



Araştırma Makalesi

## Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu

Ayşenur ŞİRİN<sup>1</sup>, Ali KARANFİL<sup>1</sup>, Savaş KORKMAZ<sup>1\*</sup>

### ÖZ

Bağ alanlarında verim ve kaliteyi düşüren en önemli faktörlerin başında hastalık ve zararlılar gelmektedir. Bunların içerisinde mücadelenin zor olması nedeni ile virüs hastalıkları büyük bir öneme sahiptir. Bağ alanlarında gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde çok sayıda virüs hastalığı tanımlanmıştır. 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 olmuştur. Bu çalışma etmenin tespiti ve izolatlarının moleküler karakterizasyonu amacı ile yürütülmüştür. Bu amaçla Çanakkale ili ve ilçeleri bağ üretim alanlarında virüs ve virüs benzeri semptom gösteren 60 bitkiden örnekler alınarak GFLV spesifik primer çifti ile ters transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) kullanılarak testlenmiştir. Gerçekleştirilen testlemeler sonucunda toplanılan örneklerin 34'ünde GFLV enfeksiyonu tespit edilmiştir. Toplanan örneklerdeki GFLV enfeksiyon oranı ise %56.66 olmuştur. Enfekteli örneklerde en dikkat çeken semptom tipi yapraklardaki sarımtırak klorozlar ve yaprak deformasyonları olarak belirlenmiştir. İzolatların moleküler karakterizasyonu amacı ile enfekteli olarak bulunan örneklerden elde edilen 4 izolat seçilerek kendi içlerinde ve dünya izolatları ile kılıf protein (CP) gen bölgesine göre göstermiş oldukları benzerlik ve filogenetik ilişkileri araştırılmıştır. Moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda Türk ve dünya izolatlarının birbirleri ile %85 ve üzeri nükleotid ve amino asit benzerliği gösterdiği saptanmıştır. Filogenetik analizler sonucunda ise Türk izolatlarının iki farklı gruba dağılım gösterdiği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** GFLV, RT-PCR, Benzerlik, Filogenetik

### Detection and Molecular Characterization of Grapevine Fanleaf Virus in Vineyards of Çanakkale Province

#### ABSTRACT

Diseases and pests are among the most important factors that reduce productivity and quality in vineyards. Among these, virus diseases are very important because they are difficult to combat. As a result of studies carried out in vineyard areas, many virus diseases have been identified. One of these virus diseases is grapevine fanleaf virus (GFLV). Although many studies have been conducted on GFLV in Türkiye, most studies have focused on detecting the virus. This study was carried out to identify the agent and molecular characterization of its isolates. For this purpose, samples were taken from 60 plants showing virus and virus-like symptoms in the vineyard production areas of Çanakkale province and its districts and tested using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with GFLV-specific primer pair. As a result of the tests performed, GFLV infection was detected in 34 of the samples collected. The GFLV infection rate in the collected samples was 56.66%. The most striking symptom type in infected samples was determined to be yellowish chlorosis and leaf deformations on the leaves. For molecular characterization of the isolates, 4 isolates obtained from the infected samples were selected and their similarities and phylogenetic relationships among themselves and with world isolates were investigated based on the coat protein (CP) gene region. As a result of molecular characterization studies, it was determined that Turkish and world isolates showed 85% or more sequence similarity. As a result of phylogenetic analysis, it was determined that Turkish isolates were distributed into two different groups.

**Keywords:** GFLV, RT-PCR, Similarity, Phylogenetic

ORCID ID (Yazar sırasına göre)

0000-0002-2666-9007, 0000-0002-4503-6344, 0000-0001-8227-3800

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 13.01.2024

Kabul Tarihi: 27.06.2024

<sup>1</sup>Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

\*E-posta: skorkmaz@comu.edu.tr

# Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu

## Giriş

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 kısalmasına sebep olmaktadır. Bağlarda hastalık etmenleri içinde virüs hastalıkları önemli derecede ekonomik kayba neden olan önemli bir grubu 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)'dür.

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. Virionları +(ss)RNA yapısındadır (Demangeat ve ark., 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 yapraklarda parlak sarımtırak renk değişimleri görülür. Damarlarda veya damarlar arasında büyük lekeler görülebilir. Yazın artan sıcaklıklar ile 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 (Avgelis and Tzortzakakis; Tülek, 2014; Türkmen ve Ertunç, 2019).

GFLV ile ilgili ülkemizin bağ üretim alanlarında etmenin tanısına yönelik birçok çalışma yapılmıştır (Kaya ve Erilmez, 2014; Tülek, 2014; Önder ve ark., 2016; Karadeniz ve ark., 2018). Ancak moleküler karakterizasyonuna yönelik son derece sınırlı sayıda çalışma olduğu görülmektedir (Türkmen, 2020). Çanakkale ilinde ise 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.

## Materyal ve Metot Arazi Çalışmaları

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

# Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu

## Virüs Tanılama Çalışmaları

Arazi çalışmaları sonucu toplanan örneklerdeki GFLV enfeksiyonu RT-PCR testleri ile belirlenmiştir. Bu doğrultuda ilk olarak toplanan örneklerden total nükleik asit (TNA) izolasyonu gerçekleştirilmiş, daha sonrasında RT-PCR analizleri yapılmıştır. RT-PCR testlerinde GFLV'e spesifik primer çifti 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.

## Total Nükleik Asit İzolasyonu

Arazide GFLV enfeksiyonu açısından şüpheli olarak görülen ve toplanan örneklerden TNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Li ve

ark. (2008)'in belirttiği CTAB metodu ile TNA izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla total TNA 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 Li ve ark. (2008)'in belirttiği şekilde izolasyon aşamaları yerine getirilmiştir.

## RT-PCR Çalışmaları

Gerçekleştirilen RT-PCR çalışmaları kimyasalların sağlandığı firmaların ve GFLV'in CP gen bölgesinin kısmi dizilerine spesifik Rowhani ve ark. (1993)'in belirttiği primer çifti (Çizelge 1) ve RT-PCR koşulları da dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir.

PCR reaksiyonlarında Takara (Japonya) firmasından sağlanan PCR mastermiks kullanılarak ve MJ Mini (Bio-Rad, ABD) PCR cihazında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 1. PCR çalışmalarında kullanılan primer çifti

Primer Yönü	Sekans (5' - 3')	Ürün büyüklüğü	Referans
İleri	ACCGGATTGACGTGGGTGAT	321 bp	Rowhani ve ark. (1993)
Geri	CCAAAGTTGGTTTCCCAAGA		

## Sekans Analizleri

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.

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 (Çizelge 2). Alınan bu izolatlar ile Çanakkale GFLV izolatlarına ait veriler Sequence Demarcation Tool (SDT) programında (Muhire ve ark., 2014) çoklu dizileme yapılarak izolatların nükleotit ve amino asit düzeyinde birbirleri ile göstermiş oldukları benzerlik oranları belirlenmiştir.

İzolatların filogenetik ilişkileri de CLC Main Workbench (V.20) 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 ağaç oluşturulmuştur. Ayrıca filogenetik ağaçta ağacın doğruluğunu arttırmak amacıyla dış grup olarak olive latent ringspot virus (OLRV) kullanılmıştır.

## Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu

Çizelge 2. Biyoinformatik analizlerde kullanılan bazı grapevine fanleaf virus (GFLV) izolatlarına ait bilgiler

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

### Sonuçlar ve Tartışma

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 (Çizelge 3).

Çizelge 3. Çanakkale ili ve ilçeleri bağ üretim alanlarından toplanılan ve grapevine fanleaf virus (GFLV) ile enfekteli bulunan örnek sayıları ve GFLV enfeksiyon oranı

İlçeler	Enfekteli Örnek Sayısı	Toplanan Örnek Sayısı	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

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

## Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu

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 farklılıklar, asma bitkilerinin yaşı ve virüsü taşıyan nematodların toprakta bulunma durumu gibi faktörler göz önünde bulundurulduğunda her ilçeden alınan örneklerdeki enfekteli bitki sayısı farklılık göstermektedir. 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 birçok çalışmada da farklı enfeksiyon oranları bildirilmiştir. Özaslan ve ark. (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) 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 enfeksiyon oranını %8,1 olarak bulmuştur. Bir başka çalışmada ise Karadeniz ve ark. (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 semptomları yapraklardaki gümüş renge dönen sararmalar olarak gözlenmiştir. Ayrıca bu sararmaların bazen yaprağın tamamını kapladığı bazen de sadece yaprak kenarlarında olduğu görülmüştür (Şekil 1). 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.

## Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu



Şekil 1. Grapevine fanleaf virus ile enfekteli asma bitkilerinde gözlenen sararma ve yaprak deformasyonu belirtileri

GFLV ile enfekteli olarak bulunan bitkilerde gözlenen belirtiler ülkemizde bu zamana 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 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.

Bu çalışmada araziden toplanan örnekler RT-PCR yöntemiyle test edilmiştir. Testlemeler süresince yöntem açısından herhangi bir zorlukla karşılaşılmağı. Enfekteli örnekler RT-PCR sonucunda agaroz jelde beklenen büyüklükte bantlar oluşturmuştur. 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 ve ark., 1993; Pourrahim ve ark., 2007; Eichmeier ve ark., 2010; Cepin ve ark., 2021).

Nitekim Önder ve ark. (2016), ülkemiz bağlarında sorun oluşturan ve yaygın olarak bulunan GFLV'yi klasik RT-PCR ve gerçek zamanlı RT-PCR kullanarak testlemişlerdir. 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 kullanılabilceğini destekler niteliktedir.

## Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu

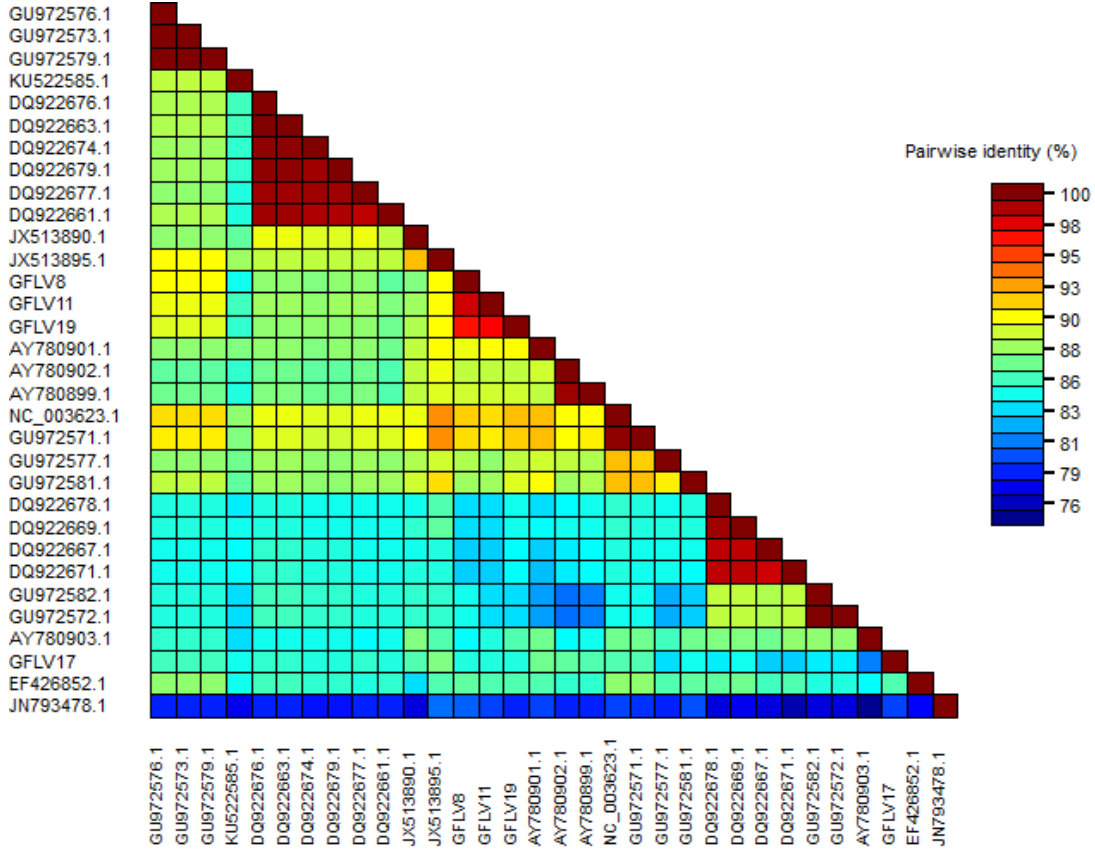
Çanakkale ili ve ilçelerinde tespit edilen GFLV izolatlarının moleküler karakterizasyonları amacı ile 4 GFLV izolatı seçilerek moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla GFLV enfeksiyonu tespit edilen her bir ilçeden bir izolat olacak şekilde GFLV izolatı belirlenmiştir. Bozcaada'dan 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.

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 2).

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 matrisi 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 yoktur. 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 gerçekleşmiştir (Şekil 2).



## Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu



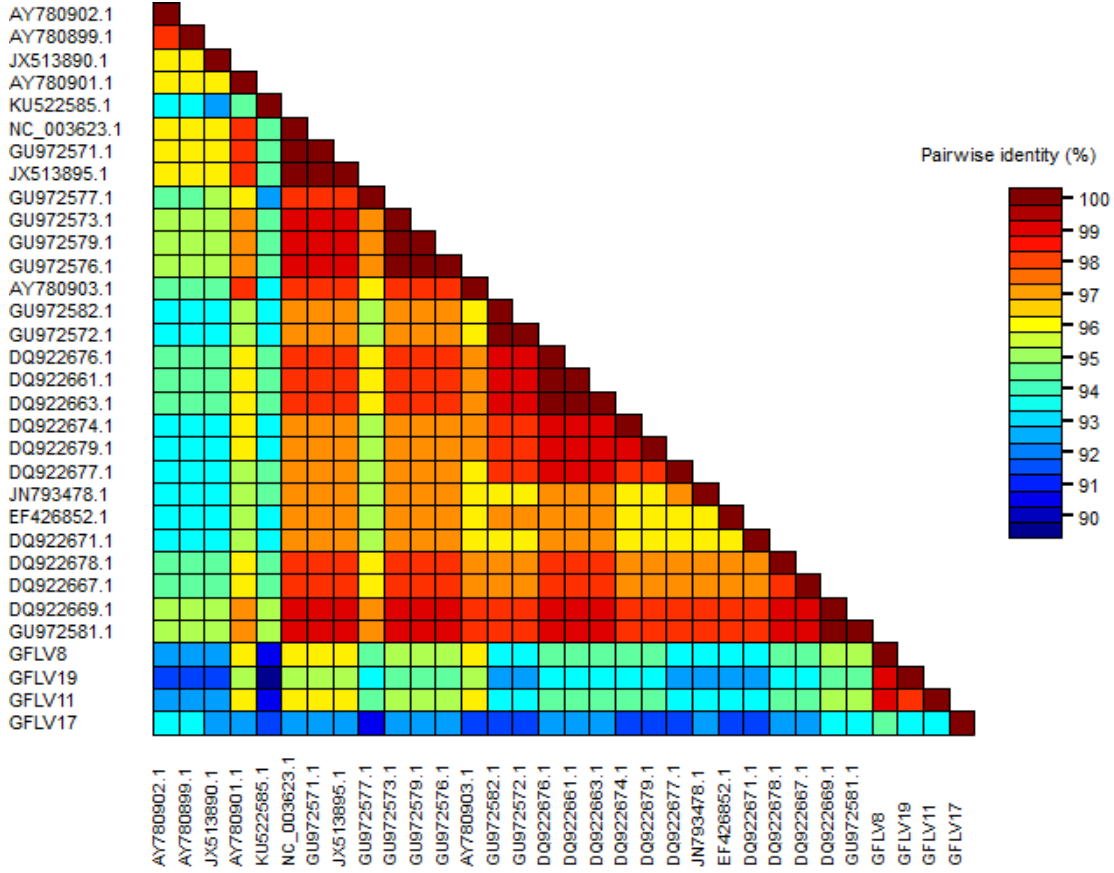
Şekil 2. Grapevine fanleaf virus izolatlarının kılıf protein gen bölgesine göre nükleotit düzeyinde birbirleri ile göstermiş oldukları sekans benzerlik oranları

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 3).

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 3).



## Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu



Şekil 3. Grapevine fanleaf virus izolatlarının kılıf protein gen bölgesine göre amino asit düzeyinde birbirleri ile göstermiş oldukları sekans benzerlik oranları

Pourrahim ve ark. (2007), İran'ın kuzey doğusunda bulunan iki farklı bölgeden elde edilen beş farklı GFLV izolatını, 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 ve kuzeybatı İran'dan gelen diğer izolatlarla %83.0-87.1 homolojiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. 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 5. grupta yer aldığı belirlenmiştir. Çanakkale ili izolatlarından 8, 11 ve 19 numaralı sırasıyla Bozcaada, Bayramiç ve Lapseki ilçelerinden elde edilen izolatlarla 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 4).

## Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu



Şekil 4. Grapevine fanleaf virus izolatlarının kılıf protein gen bölgesine göre nükleotit düzeyinde birbirleri ile göstermiş oldukları filogenetik ilişkiler

Oliver ve ark. (2010) Kaliforniya ve dünya GFLV izolatlarının moleküler karakterizasyonu amacı ile yürütmüş oldukları çalışmalarında GFLV izolatlarının CP gen bölgesine göre 9 filogenetik gruba ayrıldığı belirtmişlerdir. Gerçekleştirilen bu çalışmada 5, Oliver ve ark. (2010)'nın çalışmasında ise 9 grup oluşumunun kullanılan izolat sayısı ve farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Gerçekleştirilen bu çalışma ile GFLV'nin Çanakkale ilinde bağ üretimi 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.

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.

### Teşekkür

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: FYL-2021-3747.

### Kaynaklar

- Avgelis, A. D., Tzortzakakis, E. A. (1997) Occurrence and distribution of Xiphinema species and grape fanleaf nepovirus in vineyards of the Greek island of Samos. *Nematologia Mediterranea* 25: 177-182.
- Cepin, U., Gutiérrez-Aguirre, I., Balažic, L., Pompe-Novak, M., Gruden, K., 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.

## Çanakkale İli Bağ Alanlarında Grapevine Fanleaf Virus İzolatlarının Tespiti ve Moleküler Karakterizasyonu

- Cigsar, I., Digiario, M., Martelli, G.P. (2002). Sanitary status of grapevines in south-eastern and central Anatolia (Turkey). *EPPO Bulletin* 32 (3): 471-475.
- Demangeat, G., Komar, V., Cornuet, P., Esmenjaud, D., 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., Baránek, M., 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.
- Karadeniz, H., Yağcı, A., Topkaya, Ş., Yanar, Y. (2018) Tokat ili ve ilçelerinde bazı bağ virüs hastalıklarının serolojik yöntemlerle belirlenmesi, *Bitki Koruma Bülteni* 58 (2): 103-110.
- Kaya, A., Erilmez, S. (2014) Detection of viruses in Aegean Region grapevines. *The Journal of Turkish Phytopathology* 43 (1-2-3): 45-57.
- Li, R., Mock, R., Huang, Q., Abad, J., Hartung, J., Kinard, G. (2008) A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the pcr-based detection of diverse plant pathogens. *Journal of Virological Methods* 154 (1-2): 48-55.
- Muhire, B.M., Varsani, A., Martin, D.P. (2014). SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS One*, 9: 0108277.
- Oliver, J. E., Vigne, E., Fuchs, M. (2010) Genetic structure and molecular variability of Grapevine fanleaf virus populations. *Virus Research* 152 (1-2): 30-40.
- Önder, S., Paylan, İ.C., Gümüş, M. (2016) 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.
- Pourrahim, R., Farzadfar, S.H., Golnaraghi, A.R., 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.
- 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.
- 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.
- 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., & Ertunç, F. (2019). Determination of Grapevine Leafroll Diseases Infection in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7(11), 1947–1953.
- 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.