



Asma ve Narlardan İzole Edilen *Grapevine leafroll-associated virus-1* İzolatlarının Kısmi Sekanslarının Karşılaştırmalı Genomik Analizleri

Eminur Elçi^{1*}, Mona Gazel², Kadriye Çağlayan²

¹Ömer Halisdemir Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Bitkisel Üretim ve Teknolojileri Bölümü, 51240 Niğde, Türkiye

²Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 31100 Hatay, Türkiye

MAKALE BİLGİSİ

Araştırma Makalesi

Geliş 27 Şubat 2017
Kabul 26 Nisan 2017

Anahtar Kelimeler:
Punica granatum L.
Vitis vinifera L.
dsRNA
cDNA
DOP-PCR
Filogenetik analiz.

*Sorumlu Yazar:

E-mail: eminur@gmail.com

Ö Z E T

Asma yaprak kıvrıcıklık (grapevine leafroll) hastalığı geçmişten bu yana bağ virüs hastalıkları içerisinde ekonomik önem derecesi yüksek olan dünya çapında yayılım gösteren bir hastalıktır. *Closterovirus* cinsine ait virüs üyeleri içerisinde, Asma yaprak kıvrıcıklık virüsü 1 (*Grapevine leafroll-associated virus 1*) (GLRaV-1) en eski olanıdır. Bağlarda önemli verim kayıplarına neden olan bu virüs, özellikle yapraklarda kıvrılma semptomu ile tanımlanır. Nar bitkisi, ekonomik değeri yüksek bitkiler arasında yer almakta olup henüz az sayıda virüs hastalıkları tanımlanmış ancak son yıllarda yürütülen çalışmalarda bu bitkinin de GLRaV-1'in konukçusu olabileceği bildirilmiştir. Bu çalışmanın amacı, bağ ve narlardan elde edilen GLRaV-1 izolatlarının genomik olarak kıyaslanmasıdır. Bu amaçla, 2014 yılında Hatay ve Niğde illerinden toplanan asma ve nar örneklerinden total RNA ve dsRNA izolasyonları yapılmış, virüs genomuna özgü 2 farklı bölgenin (hareket (movement) proteini (p24) ve ısı şok (heatshock) proteinini (HSP70h) çoğaltan primerler kullanılarak RT-PCR ile analizleri yapılmış elde edilen ürünler klonlanmış ve sekans analizleri yapılmıştır. Ayrıca Closterovirüs'ün HSP70h genine özgü dejenere primer kullanılarak DOP-PCR analizleri yapılmıştır. DNA dizi analizlerinin sonunda elde edilen kısmi genomun, BLAST analizleri yapıldıktan sonra filogenetik analizleri yapılmıştır. Bu çalışma sonunda, yeni bir konukçu olduğu düşünülen nardan izole edilen GLRaV-1 izolatlarının asma izolatları ile kıyaslamalı olarak analiz edilmesi sağlanmış ve izolatlar arası yüksek oranda benzerlik olduğu tespit edilmiştir.

Turkish Journal Of Agriculture - Food Science And Technology, 5(10): 1136-1141, 2017

Comparative Genomic Analysis of Partial *Grapevine Leafroll-Associated Virus-1* Sequences Isolated from Pomegranate and Grapevines

ARTICLE INFO

Research Article

Received 27 February 2017
Accepted 26 April 2017

Keywords:
Punica granatum L.
Vitis vinifera L.
dsRNA
cDNA
DOP-PCR
Phylogenetic analysis.

*Corresponding Author:

E-mail: eminur@gmail.com

ABSTRACT

Grapevine leafroll disease is one of the worldwide diseases with economic importance among grapevine virus diseases since many years. *Grapevine leafroll-associated virus-1* (GLRaV-1) is the first identified virus related to leafroll viruses which are belonged to *Closterovirus* and *Ampelovirus*. Leafroll symptoms are typical for this virus and it causes yield losses on grapevines. Pomegranates are also economically important trees and up to now; only a few viral agents were identified in this plant species and in the last years, it was reported that pomegranate could be as a new host of GLRaV-1. Aim of this study was to compare GLRaV-1 isolates from grapevine and pomegranates. For this purpose, dsRNA and total RNA isolations were done and RT-PCR analysis were conducted by using primers of movement protein (p24) and heatshock70 protein (HSP70h) genes of GLRaV-1 and PCR products were cloned and sequenced in the collected samples from Hatay and Niğde in 2014. -PCR analysis was done by using degenerated primer heatshock 70 homolog protein of *Closterovirus*. Blast and phylogenetic analysis were performed with the obtained partial nucleotide sequences. At the end of this study, it was ensured that GLRaV-1 isolates isolated from the pomegranate, which is thought to be a new host, were analysed comparatively with the grapevine isolates and high similarities were detected between isolates.

Giriş

Bağcılıkta ülkemiz, İtalya, Fransa, ABD ve İspanya'dan sonra üretimde beşinci sırayı almakta olup üzüm, sofralık ve kurutmalık olarak uluslararası boyutta önemli rol alırken şarapçılık da son yıllarda önemli gelişmeler göstermeye başlamıştır. Diğer tüm ürünlerde olduğu gibi bağ yetiştiriciliğini tehdit eden zararlı ve hastalıklar mevcuttur. Bu etmenler arasında özellikle hücre içinde yaşayan organizmalar (virüsler, viroidler, sadece floem ve ksilemde bulunan prokaryotlar) göze çarpmakta ve bitkilerin yaşam kalitesini azaltarak verimde azalmalara neden olmaktadır. Günümüzde bağları enfekte eden 60 kadar virüs saptanmıştır (Martelli, 2014). Bu virüslerin hemen hemen yarısı *Nepovirus*, *Sadwavirus*, *Closterovirus*, *Ampelovirus*, *Vitivirus*, *Maculavirus* ve *Foveavirus* cinsine ait virüslerdir. Bu virüsler tarafından neden olunan 22 adet hastalık bilinmektedir ve bunlardan sadece bir kaçının ekonomik zararı yüksektir (Martelli, 2014).

Asma yaprak kıvrıcılık (grapevine leafroll) hastalığının geçmişi 19. yüzyılın ortalarına dayanmakta olup, asma virüs hastalıkları içerisinde ekonomik önem derecesi yüksek olan, dünya çapında yayılım gösteren bir hastalıktır (Martelli, 2014). Hastalığın en belirgin belirtileri, büyüme mevsiminin sonuna doğru görülebilmekte olup iklim koşullarına bağlı olarak Haziran veya Temmuz başlarından itibaren üzüm çeşitlerinin yaşlı yapraklarında lekelenmeler şeklinde gelişir. Bu lekeler genişler ve birleşir, yaz sonunda veya sonbaharda kırmızımsı ve sarımsı renk, yaprak ayasının tamamını kapladığı halde, ana damarlar yeşil olarak kalır. Şiddetli hastalık seyrinde kırmızı asma çeşitlerinde tüm yaprak yüzeyi koyu bordo bir renk alır. Hastalık sonucu vejetasyon gecikir ve dane olumunda düzensizlikler gözlenerek 2-3 haftalık gecikmeler yaşanabilir. Danelerde şeker içeriği %30 oranında düşebilir ve antosiyanin, fenolik vb. içeriği değiştiğinden şaraplık üzüm kalitesinde de önemli ölçüde azalmalar meydana gelir. Beyaz daneli üzümlerde yapraklarda kızarma yerine klorotik lekeler gözlenir (Martelli, 2014). Yaprak kıvrıcılık hastalığından sorumlu olan *Ampelovirus* ve *Closterovirus* familyasında yer alan çeşitli virüsler tanımlanmış olup, Asma yaprak kıvrıcık virüsü 1 (*Grapevine leafroll-associated virus 1: GLRaV-1*) bunlar arasında en eski olanıdır. Bu cinslere ait bugüne kadar 9 virüs saptanmıştır (*Grapevine leafroll associated virus 1-9*), bunlardan dört tanesinin (GLRaV-1, -2, -3 ve -7) hastalık etmeni olduğu deneysel olarak da kanıtlanmıştır (Martelli, 2014). Bu virüslerden sadece GLRaV-2 *Closterovirus* cinsine ait olup diğerlerinin hepsi *Ampelovirus* cinsi içinde yer almaktadır. Hastalığın uzak mesafelere taşınması bulaşık üretim materyalleri ile olmakla birlikte yakın mesafeli taşınmalarda pseudococcid (*Helicococcus*, *Phenacoccus*, *Pseudococcus* ve *Planococcus*) ile coccid (*Pulvinaria*, *Nepulvinaria*, *Parthenolecanium*, *Coccus*, *Parassaissetia*, *Saissetia* ve *Ceroplastes*) unlu bitleri semi-persistent taşınmadan sorumlu olmaktadır (Martelli, 2014). Ülkemizde bağlarda hastalığa neden olan virüs etmenlerinden *Grapevine fanleaf nepovirus* (GFLV), *Grapevine fleck virus* (GFkV), *Grapevine leafroll-associated virus 1-2-3-4-5-7-9* (GLRaVs), *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B*

(GVB), *Grapevine deformation virus* (GDefV), *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine Pinot gris virus* (GPGV) gibi birçok virüsün varlığı tespit edilmiştir (Özaslan ve Yılmaz, 1995; Çağlayan., 1997; Yılmaz ve ark., 1997; Köklü ve ark., 1998; Köklü ve Baloğlu, 2000, 2001a, 2001b; Çığsar ve ark., 2002, 2003; Akbaş ve ark., 2007; Buzkan ve ark., 2010, 2015; Gazel ve ark., 2016).

Nar bitkisi ülkemiz için ekonomik öneme sahip bitki türleri arasındadır ve üretim açısından dünya çapında İran, Hindistan ve Çin'den sonra 4. sırada yer almakta olup, dünya nar ticaretinde önemli ülkeler arasında yer almaktadır (Kurt ve Şahin, 2013). Bağ hastalıklarının yanı sıra nar bitkisini de hastalandıran çeşitli fungal ve bakteriyel etmenler tanımlanmış olup (*Xanthomonas axanopodis pv punicae* (Yenjerappa ve ark., 2013), *Botrytis cinerea* (Mirzaei ve ark., 2008), *Penicillium spp.* (Palou ve ark., 2013), *Alternaria alternata* (Gat ve ark., 2012), *Aspergillus niger*, *Aureobasidium pullulans* (Pala ve ark., 2009; Özgüven ve ark., 2012; Thomidis, 2014), *Cytospora granati* (Mirabolathy ve ark., 2012), *Cytospora punicae* Sacc. (Hand ve ark., 2014; Palavouzis ve ark., 2015) bulaşıklık kaynağı virüs etmenleri için kısıtlı bilgi bulunmaktadır. Çağlayan ve ark. (2014; 2016) nar ağaçlarında gözlenen virüs benzeri semptomların gerek serolojik gerekse moleküler yöntemlerle GLRaV-1 ile ilişkisini ilk kez ortaya koymuştur.

Bu çalışmanın amacı, nar bitkisinden elde edilen GLRaV-1 izolatlarının asmadan elde edilen izolatlar ile karşılaştırmalı genomik analizlerinin yapılması ve bu iki tür bitki grubundaki izolatların benzerlik ve farklılıkların genomik düzeyde tespit edilmesidir.

Materyal ve Metot

Bitki Materyali

Nar bitkilerinde virüs hastalıklarına benzer belirti gösteren yaprak örnekleri bahar ve sonbahar dönemleri arasında Niğde ve Hatay illeri çevresinden 2014 yılında toplanmıştır. Ayrıca Hatay'da serolojik ve moleküler yöntemlerle tespit edilmiş olan GLRaV-1 ile bulaşık olduğu bilinen (Çağlayan ve ark., 2014; 2016) 3 adet "Hicaz" nar bitkisinden de yaprak örnekleri toplanmıştır. Toplamda, Hatay ilinden sonbahar döneminde 36 adet şüpheli nar örneği ve 24 adet asma örneği toplanmıştır. Niğde ilinden ise 24 adet şüpheli asma örneği toplanmıştır.

Total RNA İzolasyonu

Yaprak örneklerinden total RNA'lar, iki farklı şekilde izole edilmiştir. Asma örneklerinden RNA izolasyonu için Zymo Research (USA) "Plant RNA Extraction Kit" kullanılmıştır. Nar örneklerinin fenolik oranları çok yüksek olduğu için bazı modifikasyonlar yapılmıştır. Ekstraksiyon solüsyonu içerisine PVP40 eklenmiş ve iki kere fenol:chloroform:isoamilalkol (25:24:1) basamağından geçirilmiştir. Ayrıca ekstra olarak ta ZymoResearch (USA) "RNA clean&Concentrator" ticari kiti aracılığıyla temizlenmesi sağlanmıştır.

dsRNA İzolasyonu

Yaprak dokusundan 30 g sıvı azotta homojenize edilerek üzerine 90 ml 2xSTE (1 M NaCl, 0,5 M Tris, 0,01 M EDTA) ve 35 ml %10 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat), 2 ml bentonit, 2 ml merkaptolanol eklenmiştir. fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) karışımı eklendikten sonra oda sıcaklığında 45 dk. çalkalanıp 10.000 rpm' de 15 dk. santrifüj edilmiştir. Oluşan üst faz yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 3 g CF11 selüloz ve 26 ml saf etanol eklenerek 1 saat oda sıcaklığında hafifçe çalkalanmıştır. 10.000 rpm' de 15 dk. santrifüj edildikten sonra, çökelen selüloz 50 ml %17 etanol- STE karışımı içerisinde çözündürülerek tekrar 10.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiştir. Kolon kromatografisi için 20 ml şırıngaların içine tülbent ve cam yünü yerleştirilmiştir. Pellet 50 ml yıkama solüsyonunda çözündürülerek kolona aktarıldıktan sonra kolonda 3–4 kez 50 ml' lik yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra, kolondaki sıvı tamamen uzaklaştığında, 40 ml STE solüsyonu eklenerek, steril beherde çökelen dsRNA toplanmıştır. Üzerine 2,5 hacim soğuk etanol ve 0,1 hacim 3 M sodyum asetat eklenerek, -20°C'de bir gece tutulmuştur. Ertesi gün 10.000 rpm' de 30 dk. santrifüj edildikten sonra pellet oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan pellet 1ml TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7,5) tampon solüsyonu içerisinde çözündürüldükten sonra 6.000 rpm' de 4 dk. santrifüj edilecek ve sıvı kısım üzerine 2,5 hacim soğuk etanol ve 0,1 hacim 3 M sodyum asetat eklenip -20°C' de bir gece tutulmuştur. Pellet, 15.000 rpm' de 20 dk. santrifüj edildikten sonra %70' lik soğuk etanolde yıkanmıştır. Kurutulan pellet 10 ml TE tampon solüsyonu içerisinde çözündürülerek -20°C' de saklanmıştır (Morris ve Dodds, 1979). dsRNA, agaroz jelde ayrıştırılıp UV ışığı altında görüntülenmiştir.

cDNA Sentezi

Total RNA' ların ve dsRNA' ların kalıp olarak kullanılması ile cDNA sentezlenmiştir. 0,2 µg/µl Random hexamer primerinden 1 µl, RNA'dan 5 µl eklenip, steril su ile 12,5 µl' ye tamamlandıktan sonra 94°C'de 5 dk. ısı bloкта inkübe edildikten sonra 5 dk. buz üzerinde bekletilmiş ve üzerine 1 µl M-MLV ters transkriptaz (*Moloney Murine Leukaemia virus reverse transcriptase*, 200 unite/µl), 4 µl 5x Ters Transkriptaz buffer, 2 µl 0,1M DTT, ve 0,5 µl 10mM dNTP eklenerek 42°C'de 1 saat ve ardından 70°C'de 10 dk. inkübe edildikten sonra buz üzerinde tutulmuştur.

DOP-PCR; Dejenere Edilmiş Oligonükleotid Primer-PCR

cDNA' lar kullanılarak DOP-PCR yapılmıştır. 1 µl cDNA, 25 µl Master Mix, 2,5 µl primerler eklenerek karışım hazırlanmıştır. Closteroviral HSP70h Degenerated primeri (620 bp, Elbeaino ve ark., 2010), Motif Is GGITTIGAITTYGGIACIAC 1806-1826, Motif IIa RTCIAAIGTICCCICCCRAA 2401-2421 (I (Inosine), (R: A+G), (Y: T+C), (S: C+G), (K: G+T), (H:A+T+G), W(A+T)) kullanılarak PCR karışımı 94°C 5 dk. takiben 5 döngü 94°C 1 dk. 30°C 1,5 dk., 30°C'den 72°C'ye kadar 15 sn.de 3,5°C artacak şekilde 5 dk., 72°C 3 dk. tutulduktan sonra, 35 döngü 94°C 1 dk. 62°C 1 dk., her bir döngüde 14 sn uzayacak şekilde 72°C 2 dk. ve

72°C 7 dk. tutularak reaksiyon gerçekleştirilecektir. Sybr Gold ile boyanan %1,5' luk agaroz jel, UV altında görüntülenmiştir.

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

cDNA' lar kalıp olarak kullanılarak PCR yapılmıştır. 5 µl 5× PCR buffer, 1 µl 25 mM MgCl₂, 0,5 µl 10 mM dNTPs, 0,5 µl primer seti (10 µM), 0,2 µl Taq polimeraz (500 unite/µl), içeren 25 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Kullanılan primer dizileri GLRaV-1-p24 geni için

F:5'-CGCGCTTGCAGAGTTTAAGTGGTT-3',

R:5'-TCCGTGCTGCATTGCAACTTTCTC-3'

(634bp); GLRaV-1-HSP70h geni için

F:5'-CAGGCGTCGTTTGTACTGTG-3',

R:5'-TCGGACAGCGTTTAAGTTCC-3

(540bp) şeklindedir (Alabi ve ark., 2011). PCR reaksiyonları 35 döngü 94°C 30 s, 54°C 45 s, ve 72°C 1 dk.; ve 72°C 10 dk. olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Moleküler Klonlama

Elde edilen PCR ürünleri DNA temizleme kiti (ZymoResearch-DNA clean&concentrate) kullanıldıktan sonra ürünlerin vektöre bağlanması (ligasyon) için; 1 µl pGEM-TEasy vector plazmid, 1 µl 10x ligasyon solüsyonu, 1 µl DNA ligaz, 5 µl DNA ve 2 µl sdH₂O eklenerek, oda sıcaklığında 2 sa. ve takibinde 70°C' de 15 dk. inkübe edilmiştir. Transformasyon için; 25 µl *E. coli* ve 1 µl ligasyon solüsyonu küvet içerisine eklenmiş ve GenePulser cihazında 2,4 V akım verildikten sonra, karışım 975 µl sıvı besiyerine aktarılıp 37°C' de 1 sa. 250 rpm' de çalkalanarak inkübe edilmiştir. Ampisilin içeren YT agar (lucigen) besiyeri hazırlandıktan sonra üzerine 100 mM IPTG ve 50mg/ml XGal eklenerek, hücreler hazırlanan besiyerine ekilerek 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Mavi – beyaz renkte oluşan kolonilerden beyaz olanları TB besiyerine (500 ml sdH₂O içinde; 5,9 g tripton, 11,8 g maya ekstraktı, 4,7 g dipotasyum hidrojen fosfat, 1,1 g potasyum dihidrojen fosfat) aktararak inkübasyona bırakılmıştır. Büyüyen hücreler seçilmiş, koloni PCR ile test edilmiş ve nükleotid dizilerini belirlemek üzere DNA dizilemeye tabi tutulmuştur.

Nükleotid Dizi ve Filogenetik Analizler

Nükleotid dizileme, ABI 3730 Automated Genetic Analyzer cihazı kullanılarak hizmet alımı şeklinde yapılmıştır (İontek, İstanbul). Elde edilen diziler BLAST (NCBI) analizlerine tabii tutulmuştur. Filogenetik analizler MEGA 6.0.6 yazılımı kullanılarak neighbor-joining metodu ile 1000 bootstrap tekrarı ile yapılmıştır (Tamura ve ark. 2011)

Bulgular ve Tartışma

Ülkemiz için ekonomik değere sahip bağlardan başka, son yıllarda narlarda da hastalık oluşturduğu belirlenen GLRaV-1 virüsünün farklı izolatlarının genomik benzerlikleri araştırılmıştır. Daha önceki çalışmalarda nar bitkisinde gözlenen GLRaV-1 benzeri semptomların gerek serolojik gerekse moleküler yöntemlerle GLRaV-1 ile ilişkileri araştırılmış ve semptomolojik narlarda bu virüsün varlığı tespit edilmiştir (Çağlayan ve ark., 2014). Bu çalışma ile nar GLRaV-1 izolatları genomik olarak

karakterize edilmiş ve asma izolatları ile olan benzerlikleri karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır.

Yapılan arazi çalışmalarında nar ağaçlarından sonbahar döneminde toplanan şüpheli yaprak örneklerinde en sık gözlenen semptomlar yaprak sararması, yaprak kıvrıklaşması ve damar açılması şeklindedir (Resim 1).

GLRaV-1 etmeninin varlığının analizi için toplanan şüpheli örneklerin total RNA'ları izole edilmiş ve cDNA sentezlenmiştir. GLRaV-1'in p24 genine özgü primerler ile analiz edildiğinde Hatay ilinden toplamda 9 adet asma örneği (%37,5) ile 3 adet nar örneğinin (%8,3) GLRaV-1 ile enfekteli olduğu tespit edilmiştir. Niğde ili örneklerinde herhangi bir GLRaV-1 enfeksiyonu tespit edilememiştir. PCR analizlerinde negatif olarak tespit edilen şüpheli örneklerde gözlenen semptomların diğer virüs hastalıklarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

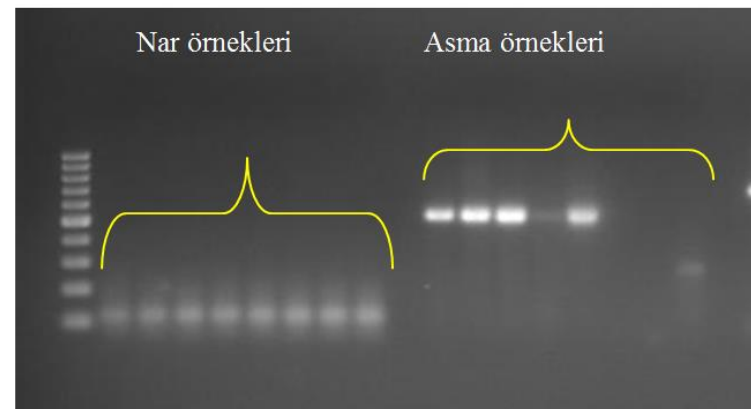
HSP70h gen bölgesinin amplifikasyonu için yapılan PCR analizlerinde; p24 gen bölgesi için pozitif sonuç veren asma örneklerinin hepsinde amplifikasyon gözlenirken, nar örnekleri çeşitli modifikasyonlara rağmen HSP70h gen bölgesi için amplikon vermemiştir (Resim 2). Daha önceki çalışmalarda da (Çağlayan ve ark., 2016) tespit edilen bu durum nedeni ile dsRNA izolasyonları yapılmıştır. Elde edilen dsRNA profili

Resim 3'te yer almaktadır. Nar bitkisindeki yaklaşık 1060 bp'lik ürünün agaroz jelde çok zayıf görünmesinin nedeninin virüs konsantrasyonunun çok düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Asma örneğinde ise yaklaşık 1060 bp ile 890 bp'lik ürün gözlenmiştir (Resim 3). Asma ve nar örneklerinin dsRNA profilleri kıyaslandığında her ikisinde de benzer RNA büyüklüklerinin elde edildiği gözlenmiştir. Nardan izole edilen dsRNA'nın kalıp olarak kullanılarak yapılan cDNA ve PCR analizinde yine HSP70h gen bölgesi çoğaltılamamış ve bu nedenle Closteroviral HSP70h dejenere primerler kullanılmıştır. DOP-PCR analizleri sonucunda da sadece pozitif kontrol olarak kullanılan GLRaV-1 ile enfekteli olduğu bilinen asma örneğinde amplifikasyon elde edilmiş olup, testlenen nar örneklerinde beklenen seviyede amplifikasyonlar gözlenememiştir (Resim 4).

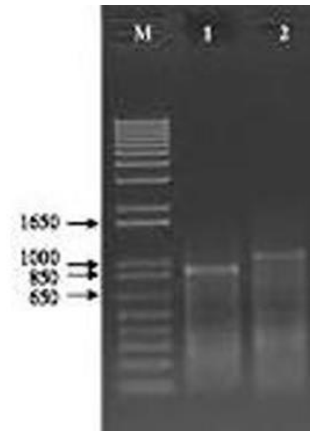
Nar ve asma örneklerinde ürün veren p24 gen bölgesinin PCR ürünleri klonlanıp DNA dizi analizine tabii tutulup, elde edilen sekanslar BLAST analizleri ile kıyaslandığında; asma ile nar izolatlarının kısmi p24 gen bölgelerinin maksimum nükleotid ve aminoasit benzerlik oranlarının birbirleri ile çok benzer ve diğer GenBankası izolatları ile de yüksek oranda (<%90) benzerlik gösterdikleri tespit edilmiştir (Tablo 1).



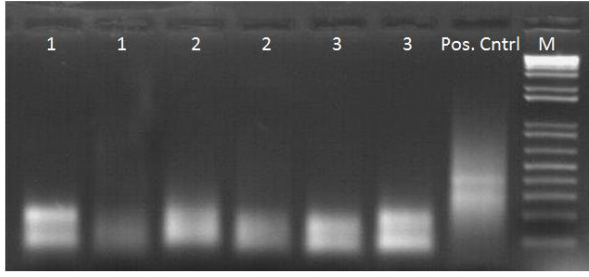
Resim 1 Nar bitkisinin yaprağında gözlenen semptomlar, A: Kloroz ve yaprak deformasyonu, B: Damar açılmaları.



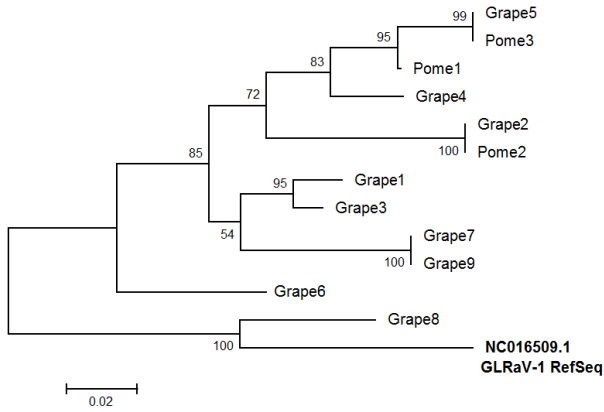
Resim 2 Nar ve asma örneklerinde GLRaV-1'in PCR analizinin agaroz jel sonuçları. Örnekler, sırası ile nar (ilk 8 kuyucuk) ve asma (ikinci sekiz kuyucuk) örneklerinin GLRaV-1 HSP70h özgü primeri ile RT-PCR analizinin sonuçlarını göstermektedir.



Resim 3 Nar (1) ve Asma (2) örneğinden elde edilen dsRNA profilleri. M: 1 kb plus RNA Marker (Thermo Sci., USA).



Resim 4 DOP-PCR analizinin agaroz jel elektroforezi sonucu. Nar örnekleri iki tekrar olarak 1, 2 ve 3 No'lu örnekler olup Pozitif kontrol olarak GLRaV-1 ile bulaşık olduğu bilinen asma örneği kullanılmıştır. M: 1 kb plus DNA Marker (Thermo Sci., USA).



Resim 5 Asma ve nar GLRaV-1 izolatlarının p24 movement proteininin aminoasit dizilerinin neighbor-joining metodu kullanılarak Mega 6.0.6 yazılımı yardımı ile oluşturulan dendrogramı. Grape1-9: Asma GLRaV-1 izolatlarını, Pome1-3: Nar GLRaV-1 izolatlarını tanımlamaktadır. Dalların yanındaki değerler Bootstrap değerlerinin göstermektedir. NC016509.1/GLRaV-1 RefSeq GenBankasından alınan izolatdır.

Tablo 1 Asma (Grape1-9) ve nar (Pome1-3) GLRaV-1 izolatlarının p24 gen bölgesinin nükleotid dizilerinin BLAST analizleri sonucu referans izolatla (Acc. No.:NC016509) maksimum nükleotid (nt) ve aminoasit (aa) benzerlik oranları.

İzolat Adı	Max. nt. Identity(%)	Max. aa. Identity(%)
Grape1	95	94
Grape2	92	93
Grape3	93	94
Grape4	91	92
Grape5	91	92
Grape6	89	90
Grape7	93	96
Grape8	94	93
Grape9	93	96
Pome1	89	90
Pome2	91	91
Pome3	93	94

Yapılan filogenetik analizler sonucunda ise nar izolatlarının yüksek bootstrap değerleri ile bağ GLRaV-1 izolatları ile benzer homoloji gösterdikleri ve aynı kümede sınıflandıkları gözlenmiştir. Asmadan izole edilen Grape2 ile nardan izole edilen Pome2 ve Grape5 ile Pome5 izolatlarının GLRaV-1 kısmi dizilerinin yüksek

bootstrap değerleri ile aynı dalda kümelenecekleri bu sonuçları doğrulamaktadır (Resim 5). Gen Bankasından alınan referans GLRaV-1 genomu (Acc. No.: NC016509) ile asmadan izole edilen Grape8 GLRaV-1 izolatının benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda, GLRaV-1'in nar bitkisini enfekte ettiği, bu bitkideki izolatların ana konukçusu olarak bilinen asma bitkisinden izole edilen izolatları ile p24 gen bölgesinde yüksek oranda benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Daha anlamlı karşılaştırmalı genetik analizlerinin yapılabilmesi için nar izolatlarının tüm genom dizilerinin elde edilmesi ve analizlerinin yapılması gereklidir. Bu konuda, yeni nesil dizileme teknolojileri kullanılarak çalışmalar yapılması hızlı, detaylı ve güvenilir sonuçlar alınmasını sağlayacaktır.

Teşekkür

Bu çalışma FEB2015/23BAGEP no'lu proje kapsamında Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

- Akbaş B, Kunter B, İlhan D. 2007. Occurrence and Distribution of Grapevine Leafroll associated Viruses 1, 2, 3 and 7 in Turkey. *J Phytopathol* 155(2), pp.122-124.
- Alabi OJ, Al Rwahnih M, Karthikeyan G, Poojari S, Fuchs M, Rowhani A, Naidu RA. 2011. Grapevine Leafroll-Associated Virus 1 Occurs As Genetically Diverse Populations. *Phytopathology* 101: 1446-1456.
- Buzkan N, Karadag S, Kaya A, Baloğlu S, Minafra A. 2010. First report of the occurrence of Grapevine leafroll-associated virus-5 in Turkish vineyards. *J Plant Pathol* 158: 448-449.
- Buzkan N, La Notte P, Karadag S, Aktan A, Saldarelli P, Minafra A. 2015. Detection of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus in autochthonous grapevine cultivars in Turkey. *J Plant Pathol* 97: 387-389.
- Çağlayan K, Elçi, E, Gazel M. 2016. Detection and partial characterization of grapevine leafroll-associated virus 1 in pomegranate trees in Turkey. *Eur J Plant Pathol* 2016 145: 199-203.
- Çağlayan K, Gazel M, Elçi E, Çınar CT. 2014. First Report on Grapevine Leafroll-Associated Virus-1 (GLRaV-1) in Pomegranate Trees (*Punica Granatum* L.) in Turkey. 14th Mediterranean Phytopathological Union (MPU) Congress. İstanbul, Türkiye. 25-29, August 2014.
- Çağlayan K. 1997. Incidence of grapevine leafroll, GVA and tomato black ring virus in the vineyards of Hatay Province. *J Turk Phytopathol* 26: 121-128.
- Çığsar I, Digiario M, Gokalp K, Abou Ghanem-Sabanadzovic N, De Stradis A, Boscia D, Martelli GP. 2003. Grapevine deformation virus, a novel nepovirus from Turkey. *J Plant Pathol* 85: 183-191.
- Çığsar İ, Digiario M, Martelli GP. 2002. Sanitary status of grapevine in south-eastern and central Anatolia (Turkey). *EPPPO Bull.* 32: 471-475.
- Elbeaino T, Digiario M, Heinoun K, De Stradis A, Martelli GP. 2010. Fig mild mottle-associated virus, a novel closterovirus infecting fig. *J Plant Pathol* 85: 183-191.
- Gat T, Liarzi O, Skovorodnikova Y, Ezra D. 2012. Characterization of *Alternaria alternata* causing black spot disease of pomegranate in Israel using a molecular marker. *Am. Phytopathol. Soc.* 96: 1513-1518.

- Gazel M, Caglayan K, Elçi E, Öztürk L. 2016. First report of Grapevine Pinot gris virus in grapevine in Turkey. *Plant Disease* 100 (3): 657.
- Hand FP, Choudhury RA, Gubler WD. 2014. First report of *Cytospora punicea* causing wood canker and branch dieback of pomegranate (*Punica granatum*) in the United States. *Plant Dis.* 98: 2012–2013
- Köklü G, Baloğlu S. 2001a. Asma Yaprak Kıvrılması İle İlişkili Virüs 3 (GLRaV-3)'ün Saflaştırılması ve Antiserum Üretimi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi* 1(1): 5-8.
- Köklü G, Baloğlu S. 2000. Determination of Incidence of Grapevine leafroll Associated Viruses in Some Grapevine Varieties Grown in Thrace Region. *J Turk Phytopathol* 29 (2-3): 85-94.
- Köklü G, Baloğlu S. 2001b. Trakya Bölgesi Yetiştirilen Bağlarda dsRNA Analizleriyle Asma Yaprak Kıvrılması ile İlişkili Virüslerin Tespit Edilmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi* 1(1): 1-4.
- Köklü G, Digiaro M, Savino V. 1998. A survey of grapevine viruses in Turkish Thrace. *Phytopathol Mediterr* 37: 140-142.
- Kurt H, Şahin G. 2013. Bir Ziraat Coğrafyası Çalışması: Türkiye'de Nar (*Punica granatum* L.) Tarımı. *Marmara Coğrafya Dergisi* 27: 551-574.
- Martelli GP. 2014. Directory of Virus and Virus-Like Diseases of The Grapevine and Their Agents. *J Plant Pathol* 96: 1-4.
- Morris T J, Dodds J A. 1979. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology* 69: 854-858.
- Mirabolfathy M, Groenewald JZ, Crous PW. 2012. First report of *Pilidiella granati* causing dieback and fruit rot of pomegranate (*Punica granatum*) in Iran. *Plant Dis.* 96: 461.
- Mirzaei S, Goltapeh EM, Shams-Bakhsh M, Safaie N. 2008. Identification of *Botrytis* spp. on plants grown in Iran. *J. Phytopathol.* 156: 21–28.
- Özaslan M, Yılmaz MA. 1995. Grapevine virus diseases in Adana, Tarsus, Şanlıurfa and Adıyaman regions (Adana, Tarsus, Şanlıurfa ve Adıyaman bölgelerinde yetiştirilen bağlara zarar veren virüs hastalıkları). VII Fitopatoloji Kongresi. Adana, Türkiye. pp: 306-312.
- Özgüven AI, Yılmaz C, Keles D. 2012. Pomegranate biodiversity and horticultural management. *Acta Hort.* 940: 21–28.
- Pala H, Tatlı A, Yılmaz C, Özgüven AI. 2009. Important diseases of pomegranate fruit and control possibilities in Turkey. *Acta Hort.* 818: 285–290.
- Palavouzis SC, Tzamos S, Paplomatas E, Thomidis T. 2015. First report of *Cytospora punicea* isolated from pomegranate plants with symptom of collar rot in Northern Greece. *J. Plant Pathol.* 97: 209–220
- Palou L, Taberner V, Guardado A, Del Río MÁ, Montesinos-Herero C. 2013. Incidence and etiology of postharvest fungal diseases of pomegranate (*Punica granatum* cv: mollar de Elche) in Spain. *Phytopathol. Mediterr.* 52: 478–489.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731–2739.
- Thomidis T. 2014. Fruit rots of pomegranate (cv. wonderful) in Greece. *Plant Pathol.* 43: 583–588.
- Yenjerappa S, Nargund V, Byadagi A, Ravikumar M, Mokashi, A, Basavangoud K. 2013. Biological management of bacterial blight of pomegranate caused by *Xanthomonas axanopodis* pv. *punicea*. *Karnataka J. Agrisci.* 26: 561–562.