ve dışında konsantrasyonda bir artış gösterdiğini bulmuşlardır. Çiçek/meyve kümelerinde, olgun yapraklarda ve dallarda, vejetatif dönem boyunca GFLV konsantrasyonunun önemli ölçüde azaldığını saptamışlardır. ELISA ile elde edilen yarı nicel sonuçların, qPCR ile doğrulandığını belirtmişlerdir.

M'Rabet vd. (2019), Kuzey Tunus'ta grapevine fanleaf virus'un etiyolojisi ile ilgili bir çalışma yürütmüşlerdir. Araştırmacılar 2016-2017 yıllarında bağ alanlarında bir sörvey çalışması yapmışlar ve GFLV semptomu gösteren bitkilerden 178 örnek toplamışlardır. Serolojik analiz sonucunda toplanan örneklerin %36'sı GFLV ile enfekteli olarak bulunmuştur. Çalışmada İlkbaharda arazide görülen semptomlarla bu hastalığın serolojik

tanısı arasında ilişki gözlemlenmiştir. Ayrıca polenin doğal koşullar altında GFLV'in viral partiküllerinin çok etkili bir taşıyıcısı olduğunu saptamışlardır. Asma-vektör etkileşimi çalışması kapsamında ise, *Xiphinema* cinsine ait ektoparazitik nematodların farklı üzüm bağlarında homojen bir dağılıma sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca GFLV, enfekteli asma bitkilerinin bulunduğu toprak rizosfer tabakasından elde edilen nematod vektöründe DAS-ELISA ile saptanmıştır.

Shehu vd. (2019), yaptıkları çalışmada Arnavutluk'un Durres bölgesindeki alanlar ile Rrashbull, Synej, Arapaj ve Ramanat köylerinde GFLV' nin varlığını araştırmışlardır. Bölgedeki bağ alanlarından virüs ve virüs benzeri semptomlar gösteren 82 örnek toplamışlar ve bu örnekleri DAS-ELISA ile testlemişlerdir. Bu çalışma sonucunda Rrashbull ve Arapaj'dan alınan örneklerde GFLV enfeksiyonu tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Rivadeneria vd. (2022), Arjantin'in kuzeybatı bölgesindeki Calchaquies Vadilerinde bulunan ticari üzüm bağlarında sekiz asma virüsünün varlığını belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışma kapsamında hiçbir virüs benzeri semptom göstermeyen veya gösteren toplam 103 olgun asma sürgün örneğini rastgele toplamışlardır. Toplanan örnekler, içlerinde GFLV'nda olduğu çok sayıda viral etmen açısından testlenmiştir. Gerçekleştirilen testler sonucunda %21 oranında GFLV enfeksiyonu tespit edilmiştir. Bu çalışma, Arjantinde Calchaquies Vadileri bölgesinde asma virüslerinin varlığına ilişkin ilk araştırma raporu olduğu vurgulanmıştır.

## **2.2. Ülkemizde GFLV ile İlgili Yapılan Çalışmalar**

Azeri (1983), yaptığı çalışmada İzmir ve Manisa bölgesindeki bağlarda bulunan Sultani çekirdeksiz çeşidinde gözlemsel olarak virüslerin varlığına yönelik bir çalışma yürütmüştür. Bu çalışmanın sonucunda GFLV'nin bölgede yoğun olarak görüldüğü tespit edilmiş ve GFLV'nin enfeksiyon oranı çok yüksek olarak saptanmıştır.

Azeri ve Fidan (1988), yaptıkları çalışmada İzmir ve Manisa illerinde bağlarda GFLV varlığını araştırmışlardır. Bu çalışma sonucunda GFLV'nin varlığını indikatör bitkiler üzerinde yapılan indekslemeler ile saptamışlardır.

Akbaş ve Erdiller (1993), yaptıkları çalışmada Ankara ilinde bağ alanlarında grapevine fanleaf virus (GFLV)'un varlığını araştırmışlardır. Çalışma sonucunda bağ alanlarında GFLV varlığı simptomolojik olarak ve serolojik yöntemlerle tespit edilmiştir.

Özaslan vd. (1994), yaptıkları bir çalışmada Kahramanmaraş ili ve ilçelerinde bulunan bağlarda grapevine fanleaf virus (GFLV), arabis mosaic virus (ArMV), grapevine fleck virus (GFkV), grapevine leafroll associated virus (GLRaV)-1 ve 3'ün varlığını araştırmışlardır. Bağ alanlarından toplam 70 örnek toplamışlar ve örnekleri ELISA yöntemi ile testlemişlerdir. Testlemeler sonucunda toplanan 70 örnekten 31'inin bir ya da daha fazla virüs ile enfekteli olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışma da GLRaV-3 ve 1'in en fazla bulunan virüsler olduğu bunları ArMV ve GFLV'nin izlediği belirtilmiştir. Ayrıca bu virüslerin bağlarda %45 oranında ürün kayıplarına neden olduğu gözlenmiştir.

Özaslan vd. (1995), ülkemizin Doğu Akdeniz ve Güney Doğu Anadolu bölgelerinde bağ üretimi yapılan alanlarında bağ virüslerinin varlığına yönelik bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışma kapsamında tipik virüs belirtileri gösteren asma bitkilerinden sürgün ve yaprak örnekleri toplamışlardır. Toplanan 190 örnek biyolojik ve serolojik yöntemlerle test edilmiştir. Biyolojik testlemeler sonucunda 190 örneğin 89'u grapevine fanleaf virus (GFLV) ve grapevine leaf rugose virus (GLRV) ile enfekteli olduğu saptanmıştır. Serolojik testlemelerde ise 199 örnekten 107'si bir ya da birden fazla virüs ile enfekteli olarak bulunmuştur. Çalışmada en fazla bulunan virüsün GFLV olduğu belirlenmiştir.

Akbaş (1998), yaptığı çalışmada Karaman, Konya ve Nevşehir illeri ve çevresinde bulunan bağlarda grapevine fanleaf virus (GFLV)'un varlığını araştırmıştır. Bağ alanlarından 334 adet örnek toplamış ve bu örnekler biyolojik ve serolojik testlere tabi tutmuştur. Bu çalışmanın sonucunda en yaygın olarak görülen viral hastalığın GFLV olduğunu belirtmiştir.

Köklü vd. (1998), yaptıkları çalışmada Trakya Bölgesi'nde Tekirdağ, Edirne illeri ve Şarköy ilçesinde bulunan bağlarda GFLV'nin varlığını araştırmışlardır. Bu bağ alanlarından toplanan 65 asma örneği testlere tabi tutulmuştur. Bu çalışmanın sonucunda örneklerin %92.7'sinde en az bir virüs hastalığı enfeksiyonu tespit ederlerken, örneklerin %14.5'inde ise GFLV enfeksiyonu tespit etmişlerdir.

Çığışar vd. (2002), Güneydoğu Anadolu bölgesi ve Nevşehir ili bağ üretim alanlarında 1999-2002 yılları arasında virüs ve virüs benzeri hastalıkların durumunu belirlemek amacıyla bir çalışma yürütmüştür. Altı ilde yapılan sörveyler sonucunda toplam 1001 yaprak örneği toplayarak testlemiştir. Testlemeler biyolojik ve serolojik yöntemlerle yapılmıştır. Testlenen örneklerin %54,1'inin en az bir virüsle bulaşık olduğu saptanmıştır. En yaygın virüs %41,2'lik oranla GVA olup bunu %38,1 ile GLRaV-1, %8,1 ile GFLV ve %5,4 GFkV izlemiştir.

Tarla (2005), yaptığı çalışmada Adana ve Mersin çevresindeki bağ alanlarında grapevine fanleaf virus (GFLV)'ün varlığını araştırmıştır. Bu bağ alanlarından 384 örnek toplanmış ve bu örnekler DAS- ELISA yöntemiyle testlenmiştir. Testlemeler sonucunda 63 örnekte GFLV varlığı tespit edilmiştir.

Kaya ve Erilmez (2014) İzmir, Denizli, Çanakkale ve Manisa illeri bağ alanlarında iki farklı yıllarda bir arazi çalışması yürüterek virüs simptomları gösteren bitkilerden güdümlü örnekleme yöntemi kullanarak yaprak ve sürgün örnekleri toplamışlardır. Çalışma bağ alanlarında ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde olmak üzere iki farklı sezonda yapılmış ve toplam 746 örnek toplanmıştır. Örnekler serolojik bir yöntem olan ELISA ve moleküler bir yöntem olan RT-PCR ile testlenmiştir. Testlemeler sonucunda GFLV ile birlikte birçok bağ virüsü enfeksiyonu da tespit edilmiştir. Ayrıca araştırmacılar her iki tanı yönteminin birbiriyle paralel bir sonuç verdiğini belirtmiştir.

Tülek (2014), Trakya bölgesi bağ alanlarında grapevine fanleaf virus (GFLV)'ün varlığını araştırmak ve vektör nematod *Xiphinema index*'in yaygınlık durumunu belirlemek amacıyla bir çalışma yürütmüştür. Çalışma kapsamında tipik GFLV'nin simptomuna benzer

simptom gösteren bitkilerden sürgün, yaprak, petiol ve kambiyal doku örnekleri almıştır. Ayrıca virüs benzeri symptom gösteren bitkilerin kök bölgesinden toprak örnekleri de almıştır. İki yıl süresince toplam 152 örnek alınmış ve ELISA yöntemi ile GFLV açısından testlenmiştir. Analizler sonucunda 35 örnekte GFLV enfeksiyonu bulunmuştur. Enfekteli bulunan 38 örneğin etrafından alınan toprak örneklerinin 9'unda ise *X. index* nematoduna rastlanılmıştır. Ayrıca çalışmanın yapıldığı bağ alanlarında diğer bir nematod olan *X. pachtaicum*'un yaygın olduğu tespit edilmiştir.

Tarla ve Asil Yılmaz (2015), Adana ve Mersin illeri bağ üretim alanlarında 2002-2003 yıllarında bir çalışma yürüterek virüs symptomları gösteren bitkilerden yaprak ve kabuk dokuları almışlardır. Çalışma kapsamında toplam 384 örnek alınmış ve bu örnekler grapevine fanleaf virus (GFLV)'un varlığını belirlemek amacıyla ELISA yöntemi ile testlenmiştir. Testlemeler sonucunda 63 örnek enfekteli bulunmuş ve enfeksiyon oranı % 16.4 olarak gerçekleşmiştir. Çalışma kapsamında ayrıca mekanik inokulasyon denemeleri de yapılmıştır. İnokulasyonlar sonucunda *Nicotiana benthamiana* bitkisinde lokal lezyonlar görülmüştür. Diğer otsu bitkilerde herhangi bir symptom gözlenmemiştir.

Önder vd. (2016a), Ülkemiz bağlarında sorun oluşturan ve yaygın olarak bulunan grapevine fanleaf virus (GFLV)'u klasik RT-PCR ve gerçek zamanlı RT-PCR kullanarak teslemişlerdir. Çalışma kapsamında daha önceden serolojik yöntemlerle test edilmiş enfekteli bulunan ve sağlıklı örnekler kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar birbiriyle kıyaslandığında her iki moleküler yöntemde GFLV'nin teşhisinde başarıyla kullanıldığı belirtilmiştir. Bununla birlikte real-time RT-PCR'ın çok daha hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğu, klasik PCR'dan sonraki jel elektroforez ve görüntülenme aşamasına gereksinim duyulmadığı için olası bulaşıklık riskini de ortadan kaldırdığı vurgulanmıştır.

Önder vd. (2016b), bir başka çalışmada Ege bölgesi bağ üretim alanlarında iki yıl süreli yaptıkları bir sorveyde farklı asma çeşitlerinden virüs ve virüs benzeri symptom gösteren toplam 423 örnek almışlardır. Alınan yaprak ve sürgün örnekleri grapevine fanleaf virus (GFLV)'un varlığını belirlemek amacıyla serolojik bir yöntem olan ELISA ile testlemişler ve örneklerin 88'inin GFLV ile enfekteli olduğunu tespit etmişlerdir. Örneklemeye



yapılan Manisa, Denizli ve İzmir illerinde GFLV tespit edilirken Uşak ve Aydın illerinde ise virüse rastlanılmamıştır. Çeşit bazında ise en yüksek enfeksiyon oranı Sultani çekirdeksiz çeşidinde görülmüştür.

Balsak (2016), yaptığı çalışmada Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde bulunan bağlarda yerli asma çeşitleri üzerinde grapevine fanleaf virus (GFLV)'ün tanınmasını gerçekleştirmiştir. Bu bağ alanlarından 206 örnek toplanmış ve örnekler virüs spesifik primerle RT-PCR yöntemiyle testlenmiştir. Bu çalışma sonucunda RT-PCR testlerinde ilgili gen bölgelerine karşılık istenilen büyüklükte DNA bantlarını elde edilmiştir.

Erilmez ve Kaya (2016), bağlarda sorun oluşturan virüs hastalıklarının tanısında serolojik bir yöntem olan ELISA ve moleküler bir yöntem olan RT-PCR'ı aynı örnekler için kullanarak yöntemlerin duyarlılıklarını birbiriyle kıyaslamışlardır. Bu amaçla Ege bölgesinin bağ üretimi yapılan iki önemli ilinden virüs hastalıkları belirtilen gösteren toplam 50 örnek toplamışlardır. Toplanan örnekleri birçok viral etmen açısından testlemişlerdir. Testlemeler sonucunda GFLV enfeksiyonunu da tespit etmişlerdir.

Karadeniz vd. (2018), Tokat ili ve ilçelerinde 2015 yılında bağ üretimi yapılan alanlarda bağda virüs hastalıklarının varlığını belirlemek amacıyla bir arazi çalışması yürütmüşlerdir. Çalışma kapsamında bağlarda tipik virüs hastalığı belirtilen gösteren bitkilerden örnekler toplamışlar ve toplanan örnekleri birçok bağ virüs hastalıkları etmenleri açısından testlemişlerdir. Testlemeler sonucunda toplanılan örneklerde birçok virüs hastalığı enfeksiyonu tespit ettiklerini bildirmişlerdir. GFLV enfeksiyonunu ise %0.3 oranında belirlediklerini bildirmişlerdir.

Türkmen (2020), Orta Karadeniz Bölgesi'nde bağ üretimi yapılan Amasya, Çorum ve Tokat illerinde 2017 yılı üretim sezonu içerisinde toplam 418 yaprak ve sürgün örneği toplayarak bu örnekleri grapevine fanleaf virus (GFLV) ve grapevine pinot gris virus (GPGV) için ELISA yöntemi ile testlemiştir. Testlenen örneklerin 84'ünde GFLV pozitif olarak bulunmuştur. Daha sonra tüm örnekler RT-PCR yöntemi ile testlenmiş ve 32 örneğin

daha GFLV ile enfekteli olduğu bulunmuştur. Toplam enfeksiyon oranı ise % 28 olarak gerçekteşmiştir. GPGV ile enfekteli örnek sayısı ise 20 olarak bulunmuştur. Filogenetik analizlerde GFLV izolatlarının 12 İran izolatu ile yüksek oranda benzerlik gösterdiği görölmüştür.



## ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Arazi Çalışmaları

Arazi çalışmaları Çanakkale ili ve ilçelerinde 2021-2022 yılı içerisinde bağ alanlarında gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda Çanakkale Merkez, Bayramiç, Eceabat, Lapseki ve Bozcaada ilçelerinde örnekleme yapılmıştır. Bağ alanlarındaki bitkiler ilkbahar ve sonbahar aylarında yapılan arazi çalışmalarında görsel olarak incelenmiştir. Virüs ve virüs benzeri simptom gösteren bitkilerden yaprak ve/veya odun dokusu örnekleri toplanmıştır. GFLV ile enfekteli olduğu düşünülen örnekler uygun saklama koşullarında üniversitemizin viroloji laboratuvarına getirilmiştir.

#### 3.2. Virüs Tanılama Çalışmaları

Arazi çalışmaları sonucu toplanan örneklerdeki GFLV enfeksiyonu RT-PCR testleri ile belirlenmiştir. Bu doğrultuda ilk olarak toplanan örneklerden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, daha sonrasında RT-PCR analizleri yapılmıştır. RT-PCR testlerinde GFLV'e spesifik primer çiftleri kullanılmıştır. Elde edilen test sonuçları agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilerek virüs tanılama çalışmaları sonlandırılmıştır. Ayrıca virüs tanılama çalışmalarında Bioreba GFLV pozitif kontrol (Art. Nr.: 120453, İsviçre) ve negatif kontrol (Steril saf su) testlerin doğruluğu amacı ile kullanılmıştır.

##### 3.2.1. Total RNA İzolasyonu

Arazide GFLV enfeksiyonu açısından şüpheli olarak görülen ve toplanan örneklerden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Li vd. (2008)'in belirttiği CTAB metodu ile total RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla total RNA izolasyonunda ilk olarak her bir bitki örneğinden 1 g tartılarak ayrı ayrı porselen havanlara konulup, üzere 1 ml CTAB buffer ve 20 µl DDT eklenerek ezilme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen

karşımlar örnek numaralandırılmış steril olan eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Eppendorf tüpleri 1 dk vorteksleme işlemi yapılmış ve derin dondurucuda (-20 °C) 20 dk bekletilmiştir. Derin dondurucudan alınan homojenatlar vorteks yapılarak çözünme sağlanmıştır. Çözünen örnekler “dry blok heating/cooling thermostta” cihazı ile 65 °C 15 dk inkübe edilmiştir. Bu işlem sırasında eppendorf tüpleri eşit ısı dağılması için her 3 dk da bir kısa süreli vorteksleme yapılmıştır. İnkübe edilen örnekler 12.000 rpm’de 6 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonunda eppendorf tüplerinde 2 fazlı bir karışım oluşmuştur, bu karışımın süpernatant kısmından 500 µl alınıp yeni steril olan eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Süpernatant bulunan tüplerin içerisine 650 µl 24:1 oranında hazırlanan kloroform:izoamilalkol eklenmiştir. Bu karışım 12.000 rpm’de 10 dk santrifüj işlemi yapılmıştır. İşlem sonrası oluşan süpernatantların her bir tüpü içerisinde 175 µl -20 °C ’den çıkarılan soğuk izopropanol bulunan yeni eppendorf tüplerine aktarılmış ve 12.000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Bu işlemler sonrasında oluşan süpernatant ve pelet kısımlarından pelet kısmına dikkat edilerek süpernatantın bir kısmı dökülerek kalan kısımları ise pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Bu işlem sonrasında eppendorf tüplerinde sadece pelet kısmı kalmıştır. İçerisinde sadece pelet kalan tüplerin 750 µl %70’lik etil alkol ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama sonrası tüplerin içinde bulan %70’lik etil alkol dökülüp, 12.000 rpm’de santrifüj edilerek uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi sonunda 5-10 dk 25 °C’de tüplerin kuruması sağlamıştır. Kuruma işlemi sonunda oluşan peletlere 35 µl Tris-HCl (20 mM, Ph: 8) eklenip, 2500 rpm’de çözdürülmüştür. Elde edilen çözelti bir sonraki aşamaya kadar -80 °C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

### **3.2.2. Denatürasyon Aşaması**

Bu amaçla ilk olarak PCR tüplerine etiketleme yapılmıştır. Etiketleme yapılan PCR tüplerine elde edilen total RNA’lardan 2 ul, dNTP karışımından 1 ul, random primer’den 1 ul ve steril sudan 3 ul eklenerek toplamda 10 ul’lik bir denatürasyon karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan bu karışım PCR cihazında 65 °C’de 5 dk bekletilerek denatürasyon aşaması tamamlanmıştır. Bu işlemi takiben hızlı bir şekilde örnekler buzda 2 dk bekletilerek bir sonraki aşamaya geçilmiştir. Denatürasyon aşamasında kullanılan kitler Thermo Scientific firmasından alınan RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.3. Ters Transkripsiyon Aşaması (RT)

Denaturasyon aşamasını takiben elde edilen bu denatüre edilmiş RNA'lardan tamamlayıcı DNA'lar (Complimentary DNA; cDNA) sentezlenmiştir. Bu amaçla Thermo Scientific firmasından alınan RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit üretici firmanın önerileri doğrultusunda RT aşaması tamamlanmıştır. Toplam reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde RT karışım hazırlanmıştır. Kitlerin sağlandığı firmanın önerileri doğrultusunda PCR cihazı uygun sıcaklık derecelerine ayarlanarak cDNA'lar elde edilmiştir.

### 3.2.4. PCR Aşaması (Amplifikasyon)

Sentezlenen cDNA kütüphanelerinde GFLV'ye ait viral genom varlığının araştırılması amacı ile PCR karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım toplam hacim 25 µl olacak şekilde Takara (Japonya) firmasından sağlanan 2X yoğunluktaki EmeraldAmp MAX PCR Master Mix kiti kullanılarak üretici firmanın önerileri ve kullanılan GFLV gen spesifik primer çiftinin Tm değeri dikkate alınarak reaksiyonlar oluşturulmuştur. Bu amaçla GFLV gen spesifik primer çiftlerinin her birinden (20pmol) 0.5 µl (Tablo 4), 2X master mix'den 12.5 µl, cDNA'lardan 2 µl ve steril sudan 9.5 µl eklenerek oluşturulmuştur.

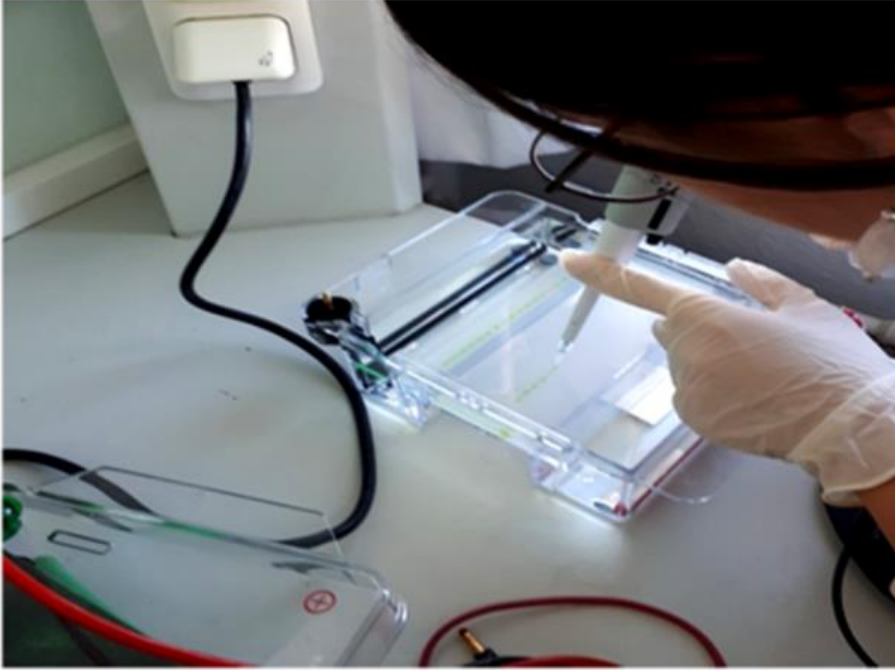
Tablo 4

Moleküler çalışmalarda kullanılan primer çiftleri

Kod	Primer Dizisi	Yön	Ürün	Referans
GFLV	CCAAAGTTGGTTTCCCAAGA	İleri	321 bç	Rowhani vd.(1993)
	ACCGGATTGACGTGGGTGAT	Geri		

### 3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR reaksiyonları sonucunda toplanan örneklerdeki GFLV enfeksiyonunun belirlenmesi amacı ile istenilen büyüklükte RT-PCR ürünlerinin elde edilip edilmediği agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Bu amaçla elde edilen RT-PCR ürünleri uygun büyüklükte DNA markörleriyle birlikte %1'lik agaroz jelinde 100 voltta, 45 dk ayrıştırılıp ethidyum bromür ile boyandıktan sonra Major Science UVDI jel görüntüleme cihazında bant oluşumu varsa fotoğraflanmıştır (Şekil 2). Agaroz jel elektroforezinde ayrıca marker olarak “Thermo Scientific™ SM0313 DNA Ladder” kullanılmıştır.



Şekil 2. Agaroz jel elektroforezinde kuyucuklara RT-PCR ürünlerinin yüklenmesi

### 3.3. Biyoinformatik Analizler

Agaroz jel elektroforezi sonucunda GFLV enfeksiyonu tespit edilen örnekler belirlenerek, bu izolatların moleküler karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla enfekteli örnekler arasından 4 GFLV izolatu seçilerek, virüs tanılama çalışmalarında

kullanılan primer çifti ve RT-PCR koşulları ile izolatların CP genleri çoğaltılmıştır. Çoğaltılan CP genlerinin kontrolü agaroz jel elektroforezi ile yapılmıştır. Agaroz jel elektroforezinde ayrıca marker olarak “SGM04 (BioBasic, Kanada)” kullanılmıştır.

Seçilen GFLV izolatlarına ait CP genlerinin diziliminin belirlenmesi amacı ile BM Labosis firmasından (Ankara) sekanslama hizmeti alınmıştır. Sekanslama çift yönlü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ham sekans verileri CLC Main Workbench programında birleştirilerek ileri analizler için hazır hale getirilmiştir (Ek 1-8).

Çanakkale ili GFLV izolatlarının moleküler karakterizasyonu amacı ile izolatların kendi içlerinde ve dünyadaki diğer izolatlar ile benzerlik oranları ve filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi amacı ile analizler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak gen bankası veri tabanında GFLV izolatlarının hedef CP genlerine karşılık gelen bölgeyi içeren izolatlar gen bankasından alınmıştır (Tablo 5). Alınan bu izolatlar ile birlikte Çanakkale GFLV izolatlarına ait Sequence Demarcation Tool programında (Kumar vd. 2018) çoklu dizileme yapılarak izolatların nükleotit (Şekil 3) ve amino asit (Şekil 4) düzeyinde birbirleri ile göstermiş oldukları benzerlik oranları belirlenmiştir.

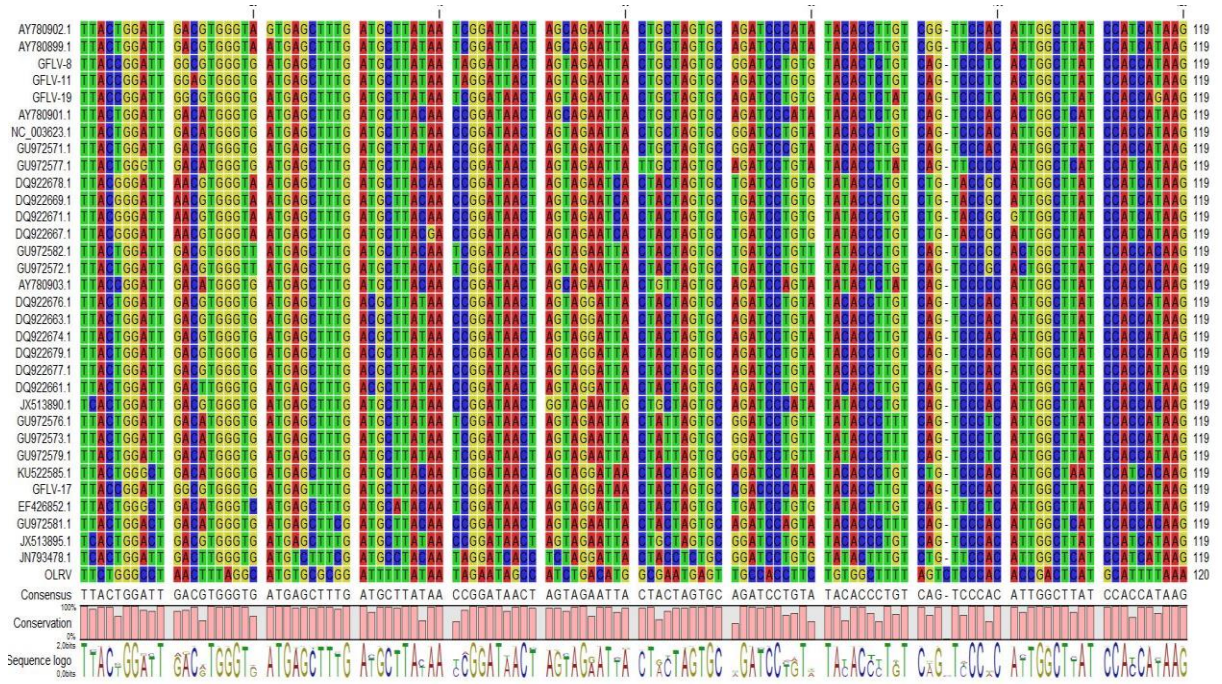
İzolatların filogenetik ilişkileri de CLC Main Workbench programında belirlenmiştir. Bu amaçla ilk olarak GFLV sekans verileri Clustal W ile dizilenmiştir. Daha sonra bu diziler neighbor-joining metodu ile 1000 tekrarlı bootstrap değeri uygulanarak GFLV izolatlarının filogenetik ilişkilerini gösteren ağaçlar oluşturulmuştur. Ayrıca filogenetik ağaçta ağacın doğruluğunu arttırmak amacıyla dış grup olarak olive latent ringspot virus (OLRV) kullanılmıştır.

Tablo 5

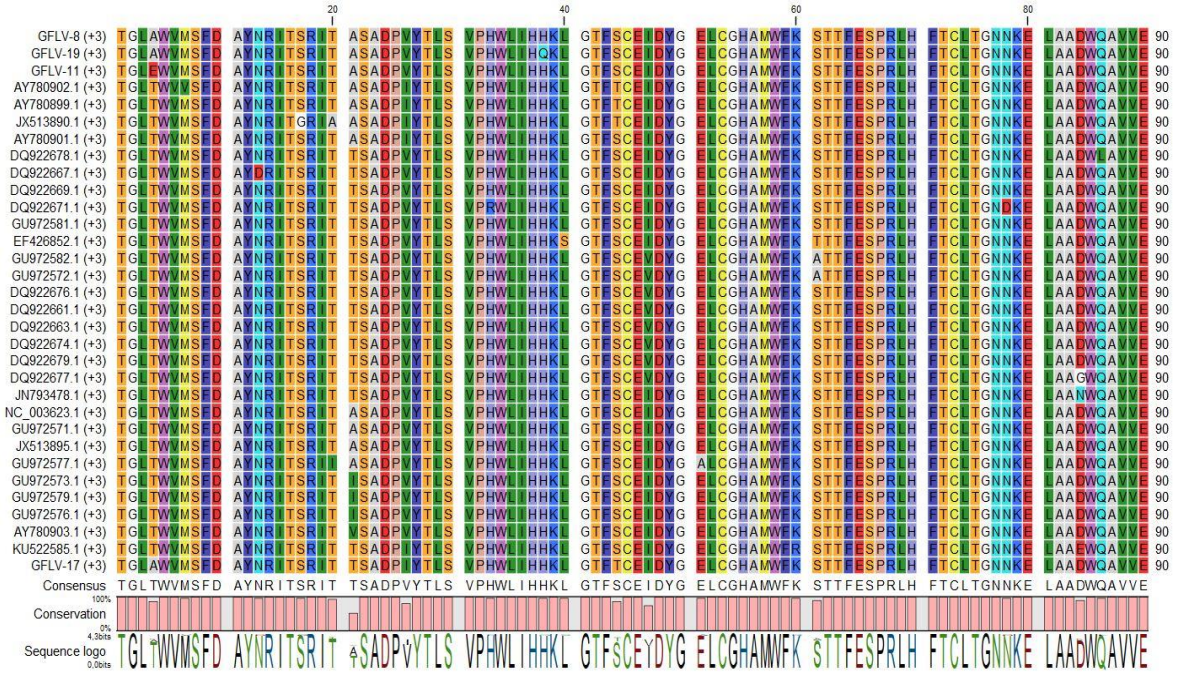
Biyoinformatik analizlerde kullanılan bazı grapevine fanleaf virus (GFLV) izolatlarına ait bilgiler

Erişim Numarası	İzolat Adı	Orijin
GU972571	CAZINA1	ABD
GU972572	CAZINA2	ABD
GU972573	CAZINA3	ABD
GU972576	CACSB1	ABD
GU972577	CACSB2	ABD
GU972579	CACSB4	ABD
GU972581	CACSC1	ABD
GU972582	CACSC2	ABD
NC003623	F13	Fransa
EF426852	GHu	Macaristan
JN793478	MEnd	Çekya
AY780901	A17d	Fransa
AY780902	A10a	Fransa
AY780903	B19a	Fransa
AY780899	A17a	Fransa
JX513895	3138-01	ABD
JX513890	1050-02	Kanada
DQ922661	Vol50c2	Slovenya
DQ922663	Vol51c2	Slovenya
DQ922667	Vol52c1	Slovenya
DQ922669	Vol54c2	Slovenya
DQ922671	Vol55c1	Slovenya
DQ922674	Vol57c1	Slovenya
DQ922676	Vol57c3	Slovenya
DQ922677	Vol57c4	Slovenya
DQ922678	Vol57c5	Slovenya
DQ922679	Vol57c6	Slovenya
KU522585	SDHN	Çin





Şekil 3. Grapevine fanleaf virus izolatlarının nükleotit düzeyinde çoklu dizi karşılaştırmaları



Şekil 4. Grapevine fanleaf virus izolatlarının amino asit düzeyinde çoklu dizi karşılaştırmaları

## DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

### ARAŞTIRMA BULGULARI

#### 4.1. Arazi ve Virüs Tanılama Çalışmaları

Gerçekleştirilen arazi çalışmaları kapsamında Çanakkale Merkez ve Bayramiç'ten 13, Eceabat'tan 7, Lapseki'den 4 ve Bozcaada'dan 23 virüs ve virüs benzeri belirti gösteren bitkilerden yaprak örnekleri alınmıştır. Bu kapsamda toplamda 60 örnek toplanmıştır. Alınan örneklerin RT-PCR ile GFLV enfeksiyonu açısından testlenmesi sonucunda ise 34 örnekte GFLV enfeksiyonu bulunmuştur. GFLV enfeksiyonunun ilçelere göre dağılımı ise şu şekildedir: Bayramiç'te 5 bitkide, Eceabat'ta 7 bitkide, Lapseki'de 4 bitkide ve Bozcaada'dan ise 18 bitkide tespit edilmiştir. Merkez ilçede toplanan örneklerde ise GFLV enfeksiyonu tespit edilememiştir (Tablo 6).

Toplanılan örneklerdeki GFLV enfeksiyon oranlarına bakıldığında ise toplanılan tüm örneklerdeki enfeksiyon oranı %56.66 olarak belirlenmiştir. Toplanılan örneklerdeki en yüksek enfeksiyon oranı %100 ile Gelibolu ve Lapseki ilçelerinden elde edilirken, en az enfeksiyon oranı ise %38.46 ile Bayramiç ilçesinden elde edilmiştir. Bozcaada ilçesinde tespit edilen enfeksiyon oranı ise %78.26 olarak belirlenmiştir. Daha önce de belirtildiği gibi Çanakkale Merkez ilçede GFLV enfeksiyonu tespit edilememiştir (Tablo 6).

Çalışma kapsamında ilçe bazında alınan örneklerde enfeksiyon oranları arasında homojen bir dağılım olmadığı görülmüştür. Eceabat ve Lapseki'den alınan tüm örnekler enfekteli çıkarken Merkez ilçeden alınan 13 örnekte enfekteli bitkiye rastlanılmamıştır. Çanakkale'de bağcılık çok eskiden beri yapılan bir üretim faaliyetidir. Ancak bağ alanları Bozcaada dışında modern bir üretim şekline sahip değildir. Çoğunlukla goble sistemi şeklinde üretim yapılmaktadır ve yine Bozcaada dışında asma bitkileri oldukça yaşlıdır. Ayrıca ilçe bazında da toprak yapıları ve arazi yükseltileri de birbirinden farklıdır. Tüm bu bilgilerin ışığında çeşit özellikleri, bağlarda uygulanan kültürel işlemler, toprak ve iklim yapılarından kaynaklanan farklılar, asma bitkilerinin yaşı ve virüsü taşıyan nematodların

toprakta bulanma durumu gibi faktörler göz önünde bulundurulduğunda her ilçeden alınan örneklerdeki enfekteli bitki sayısında farklılık göstermektedir.

Tablo 6

Çanakkale ili ve ilçeleri bağ üretim alanlarından toplanılan ve grapevine fanleaf virus (GFLV) ile enfekteli bulunan örnek sayıları ve GFLV enfeksiyon oranı

İlçeler	Enfekteli Sayısı	Örnek	Toplanan Sayısı	Örnek	Enfeksiyon Oranı (%)
Bayramiç	5		13		38.46
Eceabat	7		7		100.00
Lapseki	4		4		100.00
Bozcaada	18		23		78.26
Merkez	-		13		-
Toplam	34		60		56.66

Çanakkale de bağ üretimi yapılan alanlarda (Gökçeada hariç) hem ilkbahar döneminde hem de sonbahar döneminde hemen hemen tüm bağ alanlarına arazi çıkışları yapılarak bitkiler görsel olarak incelenmiştir. Çok fazla bağ alanları görsel olarak incelenmesine rağmen sadece 60 bitkiden örnek alınmıştır. Her ne kadar örnek alınan bitkiler içinde hastalıklı bitki oranı yüksek olarak görünse de (56.66) bu toplanan örnekler içindeki hastalıklı bitki oranını ifade etmektedir. Bununla birlikte bağ alanlarında GFLV benzeri semptom gösteren bitki sayısı oldukça azdır. Ülkemizde yapılan bir çok çalışmada da farklı enfeksiyon oranları bildirilmiştir. Özaslan vd. (1995), ülkemizin Doğu Akdeniz ve Güney Doğu Anadolu bölgelerinde bağ üretimi yapılan alanlarında bağ virüslerinin varlığına yönelik yaptıkları bir çalışmada biyolojik testlemeler sonucunda 190 örneğin 89'unu (%48) grapevine fanleaf virus (GFLV) ile enfekteli bulurken, Çığışar (2002), Güneydoğu Anadolu bölgesi bağ alanlarında virüs ve virüs benzeri hastalıkların durumunu belirlemek amacıyla yürüttüğü bir çalışmada topladıkları 1001 örnekte GFLV ile enfeksiyon oranını %8,1 olarak bulmuşlardır. Bir başka çalışmada ise Karadeniz vd. (2018), Tokat ili ve ilçelerinde bağ üretimi yapılan alanlarda bağda virüs hastalıklarının varlığını belirlemek amacıyla yaptıkları serolojik testler sonucunda GFLV enfeksiyon oranını % 0.3 olarak bulmuşlardır. Bu sonuçlardan da anlaşıldığı gibi GFLV enfeksiyon oranı ülkemizin farklı bölgelerinde yapılan

birçok çalışmada farklı oranlarda tespit edilmiştir. Tüm bu çalışmalar bizim çalışmamızda farklı ilçelerde farklı enfeksiyon oranlarının ortaya çıkmasını destekler niteliktedir.

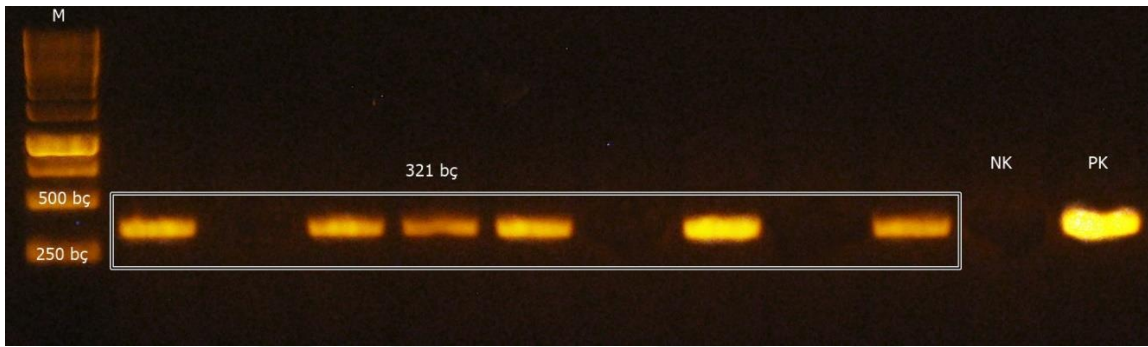
GFLV ile enfekteli olarak bulunan örneklerdeki en tipik virüs belirtileri yapraklardaki gümüş renge dönen sararmalar olarak gözlenmiştir. Ayrıca bu sararmaların bazen yaprağın tamamını kapladığı bazen de sadece yaprak kenarlarında olduğu görülmüştür (Şekil 5). Ancak sözü edilen bu belirtilere ilkbahar başlangıcında rastlanılmıştır. Sonbahar aylarında yapılan örneklemelerde çok tipik semptom oluşumu gözlenmediği durumlarda da GFLV enfeksiyonu tespit edilebilmiştir. Bu bağlamda etmenin ilkbahar aylarında oldukça karakteristik semptomlara neden olmasına rağmen, vejetasyon periyodunun sonuna doğru bitki içindeki konsantrasyonunun arttığı düşünülmektedir.



Şekil 5. Grapevine fanleaf virus ile enfekteli asma bitkilerinde gözlenen sararma belirtileri

Bu çalışmada araziden toplanan örnekler RT-PCR yöntemiyle test edilmiştir. Testlemeler süresince yöntem açısından herhangi bir zorlukla karşılaşılmamıştır. Enfekteli

örnekler RT-PCR sonucunda agaroz jelde beklenen büyüklükte bantlar oluşturmuştur (Şekil 6). GFLV floemde sınırlı bir virüstür. Bu nedenle dokulardaki konsantrasyonu mevsimsel olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Özellikle teşhis amaçlı serolojik yöntemler kullanıldığında bazen beklenen düzeyde iyi sonuçlar vermeyebilmektedir. Bu kapsamda tanı ve teşhis için moleküler bir yöntem olan RT-PCR her zaman çok daha duyarlı bir yöntem olması nedeniyle birçok araştırmacı tarafından başarıyla kullanıldığı görülmektedir (Rowhani vd.,1993; Pourrahim vd.,2007; Eichmeier vd.,2010; Önder vd., 2015; Cepin vd., (2021).



Şekil 6. Toplanılan örneklerin RT-PCR ile testlenilmesine ait jel fotorağları (M: Marker; 250-10.000 bç, NK: Negatif kontrol; su, PK: Pozitif kontrol; Bioreba GFLV pozitif kontrol)

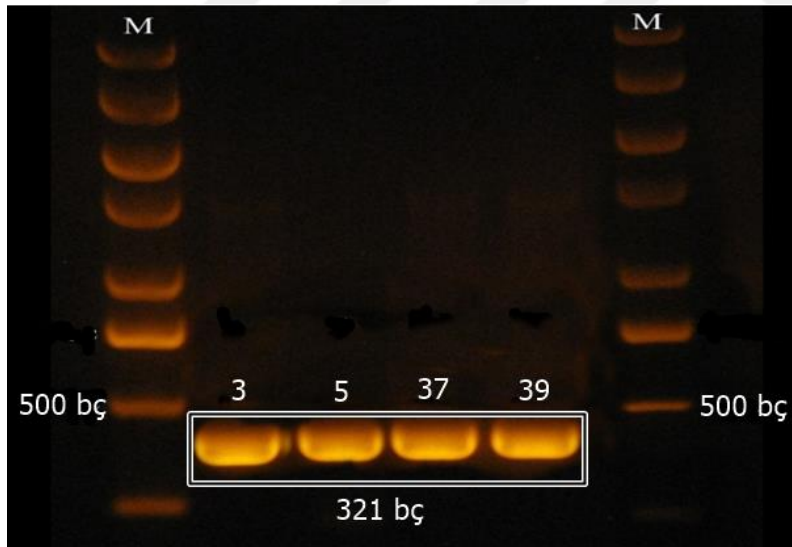
Nitekim Önder vd., (2016a), ülkemiz bağlarında sorun oluşturan ve yaygın olarak bulunan grapevine fanleaf virus (GFLV)'u klasik RT-PCR ve gerçek zamanlı RT-PCR kullanarak teslemişlerdir. Çalışma kapsamında daha önceden serolojik yöntemlerle test edilmiş enfekteli bulunan ve sağlıklı örnekler kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar birbiriyle kıyaslandığında her iki moleküler yönteminde GFLV'nin teşhisinde başarıyla kullanıldığı belirtilmiştir. Bu çalışmada GFLV'nin tanısında moleküler metotların başarı ile tanı amaçlı olarak kullanılabileceğini destekler niteliktedir.

GFLV ile enfekteli olarak bulunan bitkilerde gözlenen belirtiler ülkemizde şimdiye kadar yapılan birçok çalışmadan elde edilen sonuçlar ile de benzerlik göstermektedir. Kaya ve Erilmez (2014), Ege bölgesi bağ alanlarında virüs hastalıklarının belirlenmesi amacı ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında GFLV ile enfekteli bitkilerin yapraklarında sararma ve yelpaze şeklini alma şeklinde belirtilerin olduğunu belirtmişlerdir.

Türkmen (2020), tarafından Batı Karadeniz bölgesinde gerçekleştirilen bir çalışmada da GFLV ile enfekteli bitkilerin yaprak damarlarında renk açılmaları olduğunu belirtmiştir. Bu bağlamda bu çalışma ve belirtilen diğer çalışmalardan elde edilen GFLV belirtileri birbirleri ile oldukça paralel olarak bulunmuştur.

## 4.2. Biyoinformatik Analizler

Çanakkale ili ve ilçelerinde tespit edilen GFLV izolatlarının moleküler karakterizasyonları amacı ile 4 GFLV izolatı seçilerek moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla GFLV enfeksiyonu tespit edilen her bir ilçeden bir izolat olacak şekilde GFLV izolatı belirlenmiştir. Bozcaada'dan GFLV-8, Bayramiç'ten GFLV-11, Eceabat'tan GFLV-17 ve Lapseki'den GFLV-19 izolatı seçilmiştir. Seçilen bu izolatların CP gen bölgesinin 321 bç'lik kısmı RT-PCR ile çoğaltılmıştır (Şekil 7).



Şekil 7. Grapevine fanleaf virus izolatlarının RT-PCR ile kılıf protein genlerinin çoğaltılmasını gösteren agaroz jel elektroforez sonucu (M: Marker; 100-5.000 bç)

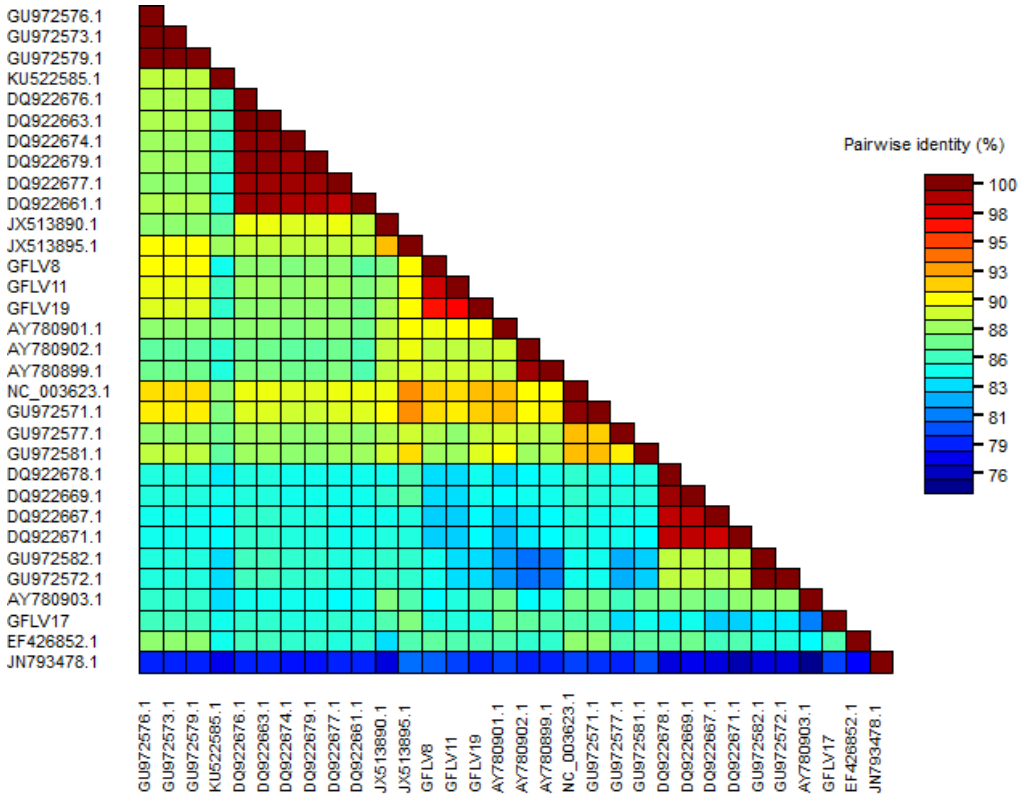
Ülkemizde gerçekleştirilen bir çalışmada da Rowhani vd. (1993)'nın tasarlanmış oldukları GFLV spesifik primer çifti ile GFLV enfeksiyonunun tanısı gerçekleştirilmiştir. GFLV enfekteli bitkilerden hedef 321 bç kılıf protein geninin kısmi dizilerine karşılık gelen

bantlar elde edilmiştir (Kaya ve Erilmez, 2014). Bu bağlamda bu primer çiftinin başarılı bir şekilde GFLV enfeksiyon tanılama çalışmalarında ileriki yıllarda da yapılması muhtemel diğer çalışmalarda kullanılabileceği düşünülmektedir.

Çanakkale ili GFLV izolatlarının kendi içlerinde nükleotit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranlarına bakıldığında %83-98 oranında sekans benzerliği gösterdiği belirlenmiştir. Çanakkale GFLV izolatlarından 8, 11 ve 19 numaralı sırasıyla Bozcaada, Bayramiç ve Lapseki ilçelerinden elde edilen izolatların birbirleri ile oldukça yakın sekans benzerliğine sahip olduğu görülmüştür. Eceabat'tan elde edilen 17 numaralı izolatın ise diğer Çanakkale izolatları ile sahip olduğu sekans benzerlik oranının genel olarak %83 düzeyinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 8).

Dünya izolatları ile nükleotit düzeyinde Çanakkale GFLV izolatlarının göstermiş oldukları sekans benzerlik oranlarına bakıldığında ise izolatların %76-90 arasında bir benzerliğe sahip olduğu görülmektedir. Nükleotit düzeyindeki benzerlik matriksi detaylı olarak incelendiğinde bazı dünya izolatlarının birbirleri ile %100 sekans benzerliği gösterdiği de görülmektedir. Ancak Çanakkale GFLV izolatları ile bu oranda sekans homolojisi gösteren izolat varlığı olmadığı görülmektedir. Çanakkale 8, 11 ve 19 numaralı sırasıyla Bozcaada, Bayramiç ve Lapseki ilçelerinden elde edilen izolatların AY780901 erişim numaralı, A17d kodlu Fransa orijinli izolat ile en yüksek benzerlik oranını (%90) gösterdikleri belirlenmiştir. Eceabat izolatı olan 17 numaralı GFLV izolatının ise en yüksek sekans benzerlik oranını EF426852 erişim numaralı, GHu kodlu Macaristan izolatı ile %83 sekans benzerlik oranı ile gösterdiği görülmektedir. Genel olarak Türk izolatlarına sekans benzerliği açısından en uzak GFLV izolatının ise JN793478 erişim numaralı, MEnd kodlu Çekya izolatının olduğu belirlenmiştir. Bu izolat ile Çanakkale GFLV izolatlarının sekans benzerlik oranı %76 olarak belirlenmiştir (Şekil 8).



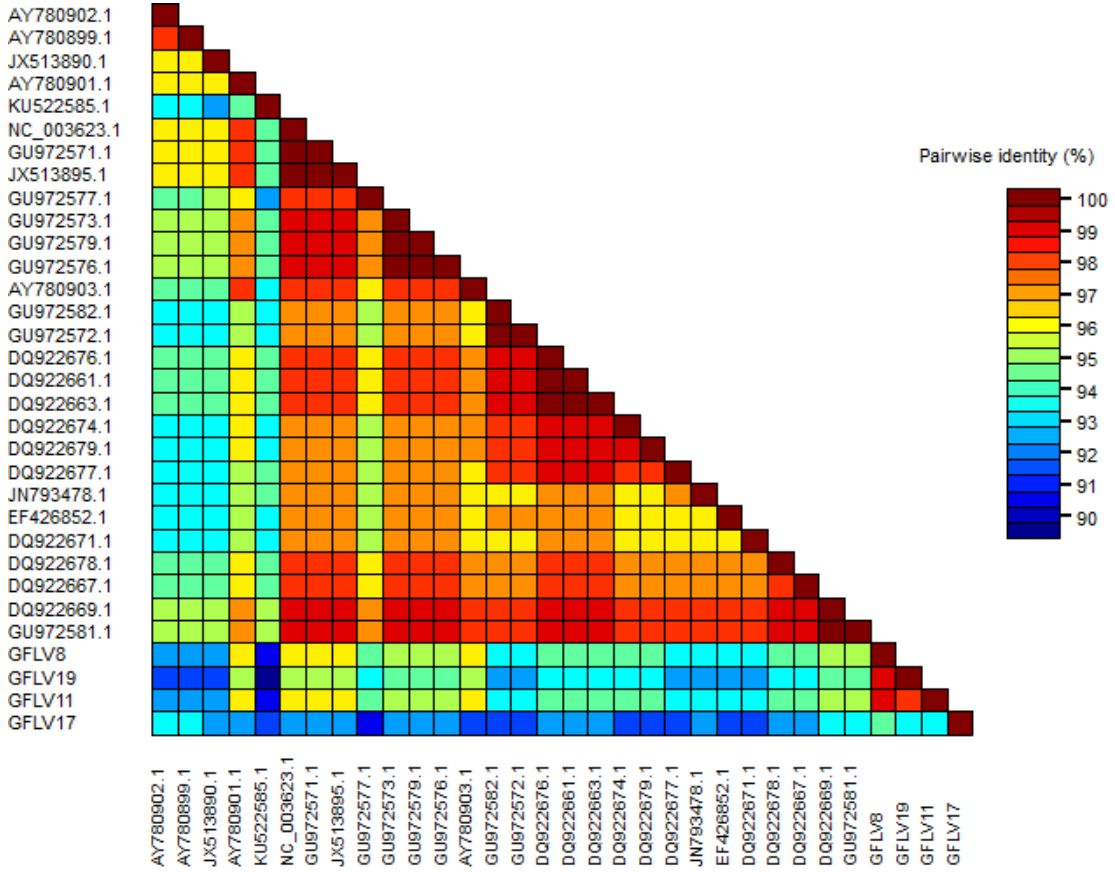


Şekil 8. Grapevine fanleaf virus izolatlarının nükleotit düzeyinde birbirleri ile göstermiş oldukları sekans benzerlik oranları

Çanakkale ili GFLV izolatlarının amino asit düzeyindeki benzerlik oranları incelendiğinde izolatların kendi içlerinde %93-98 arasında benzerlikler gösterdiği belirlenmiştir. GFLV 8,11 ve 19 numaralı sırası ile Bozcaada, Bayramiç ve Lapseki ilçelerinden elde edilen izolatların birbirleri ile %98 oranında sekans benzerliği gösterdiği belirlenmiştir. Eceabat'tan elde edilen 17 numaralı izolatın ise diğer Çanakkale izolatlarından sekans benzerliği açısından oldukça farklı olduğu görülmüştür. GFLV-17 numaralı Eceabat izolatının diğer izolatlar ile sekans benzerlik oranının %83 olarak bulunmuştur (Şekil 9).

Çanakkale ili GLFV izolatları ile dünya izolatlarının amino asit düzeyindeki sekans benzerlik oranları karşılaştırıldığında izolatların birbirleri %90-97 oranında benzerlikler gösterdiği belirlenmiştir. Çanakkale ili izolatlarına sekans benzerlik oranı açısından en yakın izolatlar AY780901 erişim numaralı A17d kodlu, NC003623 erişim numaralı F13 kodlu ve

AY780903 erişim numaralı B19a kodlu Fransa izolatları, GU972571 erişim numaralı CAZINA1 kodlu ve JX513895 erişim numaralı 3138-01 kodlu ABD izolatları %97 benzerlik oranı ile belirlenmiştir. Çanakkale ili GFLV izolatlarına en uzak olan izolat ise GU972577 erişim numarası ile CACSB2 kodlu ABD izolatı %90 benzerlik oranı ile belirlenmiştir (Şekil 9).

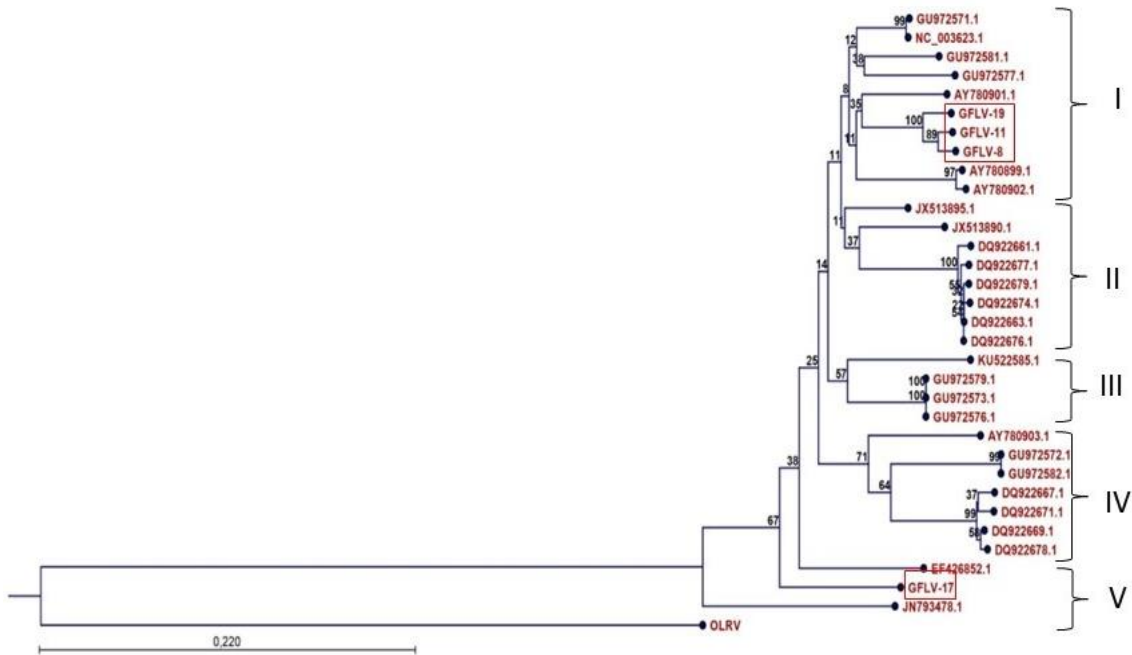


Şekil 9. Grapevine fanleaf virus izolatlarının amino asit düzeyinde birbirleri ile göstermiş oldukları sekans benzerlik oranları

Pourrahim vd. (2007), İran'ın kuzey doğusunda bulunan iki farklı bölgeden elde edilen beş farklı Grapevine fanleaf virus (GFLV) izolatını, örtü proteini (CP) gen dizilerine dayalı olarak karakterize etmişlerdir. Biyoinformatik analizler sonucunda bu izolatların genbankasında bulunan diğer GFLV izolatları ile CP gen bölgeleriyle %83.7-87.5 homolojiye ve kuzeybatı İran'dan gelen diğer izolatlarla %83.0-87.1 homolojiye sahip olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada elde edilen GFLV izolatları kendi arasında %98.6 ile

%100 arasında bir benzerlik göstermiştir. Gerçekleştirilen bu çalışma ile Pourrahim ve ark. (2007)'nin elde ettiği sonuçlar kısmen birbirini destekler niteliktedir.

Çanakkale ili GFLV izolatları ile dünyanın farklı ülkelerinden elde edilen GFLV izolatları kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçta tüm izolatların 5 farklı gruba dağılım gösterdiği görülmüştür. Çanakkale ili GFLV izolatlarının ise bu gruplardan ikisine dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Çanakkale ili izolatlarından GFLV-8, 11 ve 19 numaralı sırasıyla Bozcaada, Bayramiç ve Lapseki ilçelerinden elde edilen izolatların I. grupta, 17 numaralı Eceabat'tan elde edilen izolatın ise V. grupta yer aldığı belirlenmiştir. Çanakkale ili izolatlarından 8, 11 ve 19 numaralı sırasıyla Bozcaada, Bayramiç ve Lapseki ilçelerinden elde edilen izolatlara en yakın olarak bulunan izolat AY780901 erişim numaralı, A17d kodlu Fransa izolatı olurken, 17 numaralı Eceabat izolatına en yakın olarak bulunan izolat ise EF426852 erişim numaralı GHu kodlu Macaristan izolatı olmuştur (Şekil 10).



Şekil 10. Grapevine fanleaf virus izolatlarının nükleotit düzeyinde birbirleri ile göstermiş oldukları filogenetik ilişkiler

Pourrahim vd. (2007), İran'ın kuzey doğusunda bulunan iki farklı bölgeden elde edilen beş farklı grapevine fanleaf virus (GFLV) izolatını, örtü proteini (CP) gen dizilerine dayalı olarak karakterize etmişlerdir. Filogenetik analizler sonucunda ise ağaçta iki ana grup oluştuğunu belirtmişlerdir. Birinci ana grupta dünya izolatları yer alırken ikinci ana grupta ise İran izolatlarının kümelendiği bulunmuştur. Gerçekleştirilen bu çalışmada 5, Pourrahim vd. (2007)'nin çalışmasında ise 2 grup oluşumunun kullanılan izolat sayısı ve farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.



## BEŞİNCİ BÖLÜM

### SONUÇ VE ÖNERİLER

Gerçekleştirilen bu çalışma kapsamında Çanakkale ili ve ilçeleri bağ üretim alanlarından virüs ve virüs benzeri belirti gösteren 60 asma bitkisinden yaprak ve sürgün örnekleri alınmıştır. Alınan örneklerin RT-PCR ile GFLV enfeksiyonu açısından testlenmesi sonucunda 34 bitkide etmenin enfeksiyonu tespit edilmiştir. Bu sonuçla toplanılan örneklerde GFLV enfeksiyonu genel olarak %54.66 olarak belirlenmiştir. Örnekleme yapılan Çanakkale Merkez ilçe dışında tüm ilçelerde GFLV enfeksiyonu tespit edilmiştir.

GFLV enfeksiyonunun tanılanmasında RT-PCR metodunun güvenle kullanılabilceği görülmüştür. Enfekteli olarak bulunan örneklerde tipik GFLV semptomları olan asma yapraklarındaki çeşitli renk açılmaları dikkat çekmiştir. Ayrıca yapılan gözlemlere dayalı olarak sonbahar aylarında yapılan örneklemelemlerde GFLV enfeksiyonunun tespitinin daha güvenilir olduğu görülmüştür.

Çanakkale ili GFLV izolatlarının kendi içlerinde nükleotit düzeyinde göstermiş oldukları benzerlik oranlarına bakıldığında ise %83-98 oranında sekans benzerliği gösterdiği belirlenmiştir. Çanakkale ili GFLV izolatlarının amino asit düzeyindeki benzerlik oranları incelendiğinde izolatların kendi içlerinde %93-98 arasında benzerlikler gösterdiği görülmüştür.

Dünya izolatları ile nükleotit düzeyinde Çanakkale GFLV izolatlarının göstermiş oldukları sekans benzerlik oranlarına bakıldığında ise izolatların %76-90 arasında bir benzerliğesahip olduğu görülmüştür. Çanakkale ili GFLV izolatları ile dünya izolatlarının amino asit düzeyindeki sekans benzerlik oranları karşılaştırıldığında izolatların birbirleri %90-97 oranında benzerlikler gösterdiği belirlenmiştir.

Çanakkale ili GFLV izolatları ile dünyanın farklı ülkelerinden elde edilen GFLV izolatları kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaçta tüm izolatların 5 farklı gruba dağılım

gösterdiği görülmüştür. Çanakkale ili GFLV izolatlarının iki farklı filogenetik gruba dağılım gösterdiği belirlenmiştir.

Gerçekleştirilen bu çalışma ile GFLV'nin Çanakkale ilinde bağ üremi yapılan alanlarında varlığı RT-PCR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. GFLV ülkemizde ve dünyada yaygın olan ve üretimde önemli ekonomik kayıplara neden olan bir virüstür. Bu nedenle Çanakkale ilinde yeni kurulacak olan bağ alanları GFLV'nin vektörleri olan nematodlar açısından kontrol edilmeli ve temiz olan alanlarda bağ tesis edilmelidir. Ayrıca tüm çok yıllık ve tek yıllık bitkilerde olduğu gibi bağ üretiminde de sağlıklı üretim materyalleri ile yeni bağlar kurulmalıdır.

Bu çalışma kapsamında sadece 4 izolatın kısmı kılıf protein gen bölgesine göre moleküler karakterizasyon yapılmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda kılıf protein genin tamamı ve hatta virüsün tüm genom dizi analizleri sekanslanarak ülkemize özgü izolatlara ait tüm genom bilgileri ortaya çıkarılmalı ve bilim camiasının hizmetine sunulmalıdır.

Ülkemizde GFLV ile ilgili bu zamana kadar yapılan çalışmalar daha çok biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak virüsün teşhisine yöneliktir. Bundan sonra bu çalışmalara ilaveten virüs-vektör ilişkileri, dayanıklılık çalışması vb. gibi çalışmalar da yapılarak virüsün kontrolüne yönelik yeni stratejiler geliştirilmelidir.

## KAYNAKÇA

- Akbaş, B. ve Erdiller, G. (1993). "Researches on grapevine virus diseases and determination of their incidences in Ankara, Türkiye". *Journal of Turkish Phytopathology*, 22(2-3), 47-54.
- Akdoğan, M. (1965). "Bağlarda bulaşık soysuzlaşma ve korunma areleri". Tarım Bakanlığı Ziraat İşleri Genel Müdürlüğü Yayım Dairesi Başkanlığı ifti Broşürü, 1, 1-8.
- Anfoka, G.H., Shahrour, W. ve Nakhla, M.K. (2004). "Detection and molecular characterization of grapevine fanleaf virus and grapevine leafroll-associated virus 3 in Jordan". *Journal of Plant Pathology*, 86(3), 203-207.
- Azeri, T. (1983). "lkemiz bağcılığında virüs sorunu ve virüssüz bağ üretim programı". *Bornova Zirai Mücadele ve Araştırma Enstitüsü Yıllık*, 1(1), 61-69.
- Azeri, T. ve Fidan, . (1988). "Virus and virus-like diseases effecting grapevine and growing virus-free grapes in the Aegean Coast". *Proc. Of the V. Congress of Turk. Phyt. Soc.*
- Balsak, S.C. (2016). Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgesi bağlarında otokton asma varyetelerinde bazı vitivirus (GVA, GVB) ve nepovirus (GFLV) grubu virüslerin genetik çeşitliliğinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Bashir, N.S., Nikkhah, S., ve Hajizadeh, M. (2007a). "Distinct phylogenetic positions of Grapevine fanleaf virus isolates from Iran based on the movement protein gene". *Journal of General Plant Pathology*, 73, 209-215.
- Bashir, N.S. ve Hajizadeh, M. (2007b). "Survey for grapevine fanleaf virus in vineyards of north-west Iran and genetic diversity of isolates". *Australasian Plant Pathology*, 36, 46-52.
- Bovey R, Grtel W., Hewitt W.B., Martelli G.P. ve Vuittenez A. (1990). Soil-borne viruses transmitted by nematodes. In: Bovey R, Grtel W., Hewitt W.B., Martelli G.P., Vuittenez A. (eds.). *Virus and virus-like diseases of grapevines*, pp. 46-50. Editions Payot, Lausanne, Switzerland.
- Cazalis-Allut, L.C. (1865). "De la dgnration des vignes". *Ouvres Agricoles*, 57-61.

- Cepin, U., Gutiérrez-Aguirre, I., Bala ic, L., Pompe-Novak, M., Gruden, K. ve Ravnikar, M. (2010). “A one-step reverse transcription real-time PCR assay for the detection and quantitation of Grapevine fanleaf virus”. *Journal of Virological Methods*, 170(1-2), 47-56.
- Cigsar, I., Digiario, M. ve Martelli, G.P. (2002). “Sanitary status of grapevines in south-eastern and central Anatolia (Turkey)”. *EPPO Bulletin*, 32(3), 471-475.
-  elik, H. (2014). “ z m n besin değeri”. *Türkiye Tohumcular Birliği Dergisi*, 3(11), 18-21.
- Demangeat, G., Komar, V., Cornuet, P., Esmenjaud, D. ve Fuchs, M. (2004). “Sensitive and reliable detection of grapevine fanleaf virus in a single *Xiphinema index* nematode vector”. *Journal of Virological Methods*, 122(1), 79-86.
- Eichmeier, A., Bar nek, M. ve Pidra, M. (2010). “Analysis of genetic diversity and phylogeny of partial coat protein domain in Czech and Italian GFLV isolates”. *Plant Protection Science*, 46(4), 145-148.
- Erilmez, S. ve Kaya, A. (2016). “Comparison of DAS-ELISA and RT-PCR methods for the diagnosis of grapevine viruses”. *Plant Protection Bulletin*, 56(1), 1-14.
- FAOSTATS, (2020). <https://www.fao.org/faostat/en/#home> (Erişim Tarihi: 31.03.2023).
- Fattouch, S., Acheche, H., M’hirsi, S., Marrakchi, M. ve Marzouki, N. (2005). “Detection and characterization of two strains of grapevine fanleaf nepovirus in Tunisia”. *EPPO Bulletin*, 35(2), 265-270.
- Fiore, N., Zamorano, A., Rivera, L., Gonzalez, F., Aballay, E., Montealegre, J. ve Pino, A.M. (2011). “Grapevine viruses in the Atacama region of Chile”. *Journal of Phytopathology*, 159(11-12), 743-750.
- Hewitt W.B., Raski D.J. ve Goheen A.C. (1958). “Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines”. *Phytopathology* 48: 586-595.
- Karadeniz, H., Yağcı, A., Topkaya, Ő. ve Yanar, Y. (2018). “Tokat ili ve ilçelerinde bazı bağ virüs hastalıklarının serolojik yöntemlerle belirlenmesi”. *Bitki Koruma Bülteni*, 58(2), 103-110.



- Kaşkaloğlu, N.ve Türkmenoğlu, H. (1965). “Bağ hastalık ve zararlıları”. Bornova Ziraat Mücadele Enstitüsü Yayını, 1, 32.
- Kaya, A., ve Erilmez, S. (2014). “Detection of viruses in Aegean Region grapevines”. The Journal of Turkish Phytopathology, 43(1-2-3), 45-57.
- Koklu, G., Digiario, M. ve Savino, V. (1998). “A survey of grapevine viruses in Turkish Thrace”. Phytopathologia Mediterranea, 37(3), 140-142.
- Krebelj, A.J., Čepin, U., Ravnikar, M. ve Novak, M.P. (2015). “Spatio-temporal distribution of Grapevine fanleaf virus (GFLV) in grapevine”. European Journal of Plant Pathology, 142, 159-171.
- Li, R., Mock, R., Huang, Q., Abad, J., Hartung, J. ve Kinard, G. (2008). “A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR based detection of diverse plant pathogens”. J Virol Methods, 154, 48–55.
- Liebenberg, A., Freeborough, M.J., Visser, C.J., Bellstedt, D.U. ve Burger, J.T. (2009). “Genetic variability within the coat protein gene of grapevine fanleaf virus isolates from South Africa and the evaluation of RT-PCR, DAS-ELISA and immunostrips as virus diagnostic assays”. Virus Research, 142(1-2), 28-35.
- M’Rabet, B.S, Mougou-Hamdane, A. ve Kallel, S. (2015). “Interaction plante-virus-vecteur. Cas du court-noué de la vigne en Tunisie”. Cahiers Agricultures, 24(5), 292-300.
- Martelli, G.P., Walter, B. ve Pinek, L. (2003). Grapevine fanleaf virus. Association of Applied Biologists, Descriptions of Plant Viruses.
- Martelli G.P. ve Savino, V. (1990). “Fanleaf degeneration”. Compendium of Grape Diseases, 48-49.
- Muhire, B.M., Varsani, A. ve Martin, D.P. (2014). “SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation”. PloS One, 9(9), e108277.
- Önder, S., Paylan, İ.C. ve Gümüş, M. (2016a). “Comparison of conventional RT-PCR and real-time RT-PCR assays for diagnosis of grapevine fanleaf nepovirus (GFLV)”. The Journal of Turkish Phytopathology, 45(2-3), 53-62.

- Önder, S., Paylan, İ.C. ve Gümüş, M. (2016b). "Detection of several important viral agents by real-time PCR in Aegean vineyards". *The Journal of Turkish Phytopathology*, 45(1), 21-30.
- Özaslan, M., Baloğlu, S. ve Yılmaz, M.A. (1994). "Virus diseases of grapevine in Southeastern Anatolian region in Türkiye". 11.Th Proc. of ICVG, 62, 122.
- Özaslan, M. (1995). Adana, Tarsus, Gaziantep, Şanlıurfa ve Adıyaman bölgelerinde yetiştirilen bağlarda zararlı virüs hastalıklarının serolojik ve biyolojik yöntemlerle saptanması. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana Doktora Tezi., 102 s.
- Palomares-Rius, J.E., Gutiérrez-Gutiérrez, C., Cantalapiedra-Navarrete, C. ve Castillo, P. (2012). "Prevalence and diversity of grapevine fanleaf virus in Southern Spain". *Plant Pathology*, 61(6), 1032-1042.
- Petri, L. (1918). "Nuove vedute sulle cause dell'arricciamento della vite". *Rendiconto Accademia Nazionale dei Lincei*, 27, 271.
- Pourrahim, R., Farzadfar, S.H., Golnaraghi, A.R. ve Ahoonmanesh, A. (2007). "Partial molecular characterization of some grapevine fanleaf virus isolates from North-East of Iran". *Journal of Phytopathology*, 155(11-12), 754-757.
- Rivadeneira, M., Galván, M.Z., Abán, M., Semke, R.E., Rivadeneira, J., Lanza Volpe, M. ve Gomez Talquenca, S. (2022). "Survey for major grapevine viruses in commercial vineyards of Northwestern Argentina". *Plants*, 11(13), 1720.
- Rowhani, A. (1992). "Use of F(ab')<sub>2</sub> antibody fragment in ELISA for detection of grapevine viruses". *American Journal of Enology and Viticulture*, 43(1), 38-40.
- Rowhani, A., Chay, C., Golino, D.A. ve Falk, B.W. (1993). "Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue". *Phytopathology*, 83(7), 749-758.
- Semerci, A., Kızıltuğ, T., Çelik, A. ve Kiracı, M. (2015). "Türkiye bağcılığının genel durumu". *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20(2), 42-51.

- Shehu, D., Sadikaj, D. ve Ruci, T. (2019). "Diagnostic of grapevine fanleaf virus (GFLV) on Durres district, Albania". Journal of Multidisciplinary Engineering Science and Technology, 6(3), 9765-9767.
- Sokhandan, B.N., Pashaei, A. ve Doulati, B.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), 213-221.
- Sokhandan-Bashir, N. ve Melcher, U. (2012). "Population genetic analysis of grapevine fanleaf virus". Archives of Virology, 157, 1919-1929.
- Stellmach, G. (1973). "Notes on a modification in the technique for inactivating NEPO-viruses in grapes by heat treatment". Rivista di Patologia Vegetale, 165-171.
- Tarla, G. ve Yilmaz, M.A. (2015). "Detection of grapevine fanleaf virus using serological and biological assays". Journal of Basic & Applied Sciences, 11, 343.
- Tekdal, D. ve Sarlar, S. (2016). "Yerel asma genetik kaynakları ve önemi". Bağbahçe Bilim Dergisi, 3(3), 20-26.
- Tekinel, N., Dolar, M.S., Nas, Z., Bilgin, N., Salih, H. ve Salcan, Y. (1971). "Investigations of fanleaf disease in the Mediterranean vineyards". Plant Protection Bulletin, 11, 225-247.
- TÜİK, (2021). Tarımsal istatistikler. [www.tuik.gov.tr/](http://www.tuik.gov.tr/) (Erişim Tarihi: 28.10.2022).
- Tülek, B. (2014). Türkiye'nin Trakya bölgesi bağlarında kısa boğum hastalığı grapevine fanleaf virus (GFLV)] ile vektör nematod *Xiphinema* spp. ilişkilerinin araştırılması. Doktora Tezi. Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Türkmen, Y. (2020). Batı Karadeniz bölgesinde asma yelpaze yaprak virüsü (grapevine fanleaf Virus) ve asma pinot gris virüsü (Grapevine pinot Gris virus)'nün tespiti. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Walker, M.A., Meredith, C.P. ve Goheen, A.C. (1985). "Sources of resistance to grapevine fanleaf virus (GFV) in Vitis species". Vitis, 24(4), 218-228.

Zarghani, S.N., Shams-Bakhsh, M., Bashir, N.S. ve Wetzel, T. (2013). “Molecular characterization of whole genomic RNA 2 from Iranian isolates of grapevine fanleaf virus”. *Journal of Phytopathology*, 161(6), 419-425.

Zhou, J., Fan, X., Dong, Y., Zhang, Z. P., Ren, F. ve Hu, G. (2015). “Detection and genetic variation analysis of grapevine fanleaf virus (GFLV) isolates in China”. *Archives of Virology*, 160, 2661-2667.



## **EKLER**

### **EK 1**

#### **Çanakkale İli Grapevine Fanleaf Virus İzolatının (GFLV-8) Nükleotit Sekans Dizilimleri**

TTACCGGATTGGCGTGGGTGATGAGCTTTGATGCTTATAATAGGATTACTAGT  
AGAATTACTGCTAGTGCGGATCCTGTGTACACTCTGTCAGTCCCTCACTGGCT  
TATCCACCATAAGTTGGGCACGTTTTCTTGTGAGATAGACTATGGAGAATTGT  
GCGGTCATGCCATGTGGTTTAAGTCTACAACATTTGAATCTCCGCGGTTGCAT  
TTCACATGTTTAACGGGCAACAACAAGGAGTTGGCGGCAGACTGGCAAGCTG  
TCGTGGA ACTATATGCTGAATTGGAAGAGGCCCGCCTCTTTTCTTGGGAAACCC  
AACTTTGG

### **EK 2**

#### **Çanakkale İli Grapevine Fanleaf Virus İzolatının (GFLV-11) Nükleotit Sekans Dizilimleri**

TTACCGGATTGGAGTGGGTGATGAGCTTTGATGCTTATAATAGGATTACTAGT  
AGAATTACTGCTAGTGCAGATCCTGTGTACACTCTGTCAGTCCCTCACTGGCT  
TATCCACCATAAGTTGGGCACGTTTTCTTGTGAGATAGACTATGGAGAATTGT  
GCGGTCATGCCATGTGGTTTAAGTCCACAACATTTGAATCTCCACGGTTGCAT  
TTTACATGTTTAACGGGCAACAACAAGGAGTTGGCGGCAGACTGGCAAGCTG  
TCGTAGAACTATATGCTGAATTGGAAGAGGCCCGCCTCTTTTCTTGGGAAACCC  
AACTTTGG

### **EK 3**

#### **Çanakkale İli Grapevine Fanleaf Virus İzolatının (GFLV-17) Nükleotit Sekans Dizilimleri**

TTACCGGATTGGCGTGGGTGATGAGTTTTGATGCTTACAATCGGATAACTAGT  
AGGATAACTACTAGTGCCGACCCCATATACACCTTGTCAGTCCCACATTGGCT  
TATCCACCATAAGTTGGGTACATTTACTTGTGAAATTGATTATGGAGAATTAT  
GTGGCCATGCTATGTGGTTCAAGTCCACAACATTTGAGTCTCCAAGGTTGCAT  
TTCACGTGCCTGACAGGTAATAATAAAGAGTTGGCGGCAGACTGGCAAGCTG  
TCGTTGAATTGTATGCTGAGCTGGAAGAGGCCACATTTTTTCTTGGGAACCC  
AACTTTGG

### **EK 4**

#### **Çanakkale İli Grapevine Fanleaf Virus İzolatının (GFLV-19) Nükleotit Sekans Dizilimleri**

TTACCGGATTGGCGTGGGTGATGAGCTTTGATGCTTATAATCGGATAACTAGT  
AGAATTACTGCTAGTGCAGATCCTGTGTACACTCTATCAGTCCCTCATTGGCT  
TATCCACCAGAAGTTGGGCACGTTTTCTTGTGAGATAGACTATGGAGAATTGT  
GCGGTCATGCCATGTGGTTTAAGTCCACAACGTTTGAATCTCCACGGTTGCAT  
TTCACATGTTTAACGGGCAACAACAAGGAGTTGGCGGCAGACTGGCAAGCTG  
TCGTAGAACTATACGCCGAATTGGAAGAGGCCGCCTCTTTTTCTTGGGAAACC  
CAACTTTGG

**EK 5**

**Çanakkale İli Grapevine Fanleaf Virus İzolatının (GFLV-8) Amino Asit Sekans  
Dizilimleri**

TGLAWVMSFDAYNRITSRITASADPVYTLSPHWHLIHHKLGTFSC EIDYGELCGH  
AMWFKSTTFESPRLHFTCLTGNNKELAADWQAVVELYAELEEAASFLGKPNF

**EK 6**

**Çanakkale İli Grapevine Fanleaf Virus İzolatının (GFLV-11) Amino Asit Sekans  
Dizilimleri**

TGLEWVMSFDAYNRITSRITASADPVYTLSPHWHLIHHKLGTFSC EIDYGELCGHA  
MWFKSTTFESPRLHFTCLTGNNKELAADWQAVVELYAELEEAASFLGKPNF

**EK 7**

**Çanakkale İli Grapevine Fanleaf Virus İzolatının (GFLV-17) Amino Asit Sekans  
Dizilimleri**

TGLAWVMSFDAYNRITSRITTSADPIYTLSPHWHLIHHKLGTF TCEIDYGELCGHA  
MWFKSTTFESPRLHFTCLTGNNKELAADWQAVVELYAELEEA TFFLGPNPF

## **EK 8**

### **Çanakkale ili Grapevine Fanleaf Virus İzolatının (GFLV-19) Amino Asit Sekans Dizilimleri**

TGLAWVMSFDAYNRITSRITASADPVYTLSPHWLIHQKLGTFSC EIDYGELCGH  
AMWFKSTTFESPRLHFTCLTGNNKELAADWQAVVELYAELEEAASFLGKPNF





## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

İsim SOYİSİM :

Doğum Yeri :

Doğum Tarihi :

### EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi :

Bildiği Yabancı Diller :

### BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar

b) Bildiriler

c) Katıldığı Projeler

### İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl:

### İLETİŞİM

E-posta Adresi :

ORCID :