



Molecular Detection and Characterization of New Emerging Viruses by PCR Analysis in Hatay and Tekirdag Vineyards

Hamide Deniz Kocabağ^{1,a,*}, Kadriye Çağlayan^{1,b}, Mona Gazel^{1,c}

¹Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Mustafa Kemal University, 31000 Hatay, Turkey

*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 17/01/2019 Accepted : 20/03/2019</p> <p>Keywords: <i>Vitis vinifera</i> GPGV GSyV-1 GRBaV GRLDaV Turkey</p>	<p>The improvements on the next generation sequencing or high-throughput technologies allowed the discovery of several unknown viruses in grapevines and also in other plants. The most important new emerging grapevine viruses were identified as <i>Grapevine pinot gris virus</i> (GPGV), <i>Grapevine syrah virus 1</i> (GSyV-1), <i>Grapevine red blotch-associated virus</i> (GRBaV) and <i>Grapevine roditis leaf discoloration virus</i> (GRLDaV). The aim of the present study was to investigate the occurrence and characterization of these viruses in Tekirdag and Hatay viticulture production areas by PCR and DNA sequencing analyses. Totally 191 and 111 grapevine samples showing both virus-like symptoms and symptomless were collected from Tekirdağ and Hatay provinces, respectively. Among the tested samples GPGV and GSyV-1 were detected in both local and imported cultivars by the infection rate of 43.62 % and 1.04% in Tekirdağ, respectively. In Hatay province, only GSyV-1 was detected by the infection rate of 0.9 % and all tested samples were negative for GPGV, GRBaV, GRLDaV. RT-PCR results showed that DNA fragments of 411 bp, 302 bp and 618 bp corresponding to the part of the coat protein (CP), movement protein (MP) and the replicase genes of GPGV were successfully amplified in Tekirdağ samples. All PCR products of GPGV were directly sequenced on both strands. All the nucleotide sequences of CP, MP and 5' UTR and N-terminus of replicase genes shared the highest sequence identity with different GPGV isolates deposited in Genbank</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 7(5): 789-798, 2019

Bağlarda Yeni Saptanan Virüslerin Hatay ve Tekirdağ İli Bağ Alanlarında PCR Yöntemiyle Belirlenmesi ve Moleküler Karakterizasyonu

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 17/01/2019 Kabul : 20/03/2019</p> <p>Anahtar Kelimeler: <i>Vitis vinifera</i> GPGV GSyV-1 GRBaV GRLDaV Hatay Tekirdağ</p>	<p>Son yıllarda yeni nesil sekans analiz tekniklerinin yaygın olarak kullanılması bağlarda ve diğer bitki türlerinde etiyojisi bilinmeyen birçok virüs hastalığının etmeninin belirlenmesini sağlamıştır. Bağlarda bu teknoloji ile saptanan yeni virüslerden en önemlileri <i>Grapevine Pinot Gris Virus</i> (GPGV), <i>Grapevine Syrah Virus-1</i> (GSyV-1), <i>Grapevine Red-blotch associated Virus</i> (GRBaV) ve <i>Grapevine Roditis Leaf Discoloration Virus</i> (GRLDaV)'dir. Bu çalışmanın amacı Tekirdağ ve Hatay ili bağ alanlarında GPGV, GSyV-1, GRBaV ve GRLDaV varlığının PCR ve DNA dizileme yöntemleriyle saptanması ve karakterizasyonlarının yapılmasıdır. Bu çalışma kapsamında virüs benzeri simptom gösteren omcaların yanı sıra simptomsuz omcalardan da örnekler alınmış ve toplam olarak Tekirdağ ilinden 191, Hatay ilinden ise 111 örnek toplanmıştır. Tekirdağ ilinden toplanan bağ örneklerinde %43,62 oranında GPGV, %1,04 oranında GSyV1 saptanmıştır. Hatay ilinden toplanan örneklerde ise sadece %0,9 oranında GSyV1 saptanmış ve testlenen örnekler GPGV, GRBaV, GRLDaV açısından temiz bulunmuştur. Tekirdağ örneklerinin GPGV için yapılan RT-PCR analizlerinde kısmi kılıf protein, hareketlilik, ve replikaz genlerini çoğaltan primerler kullanıldığında sırasıyla 411 bp, 302 bp ve 618 bp büyüklüğünde PCR ürünleri elde edilmiştir. Bu ürünlerin doğrudan iki yönlü sekans analizi sonucunda ve her üç gen bölgesinin de nükleotid dizilimlerinin gen bankasında kayıtlı farklı GPGV izolatları ile yüksek oranda homoloji gösterdiği saptanmıştır.</p>

^a denizkocabag33@gmail.com

^b <https://orcid.org/0000-0002-2895-9542>

^c kcaglayan@yahoo.com

^d <https://orcid.org/0000-0002-4381-4149>

^e monagazel@hotmail.com

^f <https://orcid.org/0000-0001-7162-0336>



Giriş

Bağcılık için yerkürenin en elverişli iklim kuşağı üzerinde bulunan ülkemiz, asmanın gen merkezi olmasının yanı sıra son derece eski ve köklü bir bağcılık kültürüne de sahiptir. Kültür asmasının anavatanı olarak tanımlanan ülkemizde bağcılık önemli bir tarım kolu durumundadır. Anadolu'da bağcılık kültürünün tarihi oldukça eskidir. Yapılan arkeolojik kazılardan Anadolu'da bağcılık kültürünün M.Ö. 3000 yılına kadar dayandığı saptanmıştır. Tarih boyunca Anadolu'da elde edilen üzümler çoğunlukla kuru ve yaş olarak tüketilmiş, bir kısmı da pekmez, pestil ve lokum şeklinde değerlendirilmiştir (Oraman, 1965). TÜİK istatistiklerine göre üzüm üretimi açısından ülkemizin son beş yıllık üretimi incelendiğinde 2015 yılında ülkemiz bağ alanlarında ve üretimde gerilemenin olduğu gözlenmektedir.

Bu çalışma kapsamında örnekleme yapılan Hatay ilinde sofralık ve şaraplık 48.119 dekar ekili bağ alanı bulunmakta olup yıllık üretim 29.656 ton iken Tekirdağ ilinde sofralık ve şaraplık toplam 38.368 dekar ekili bağ alanı bulunmaktadır ve 45.189 ton üretim ile bu iki il ülkemiz bağcılığına önemli katkı sağlamaktadır (Anonim, 2018). Dünya bağcılığında İtalya, Fransa, ABD ve İspanya'dan sonra üretimde beşinci sırayı alan ülkemizde üzüm, sofralık ve kurutmalık olarak iç tüketim ve dış satımda önemli rol alırken diğer kullanımlar dışında şarapçılık da son yıllarda önemli gelişmeler göstermeye başlamıştır. Diğer tüm ürünlerde olduğu gibi bağ yetiştiriciliğini de tehdit eden önemli hastalık ve zararlılar mevcuttur. Bu etmenler arasında özellikle hücre içinde yaşayan enfektiyöz organizmalar (virüsler, viroidler, sadece floem ve ksilemden bulunan prokaryotlar) bitkilerin yaşam kalitesini azaltarak verimde azalmalara neden olmaktadır. Günümüzde bağları enfekte eden 62 kadar virüs rapor edilmiştir (Martelli, 2010). Bu virüslerin hemen yarısı *Nepovirus*, *Sadwavirus*, *Closterovirus*, *Ampelovirus*, *Vitivirus*, *Maculavirus* ve *Foveavirus* cinsine aittir ve bunlar tarafından neden olunan 22 adet hastalık bilinmektedir ve bunlardan sadece birkaçı ekonomik anlamda zarar yapmaktadır. Bu hastalıklar oluşturdukları belirtilere ve etmenlerine göre farklı gruplarda incelenmektedir. Dünya bağ alanlarına son yıllarda giriş yapmış ve tanımlanmış bazı yeni virüsler de bulunmaktadır. Yeni virüslerden birkaçı, *grapevine syrah virus 1* (GSyV-1), *grapevinerod blotch associated virus* (GRBaV), *grapevine pinot gris virus* (GPGV) ve *grapevine roditis leaf discoloration associated virus* (GRLDaV)'dur.

Bu etmenlerden GSyV-1, ilk kez 2009 yılında ABD de iki farklı araştırmacı grubu tarafından tanımlanmıştır. Bu gruplardan birisi şiraz üzüm çeşidinde (Syrah) grapevine syrah virus-1 (GSyV-1) diğeri ise yabani asmalarda grapevine virus Q (GVQ) olarak adlandırılan iki farklı virüsün varlığını bildirmiştir (Al Rwahnih ve ark., 2009; Sabanadzovic ve ark., 2009). Tespit edilen bu yeni virüslerden ilki '*Grapevine syrah virus-1*' olarak adlandırılmış ve *Tymoviridae* familyası *Marafivirus* cinsi içine dahil edilmiştir. Bu virüs 2010 yılında Şili, 2015 yılında ise Orta Avrupa ülkelerinden Slovakya ve Çek Cumhuriyeti'nde saptanmıştır (Glasa ve ark., 2015).

GRBaV'nin neden olduğu "bağ kırmızı beneklenme hastalığı (red blotch disease)" ise 2008 yılından beri Kuzey Amerika bağ alanlarında görülmektedir. Bununla birlikte

hastalığa neden olan virüsün tanımlanması ve adlandırılması 2012 yılında sonuçlandırılarak etmen virüs *Geminiviridae* familyasına dahil edilmiş ve *Grapevine red blotch-associated virus* (GRBaV) olarak adlandırılmıştır (Al Rwahnih ve ark., 2012). Bu virüsün en yaygın tespit edildiği kırmızı üzüm çeşitleri Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Malbec, Merlot, Mourvèdre, Petite Sirah, Petit Verdot, Pinot Noir ve Zinfandel; beyaz çeşitler ise Chardonnay, Riesling, Semillon ve Viognier'dir. GRBaV bugüne değin sadece ABD ve Kanada'da koleksiyon bağları, damızlık bloklar, fidanlıklar ve ticari bağlarda tespit edilmiştir (EPPO, 2015). GRBaV'nin kesin vektörü bilinmemekle birlikte enfekteli bitki materyallerinden aşı yoluyla temiz bitki materyallerine taşındığı bildirilmektedir. Kaliforniya'da yapılan bir çalışmada GRBaV'nin *Erythroneura zizac* (Hemiptera: Cicadellidae) ve *Spissistilus festinus* (Hemiptera: Membracidae) ile sağlıklı asmalara taşındığı gözlenmiş ve bu virüsün ana vektörünün olasılıkla *S. festinus* olduğu bildirilmiştir (EPPO, 2015).

Grapevine pinot gris virus (GPGV), yeni nesil sekans analiz yönteminin bitki virolojisi alanında yoğun olarak kullanılmaya başlaması ile birlikte ilk kez 2012 yılında İtalya'da saptanmış yeni bir virüsdür. GPGV'nin İtalya izolatının tüm genom sekans analizi yapılmış ve bu virüsün *Trichovirus* cinsine giren *Grapevine berry inner necrosis virus* (GINV) ile çok yakın akraba olduğu bildirilmiştir (Giampetruzzi ve ark., 2012). Avrupa'da çoğunlukla şaraplık üzüm çeşitlerinde saptanan bu virüs şu ana değin Avrupa dışında sadece Kore'de üzüm salkımaında nekrozla şeklinde semptom oluşturan sofralık "Tamnara" üzüm çeşidinde saptanmıştır (Cho ve ark., 2013). İlk kez Kuzey İtalya'da Pinot gris üzüm çeşidinde saptandığı için bu isimle anılmaktadır. İlerleyen yıllarda bu virus Kore (Cho ve ark., 2013), Slovenya (Plesko ve ark., 2014), Slovakya, Çek Cumhuriyeti (Glasa ve ark., 2014), Fransa (Beuve ve ark., 2015) ve Türkiye'de (Gazel ve ark., 2016) saptanarak her geçen yıl farklı ülkelere kayıtlar bildirilmektedir (Salderelli ve ark., 2017). GPGV ile enfekte olan bağ gözleri ve yapraklardaki semptomlu alanlardan toplanan *Colomerus vitis* akar örnekleri ile spesifik primerler kullanarak yapılan RT-PCR analizlerinde akar bünyesinde GPGV tespit edilmiştir. Gerek doğal koşullarda gerekse deneysel taşıma denemelerinde GPGV ile enfekteli asmalardan toplanan akarlar sağlıklı bitkilere aktarılmış ve her iki koşulda da GPGV başarılı bir şekilde taşınmıştır. Bu çalışma ile *C. vitis*'in bu virüsün potansiyel bir vektörü olduğu bildirilmiştir (Malagnini ve ark., 2016).

1980'li yılların başlarında Yunanistan'da "Roditis" ve "Savastiano" üzüm çeşitlerinde 'Roditis leaf discoloration (RLD)' olarak adlandırılan bir hastalık gözlenmiş ve bu hastalıktan sorumlu virus 2015 yılında tanımlanarak 'grapevine roditis leaf discoloration associated virus' (GRLDaV) olarak adlandırılmıştır. Aynı araştırma grubu bu virüsün asmadan asmaya ve bazı otsu konukçulara (*Chenopodium quinoa*, *Gomphrena globosa* ve *Nicotiana benthamiana*) mekanik olarak taşındığını bildirmiştir. Hastalığın Yunanistan'da 1988-1992 yılları arasında yaygınlaşması üzerine unlu bitlerin bu virüsün taşınmasında rol oynayabileceği düşünülmüştür (Maliogka ve ark., 2015).

Bu çalışmanın amacı, bağ alanlarına son yıllarda tespit edilmiş olan GSyV-1, GRBaV, GPGV, GRLDaV gibi yeni virüslerin Hatay ve Tekirdağ ili bağ alanlarındaki yaygınlık durumunun PCR yöntemiyle belirlenmesi ve tespit edilen virüslerin DNA dizi ve filogenetik analizler ile karakterizasyonunun yapılmasıdır.

Materyal ve Yöntem

Arazi Çalışmaları ve Örneklem

Arazi çalışmaları Hatay ve Tekirdağ illerinde yoğun olarak bağcılığın yapıldığı ilçelerde (Hatay- Kırıkhan, Hassa; Tekirdağ- Merkez, Şarköy) yürütülmüştür. Yapraklarda klorotik lekeler, bodurlaşma, yaprak ve sürgünlerde deformasyon ve verim azalması gibi virüs benzeri belirti gösteren Antep karası, Chardonnay, Shiraz, Zinfandel, Palieri, Alicante bouchet, Dimyat, Kalecik karası, Pinot noir, Çavuş, Hambur misketi, Gamay, Alphonse, Boğazkere, Zevik, Razak, Narince, Merlot, Michel palieri, Lival, Karasakız 17, Cinsout, Paraz karası, Çınar üzümü 34-10, 8-11 Tiryaki, Ada karası gibi yerli ve yabancı sofralık ve şaraplık üzüm çeşitlerinden yaprak ve sürgün örnekleri toplanmıştır. Toplanan örnekler testleninceye kadar +4°C’ de muhafaza edilmiştir.

Moleküler Çalışmalar

Toplam nükleik asit (TNA) izolasyonu: Bağlardan toplanan örneklerden RNA izolasyonu için “Qiagen RNeasy plant mini kit” MacKenzie ve ark (1997)’nin önerdiği yonteme göre modifiye edilerek firma önerisi doğrultusunda kullanılmıştır. GRBaV ve GRLDaV’nin DNA virüsü olması nedeniyle aynı örneklerden DNA izolasyonu “Qiagen DNA plant mini kit” kullanılarak yapılmıştır. Nükleik asit izolasyonlarında ilkbahar döneminde yapraklar, sonbahar ve kış döneminde ise sürgünlerden hazırlanan kabuk ve floem kazıntıları kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak GSyV1 ve GRLDaV enfekteli bitki ve plasmid DNA’ları Dr. V. Maliogka’dan (Aristoteles Üniversitesi, Selanik-Yunanistan), GRBaV Dr. M. Al Rwahnih’den (Kaliforniya Üniversitesi-ABD), GPGV Dr. M. Glasa’dan (SAVBA-Viroloji Enstitüsü, Slovakya) temin edilmiştir.

Reverse transkripsiyon (RT): RNA virüslerinin PCR ile testlenmesinde ilk aşamada, RNA’lardan cDNA elde edilmiştir. Her bir örnek için 1 µl Random hexamer primer, 6,5 µl d₂H₂O ve 5 µl RNA karışımı hazırlanarak PCR tüplerine konulmuştur. PCR cihazında 94°C’de 5 dakika ve buz da 5 dakika bekletildikten sonra her bir tüp içine 5×RT tamponundan (Fermatas) 4 µl, d₂H₂O 2 µl, dNTP (10 mM) 0,5 µl ve RT enziminden 1 µl eklenmiştir. Tüpler PCR cihazında 42°C’de 1 saat 72°C’de 10 dakika tutularak ve cDNA aşaması tamamlanmıştır.

Grapevine Pinot Gris Virus(GPGV) ’un PCR analizleri

GPGV’nin RT-PCR analizlerinde hareketlilik geni (movement protein=MP) (302 bp), kılıf protein geni (coat protein=CP) (411 bp) ve replikaz genine (replicase=REP) (618 bp) spesifik primerler kullanılmıştır (Glasa ve ark., 2014). Bu primerler için PCR karışımı, 16,8 µl d₂H₂O, 2,5 µl 10× buffer, 2µl dNTP (2,5 mM), 1,5 µl MgCl₂ (25 mM), virüse özgü 1 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl), 0,2 µl Taq-DNA polymerase ve 2 µl cDNA olacak şekilde hazırlanmıştır. GPGV’nin CP gen bölgesi için GPG-CP6609F (ATTGCGGAGTTGCCTTCAAG) ve GPG-CP

7020R (CTGAGAAGCATTGTCCCATC), MP gen bölgesi için GPG-MP 5637F (AATTGATCCCGTGTAGTGC) ve GPG-MP 5939R (TCCGAGGACGATGAACCTC) primer çiftleri kullanılmıştır. Bu iki gen bölgesi için PCR döngüleri aynı olup PCR cihazı 1 döngü 94°C’de 5 dakika; 35 döngü 94°C’de 20 saniye, 55°C’de 20 saniye, 72°C’de 30 saniye ve 1 döngü 72°C’de 10 dakika olarak programlanmıştır. GPGV-replikas geninin amplifikasyonu için ise GPGREP-F (AATTGATCCCGTGTAGTGC) ve GPGREP-R (TCCGAGGACGATGAACCTC) primer çiftleri kullanılarak PCR 1 döngü 94°C’de 5 dakika; 40 döngü 94°C’de 1 dakika, 58°C’de 2 dakika, 72°C’de 3 dakika ve 1 döngü 72°C’de 10 dakika olarak programlanmıştır.

Grapevine Syrah Virus 1 (GSyV-1) ’in PCR Analizleri

GSyV-1’ün RT-PCR analizlerinde virüsün kılıf protein gen bölgesini çoğaltan üç farklı primer çifti kullanılmıştır: GSyV-1 DET-F (CAAGCCATCCCGTGCATCTGG) ve DET-R (GCCGATTTGGAACCCGATGG) (297 bp) (Al Rwannih ve ark., 2009); GVQ CP-F (TCCCAGCTTCAGGGTGAATT) ve CP-R (GCATTGCTGCGCATTGGAGG) (720 bp) (Sabanadzovic ve ark., 2009) ve GSyV-CP 5922F (CCAATGGGTCGCACTTGTTG) ve 6295R (ACTTCATGGTGGTGCCGGTC) (374 bp) (Glasa ve ark., 2015). Her üç primer içinde aynı PCR karışımı ve döngüler kullanılmıştır. PCR karışımı, 16,8 µld₂H₂O, 2,5 µl 10×Buffer, 2µl dNTP (2,5 mM), 1,5 µl MgCl₂(25 mM), virüse özgü 0,5 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl) , 0,125 µl Taq-DNA polymerase ve 2 µl cDNA olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR cihazında 1 döngü 94°C’de 5 dakika; 35 döngü 94°C’de 30 saniye, 56°C’de 20 saniye, 72°C’de 30 saniye ve 1 döngü 72°C’de 10 dakika olarak programlanmıştır.

Grapevine Redblotch Associated Virus (GRBaV) ’un PCR Analizleri

DNA virüsü olan GRBaV’ nin PCR analizlerinde, grapevine red-blotch associated virus (GRBaV) genel tanı primeri 3F (GTTATTCCAAGCTGTCCACT) ve R352 (CACTAGAAGTGCAGGAATCG) (1063bp) ile birlikte virüsün kılıf proteinini çoğaltan CP-for (AGCGGAAGCATGATTGAGACATGACG) ve CP-rev (AACGTATGTCCACTTGCAGAAGCCGC) (257 bp), replikaz genini çoğaltan REP-for (CAAGTCGTTGTAGATTGAGGACGTATTGG) ve REP-rev (AGCCACACCTACACGCCTTGCTCATC) (318 bp) primer çiftleri kullanılmıştır. Bu primerlerle yapılan PCR analizlerinde 15,8 µl d₂H₂O, 2,5 µl 10×Buffer, 1,5 µl dNTP (2,5 mM), 2 µl MgCl₂(25 mM), 0,5 µl virüse özgü primer çifti (her biri 20 pmol/µl), 0,2 µl Taq-DNA polymerase (5 U/µl) ve 2 µl DNA karışımı hazırlanmıştır. Karışım PCR cihazında 1 döngü 94°C’de 30 saniye; 35 döngü 92°C’de 30 saniye, 55°C’de 30 saniye, 72°C’de 1 dakika, 1 döngü 72°C’de 10 dakika olarak programlanmıştır.

Grapevine Roditis Leaf Discoloration Associated Virüs (GRLDaV) ’un PCR Analizleri

Bu virüsün saptanması amacıyla 261 bp düzeyinde PCR ürünü elde edilen Badna-R-Up (GAAGGAATTGAATCTCCAGCAGCAGG), Badna-R-Do (CTCTGCTACACCAAGTGATAGATTGTT) primer

çiftleri kullanılmıştır (Maliogka ve ark., 2015). PCR karışımı; 17,8 µl d₂H₂O, 2,5 µl 10×Buffer, 0,5 µl dNTP (10 mM), 1 µl MgCl₂ (25 mM), virüse özgü 0,5 µl primer çifti (her biri 10 pmol/µl), 0,2 µl Taq-DNA polymerase ve 2 µl DNA olacak şekilde hazırlanmış ve PCR cihazında 1 döngü 94°C’de 5 dakika; 35 döngü 94°C’de 30 saniye, 55°C’de 45 saniye, 72°C’de 1 dakika ve 1 döngü 72°C’de 10 dakika olarak programlanmıştır.

DNA Dizileme ve BLAST Analizi

RT-PCR analizleri ile pozitif sonuç alınan GPGV ve GSyV-1 izolatlarından bazıları seçilerek DNA dizileme yapılmak üzere İontek (İstanbul) firmasına gönderilmiştir.

Filogenetik Analiz

Sekans analizi sonrasında Clustal W (Thompson ve ark., 1994) programı ve GPGV izolatlarına ait her iki yönde elde edilen ham veriler kullanılarak DNA dizi analizleri yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında elde edilen GPGV izolatları ile NCBI’ dan indirilen referans GPGV izolatlarının nükleotit dizileri ve Clustal W programı kullanılarak çoklu dizi hizalaması yapılmıştır. Daha sonra MEGA 6 (Tamura ve ark., 2013) yazılımı kullanılarak genetik uzaklıklar belirlenmiş ve neighbor-joining algoritmasına göre (Seitou ve Nei, 1987) filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

Bulgular ve Tartışma

Arazi Çalışmaları

Survey yapılan her iki ilde de gözlenen en yaygın virüs benzeri belirtiler yapraklarda mozaikleşme, beneklenme, kıvrılma, yaprak damarlarında kızarmalar, yapraklarda kırmızı beneklenmeler ile omcanın taç bölgesinde genel kurumalar ve geriye doğru ölüm, aşı noktasında şişkinlik, boğum aralarında kısılmalar ve meyvelerde geç olgunlaşma olarak gözlenmiştir (Şekil 1 ve 2). Bağ alanlarına yeni giriş yapan virüslerle hastalık belirtileri arasında kesin bir ilişki henüz saptanamamıştır. İtalya’da 2003 yılından itibaren bağlarda gözlenen bodurlaşma, yapraklarda mozaikleşme ve klorotik lekeler, yapraklarda deformasyon ve verim azlığı gibi belirtiler önceleri trips zararı, bor noksanlığı veya bilinen bazı virüs belirtileri ile karıştırılmış ancak 2012 yılında birisi belirtilmeli, diğeri belirtimsiz iki omcadan (cv. Pinot gris) yapılan “Yeni nesil sekans (NGS)” analizleri sonucunda her iki örnekte de yeni bir virüs saptanmış ve geçici olarak “*Grapevine pinot gris virus (GPGV)*” olarak adlandırılmıştır (Giampetruzzi ve ark., 2012). Bu çalışma kapsamında testlenen bağ örneklerinde GPGV tespit edilen örneklerin bazılarında İtalya’dan bildirildiği gibi yapraklarda deformasyon, klorotik lekeler ve verim azalması gözlenmiş (Şekil 1) ancak bazı belirtiler örneklerde de GPGV tespit edilmiştir. Slovakya’da yapılan bir çalışmada da GPGV ile ilişkili özel bir belirtiler saptanamamıştır (Glasa ve ark., 2015). Bu çalışma kapsamında saptanan diğeri bir virüs de GSyV-1’dir ve bu virüs tamamen belirtimsiz örneklerde saptanmıştır. Bununla birlikte ABD’de geriye ölüm belirtileri gösteren şiraz üzüm çeşitlerinde belirtilerden sorumlu virüsleri tespit edebilmek amacıyla yürütülen NGS analizleri sonucunda bu belirtilerle ilişkili bulunan virüslerden bir tanesinin yeni bir virüs olduğu bildirilmiş ve geçici olarak ‘*Grapevine syrah virus-1*’ (GSyV-1) olarak adlandırılmıştır (Al Rwahnih ve ark., 2009).



Şekil 1 Tekirdağ ili bağ alanlarında gözlenen virüs benzeri belirtiler (A- Yapraklarda küçülme, boğum aralarında kısılma ve seyrek dane oluşumu, B- Meyvede gelişme bozukluğu ve yapraklarda klorotik lekeler C- yapraklarda deformasyon ve klorotik lekeler D- Yelpeze yaprak oluşumu ve dane oluşumunda düzensizlik)

Figure 1 Virus-like symptoms observed in the Tekirdağ vineyards (A- Small leaves, shortened internodes, rare grain formation B- Fruit deformation and chlorotic spots on the leaves C- Leaf deformation and chlorotic spots on the leaves D- Fanleaf symptom and irregular fruit formation)



Şekil 2. Kırmızı üzüm çeşitlerinde yapraklarda kızarma ve gelişme geriliği (A-B: Yapraklarda kızarma ve seyrek dane oluşumu C-D: Yaprak damarlarında kızarmalar E: Bitkide gelişme geriliği F: Yaprakta kırmızı beneklenmeler)

Figure 2 Reddening and vigourless growth of red grape varieties (A-B : Reddening on the leaves and irregular fruit formation C- D: Reddening of leaf veins E: Vigourless growth F: Red mottling on leaf)

Toplam Nükleik Asit (TNA) İzolasyonu

Bağ örneklerinden RNA izole etmek için modifiye Qiagen RNA kiti, DNA izole etmek için ise Qiagen DNA kiti kullanılmıştır. Qiagen kit yöntemleriyle yapılan izolasyonlarda RNA ve DNA kalitesini belirlemek amacıyla yapılan nanodrop spektrofotometre ölçümlerinde RNA ve DNA'ların çok iyi kalitede olmamasına rağmen PCR yapabilecek düzeyde olduğu saptanmıştır. Bağlar gibi kompleks metabolitler açısından zengin olan bitkilerde temiz ve saf nükleik asit elde etmenin oldukça zor olduğu farklı araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Xiao ve ark., 2015).

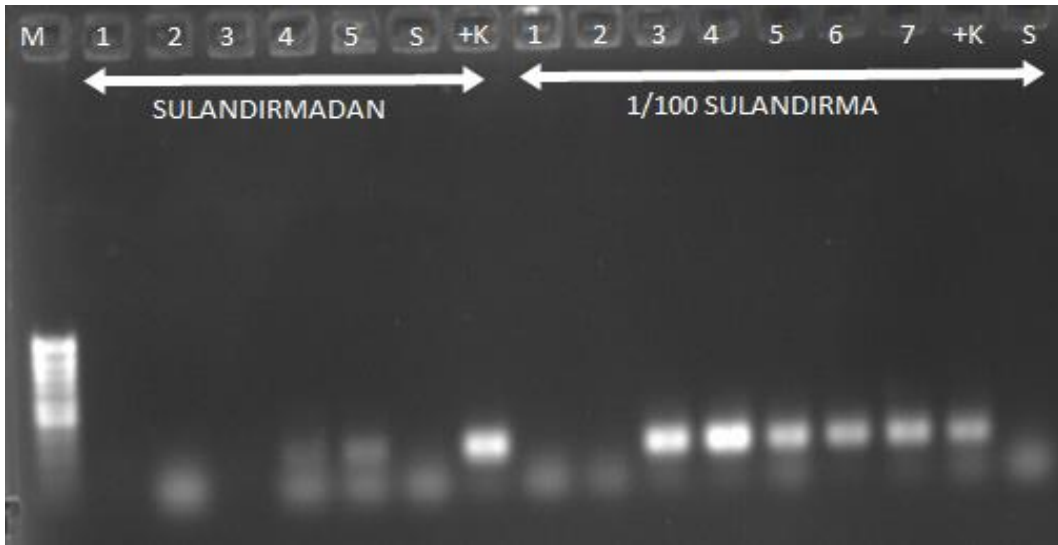
RT-PCR ve PCR Analizleri

Hatay ve Tekirdağ illerinden toplanan örnekler RNA virüsleri için RT-PCR, DNA virüsleri için ise PCR analizleri ile testlenmiştir. Testlenen virüslerinin pozitif kontrollerinin optimizasyon çalışmalarında RNA ve DNA'lar PCR işlemlerinden önce doğrudan ve 1/100 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. PCR analizlerinde hem doğrudan hem de 1/100 oranında seyreltilen nükleik asitlerden beklenen düzeyde bant oluşumu gözlenmiştir. Bu nedenle PCR analizlerinde DNA ve/veya RNA kullanılmıştır (Şekil 3).

Tekirdağ ilinden toplam 191 örnek Hatay ilinden ise 111 örnek farklı virüsler için testlendiğinde her iki ilde de DNA virüsleri olan GRBaV ve GRLDaV tespit edilmemiştir. Tekirdağ ilinde en yaygın virüsler GPGV (%43,62) ve GSyV-1 (%1,04) olarak bulunurken Hatay ilinde ise düşük yoğunlukta sadece GSyV-1 (%0,9) tespit edilmiştir.

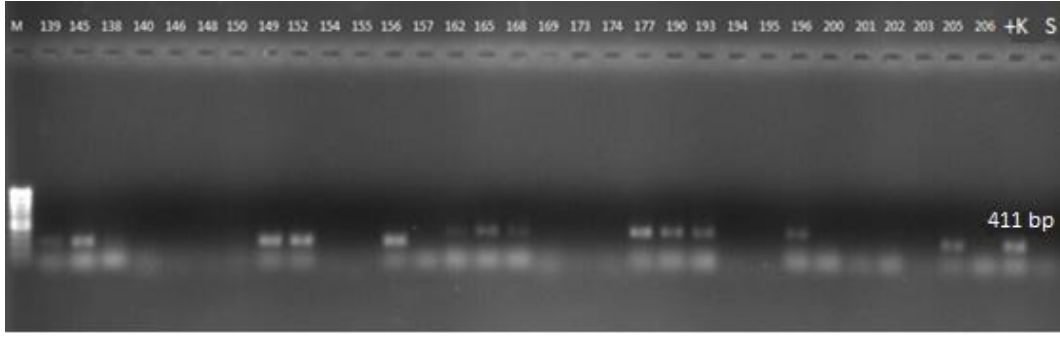
Bu çalışma kapsamında testlenen virüslerden en yaygın olanı GPGV olarak tespit edilmiştir. Hatay ili bağ alanlarında testlenen örneklerde GPGV hiç tespit edilemezken Tekirdağ ilinden toplanan örneklerin %43,62'si GPGV'ye spesifik 3 primer çiftinden en az bir tanesi ile RT-PCR analizi sonuçlarına göre pozitif

bulunmuştur. Tekirdağ ilinden testlenen bağ örneklerinin %42,28'i virüsün kılıf proteinini (CP) çoğaltan GPGV-CP primeri ile, %35,57'i hareketlilik genini (MP) çoğaltan GPGV-MP primeri ile ve %20'i ise replikaz genini (REP) çoğaltan GPGV-REP primeri ile pozitif sonuç vermiştir. Testlenen örneklerden Chardonnay, Palieri, Kalecik karası, Şiraz, Zinfandel ve Çavuş gibi yerli ve yabancı çeşitlerinden toplam 21 örnek GPGV'nin üç farklı genini (CP, MP ve REP) çoğaltan primerle de pozitif sonuç vermiştir (Şekil 4, 5, 6). GPGV'nin kılıf protein (CP) ve hareketlilik protein (MP) gen bölgelerine ait nükleotid dizileri taksonomik analizler sırasında oldukça kullanışlı genomik bölgelerdir (Berger ve ark., 2000). Bu nedenle bu çalışma kapsamında öncelikle bu iki gene ait nükleotid dizileri NCBI veri tabanındaki diğer GPGV izolatlarının dizileri ile Clustal W yöntemi kullanılarak hizalanmıştır. Hizalanan tüm nükleotid dizileri NJ (Neighbor Joining) yöntemi kullanılarak Mega 6 yazılımı ile analiz edilmiştir. Sonuçta elde edilen dendrogramların birbiri ile oldukça uyumlu olduğu görülmüştür. GPGV-CP ve -MP izolatlarına ait NJ dendrogramı incelendiğinde, GPGV Türkiye izolatlarının aynı grup içerisinde yer aldığı ve en yakın benzerlik Slovakya ve Çek Cumhuriyeti izolatları (SK77, SK08, SK31 ve TI25CZ, KF356194.1) ile gösterdiği saptanmıştır (Şekil 7). GPGV ilk kez 2012 yılında İtalya'da Trentino Bölgesinde Pinot gris ve Traminer üzüm çeşitlerinde (Giampetruzzi ve ark., 2012) ilerleyen yıllarda ise Kore (Cho ve ark., 2013), Slovakya (Glasa ve ark., 2014), Slovenya (Plesko ve ark., 2014), Uruguay (Jo ve ark., 2015), Fransa (Beuve ve ark., 2015), Romanya, Ukrayna, Bosna ve Hersek, Karadağ, Sırbistan, Hırvatistan, Makedonya, Portekiz ve İspanya (Bertazzon ve ark., 2015), A. B. D. (Al Rwahnih ve ark., 2015), Kanada (Xiao ve ark., 2015), Çin (Fan ve ark., 2015) ve Gürcistan'da (Casati ve ark., 2015) saptanmış, ülkemizde ise ilk kez 2014 yılında rapor edilmiştir (Çağlayan ve ark., 2015; Gazel ve ark., 2016).



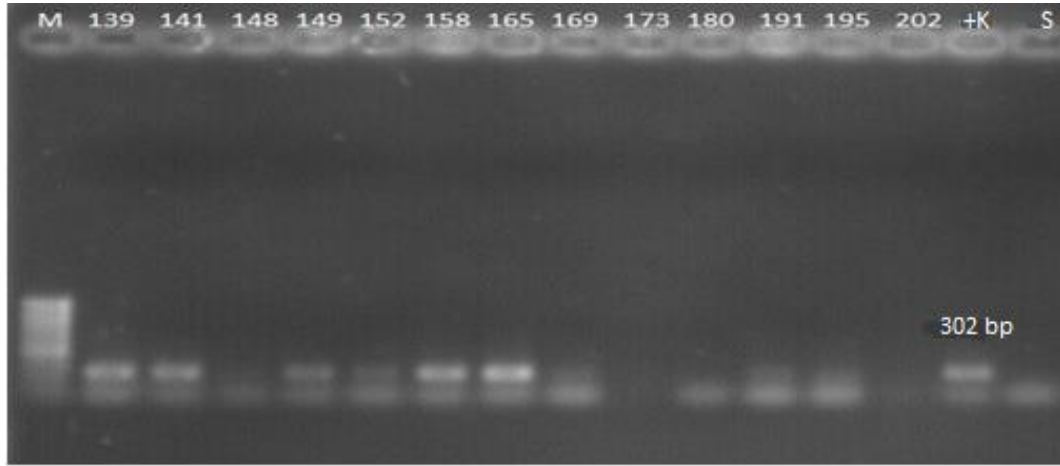
Şekil 3 Grapevine roditis leaf discoloration associated virus'un PCR analizlerinde cDNA'nın sulandırma yapmadan ve 1/100 oranında sulandırıldığında elde edilen PCR ürünleri. M: Markör (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); S: Su kontrol; +K: Pozitif Kontrol

Figure 3 PCR products of grapevine roditis leaf discoloration associated virus when cDNA was used directly and diluted as 1/100. M: Markör (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); S: Water control; +K: Positive Control



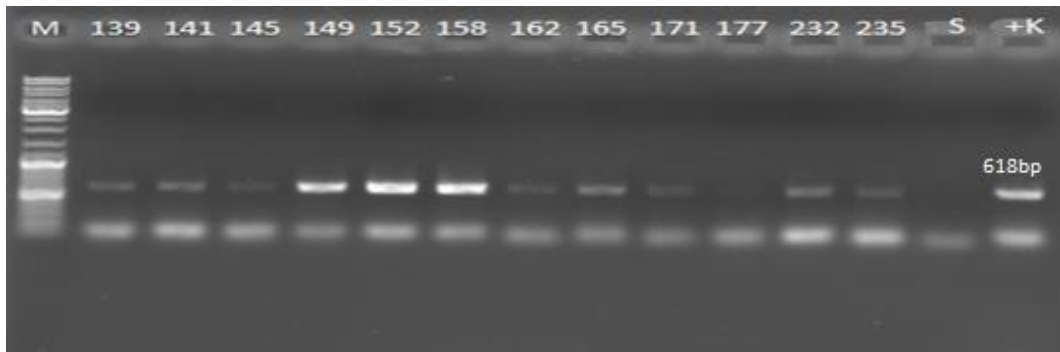
Şekil 4 Tekirdağ bağ örneklerinin grapevine pinot gris virus kılıf protein (CP) genini çoğaltan primer çifti (GPG-6609F/GPG7020R) kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu. M: Moleküler markör(SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 138, 139, 140, 145, 148, 149, 150, 152, 154, 155, 156, 157, 162, 165, 168, 169, 173, 174, 177, 190, 193, 194, 195, 196, 200, 201, 202, 203, 205, 206: Tekirdağ Bağ örnekleri; S: Su kontrol, +K: Pozitif kontrol

Figure 4 RT-PCR analysis of Tekirdağ grapevine samples by using the primer pairs (GPG-6609F / GPG7020R) amplifying grapevine pinot gris virus coat protein (CP) gene M: Molecular marker(SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 138, 139, 140, 145, 148, 149, 150, 152, 154, 155, 156, 157, 162, 165, 168, 169, 173, 174, 177, 190, 193, 194, 195, 196, 200, 201, 202, 203, 205, 206: Tekirdağ Grapevine samples; S: Water control, +K: Positive control



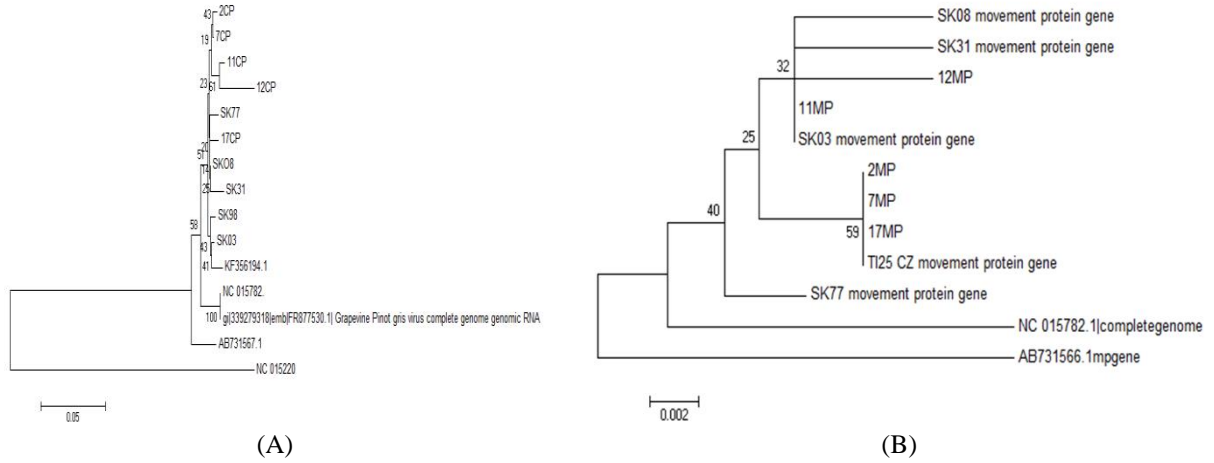
Şekil 5 Tekirdağ bağ örneklerinin grapevine pinot gris virus hareketlilik protein (MP) genini çoğaltan primer çifti (GPG-5637F/GPG-5939R) kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu M: Moleküler markör(SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 139, 141, 148, 149, 152, 158, 165, 169, 173, 180, 191, 195, 202: Tekirdağ bağ örnekleri; S: Su kontrol, +K: Pozitif kontrol

Figure 5 RT-PCR analysis of Tekirdağ grapevine samples for grapevine pinot gris virus by using primer pairs (GPG-5637F / GPG-5939R) amplifying movement protein (MP) gene . M: Molecular marker(SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 139, 141, 148, 149, 152, 158, 165, 169, 173, 180, 191, 195, 202: Tekirdağ grapevine samples; S: Water control, +K: Positive control



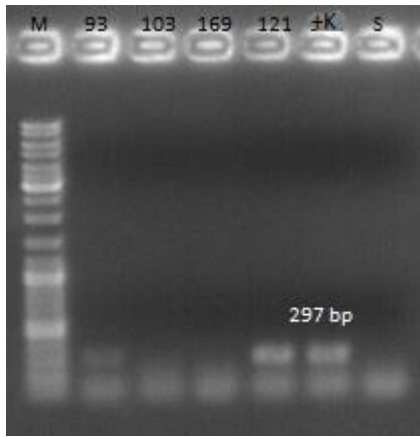
Şekil 6 Tekirdağ bağ örneklerinin grapevine pinot gris virus replikaz (REP) genini çoğaltan primer çifti (GPG-14F/GPG-632R) kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu. M: Moleküler markör (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 139, 141, 145, 149, 152, 158, 162, 165, 171, 177, 232, 235: Tekirdağ Bağ örnekleri; S: Su kontrol, +K: Pozitif kontrol

Figure 6 RT-PCR analysis of Tekirdağ grapevine samples by using the primer pairs (GPG-14F / GPG-632R) amplifying grapevine pinot gris virus replicase (REP) gene. M: Molecular marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 139, 141, 145, 149, 152, 158, 162, 165, 171, 177, 232, 235: Tekirdağ Grapevine samples; S: Water control, +K: Positive control



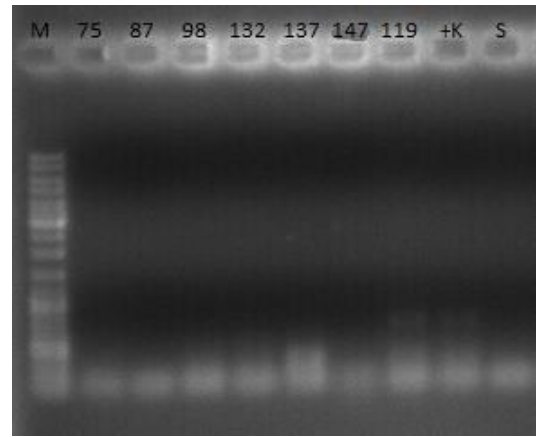
Şekil 7 Grapevine pinot gris virus'ün kılıf protein (CP) ve hareketlilik proteininin (MP) amino asit dizilerinin neighbor-joining metodu kullanılarak Mega 6 yazılımı yardımıyla oluşturulan dendogram (A: Kılıf protein(CP) phylogram, B: Hareket proteini (MP) phylogram 2MP, 7MP, 1 MP, 12MP, 17MP: Tekirdağ bağ örnekleri; SK ve CZ kodlu izolatlar GEnBankası'ndan alınan Slovakya ve Çek Cumhuriyeti izolatlarıdır. Dalların yanındaki değerler Bootstrap değerlerini göstermektedir.NC 015782 nolu izolat GenBankasından alınan ve tüm genomu yayınlanmış bir GPGV izolatı olup AB731566 grup dışı bir izolatır)

Figure 7 Phylogenetic analysis of Grapevine pinot gris virus GPGV isolates by Neighbor-joining method based on the Mega 6 model. (A: Coat Protein (CP) phylogram, B: Movement Protein (MP) phylogram. 2MP, 7MP, 1 MP, 12MP, 17MP: Tekirdağ grapevine samples; GPGV isolates coded as SK and CZ are Slovakia and Czech Republic isolates. GPGV isolates coded as NC 015782 and AB731566 are GPGV-full genome and out group isolates obtained from GenBank, respectively. The branch nodes show the bootstrap values)



Şekil 8 Tekirdağ ve Hatay bağ örneklerinin grapevine syrah virus-1'ün metiltransferaz genini çoğaltan GSYV-1-DET primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu. M: Markör (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 93, 103: Hatay bağ örnekleri, 169,121: Tekirdağ bağ örnekleri; S: Su kontrol; +K: Pozitif kontrol

Figure 8 RT-PCR analysis of grapevine samples collected from Tekirdağ and Hatay by using GSYV-1-DET primer pairs amplifying the methyltransferase gene of Grapevine syrah virus-1. M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 93, 103 Hatay grapevine samples, 169,121: Tekirdağ grapevine samples; S: Water control; +K: Positive control



Şekil 9 Tekirdağ ili şiraz üzüm çeşidinde Grapevine syrah virus-1'ün kılıf protein genini çoğaltan GVQ primer çifti kullanılarak yapılan RT-PCR analiz sonucu. M: Markör (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 75, 87, 98,132,137, 147, 119: Tekirdağ bağ örnekleri, S: Su kontrol; +K: Pozitif kontrol

Figure 9 Result of RT-PCR analysis using GVQ primer pair amplifying coat protein gene of Grapevine syrah virus-1 in the grape variety of shiraz Tekirdağ province. M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 75, 87, 98,132,137, 147, 119: Tekirdağ grapevine samples, S: Water control; +K: Positive control

Tekirdağ ve Hatay ili bağ örneklerinde grapevine syrah virus-1'in varlığını saptamak için GVQ ve GSYV-1-DET saptama primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR analizleri sonucunda Tekirdağ ilinde şiraz çeşidinden bir örnek GVQ primeri ile, bir örnek de GSYV-1-DET primeri ile pozitif sonuç verirken Hatay ili bağ örneklerinden sadece Antep karası çeşidinden bir örnek GSYV-1-DET primeri ile pozitif sonuç vermiştir (Şekil 8, 9). Glasa ve ark., (2015) tarafından son yıllarda geliştirilen ve virüsün kısmi kılıf protein genini çoğaltan SY5965F/SY6559R primeri

kullanıldığında ise Tekirdağ ili örneklerinde testlenen 42 adet örnekten 28, Hatay ili örneklerinde ise testlenen 111 sayıdaki örnekten 10 örnekte beklenen düzeyde amplifikasyon meydana gelmiş ancak sekans sonuçları anlamlı gelmediği için bu örnekler pozitif olarak değerlendirilmemiştir. Testlemede kullanılan primerlerden GVQ ve GSYV-1-DET primerleri 2009 yılında ABD'de birbirinden bağımsız iki farklı çalışma grubu tarafından sınırlı sayıda virüs izolatı genomuna uygun geliştirilen primerler olup farklı ülke izolatlarındaki varyasyonlara

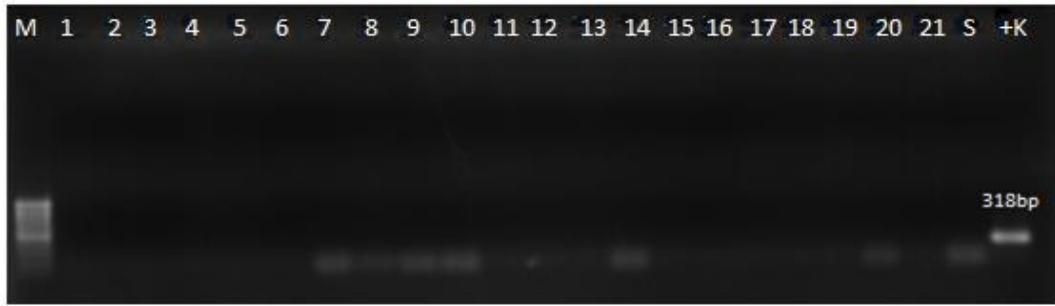
uygun olmadığı ve bu nedenle ülkemizdeki GSyV-1 izolatlarını tanılamakta yetersiz kaldığı düşünülmektedir. Nitekim Glasa ve ark., (2015) Slovakya ve Çek Cumhuriyeti bağ alanlarından toplanan örneklerin RT-PCR analizlerinde GSyV-1-Det primeri ile kendi geliştirdikleri SY5922F/SY6295R primeri kıyaslamalı olarak analiz ettiklerinde kendi geliştirdikleri primerle 2

kat daha fazla sayıda pozitif sonuç aldıklarını bildirmişlerdir. Primer performansları arasındaki farklılığın bu üç araştırmacı grubu tarafından geliştirilen primerlerin kendi ülkelerindeki GSyV-1 izolatlarına spesifik olması nedeniyle ülkemizdeki bağ örneklerinde bu virüsün saptanmasında yetersiz kaldığı düşünülmektedir.



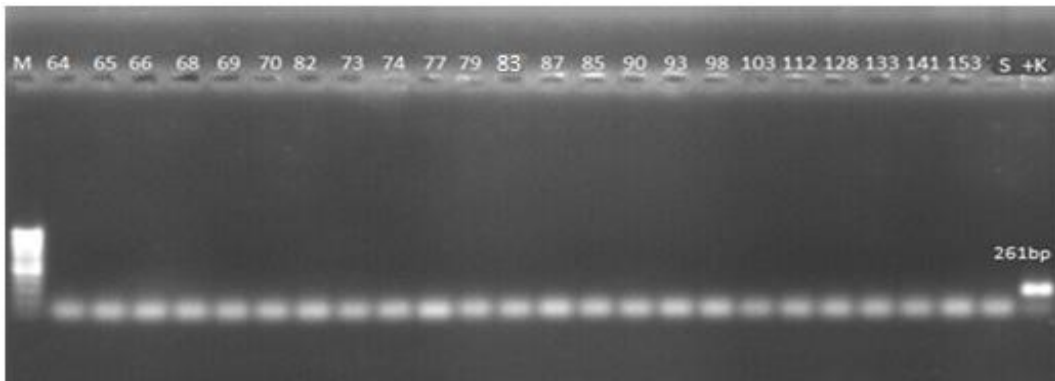
Şekil 10 Tekirdağ bağ örneklerinin grapevine red blotch associated virus-kılıf protein genini çoğaltan primer çifti (GRBaV-CP) kullanılarak yapılan PCR analiz sonucu. M: Markör (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 1-21: Tekirdağ ili farklı bağlardan toplanan bitki örnekleri; S: Su kontrol; +K: Pozitif kontrol

Figure 10 PCR analysis of Tekirdağ grapevine samples using the primer pair (GRBaV-CP) amplifying grapevine red blotch associated virus coat protein (CP) gene. M: Marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 1-21: Grapevine samples collected from different vineyards in Tekirdağ province ; S: Water control; +K: Positive control



Şekil 11 Tekirdağ bağ örneklerinin grapevine red blotch associated virus replikaz protein (REP) genini çoğaltan primer çifti (GRBaV-REP) kullanılarak yapılan PCR analiz sonucu. M: Moleküler markör (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 1-21: Tekirdağ ili farklı bağlardan toplanan bitki örnekleri; S: Su kontrol; +C: Pozitif kontrol

Figure 11 PCR analysis of the Tekirdağ grapevine samples using the primer pair (GRBaV-REP) amplifying the grapevine red blotch associated virus replikace (REP) gene. M: Molecular marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 1-21: Grapevine samples collected from different vineyards in Tekirdağ province ; S: Water control; +K: Positive control



Şekil 12 Hatay ve Tekirdağ ili bağ örneklerinin grapevine roditis leaf discoloration associated virus'üne karşı Badna-R-Up ve Badna-R-Do primer çifti kullanılarak yapılan PCR analizlerinin sonucu. M: Moleküler markör (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 64-70, 73, 74, 77, 79, 82, 83, 85, 87, 90, 93, 98: Hatay bağ örnekleri, 103, 112, 128, 133, 141, 153: Tekirdağ bağ örnekleri; S: Su kontrol; +K: Pozitif kontrol

Figure 12 PCR analysis of grapevine samples collected from Hatay and Tekirdağ using the primer pairs (Badna-R-Up/ Badna-R-Do) for grapevine roditis leaf discoloration associated virus. M: Molecular marker (SMO#383 MBI Fermentas GmbH, Almanya); 64-70, 73, 74, 77, 79, 82, 83, 85, 87, 90, 93, 98: Hatay grapevine örnekleri, 103, 112, 128, 133, 141, 153: Tekirdağ grapevine örnekleri; S: Water control; +K: Positive control

GRBaV'nin tespiti amacıyla Al Rwahnih ve ark., (2013) tarafından geliştirilen primerler kullanılarak yürütülen PCR analizleri sonucunda pozitif kontrol olarak kullanılan örnekte beklenen düzeyde bant elde edilirken Tekirdağ ve Hatay ili bağ örneklerinin hepsi bu virüs açısından negatif bulunmuştur. Sonuçların doğrulanması amacıyla Krenz ve ark. (2014) tarafından geliştirilen ve virüsün kılıf protein geni (GRBaV-CP) ve replikaz genini çoğaltan (GRBaV-REP) primer çiftleri kullanılarak PCR analizleri tekrarlanmıştır. Her iki primerle de pozitif kontrollerde beklenen düzeyde bant elde edilirken testlenen tüm örnekler negatif bulunmuştur (Şekil 10 ve 11). GRBaV'nin bugüne değin sadece Kuzey Amerika, Kore ve Kanada'da saptanmış olması nedeniyle dünya çapında yaygın bir virüs olmaması (Sudarshana ve ark., 2015) bu çalışma kapsamında elde edilen bulguları doğrular niteliktedir.

GRLDaV ilk kez Yunanistanda Roditis üzüm çeşidinde saptandığı için bu isimle anılan bir virüs olup (Maliogka ve ark., 2015) dünya çapında çok yaygın bir virüs değildir. Avrupa kıtasında Yunanistan dışında sadece İtalya ve Hırvatistan'da tespit edilmiştir (EPPO, 2018). Ülkemizde ise 2018 yılında sadece Adana ilinde ve 4 örnekte GRLDaV'nin varlığı bildirilmiştir (Serçe ve ark., 2018). Bu çalışma kapsamında Tekirdağ ve Hatay ili bağlarından toplanan hiçbir örnekte bu virüsün saptanmamış olmasına rağmen (Şekil 12) bu virüse karşı testlemelere devam edilmesi önerilmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma HMKÜ-BAP 15200 nolu proje ve HMKÜ-BAP 16528 nolu proje tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

Anonim, 2018. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>
Al Rwahnih M, Daubert S, Golino DA, Rowhani A. 2009. Deep sequencing analysis of rnas from a grapevine showing Syrah Decline symptoms reveals a multiple virus infection that included a novel virus. *Virology.*, 387(2):395-401. doi:10.1016/j.virol.2009.02.028; PMID:19304303;
Al Rwahnih M, Sudarshana MR, Uyemoto JK, Rowhani A. 2012. Complete genome sequence of a novel vitivirus isolated from grapevine. *Journal of Virology.*, 86(17): 9545. doi: 10.1128/JVI.01444-12; PMID: 22879616;
Al Rwahnih M, Dave A, Anderson MM, Rowhani A, Uyemoto JK, Sudarshana MR. 2013. Association of a DNA virus with grapevine affected by red blotch disease in California. *Phytopathology.*,103(10):1069-76. doi: 10.1094/PHYTO-10-12-0253-R; PMID:23656312;
Al Rwahnih M, Golino DA, Rowhani A. 2015. First report of Grapevine pinot gris virus infecting grapevine in the United States. *Plant Disease.*, Doi: 10.1094/PDIS-10-15-1235-PDN;
Beuve M, Candresse T, Tannier M, Lemaire O. 2015. First report of *Grapevine pinot gris virus* (GPGV) in France. *Plant Disease.*, 99(2): 293.2 - 293.2. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-14-1008-PDN>;
Berger P, Barnett OW, Brunt AA, Colinet D, Edwardson IR, Hammond I, Hill IH, Jordan RL, Kashwazaki S, Makkouk K, Morales F1, Rybicki E, Spence N, Ohki ST, Uyeda I, Van Zaayen A, Vetten RI. 2000. Family Potyviridae In: *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Springer-Verlag., NY. 703-724

Bertazzon N, Filippin L, Forte V, Angelini E. 2015. Grapevine pinot gris virus seems to have recently been introduced to vineyards in Veneto, Italy. *Archives of Virology.*, 161(3):711-4. doi: 10.1007/s00705-015-2718-2; PMID:26666440;
Casati P, Maghradze D, Quaglino F, Ravasio A, Failla O, Bianco PA. (2015). First report of Grapevine Pinot gris virus in Georgia. *Journal of Plant Pathology.*, 97(4). doi:10.4454/JPP.V98I1.003293;
Cho IS, Jung SM, Cho JD, Choi GS, Lim HS. 2013. First report of *Grapevine Pinot gris virus* infecting grapevine in Korea. *New Diseases Reports.*, 27,10. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2013.027.010>;
EPPO. 2015. *Grapevine red blotch-associated virus.* European and Mediterranean Plant Protection.
EPPO. 2018. *Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus.* European and Mediterranean Plant Protection .
Fan XD, Dong YF, Zhang ZP, Ren F, Hu GJ, Li ZN. 2015. First report of Grapevine Pinot gris virus in grapevines in China. *Plant Disease.*,100(2), p. 540. doi:10.1094/PDIS-08-15-0913-PDN.
Çağlayan K, Gazel M, Elçi E, Öztürk L. 2015. The situation of the new emerging grapevine viruses in Turkey. 18th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG). Ankara-Türkiye. 7-11 Eylül, 2015.
Giampetruzzi A, Roumi V, Roberto R, Malossini V, Yashikawa N, LaNotte P, Terlizzi F, Credi R, Salderelli P. 2012. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus-and viroid-derived small RNAs in cv Pinot gris. *Virus Research.*, 163(1):262-8. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.10.010>; PMID:22036729;
Gazel, M, Çağlayan K, Elçi E, Öztürk L. 2016. First report of Grapevine pinot gris virus in grapevine in Turkey. *Plant Disease.*, 100 (3): 657. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-15-0596-PDN>;
Glasa M, Predajna L, Kominek P, Hagyoova A, Candresse T, Olmos A, 2014 Molecular characterization of divergent *Grapevine pinot gris virus* and their detection in Slovak and Czech grapevine. *Archives of virology.*, 159(8) :2103-7. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2031-5>; PMID:24599565
Glasa M, Predajna L, Soltys K, Sabanadzovic S, Olmos A. 2015. Detection and molecular characterisation of *Grapevine Syrah virus-1* isolates from Central Europe. *Virus Genes.*, 51(1):112-21. doi: 10.1007/s11262-015-1201-1; PMID: 25940164;
Jo Y, Choi H, Kyong Cho J, Yoon JY, Choi SK, Kyong Cho W. 2015. In silico approach to reveal viral populations in grapevine cultivar Tannat using transcriptome data. *Scientific Reports.*, 28;5:15841. doi: 10.1038/srep15841; PMID: 26508692;
Krenz B, Thompson JR, McLane HL, Fuchs M, Perry KL. 2014. *Grapevine red blotch-associated virus* is widespread in the United States. *Phytopathology.*, 104(11): 1232-40. doi: 10.1094/PHYTO-02-14-0053-R; PMID:24805072
Mackenzie DJ, Mclean MA, Mukerji S, Green M. 1997. Improved RNA extraction for woody plants for the detection of viral pathogens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *Plant Disease.*, 81(2): 222-226. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.2.222>
Malagnini V, de Lillo E, Saldarelli P, Beber R, Duso C, Raiola A, Zanotelli L, Valenzano D, Giampetruzzi A, Morelli M, Ratti C, Causin R, Gualandri V. 2016 *Arch Virol.*,161(9):2595-9. doi: 10.1007/s00705-016-2935-3; PMID:27344161
Maliogka VI, Olmos A, Pappi PG, Lotos L, Efthimiou K, Grammatikaki G, Candresse T, Katis NI, Avgelis AD. 2015. A novel grapevine badnavirus is associated with the *Roditis leaf discoloration disease.* *Virus Research.*, 203:47-55. doi: 10.1016/j.virusres.2015.03.003; PMID: 25791736

- Martelli GP. 2010. Virus diseases of grapevine. Encyclopedia of Life Sciences., 2nd Ed., John Wiley ve Sons. Hoboken, NJ, USA. p. 1-11
- Oraman MN, 1965. Arkeolojik Buluntuların Işığında Türkiye Bağcılığının Tarihçesi Üzerinde Araştırmalar. Ankara Ün. Ziraat Fak. Yıllığı., 15(2): 96-108.
- Plesko MI, Marn VK, Seljak G, Zezlina I. 2014 First report of *Grapevine Pinot gris virus* in grapevine in Slovenia. Plant Dis., 98(7): 1014. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-11-13-1137-PDN>
- Sabanadzovic S, Abou Ghanem-Sabanadzovic N, Gorbalenya AE. 2009. Permutation of the active site of putative RNA-dependent RNA polymerase in a newly identified species of plant alpha-like virüs. Virology., 394(1): 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.08.006>
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution., 4: 406-425.
- Saldarelli P, Gualandri V, Malossini U, Glasa M. 2017. Grapevine Pinot gris virus .Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management., 351-363.
- Serçe CU, Altan B, Bolat V, Ayyaz M, Çifçi O, Önder S, Gökçe ZNÖ, Maliogka VI. 2018. First report of Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus infecting grapevine (*Vitis vinifera*) in Turkey. Plant Disease., 102(1), 256-257. DOI: 10.1094/PDIS-06-17-0927-PDN
- Sudarshana MR, Perry KL, Fuchs MF. 2015. Grapevine red blotch-associated virus, an emerging threat to the grapevine industry. Phytopathology., 105:1026-1032. <https://doi.org/10.1094/PHTO-12-14-0369-FI>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol. Biol., 30(12):2725-9. doi: 10.1093/molbev/mst197; PMID: 24132122
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research., 22: 4673-80. PMID: 7984417
- Xiao H, Kim W, Meng B. 2015. A highly effective and versatile technology for the isolation of RNAs from grapevines and other woody perennials for use in virus diagnostics. Virology Journal., 12 (171), 2-15. doi: 10.1186/s12985-015-0376-3; PMID:26482551