

TC

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜL SARI DAMAR VİRÜS (*Rose yellow vein virus,*RYVV) ETMENİNİN İKİ FARKLI GEN BÖLGESİNE GÖRE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Nazlı GÜRSEL

Bitki Koruma Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

TC

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÜL SARI DAMAR VİRÜS (*Rose yellow vein virus*,RYVV) ETMENİNİN İKİ FARKLI GEN BÖLGESİNE GÖRE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Nazlı GÜRSEL

Bitki Koruma Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih:**23/06/2020**

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

ÇANAKKALE

Nazlı GÜRSEL tarafından Prof. Dr. Savaş KORKMAZ yönetiminde hazırlanan ve **23/06/2020** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan "**Gül Sarı Damar Virüs (*Rose yellow vein virus,* RYVV) Etmeninin İki Farklı Gen Bölgesine Göre Moleküler Karakterizasyonu**" başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Bitki Koruma Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof. Dr. Savaş KORKMAZ ……
Başkan

Prof. Dr. Figen MERT ……
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Orhan BOZAN …….
Üye

Doç. Dr. Pelin KANTEN
Müdür V.
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Sıra No:……

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Nazlı GÜRSEL

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen, her aşamada bana yol gösteren saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Savaş KORKMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Jüri üyeleri saygı değer hocalarım Prof. Dr. Figen MERT ve Dr. Öğr. Üyesi Orhan BOZAN'a katkılarından dolayı teşekkür ederim. Çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve tezin her aşamasında yardımlarını ve bilgilerini benimle paylaşan saygı değer Araş. Gör. Dr. Ali KARANFİL'e, arkadaşlarıma ve hayatımın her evresinde yanımda olduğunu hissettirerek bana destek olan sevgili aileme çok teşekkür ederim.

Nazlı GÜRSEL

Çanakkale, Haziran 2020

SİMGELER VE KISALTMALAR

Mg	Miligram
%	Yüzde oranı
Ha	Hektar
Ml	Mililitre
rpm	Dakikadaki devir sayısı
pH	Hidrojen iyonu konsantrasyonu
mM	Milimolar
DNA	Deoksiribonükleik asit
bç	Baz çifti
A	Adenin
G	Guanin
T	Timin
C	Sitozin
ORF	Açık okuma bölgesi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
dNTP	Deoksinükleotidtrifostat
CP	Kılıf protein
MP	Hareket proteini
µl	Mikrolitre
ºC	Derece Santigrat
Taq polimeraz	Termo stabil polimeraz enzimi

ÖZET

GÜL SARI DAMAR VİRÜS (*Rose yellow vein virus,* RYVV) ETMENİNİN İKİ FARKLI GEN BÖLGESİNE GÖRE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Nazlı GÜRSEL

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Bitki Koruma Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

23/06/2020, 47

Gül bitkisi ülkemizin hemen hemen her bölgesinde doğal olarak yetişmekte veya üretimi yapılmaktadır. Güllerde enfeksiyon oluşturan çok sayıda virüs hastalığı vardır ve bunlardan bir tanesi de Gül sarı damar virüsü (*Rose yellow vein virüs*; RYVV)'dür. RYVV *Caulimoviridae* familyası içinde *Rosadnavirus* cinsine ait bir virüstür. Virüs, 9.314 nükleotitten oluşan ssDNA (+) genomuna sahiptir. Etmen ülkemiz için yeni bir virüs olup karakterizasyonu tam olarak yapılmamıştır. Bu amaçla 2018-2019 yıllarında Çanakkale ilinde virüs ve virüs benzeri simptom gösteren 71 gül örneği toplanmıştır. Toplanan örnekler PCR ile kılıf protein genine spesifik primer çifti (RYVV-F1 5'-CGAGA TTAAC GAAAT GGAC-3'and RYVV R1 5'-CGTAC TCTTT CTTGG CTT-3') ile testlenmiştir. Testlemeler sonucunda 71 örneğin 19'u enfekteli olarak bulunmuştur. Enfekteli izolatlardan biri seçilerek ilgilenilen hareket proteini (movement protein; MP) ve kılıf proteini (coat protein; CP) gen bölgelerinin tamamı PCR ile amplifiye edilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri kullanılarak seçilen izolata ait amplifiye edilmiş olan MP ve CP genlerinin nükleotid dizileri belirlenmiştir. Elde edilen RYVV MP ve CP genlerine ait nükleotit dizilimleri kullanılarak, amino asit dizilimleri çıkarılmıştır. Yapılan nükleotid ve amino asit temelli çoklu dizi karşılaştırmaları sonucunda Çanakkale RYVV izolatı ile dünya izolatları arasında nükleotid düzeyinde %96-98, amino asit düzeyinde %98-99 oranlarında benzerlik olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca filogenetik analizler sonucunda Çanakkale RYVV izolatı ile dünya izolatlarının ilişkileri ortaya konmuştur. Bu çalışma ile ülkemizde ilk defa RYVV Çanakkale izolatının iki gen bölgesine göre moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Anahtar sözcükler: Çanakkale, Gül, Polimeraz Zincir Reaksiyonu, *Rose yellow vein virus*

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Rose yellow vein virus* (RYVV) BASED ON TWO DIFFERENT GENE REGION

Nazlı GÜRSEL

Çanakkale Onsekiz Mart University

Institute of Graduate Education

Master of Science Thesis in Plant Protection

Advisor:Prof. Dr. Savaş KORKMAZ

06/23/2020, 47

Roses are naturally grown or produced in almost every region of Turkey. There are numerous viruses that infect roses, including the *Rose yellow vein virus* (RYVV). RYVV belongs in the genus *Rosadnavirus* and the family *Caulimoviridae*. The virus has a ssDNA (+) genome that consists of 9.314 nucleotides. RYVV is a new virus to Turkey and it hasn't yet been characterized. For this reason, 71 roses showing virus and virus-like disease symptoms were collected from Çanakkale province in 2018-2019. The collected samples were tested by PCR with the coat protein gene-specific primer pair (RYVV-F1 5'-CGAGA TTAAC GAAAT GGAC-3 'and RYVV R1 5'-CGTAC TCTTT CTTGG CTT-3'). As a result of the tests, 19 out of 71 samples were found to be infected with RYVV. One isolate was randomly selected and the gene regions, movement protein (MP), and coat protein (CP) were amplified by PCR and the PCR products were sequenced. The amino acid sequences of the RYVV MP and CP genes were deduced by nucleotide sequence analysis. As a result of multiple sequence comparisons based on two gene regions of the nucleotide and deduced amino acid, the Çanakkale RYVV isolate showed 96-98% nucleotide and 98-99% amino acid similarities with known isolates, respectively. Moreover, as a result of phylogenetic analysis, relationships between the Çanakkale RYVV isolate and the known isolates were revealed. This study was the first to perform molecular characterization of the RYVV Canakkale isolates, based on two gene regions, in Turkey.

Keywords: Çanakkale, Rose, Polymerase Chain Reaction, *Rose yellow vein virus*

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI iii
TEŞEKKÜR iv
SİMGELER VE KISALTMALAR v
ÖZET vi
ABSTRACT viii
ŞEKİLLER DİZİNİ xi
TABLOLAR DİZİNİ xii
BÖLÜM 1
GİRİŞ 1
BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 7
BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM 14
3.1. Arazi Çalışmaları 14
3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri 15
3.2.1. Total DNA İzolasyonu 15
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Aşaması 16
3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi 18
3.3. Moleküler Karakterizasyon Çalışmaları 19
3.4. Dizi Analizleri ve Filogenetik Soyağaçlarının Oluşturulması 19
BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA 21
4.1. Arazi Çalışmaları 21
4.2. PCR Analizleri ile Virüs Tanılama Çalışmaları 23
4.3. Moleküler Karakterizasyon Çalışmaları 25
4.4. Dizi Analizleri ve Filogenetik Soy Ağaçlarının Oluşturulması 26
4.4.1. Amino asit Dizi Analizleri 26
4.4.2. Nükleotid Dizi Analizleri 29
4.4.3. Filogenetik Analizler 35
BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER 39
KAYNAKLAR 42

ÖZGEÇMİŞ I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. *Rose yellow vein virus* ve akraba virüslerin genom yapıları 5
Şekil 2. Arazi çalışmalarında simptom gösteren örneklerin toplanması 15
Şekil 3. PCR analizleri için örneklerin hazırlanması 16
Şekil 4. Polimeraz zincir reaksiyonu analizlerinin gerçekleştirildiği thermal-cycler cihazı ve ayarlanan PCR döngüsü 18
Şekil 5. Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin jele yüklenmesi 19
Şekil 6. Arazide *Rose yellow vein virus* benzeri simptom gösteren ve örnekleme yapılan bazı gül yaprakları 21
Şekil 7. Arazi çalışmalarının gerçekleştirildiği Çanakkale ilçeleri 22
Şekil 8. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmesi sonucunda oluşan bant görüntüleri 23
Şekil 9. *Rose yellow vein virus* ile enfekteli olduğu tespit edilen gül bitkisi 25
Şekil 10. Moleküler karakterizasyon için kullanılan izolatların oluşturduğu bant görüntüleri 25
Şekil 11. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatı ile dünyadaki RYVV izolatlarının kılıf protein amino asit dizilerinin benzerlik oranları 26
Şekil 12. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatı ile dünyadaki RYVV izolatlarının kılıf protein amino asit dizilerinin hizalanması 27
Şekil 13. Çanakkale *Rose yellow vein* virus izolatı ile dünyadaki RYVV izolatlarının hareket proteini aminoasit dizilerinin benzerlik oranları 28
Şekil 14. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatı ile dünyadaki RYVV izolatlarının hareket proteini amino asit dizilerinin hizalanması 29
Şekil 15. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatı ile dünyadaki RYVV izolatlarının kılıf protein nükleotid dizilerinin benzerlik oranları 30
Şekil 16. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatı ile dünyadaki RYVV izolatlarının kılıf protein nükleotid dizilerinin hizalanması 31
Şekil 17. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatı ile dünyadaki RYVV izolatlarının hareket proteini nükleotit dizilerinin benzerlik oranları 33
Şekil 18. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatı ile dünyadaki RYVV izolatlarının hareket proteini nükleotit dizilerinin hizalanması 34
Şekil 19. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatının kılıf protein geninin amino asit dizimleri kullanılarak neighbor joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı 35
Şekil 20. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatının hareket proteini geninin amino asit dizimleri kullanılarak neighbor joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı 36
Şekil 21. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatının kılıf protein geninin nükleotid dizimleri kullanılarak neighbor joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı 37
Şekil 22. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatının hareket proteini geninin nükleotid dizimleri kullanılarak neighbor joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı 38

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. 2014-2018 yılları arası Türkiye kesme gül ekili alanı ve üretim miktarı 2
Tablo 2. Gülün sistematiği 3
Tablo 3. *Rose yellow vein virus* enfeksiyonunun belirlenmesinde kullanılan primer çifti .. 17
Tablo 4. PCR ürünleri ve hacimleri 17
Tablo 5. *Rose yellow vein virus* için amplifiye edilen gen spesifik primer çiftleri listesi ... 19
Tablo 620 Dünyanın diğer bölgelerindeki *Rose yellow vein virus* izolatlarının numaraları ve orijinleri 20
Tablo 7. Tez çalışmasında kullanılan Çanakkale'den alınan örneklere ait bilgiler 22
Tablo 8. Çanakkale ili ve ilçelerinden alınan örnek sayıları, enfekteli örnek sayıları ve enfeksiyon oranları 24

BÖLÜM 1
GİRİŞ

Süs bitkileri, genellikle ürünlerinden çok estetik güzellikleri sebebiyle üretimi yapılan bitkilerdir. Bugün ticari amaçla sürdürülen süs bitkileri ve çiçek üretimi gün geçtikçe büyüyen bir sektör halini almıştır. Bu konuda çoğu ülkede büyük yatırımlar yapılmakta olup bu ülkeler arasında bir rekabet bulunmaktadır (Korkut, 1998).

Süs bitkileri 4 temel grup içinde değerlendirilmektedir. Bunlar; dış mekan süs bitkileri, saksılı salon bitkileri, doğal çiçek soğanları, ve kesme çiçeklerdir (Titiz ve diğerleri, 2000; Yazgan ve diğerleri, 2005; Yılmaz, 2009). Üretim bakımından bu gruplar incelendiğinde ilk sırada %68,6 ile kesme çiçek yer alırken bunu %27,2 oranla dış mekan süs bitkileri takip etmektedir (Anonim, 2016).

Genel olarak 20. yüzyılın başlarında dünyada kesme çiçek üretimi değer ve ilgi görmeye başlamıştır. Günümüzde dünya üzerindeki yaklaşık 50'den fazla ülkede kesme çiçek üretimi yapılmaktadır. Dünya üzerinde kesme çiçek üretimi yapılan alan yaklaşık 550.000 hektardır. Kesme çiçek üretim alanı, süs bitkileri üretim alanlarının %39'unu oluşturmaktadır. Kesme çiçek üretiminde sahip olduğu çevre koşulları ve ucuz işgücü gibi avantajlar sayesinde Ekvador, Kenya ve Kolombiya gibi ülkeler son yıllarda dünyanın en önde gelen kesme çiçek üreticisi ve ihracatçısı olan ülkeler konumunda yer almaktadır (Anonim, 2015).

Binlerce türe sahip olması ile kesme çiçekler; milyar dolarlık bir sektör konumuna gelmiştir. Dünya çapında yaklaşık 10 milyar dolarlık ihracat ve 10 milyar dolarlık ithalat rakamlarına ulaşması ile giderek büyümekte ve gelişmekte olan bir sektör olarak karşımıza çıkmaktadır. İhracatta Hollanda, Kolombiya ve Ekvador ilk sıralarda iken ithalatta ise Almanya, Amerika, İngiltere, Hollanda gibi ülkeler ön planda yer almaktadır (Anonim, 2015).

Kesme çiçek ticareti yapan ülkelerin tüketim verileri incelendiğinde dünyadaki çiçek üretiminin yaklaşık olarak %50'sini Avrupa Birliği ülkelerinin tükettikleri bilinmektedir. Ayrıca bu ülkelerde kişi başına düşen kesme çiçek tüketiminin yüksek miktarda olduğu görülmektedir. Günümüze kadar, Avrupa'da satışı yapılan çiçek türlerine bakıldığı zaman; en popüler türün gül olduğu görülmektedir. Avrupa'da kesme çiçek tüketiminde yer alan diğer türlerden bazıları ise lale, krizantem, zambak, frezya ve orkidedir (Anonim, 2015).

Türkiye'de süs bitkisi üretimi 1940'lı yılların başında İstanbul ve civar illerinde başlamıştır. Yalova bu tarihlerde en önemli süs bitkisi üretim merkezi konumuna gelmiştir.

Ancak 1985 yılı itibariyle en yoğun üretim Antalya'da yapılmıştır. Marmara ve Ege bölgelerinde genellikle iç pazara yönelik kesme çiçek üretimi gerçekleştirilirken; Antalya civarında daha yüksek kalitede ve çoğunlukla ihracata yönelik üretim yapılmaktadır (Özkan ve Karagüzel, 1997; Taşcıoğlu ve Sayın, 2005).

Türkiye'nin kesme çiçek ekim alanlarında son 15 yıl içerisinde yaklaşık %38 oranında artış görülmektedir. Kesme çiçeklerin toplam süs bitkileri ithalatındaki payı ise %4,7 oranında bulunmaktadır (Tapkı ve diğerleri, 2018). Kesme çiçek ithalatında en önemli yer ise kesme güle aittir (Temel ve Öztürk, 2016).Türkiye'nin süs bitkileri 81,5 milyon dolara yükselen ihracatı ile dünyada 26. sırada yer almaktadır. Süs bitkileri içerisinde en fazla ihracat 27,7 milyon dolar ile %34 paya sahip kesme çiçeklere aittir. En fazla ihracat yapılan ülke ise %19,3 oranla Hollanda'dır (Tapkı ve diğerleri, 2018).

Kesme çiçek üretimi Akdeniz Bölgesi' nde 5.095 dekar, Ege Bölgesi'nde 4.221 dekar, Marmara Bölgesi'nde 1.078 dekar, diğer bölgelerde ise 652 dekar alanda yapılmaktadır. Ekim alanlarının %46,1'ini Akdeniz Bölgesi, %38,2'sini Ege Bölgesi, %9,8'ini Marmara Bölgesi, %5,9'unu ise diğer bölgeler oluşturmaktadır. Ülkemizin tüm bölgelerinde kesme çiçek üretimi yapılmaktadır (Anonim, 2015). Kesme çiçek üretiminde ekim alanı olarak ilk sırayı %41,2'lik payla İzmir almaktadır (Tapkı ve diğerleri, 2018).

Ülkemiz kesme gül üretimi ve ekili alanlarının son 5 yıla ait verileri Tablo 1'de görülmektedir. Tablo 1 incelendiğinde ekili alanla doğru orantılı olarak üretim miktarındaki değişimler görülmektedir. 2014-2017 yılları arasında ekili alanların artmasına bağlı olarak gül üretimi de artış göstermiş ve 2017 yılında 100 milyonun üzerinde kesme gül üretimi yapılmıştır. Fakat önceki yıllara kıyasla 2018 yılında gül ekili alanların sayısı azalmış ve bu doğrultuda gül üretim miktarında düşüş yaşanmıştır (Anonim, 2018).

Tablo 1
2014-2018 Yılları Arası Türkiye Kesme Gül Ekili Alanı ve Üretim Miktarı (Anonim, 2018)

Yıllar	Ekili Alan (m^2)	Üretim Miktarı (adet)
2014	1.677.912	87.198.996
2015	1.794.145	93.395.670
2016	1.873.817	92.591.970
2017	2.097.819	107.942.520
2018	2.067.547	97.587.112

Gülün sistematikte; Plantae ailesine bağlı Magnolioophyta bölümünde, Magnoliopsida sınıfında, Rosales takımı, Rosacesae familyasında bulunan Rosa cinsi

içerisinde yer aldığı ve ayrıca dünyada 200'den fazla gül türüne ait bulunan 2.500'den fazla gül çeşidi olduğu belirtilmektedir (Cairns ve diğerleri, 2000). Bugün yetiştirilmekte olan gül çeşitlerinin çoğu *Rosa indica, R. lutea* ve *R. gallica* türlerinden elde edilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2
Gülün sistematiği (Cairns ve diğerleri, 2000).

Alem	Plantae
Bölüm	Magnoliophyta
Sınıf Takım	Magnoliopsida Rosales
Familya	Rosaceae
Alt Familya	Rosaidea
Cins	Rosa
Türler	*Rosa gallica, R. indica R. lutea* ve diğer türler

Türkiye'de yetişen güller, Eurosa ve Hesperhodos olmak üzere iki alt cinste yer almaktadır (Özçelik ve diğerleri, 2010). Türkiye'de yaklaşık 25 *Rosa* türünün doğal olarak yetiştirildiği saptanmıştır. Ülkemiz için tanımlanmayı ve sınıflandırmayı beklemekte olan yeni gül türleri mevcuttur (Korkmaz ve diğerleri, 2013; Başer ve diğerleri, 1990). Modern güller, bahçe gülleri ve doğal güllerin tanımlanamayan yeni türleri ve ayrıca kaydedilecek olan yeni taksonlar da ilave edildiği takdirde ülkemizdeki toplam gül türü 70 olmaktadır. Bu taksonlara bağlı olan 500 civarında yerli (ek olarak 100-200 modern gül) soy yapısından oluştuğu tahmin edilmektedir (Ercişli ve diğerleri, 1996., Zlesak ve diğerleri, 2006).

Ülkemizin hemen hemen her bölgesinde güllerin doğal bir şekilde yetiştiği veya yetiştiriciliğinin yapıldığı bilinmektedir. Güller başta ilaç, gıda ve peyzaj gibi sektörlerde kullanılmaktadır ve bunlar gibi diğer pek çok alanda da güllerden yararlanılmaktadır. Buna rağmen, insanların bu bitkilere olan ilgisi zamanla azalmaktadır. Aynı zamanda şehirleşme faktörünün artması nedeniyle güllerin genetik çeşitliliğinin devam etmesi zamanla tehlike altına girmektedir (Özçelik ve diğerleri, 2015).

Ülkemiz, Dünya'nın önde gelen gül yağı üreticileri arasında yer almaktadır. En yüksek gül yağı ihtiva eden gül cinsi olan *Rosa damascena*'nın üretimi yalnızca ülkemizde ve Bulgaristan'daki Kızanlık isimli bölgede yapılmaktadır (Erdiller ve diğerleri, 1995; Douglas, 2001). Ülkemizde yağ gülü üretiminin yaklaşık %80'i Isparta'da gerçekleştirilmektedir (Anonim, 2017).

Türk halkı yüzyıllardan beri geleneksel olarak bazı türlerin meyvelerinden gül marmelatı, gül şurubu, kuşburnu çayı, gül pekmezi; çiçeklerinden gül sirkesi, gül suyu,

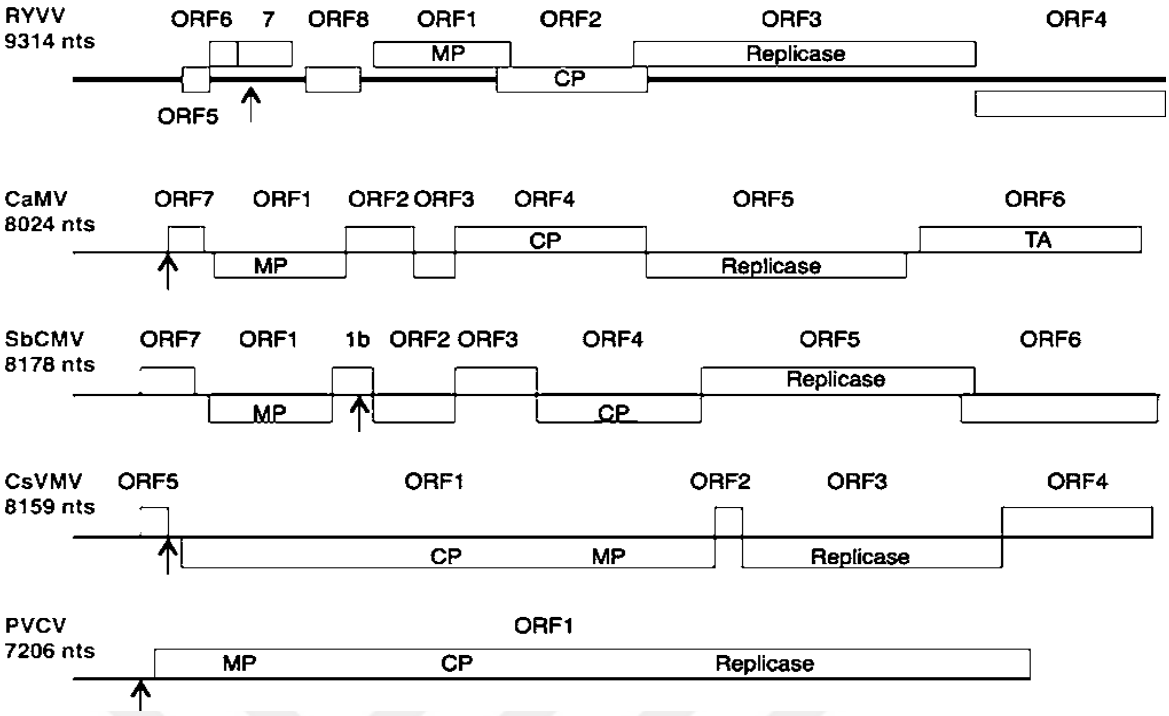
reçel, gibi ürünler üreterek ev ihtiyaçlarını karşılamaktadır. Bununla birlikte birçok gül türü gıda, baharat, parfümeri, kozmetik ve tıbbi amaçlarla da kullanılmaktadır. Uzun yıllardır Anadolu'da, *R. centifolia, R. gallica* ve *R. damascena* türleri gül yağı ve gül suyu üretmek için kullanılmaktadır (Özçelik ve diğerleri, 2015).

Gül yağı, gül çiçeği ve gül suyunun psikolojik, fiziksel ve ruhsal etki ve özelliklerinden dolayı güzellik, bakım, tedavi, koku, süs ve gıda amacıyla kullanıldığı birçok alan bulunmaktadır (Özçelik ve diğerleri, 2011). Nitekim gül yağı, gül suyu ve gül macunu tedavi yöntemi olarak "gül üçlemesi" şeklinde ifade edilmektedir. Gülden elde edilen ürünlerin hem kokusunun, hem sıvı olarak tüketilmesinin hem de cilde sürülmesinin ruhsal ve fiziksel olarak pek çok hastalığa yararlı olduğu bilinmektedir. Gül kokusunun ferahlatan ve serinleten tesirinin yanı sıra zihin açma özelliği de bulunmaktadır (Aktan ve Sağdıç, 2004; Acıduman ve diğerleri, 2007; Özçelik ve diğerleri, 2011).

Her bitki türünde olduğu gibi güllerin de hastalık ve zararlıları bulunmakta olup çeşitli enfeksiyonlar sonucu çiçek veriminde ve kalitede kayıplar meydana gelmektedir. Horst ve Clody (2007), güllerde zararlar meydana getirerek çiçek kalitesini ve verimini düşüren 26 farklı biyotik hastalık etmeninin olduğunu bildirmiştir. Ayrıca bu biyotik hastalık etmenlerine ek olarak abiyotik etmenlerin de fizyolojik bozukluklara neden olduğunu bildirmiştir. Oluşan bu kayıpların verim ve kalite üzerinde olumsuz şekilde etki ettikleri de bilinmektedir.

Dünyada gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda gülleri enfekte eden 11 farklı virüs hastalığı tanımlamıştır (Horst ve Cloyt, 2007). Bu etmenlerden en yaygın olanlar ise *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Apple mosaic virus* (ApMV) olarak bildirmiştir. Gül yapraklarında çizgili lekeler, rozetleşme, yaprak kıvırcıklığı halkalı leke, cücelik, solgunluk, çiçeklerde renk açılması ve şekil bozukluklarına sebep olan virüsler saptanmasına rağmen bazıları çok özel koşullarda lokal olarak ve nadiren karşımıza çıkan virüs hastalıklarıdır. Güllerde çiçek kalitesi ile verimini düşüren virüs kaynaklı hastalıkların, dünyanın birçok yerinde görüldüğü ve bu hastalıklar üzerine araştırmaların devam ettiği bilinmektedir.

Son yıllarda ABD'de güllerde damar sararma hastalığının etmeni olarak Caulimo benzeri olarak sınıflandırılan Gül sarı damar virüsü (*Rose yellow vein virus*, RYVV) tanımlanmıştır (Lockhart, 2011). Virüs, daha sonra yapılan çalışmalarda Caulimoviridae familyasında Rosadnavirus cinsi içinde sınıflandırılmıştır. Virüsün genom yapısı Şekil 1'de verilmiştir. RYVV 9314 nükleotidten oluşan, toplam 8 açık okuma bölgesi içeren, sirkülatif tek parçalı dsDNA genomuna sahiptir (Milleza ve diğerleri, 2013).



Şekil 1. *Rose yellow vein virus* ve akraba virüslerin genom yapıları

RYVV, ABD dışında ilk olarak Yeni Zelanda'da tek bir gül örneğinden tespit edilmiş (Perez-Egusquiza ve diğerleri 2012), ancak mevcut araştırma sırasında RYVV'nin Yeni Zelanda'nın birçok bölgesinde olduğu doğrulanmıştır. Araştırıcılar RYVV'nin aşılama yoluyla taşınabildiğini, ancak yaprak biti veya mekanik yolla taşınmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca RYVV ile enfekteli gül örneklerinde damar bantlaşması veya merkezi damar klorozunun yaygın bir şekilde görüldüğü belirtilmiştir (Lockhart, 2011).

RYVV ülkemizde ilk olarak Karanfil ve diğerleri (2018) tarafından rapor edilmiştir. Araştırıcılar Çanakkale ve Ankara illerinde RYVV simptomlarına benzer belirtiler gösteren gül bitkilerinden 26 örnek toplamışlardır. Toplanan örnekleri PCR ile testlemişlerdir. Testlemeler sonucunda 15 örnek RYVV ile enfekteli olarak bulunmuştur.

Bu tez çalışması kapsamında Çanakkale ili ve ilçelerinde bulunan park ve bahçe gibi alanlardaki güllerden, virüs ve virüs benzeri belirtiler sergileyen bitkilerden örnekler toplanmıştır. Toplanan örnekler Gül sarı damar virüsü (RYVV)'nün varlığını belirlemek için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile test edilmiştir. PCR testleri sonuçlarına göre RYVV ile enfekteli olduğu belirlenen örnekler içerisinden bir izolat seçilerek, ilgilenilen hareket protein (movement protein, MP) ve kılıf proteini (coat protein, CP) gen bölgeleri PCR ile amplifiye edilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri kullanılarak seçilen izolata ait amplifiye edilmiş olan MP ve CP genlerinin nükleotid dizilimleri belirlenmiştir. En son aşamada ise elde edilen RYVV MP ve CP genlerine ait nükleotit dizilimleri kullanılarak, bu genlere ait amino asit dizilimleri çıkarılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda bu diziler

kullanılarak dünya RYVV izolatları ile Çanakkale RYVV izolatının sekans benzerlik oranları ve filogenetik ilişkileri ortaya konmuştur.

BÖLÜM 2
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Dünyada Gül Virüsleri

Virüslerin neden olduğu hastalıklar gül üretimini sınırlayan önemli bir faktördür. Güllerde hastalık meydana getiren virüsler genellikle Nepovirus ve Ilarvirus cinslerine aittirler. Dünya üzerindeki farklı coğrafyalara ait gül üretim alanlarında Nepovirus cinsinden *Arabis mosaic virus* (ArMV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Strawberry latent ringspot virus* (SLRSV) ve *Tomato ringspot virus* (TomRSV); Ilarvirus cinsinden ise *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Tobacco streak virus* (TSV), *Apple mosaic virus* (ApMV) enfeksiyonları tespit edilmiştir (Moury ve diğerleri, 2001).

Horst ve Cloyd (2007), güllerde zararlar oluşturarak çiçek kalitesinde ve miktarında düşüşe neden olan virüs, bakteri, fungus ve prokaryotik patojenlerin sebep olduğu 26 farklı hastalığın olduğunu bildirmiştir. Ayrıca 15 abiyotik etmenin sebep olduğu fizyolojik hastalıkların yanında 12 farklı zararlı türünün de güllerdeki kalite ve verim üzerinde olumsuz şekilde etkileri olduğunu belirtmiştir. Bu araştırıcılar yaptıkları çalışmalar sonucunda güllerde 11 farklı virüs hastalığını tanımlamışlardır. Bunlar arasından en yaygın olanları ise PNRSV, ArMV ve ApMV 'nin neden olduğu mozaik hastalıklarıdır.

Güllerde ciddi kayıplara yol açan virüs hastalıklarının, dünyanın birçok yerinde ortaya çıktığı ve bu hastalıklar üzerinde çok sayıda araştırma yapıldığı bilinmektedir. Nitekim gerçekleştirilen ilk çalışmalar 1950'li yıllarda ABD'de başlamış ve takip eden yıllarda tüm dünyada çalışmalar gerçekleştirilmeye başlanmıştır (Brierley, 1953).

Klinkowski ve Sahtiyanci (1972), güllerdeki gül mozaik hastalığının etmenini bir virüs olarak tanımlamışlar ve virüsün *Rose mosaic virus* (RMV) olduğunu belirtmişlerdir. Bu etmenin neden olduğu en belirgin simptomun yapraklarda mozaik, lekelenmeler, yapraklarda deformasyon, meşe yaprağına benzer desen olarak görüldüğünü belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu virüsün 16 gül türünde hastalık yaptığını, Avrupa ülkelerine yayıldığını ve ülkemizde de görüldüğünü tespit etmişlerdir.

Wong ve diğerleri (1988) tarafından yapılan çalışmada New York'taki gül yetiştirilen alanlardan alınan örneklerin ELISA yöntemi ile testlenmesi sonucunda ApMV ve PNRSV virüsleri belirlenmiştir. Fakat hiçbir örnekte ArMV ve SLRSV saptanmamıştır. Moran ve diğerleri, (1988)'nın yaptıkları çalışmada ise Mercedes ve Sonia gül çeşitlerinde PNRSV'nin çiçek kalitesi üzerindeki olumsuz etkisi ortaya konmuştur. Wong ve Horst (1988), güllerdeki mozaik virüsü ile üç izolat üzerinde yaptıkları çalışmada DAS-ELISA

yönteminin, Indirekt ELISA testine kıyasla daha hassas bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

Brunt ve diğerleri (1996), yalnızca İngiltere'de görüldüğünü belirttikleri gül türlerinde petal yapraklarda çizgi oluşumuna ve deformasyona neden olan *Rose tobamo virus* (RTV) etmeninin özelliklerini açıklamışlardır. Bu virüsün çubuk formunda, 310–320 nm boyutlarında ve tek sarmal RNA içeren bir yapıda olduğunu belirtmişlerdir. Bunun yanı sıra doğal konukçu genişliği içerisinde gül türlerinin bulunduğu ArMV, ApMV ve PNRSV virüsleri tüm özellikleri ile tanıtılmıştır.

Güllerin duyarlı olduğu bir başka hastalık da Miller (1966)'in belirttiği gibi Gül sarı mozaik virüsü (RoYMV)'dür. Mollov ve diğerleri (2012), RoYMV'nin tüm genom dizi analizini çıkarmışlar ve Potyviridae familyasının üyelerinin özelliklerini taşıyan tüm özelliklere sahip olduğu belirtmişlerdir. RoYMV genomunun, 9508 nükleotitten oluştuğunuve 3067 amino asitlik bir poliproteini kodladığını saptamışlardır. Karşılaştırmalı sekans analizleri, RoYMV'nin tüm genom sekansı boyunca en yüksek amino asit sekansı kimliğine sahip olduğunu ortaya koymuşlar ve virüsün kılıf protein genlerinin Şalgam mozaik virüsü (TuMV) ile benzerliği ve filogenetik analizine dayanan çalışmalarla RoYMV'nin bu familyaya ait olduğunu kanıtlamışlardır.

Gül virüsleriyle yapılan bir başka çalışmada Sabandzovic ve Ghanem –Sabandzovic (2008), *Rose cryptic virus* (RCV-1) adını önerdikleri üç segmentli virüsün tam genom analizini gerçekleştirmişlerdir. Her üç segmentin de monosistronik olduğunu, RNA' ya bağımlı RNA polimerazların korunmuş motiflerini içeren protein kodlayıcının dsRNA-1 olduğunu ve muhtemelen viral kapsidin oluşmasında görev alan dsRNA 2 ve 3 tarafından kodlanmış iki proteinin %20 oranında amino asit benzerliği gösterdiğini belirtmişlerdir. Farklı çeşit güllerden alınan örneklerin RT-PCR yöntemi ile testlenmesi sonucunda 82 örnekten 24' ünde virüsü tepit etmişlerdir. Yaklaşık %30' luk enfeksiyon değeri bu virüsün özellikle hibrit çay gülü olmak üzere gül germplasmlarında oldukça yaygın olabileceğini göstermiştir. Filogenetik analizlerde virüsün beklenmedik şekilde Partitivirus cinsine ait mikovirüslere, Criptovirüslere göre daha fazla yakınlık gösterdiğini belirtmişlerdir.

Rivera ve Engel (2010), Şili'nin Santiago şehrinde gül yetiştirilen alanlarda yapraklarda sarı damar klorozu görülen bitkilerden örnekler toplamışlar ve random primer kullanarak RT-PCR yöntemi ile testlemişlerdir. Testlemeler sonucunda simptomlu örneklerde *Rose spring dwarf- associated virus* (RSDaV)'ın varlığını belirlemişlerdir. Çalışma kapsamında araştırıcılar sörvey alanını genişleterek daha fazla simptomlu, simptomsuz gül ve afid örnekleri toplamışlar ve bu örnekleri spesifik primerler kullanarak

RSDaV için RT-PCR ile testlemişlerdir. Testlemeler sonucunda test edilen tüm yaprak ve afid örneklerinin % 24'ünde virüsü teşhis etmişlerdir. Bu çalışma ile ilk defa Şili'de gül bitkilerinde ve *Rhodobium porosum* afidinde RSDaV 'yi rapor etmişlerdir.

Khatri ve diğerleri (2014), Pakistan'ın Faisalabad kentinde gül bitkilerinde yaprak kıvırcıklığı ve aşırı bodurlaşma simptomu gözlemlemişlerdir. Simptomlu bitkileri moleküler yöntemlerden PCR ve döngüsel amplifikasyon (rolling circle amplification, RCA) yöntemlerini kullanarak begomovirüsler için testlemişlerdir. Testlemeler sonucunda diğer begomovirüslerden farklı yeni bir begomovirüsün gül bitkilerini enfekte ettiğini bulmuşlardır. Buldukları virüsü *Rose leaf curl virus* (RoLCuV) olarak adlandırmışlardır. Araştırıcılar bu yeni virüsün *Tomato leaf curl virus* ile %83 oranında benzerlik gösterirken, ilişkili beta satellit, *Digeraarvensis yellow vein betasatellit* (DiAYVB) ile %96 oranında benzerlik gösterdiğini belirtmişlerdir. Virüs için enfeksiyöz klonlar hazırlanarak *Agrobacterium tumefaciens* yoluyla *Nicotiana benthamiana* bitkilerine aşılanmıştır. Tek başına RoLCuV'nin *N. Benthamiana* bitkileri üzerinde herhangi bir düzeyde simptom göstermediği ancak aynı kökenli betasatellit ile inokulasyonu sonucunda enfeksiyon yaptığı ve simptomlar oluşturduğu bildirilmiştir.

He ve diğerleri (2015), Çin'de yabani gül bitkilerinde yaprak küçülmesi ve aşırı sürgün oluşumu ile birlikte ortaya çıkan witches broom veya yaprak rozetleşmesi olarak tanımlanan yeni bir virüs benzeri hastalık karakterize etmişlerdir. Bu hastalık daha sonra geriye doğru ölümle birlikte tüm bitkinin ölmesine yol açmıştır. Araştırıcılar bu hastalığı *Wild rose leaf rosette disease* (WRLRD) olarak adlandırmıştır. Bu hastalığın daha önceden tanımlanan *Rose rosette virus* (RRV)'a benzediğini ve RRV gibi gül fidanlık endüstrisi ve ev bahçelerinde önemli sorunlar oluşturduğunu ve ölümlere neden olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalarda her iki hastalık etmeninin birbirinden farklı olduğunu vurgulamışlardır.

Chakraborty ve diğerleri (2017), Hindistan'ın kuzey doğu bölgesinde yaptıkları bir çalışmada tipik sipmtom gösteren gül bitkilerinden topladıkları 21 örneğin tamamında PCR yöntemi ile RRV' nin tanısını gerçekleştirmişlerdir. Araştırıcılar iki izolatın RNA'ya bağlı RNA polimeraz (RdRp) gen bölgesinin sekans analizini gerçekleştirmişler ve bu bölgenin daha önceden tanımlanan ve gen bankasına yüklenen diğer dünya izolatları ile %95-98 oranında bir benzerliğe sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada RVV' nin Hindistanda ilk rapor edildikten 75 yıl sonra güllerde önemli bir hastalık olarak ortaya çıktığını vurgulamışlardır.

Babu ve diğerleri (2017) tarafından yürütülen bir çalışmada Florida'da RRV'nin

karakteristik simptomlarına sahip 25 gül bitkisi örneği toplamışlardır. Toplanan bitkilerdeki RRV tespiti için birden fazla gen hedefine dayanan izotermal ters transkripsiyon rekombinaz polimeraz amplifikasyonu (RT-RPA) testini kullanmışlardır. Bu yöntemin virüsün güllerin saplarından ve yapraklarından tespit edilebildiğini gösterdiğini belirtmişlerdir. Primer çifti RPA-267, enfekteli yaprak dokularından virüsün %100 pozitif saptanmasını sağlarken, primer RPA-131 çifti sapların ve taç yaprakların % 100 virüs enfeksiyonlu olarak saptandığını belirtmişlerdir. Ayrıca RPA-321 primer çifti kullanılarak yapraklar, taç yapraklar ve gövde dokularında sırasıyla %83, %87.5 ve %75 pozitif tespit edildiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar tarafından bu çalışmanın RRV enfekteli güllerin yeni bir izotermal amplifikasyon tekniği olan RT RPA ile birden fazla gen hedefi kullanılarak tespit edilmesinin ilk raporu olduğunu bildirilmiştir.

Son yıllarda ABD'de güllerde damar sararma hastalığının etmeni olarak Caulimovirüs olan Gül sarı damar virüsü (RYVV) tanımlanmıştır. RYVV'nin, 42-45 nm çapında, Caulimoviridae familyasında karakteristik, kovalent olmayan kapalı bir dsDNA genomu içerdiği belirtilmiştir. Ayrıca RYVV' nin aşılama yoluyla taşınabildiği, ancak yaprak biti veya mekanik yolla taşınmadığı bildirilmiştir. RYVV ile enfekteli gül örneklerinde damar bantlaşması veya merkezi damar klorozunun yaygın bir şekilde görüldüğü belirtilmiştir (Lockhart ve diğerleri, 2011).

Perez-Egusquiza ve diğerleri (2012), Yeni Zelanda'da ilk kez tek bir gül örneğinden RYVV'yi tespit etmişlerdir. Ancak mevcut araştırma sırasında RYVV' nin Yeni Zelanda'nın birçok bölgesinde olduğu doğrulanmıştır. Bu çalışma kapsamında Yeni Zelanda'nın Kuzey Adası' ndaki Wanganui bölgesinden virüs benzeri simptomlar gösteren 10 adet gül örneği almışlar ve 2 örnekte RYVV varlığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar, RYVV'nin hareket proteini (MP) ve kılıf proteini (CP) genlerinin 797 bç ve 684 bç'lik kısmının sekans analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen sekans analiz sonuçlarına göre MP ve CP genleri için sırası ile % 98 ve % 96 oranlarında dünya RYVV izolatları ile benzerlikler gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmayla virüsün Yeni Zelanda'da bir süredir mevcut olduğu ilk kez ortaya konmuştur.

Mollov ve diğerleri (2012), Caulimoviridae familyasının yeni bir üyesi olan RYVV'nin tam nükleotit dizi analizi ve genom organizasyonunun ortaya çıkarılması amacı ile birtakım çalışmalar yürütmüşlerdir. Bu çalışmaya göre RYVV genomunun 9314 bç büyüklüğünde ve sekiz açık okuma bölgesine (open reading frame, ORF) sahip olduğunu bildirmişlerdir. Tanımladıkları ORF'lerden 1, 2 ve 3'ün, Caulimoviridae familyasının bilinen üyeleri ile %22-38 amino asit benzerliğine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Geri

kalan ORF'lerin ise bilinen virüslerle anlamlı bir amino asit dizi benzerliğinin olmadığını ortaya koymuşlardır. Genom organizasyonundaki farklılıklara dayanarak, Caulimoviridae familyasının bilinen üyeleri ile gösterdiği sekans benzerliği ve filogenetik analizlerin sonuçlarına göre RYVV'nin bu familyanın yeni bir üyesi olabileceğini belirtmişlerdir.

Milleza ve diğerleri (2013) tarafından *Rosa* spp.' de hangi virüslerin hastalık yaptığını doğrulamak için Yeni Zelanda'da yürütülen araştırmalar sonucunda bazı virüsler tespit edilmiş ve dağılımlarının derecesi belirlenmiştir. Seksen dokuz gül örneği, Yeni Zelanda'da farklı bölgelerden ve çeşitli kaynaklardan, özel ve kamu bahçeleri, ticari üretim alanları ve doğal çalılıklardan toplanmıştır. Bu örnekler, gülleri enfekte ettiği bilinen 17 virüs için RT-PCR ile test edilmiştir. Test edilen 89 örneğin %48'inin *Rose cryptic virus-1*(RCV-1), %22'sinin PNRSV, %20'sinin *Rose spring dwarf-associated virüs* (RSDaV), %10'unun RYVV, %2'sinin ise ArMV ile enfekte olduğunu saptamışlardır. Ayrıca örneklerin %35'i negatif olarak bulunmuştur. Virüsler bazı örneklerde tek enfeksiyonlar ve bazı örneklerde de karışık enfeksiyonlar (birlikte 2 veya 3 virüs) olarak tespit edilmiştir. Yeni Zelanda'da ilk kez RCV-1 ve RSDaV tespit edilmiştir.

Ülkemizde Gül Virüsleri

Ülkemizde güllerde virüs hastalıklarına yönelik ilk çalışma 1980'li yıllarda yapılmıştır. Çalışma kapsamında Ege Bölgesi seralarında güllerde mozaik simptomları gözlenmiş ve bu simptomların virüslerden kaynaklanabileceği rapor edilmiştir. Ancak bu çalışmada biyolojik ya da serolojik yöntemler kullanılmamıştır (Türkoğlu ve Fidan, 1982).

Çıtır ve Ilbağı (2000), Orta Karadeniz Bölgesi'nde Samsun, Tokat ve Amasya illerinde yapmış oldukları bir çalışmada 16 süs bitkisi türlerinde virüs hastalıklarını belirlemeye çalışmışlardır. Toplam 29 bitkide virüs ve virüs benzeri simptom gözlemlemişler ve ayrıca bu örnekleri biyolojik testlere tabi tutmuşlardır. Çalışma sonucunda gül örneklerinde PNRSV'nin varlığını belirlemişlerdir.

Sipahioğlu ve diğerleri (2001) tarafından yürütülen araştırmalarda ülkemiz Doğu Akdeniz Bölgesi' ndeki Adana ve İçel illerinde 1998–2000 yılları arasında yapılan simptomatolojik gözlemler doğrultusunda gül yapraklarında mozaik ve sarı lekeler, çizgiler, renk kırılması, deformasyon, meşe yaprak deseni gibi virüs simptomları gözlemlenen şüpheli gül bitkilerinden örnekler almışlar ve bu örnekleri PNRSV ve ApMV enfeksiyonunu belirlemek amacıyla ELISA testlerine tabi tutmuşlardır. Bölgedeki farklı alanlarda 45 dekar serada yetiştirilen Sonia, Smith, Athena, Madellon, Tineke, Helmut, Dallas, Jakaranta, Vega, Pareo, Osiana, Starlight çeşitlerinde güllerden toplanan şüpheli 220 örneğin testlenmesi sonucunda 6 adet Tineke, 5 adet Vega, 3 adet Madellon, 1 adet

Pareo ve 1 adet Osiana olmak üzere toplam 16 adet gül örneğinde PNRSV enfeksiyonuna rastlamışlardır. PNRSV ile enfekteli olan gül yapraklarında mozaik ve meşe yaprağı deseni simptomları yaygın olarak gözlemlenmiştir. Hastalık en fazla beyaz güllerde (Tineke) ve kırmızı güllerde (Vega) saptanmıştır. Bunun yanında seçilen örneklerin hiçbirinde ApMV enfeksiyonuna rastlanmamıştır. Bu çalışma ile PNRSV'nin gülde en önemli virüs hastalığı olduğu rapor edilirken bazı ülkelerde güllerde zararlı olan ApMV'nin bölgedeki güllerde bulunmadığı tespit edilmiştir.

Güran (2007), Şanlıurfa ili ve ilçelerinde güllerde PNRSVenfeksiyonunu saptamak amacıyla yaptığı araştırmada 2005 yılı Mayıs ayında virüs hastalığının belirtilerini gösteren 19 örnek toplamıştır. Toplanan örnekler iki farklı tanı yöntemi kullanılarak teste tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre örneklerin %21,05' i ELISA yöntemiyle, %31,57' si ise RT-PCR yöntemi ile pozitif olarak belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmayla güllerde görülen PNRSV bu ilde ilk kez saptanmıştır.

Yardımcı ve Çulal (2009), Göller Yöresi'nde 2006-2007 yılları Nisan-Mayıs aylarında yürüttükleri çalışmada yağlık güllerden tipik virüs ve virüs benzeri belirti gösteren 218 örneği farklı virüsler için DAS-ELISA yöntemini kullanarak testlemişlerdir. Test edilen örneklerin %51.8' i ArMV, %35.7' si PNRSV ve %17.8' i ApMV ile enfekteli oldukları belirlenmiştir. Ayrıca PNRSV + ApMV ve ArMV + PNRSV + ApMV ve ArMV + PNRSV, ArMV + ApMV' nin karışık enfeksiyonları da test edilen gül örneklerindetespit edilmiştir. ArMV' nin yağ gülü çeşitlerinde en yaygın virüs olduğu bu çalışmayla ortaya konmuştur. Aynı zamanda bu çalışma ApMV 'nin ülkemizde yağlık güllerde görülme sıklığına ilişkin ilk çalışma olmuştur.

Akpınar (2009), yaptığı bir çalışmada Edirne, İstanbul, Tekirdağ ve Kırklareli'ye bağlı 18 ilçeden karakteristik hastalık belirtilerini gözlemlediği güllerden toplam 287 yaprak örneği toplamıştır. Toplanan yaprak örneklerine DAS-ELISA serolojik testi uygulayarak bu örneklerde ApMV, SLRSV, PNRSV'lerin varlığını saptamaya çalışmıştır. Testlemeler sonucunda 18 adet yaprak örneğinde ApMV, 17 adet yaprak örneğinde ise PNRSV saptanmıştır. Tespit edilen bu virüslerin *Cucumis sativus, Chenopodium quinoa* ve *C. amaranticolor* indikatör bitkilerine mekanik inokulasyonu gerçekleştirilmiş fakat biyolojik olarak doğrulanamamıştır.

Yardımcı ve Kılıç (2010), Isparta'da yağ gülü üretimi yapılan alanlarda yaptıkları sörvey çalışmasında bitkilerde genel bodurlaşma, genellikle genç yapraklarda ortaya çıkan sarı renkte beneklenmeler, yaprak ayasında küçülme, klorotik ve halkalı lekeler gibi simptomlar gösteren ve SLRSV enfeksiyonu şüphesini uyandıran 142 yaprak örneği

toplamışlardır. Alınan bu örnekleri DAS-ELISA yöntemini kullanarak test etmişlerdir. Testlemeler sonucunda 36 örneğin SLRSV ile enfekte olduğunu saptamışlardır. Örneklerde SLRSV enfeksiyonu %25.4 oranında bulunmuştur. Mekanik inokulasyon çalışmalarında virüsün *C. amaranticolor'* da sistemik kloroz meydana getirdiği görülmüştür.

Kibar (2014) tarafından yürütülen çalşmada Yalova ilinde 11 farklı örtüaltı üretim alanında, mozaik, sistemik, sararma, klorotik ve nekrotik lekelerle çiçeklerde ve yapraklarda deformasyonlar sergileyen *Anthurium andreanum*, bazı gül, orkide ve gerbera bitkilerinden toplamda 150 adet yaprak toplamıştır. Bu örnekler *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Cucumber mosaic virus* (CMV) ve *Dasheen mosaic virus* (DsMV) virüsleri için DAS-ELISA yöntemi ile test edilmiştir. Testlemeler sonucunda 2 adet *A.andreanum* (Flamingo çiçeği) ve 2 adet orkide (*Cymbidium* spp.) bitkisinde DsMV hastalığını saptamıştır. Türkiye'de ilk defa DsMV bu çalışma ile rapor edilmiştir.

Kılıç ve diğerleri (2017), Burdur ilindeki yağlık gül üretim alanlarında yaptıkları çalışmada virüs benzeri simptom gösteren 102 bitki yaprağını PNRSV için DAS-ELISA ile test etmişlerdir. Araştırma sonucunda 102 örneğin 16'sı (%16) PNRSV ile enfekteli olduğu ortaya konmuştur.

RYVV ülkemizde ilk olarak Karanfil ve diğerleri (2018) tarafından rapor edilmiştir. Araştırıcılar Çanakkale ve Ankara illerinde RYVV simptomlarına benzer belirtiler gösteren gül bitkilerinden 26 örnek toplamışlardır. Toplanan örnekleri PCR ile testlemişlerdir. Testlemeler sonucunda 15 bitkide örnek RYVV enfeksiyonunu tespit etmişlerdir. Etmenin genetik çeşitliliğinin belirlenmesi amacı ile yapmış oldukları çalışmalar sonucunda Türk RYVV izolatının dünya izolatları ile arasında sırası ile % 96-97 ve % 97-98 oranlarında benzerlik gösterdiğini saptamışlardır.

Bu tez çalışmasında, Çanakkale ilinde gül yetişen alanlarda bir arazi çalışması yürütülerek RYVV varlığı araştırılmış olup, etmenin iki farklı gen bölgesine göre moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilerek, etmenin ülkemizdeki enfeksiyonu daha ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmiştir.

BÖLÜM 3
MATERYAL VE YÖNTEM

Bu tezde yürütülen çalışmalar temel olarak 4 aşamada gerçekleştirilmiştir. Öncelikle Çanakkale ili ve ilçelerindeki park ve bahçe gibi alanlarda bulunan güllerden, virüs ve virüse benzer belirtiler gösteren bitkilerden örnek toplanarak laboratuara getirilmiştir. İkinci aşamada alınan örneklerdeki *Rose yellow vein virus* (RYVV)'ün enfeksiyonunun belirlenmesi amacı ile örnekler PCR ile test edilmiştir. PCR testleri sonuçlarına göre RYVV ile enfekteli olduğu tespit edilen örnekler, sonrasında ileri analizler yapmak için bir kısmı silika jel içerisinde 4°C'de, kalan kısım ise -80°C'de saklanmıştır. Üçüncü aşama olan moleküler karakterizasyon çalışmalarında PCR testi sonucu pozitif çıkan örnekler içerisinden bir izolat seçilerek, ilgilenilen hareket proteini, (Movement Protein, MP) ve kılıf proteini, (Coat Protein, CP) gen bölgeleri PCR ile amplifiye edilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri kullanılarak seçilen izolata ait amplifiye edilmiş olan MP ve CP genlerinin nükleotid dizilimleri hizmet alımı ile belirlenmiştir. Son aşamada ise elde edilen RYVV MP ve CP genlerine ait nükleotit dizilimleri kullanılarak, amino asit dizilimleri çıkarılmıştır. Elde edilen bu diziler kullanılarak dünya RYVV izolatları ile Çanakkale RYVV izolatının moleküler ilişkileri ortaya konmuştur.

3.1. Arazi Çalışmaları

Arazi çalışmaları 2018-2019 yılları ilkbahar ve yaz aylarında Çanakkale ili ve ilçelerinde gül bitkilerinin bulunduğu park, bahçe gibi rekreasyon alanlarında yürütülmüştür. Bu alanlarda yetiştirilen gül bitkileri görsel olarak incelenmiş RYVV'nin oluşturduğu simptomlara benzer simptom gösteren bitkilerden örnek alınmıştır (Şekil 2). Örnekleme yapılan alanlar tamamen tesadüfi olarak seçilmiştir. Yapılan arazi çıkışları sonucunda 71 örnek toplanmıştır. Toplanan örnekler laboratuvara soğuk zincirde muhafaza edilerek getirilmiş ve bir sonraki aşama uygulanmasına kadar silika jel içinde buzdolabında bekletilmiştir.



Şekil 2. Arazi çalışmalarında simptom gösteren örneklerin toplanması (A: Sarı damar belirtileri görülen örnek, B: Yapraklarda sararma görülen örnek)

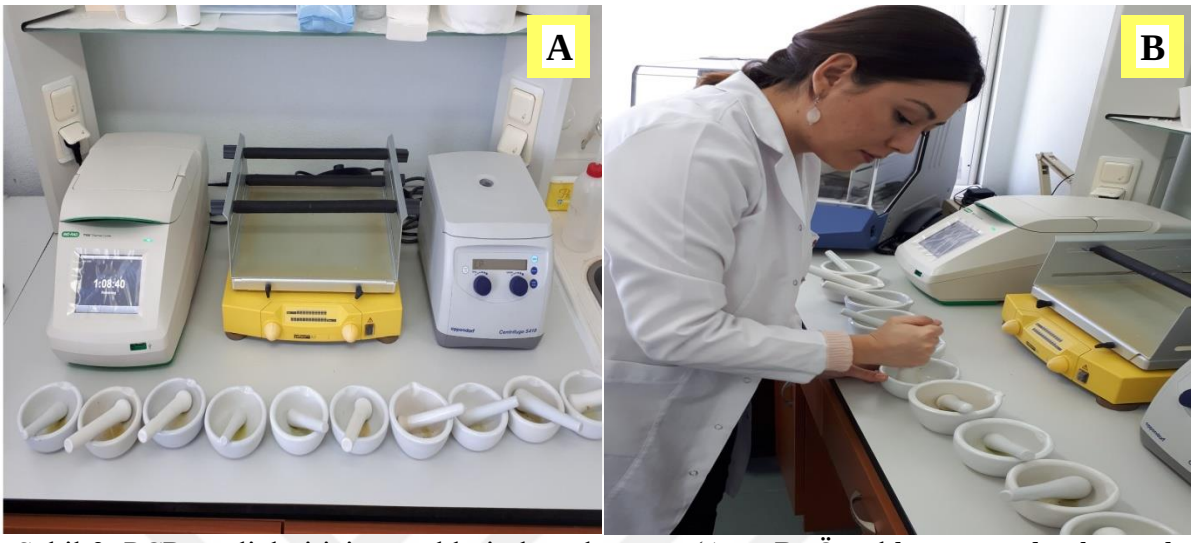
3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri

Toplanan örneklerdeki RYVV enfeksiyonunu tespit etmek amacı ile gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction, PCR) çalışmalarına total DNA izolasyonu ile başlanmıştır. Total DNA izolasyonunu takiben gen spesifik primer çifti ile PCR testleri gerçekleştirilerek RYVV enfeksiyonu araştırılmıştır.

3.2.1. Total DNA İzolasyonu

Toplanan örneklerden total DNA izolasyonu cetyltrimethyl-ammoniumbromide (CTAB) metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Li ve diğerleri, 2008). CTAB yöntemi ile total DNA izolasyonuna öncelikle seçilen örneklerden 100 mg alınıp, 1 ml CTAB buffer ve 20 µl DDT ile birlikte her bir örnek ayrı porselen havan içerisinde olacak şekilde ezilmesi ile başlanmıştır (Şekil 3). Ezilen bitki örnekleri ile izolasyon solüsyonunu içeren karışım steril eppendorf tüplere aktarılarak 1 dk. vortekslendikten sonra -20°C'de yaklaşık 30 dk. bekletilmiştir. Örnekler -20ºC'de bekletildikten sonra çözülmesi için tekrar 1 dk. vortekslenmiştir. Daha sonra 65ºC'de 15 dk. inkübe edilmiş ve inkübasyon süresince her 5 dakikada bir örnekler alt üst edilmiştir. 10.000 rpm'de 5 dk. santrifüj yapıldıktan sonra üstteki sıvı kısımdan 500µl alınarak yeni steril eppendorf tüplere aktarılmıştır. Ardından üzerlerine eşit hacimde 24:1 oranında hazırlanmış olan kloroform:isoamilalkol eklenerek tüpler alt üst edilmiştir. 14.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildikten sonra örneklerden 250µl supernatant alınarak yeni tüpe aktarılmıştır ve üzerine 175µl isopropanol eklenmiştir. Tekrar 14.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Tüplerdeki üst sıvı kısım dökülerek dipteki pellet %70'lik alkol ile yıkanmıştır. 14.000 rpm'de 5 dk. tekrar santrifüj yapıldıktan sonra üstteki sıvı kısım dökülerek tüpler kuruması için bir süre oda sıcaklığında

bırakılmıştır. Son olarak pellet 50µl 20mM Tris-HCL (pH:8) solüsyonunda çözdürülmüştür. Total DNA'lar kullanılıncaya kadar -80ºC'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Total DNA izolasyonunu takiben PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. PCR analizleri için örneklerin hazırlanması (A ve B: Örneklerin porselen havanda ezilmesi

3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Aşaması

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), DNA (deoksiribonükleik asit) dizilerinin laboratuar koşullarında çoğaltılması esasına dayanan moleküler bir tanı yöntemidir. PCR basit bir yöntem olmakla birlikte aynı zamanda duyarlı ve spesifik bir yöntemdir (Saiki ve diğerleri, 1985; Mullis, 1990).

Bu teknik, temelde 3 aşamada gerçekleşmektedir. Öncelikle DNA zincirinin ikiye ayrılarak açılması anlamına gelen denatürasyon aşamasında, kalıp DNA 92-95ºC'de 1-2 dk. tutularak yüksek sıcaklık etkisiyle çift sarmal yapıda olan DNA iplikçikleri ikiye ayrılmaktadır (Watson ve diğerleri, 1992; Hadidi ve diğerleri, 1995).DNA zincirleri açıldıktan sonra bu zincirlere primerlerin bağlanmasının gerçekleştiği ikinci aşamada (annealing), reaksiyonun sıcaklığının 37-65ºC' ye düşürülmesi sayesinde oligonükleotid primerlerin açılan DNA zincirlerindeki kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgelere bağlanması olayıdır. Bu bağlanma işlemi, üretilecek olan bazların uzunluğuna bağlı olarak 30-60 sn'de gerçekleşmektedir (Innis ve Gelfand 1990). Primerlerin uzaması yani extension aşamasında ise primerlerin DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polymerase) aracılığıyla uzatılması sağlanmaktadır. Taq-DNA polimeraz enzimi en aktif 72ºC sıcaklıkta çalışmaktadır. Bu nedenle genelde bütün çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır (Erlich ve diğerleri, 1991). Üç aşamadan oluşan bu işlemler, bir PCR döngüsünü temsil

etmektedir. Bu döngü, genel olarak 35 ile 40 defa tekrar edilerek başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçacığı çoğaltılmaktadır.

Bu çalışma kapsamında PCR analizleri alınan örneklerdeki RYVV enfeksiyonunu belirlemek amacı ile -80ºC' de saklanan total DNA'lar kullanılarak yapılmıştır. Toplanan örneklerdeki RYVV varlığı Karanfil ve diğerleri (2018)' nin belirttiği primer çifti (Tablo 3) ve PCR kitinin sağlandığı firmanın önerileri doğrultusunda (Takara, Japonya) PCR cihazında (Bio-Rad, ABD) gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak PCR karışımı hazırlanmıştır (Tablo 4). Karışıma 7,5µl PCR master mix, 0.75µl primer karışımı, 1µl DNA ve 5,75µl su eklenerek karışım toplamda 15µl olacak şekilde PCR tüplerinde hazırlanmıştır. Hazırlanan PCR reaksiyon tüpleri 94ºC' de 5 dk., 39 defa tekrarlanan 94ºC' de 30 sn., 55ºC' de 20 sn. ve 72ºC' de 45 sn., 72ºC' de 5 dk., daha sonra ise 12ºC' de bekleyecek şekilde programlanan PCR cihazına konularak (Şekil 4) PCR aşaması gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3
Rose yellow vein virus enfeksiyonunun belirlenmesinde kullanılan primer çifti

Kod	**Primer Dizisi (5'-3')**	**Yönü**	**Ürün**	**Referans**
RYVV-F1	CGAGATTAACGAAATGGAC	İleri	766 bç	Karanfil ve diğerleri (2018)
RYVV-R1	CGTACTCTTTCTTGGCTT	Geri		

Tablo 4
PCR ürünleri ve hacimleri

Bileşenler	**Hacim**
Master mix	7,5 µl
Primer karışımı (ileri ve geri)	0,75 µl
DNA	1 µl
H_2O	6,75 µl
Toplam Hacim	15 µl

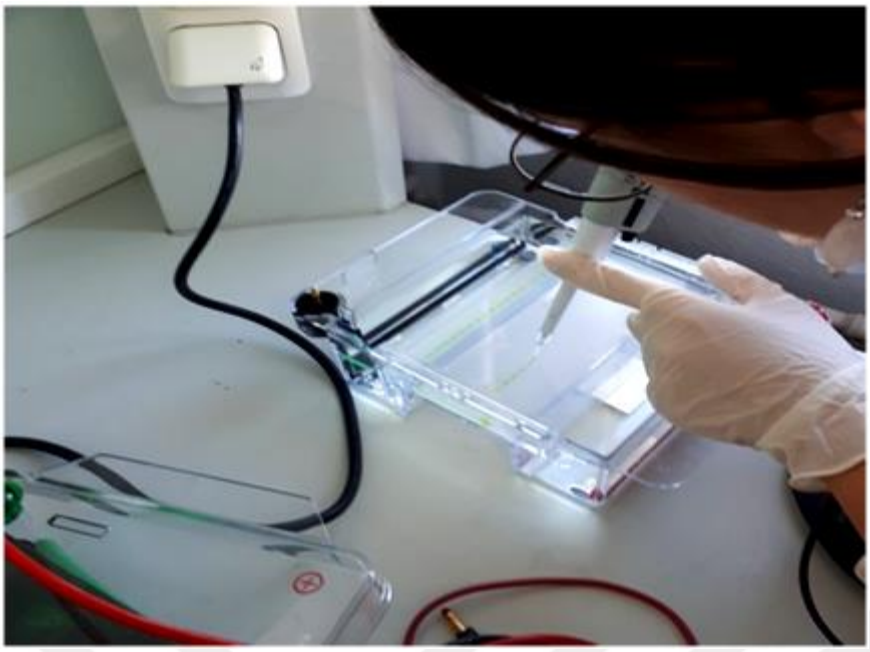


Şekil 4. Polimeraz zincir reaksiyonu analizlerinin gerçekleştirildiği thermal-cycler cihazı ve ayarlanan PCR döngüsü

3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR aşamasından sonra elde edilen DNA fragmentlerinin analizinde %1'lik agaroz jel kullanılmıştır. 100 ml hacimde 1X TAE (Tris-Asetat -EDTA) tamponu içine 1g agaroz eklenerek karışım mikrodalga fırında 3 dk. bırakılarak karışım elde edilmiştir. Elde edilen karışımın soğumasına yakın Etidyum Bromür eklenmiştir. Taraklar elektroforez tabağına yerleştirilerek jel yavaşça dökülmüştür. Kabarcık kalmamasına dikkat edilerek agorozun polimerizasyonu için 30 dk. süre ile beklenilmiştir. Jelin polimerizasyonundan sonra taraklar yavaş ve dikkatli bir şekilde çıkartılmıştır. Jel elektroforez tankına yerleştirilmiş ve 1X TAE tampon çözeltisi jeli 1-2 mm geçecek şekilde ilave edilmiştir.

Jeldeki ilk kuyucuğa bantların moleküler büyüklüğünü saptamak amacıyla marker (100-5000 bç DNA, BioBasic), negatif kontrol ve bir örnekte de su yüklenmiştir. PCR ürünleri ise 10µl alınarak 2µl yükleme tamponu (6X DNA Loading dye) ile karıştırılıp diğer kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez koşumu, yatay düzenekte 45 dk. süreyle 100 V'da ve 1X TAE çözeltisi içerisinde yapılmıştır (Şekil 5). Elektroforez aşamasından sonra boyanmış olan jelin çıkan bantları UV ışık altında gözlenmiş ve Major Science UVDI jel görüntüleme cihazında virüse ait bantlar fotoğraflanmıştır.



Şekil 5. Polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerinin jele yüklenmesi

3.3. Moleküler Karakterizasyon Çalışmaları

RYVV ile enfekteli olduğu belirlenen bir izolatın CP ve MP gen bölgeleri PCR cihazında ÇOMÜ, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Bitki Virolojisi laboratuarında yürütülen FBA-2019-2891 numaralı proje kapsamında tasarlanan gen spesifik primer çiftleri ile amplifiye edilmiştir (Tablo 5).

Tablo 5
Rose yellow vein virus için amplifiye edilen gen spesifik primer çiftleri listesi

Virüs	Lokus	Dizi	Ürün	Uzunluk
RYVV	RYVV _F2 (1088, 1105)	GGATGACAGAAGGAAAGG	1508	18
	RYVV _R2 (2578, 2595)	GGCAGTATTAGGGAGAGA		18
	RYVV _F3 (2325, 2341)	TAACGAAATGGACACCT	1481	17
	RYVV _R3 (3789, 3805)	TTGTTTATGGGCTCTGT		17

PCR ile çoğaltılan RYVV CP ve MP genlerine ait PCR ürünlerinin saflaştırma işlemi EZ Column PCR pürifikasyon kiti (BioBasic, Kanada) kullanılarak üretici firmanın önerileri yönünde gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri sekansa gönderilinceye kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Gerçekleştirilen sekanslama işlemi ile birlikte RYVV izolatının DNA baz dizilimleri hizmet alımı ile çift yönlü olarak belirlenmiştir. Elde edilmiş olan çift yönlü DNA dizileri birleştirilerek, bu dizilerin kodladığı amino asit içerikleri belirlenmiştir.

3.4. Dizi Analizleri ve Filogenetik Soyağaçlarının Oluşturulması

RYVV CP ve MP genlerinin DNA dizilimleri, daha önceki çalışmalarla dizilimi

belirlenerek gen bankasına kaydedilmiş olan, dünyadaki farklı bölgelerden elde edilmiş RYVV izolatlarının CP ve MP genlerinin DNA dizileriyle bir araya getirilmiştir. Daha sonra DNA dizileri CLC Main Work Bench V.7.9.1 programında Clustal W kullanılarak nükleotid ve amino asit düzeyinde karşılaştırılmıştır. Ayrıca dünya izolatları ile benzerlikleri ortaya konmuştur.

Çalışmada 8'i dünyanın farklı yerlerine ait ve 1'i Çanakkale'den olmak üzere toplamda 9 izolat arasında incelemeler yapılmıştır. Çanakkale izolatı için CNK ön eki kullanılarak adlandırılmıştır. Dünyanın farklı yerlerinden alınan RYVV izolatlarına ise gen bankası veri tabanında kayıtlı bulunan erişim numaraları ile ulaşılmıştır. Çalışmada kullanılan dünya izolatlarına ait gen bankası erişim numaraları ve elde edildiği ülke (orijin) bilgileri Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6
Dünyanın diğer bölgelerindeki *Rose yellow vein virus* izolatlarının numaraları ve orijinleri (Numaralar izolatların NCBI veri tabanındaki erişim numaralarıdır.)

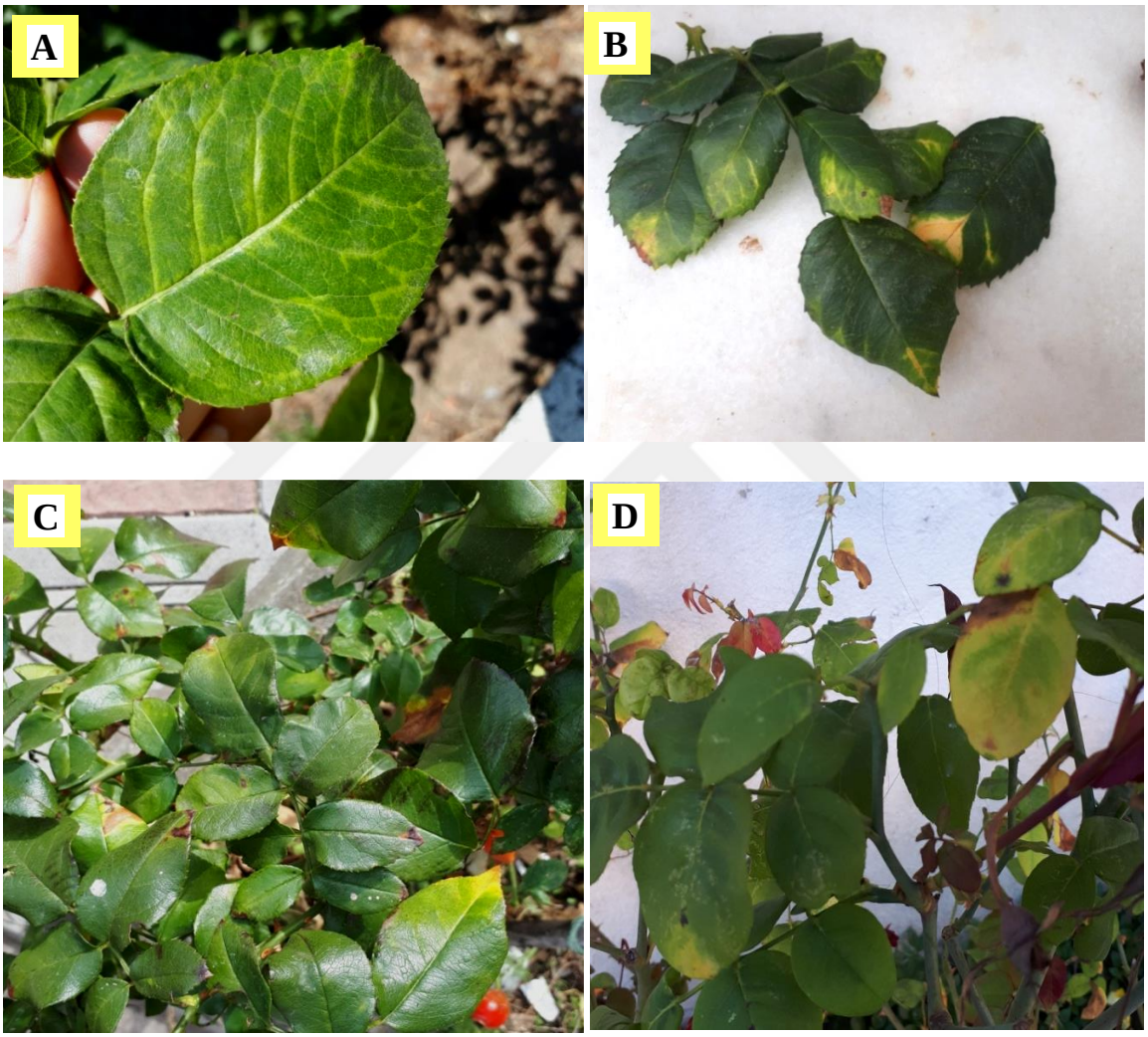
İzolat Numaraları	**Elde Edildiği Ülke**
JX887423	YeniZelanda
JX430789	YeniZelanda
JX887424	YeniZelanda
JX430788	YeniZelanda
JX028536	ABD
JX887426	YeniZelanda
JX887425	YeniZelanda
MH395928	Türkiye

Filogenetik ilişkileri belirlemek amacıyla Neighbor-joining yöntemi kullanılarak filogenetik soy ağaçları oluşturulmuştur. Bununla birlikte soyağacının doğruluğunun istatistiksel olarak belirlenmesi maksadıyla 1000 tekerrürlü bootstrap analizi yapılmış ve Çanakkale RYVV izolatının diğer izolatlarla filogenetik ilişkileri ortaya konmuştur.

BÖLÜM 4
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Arazi Çalışmaları

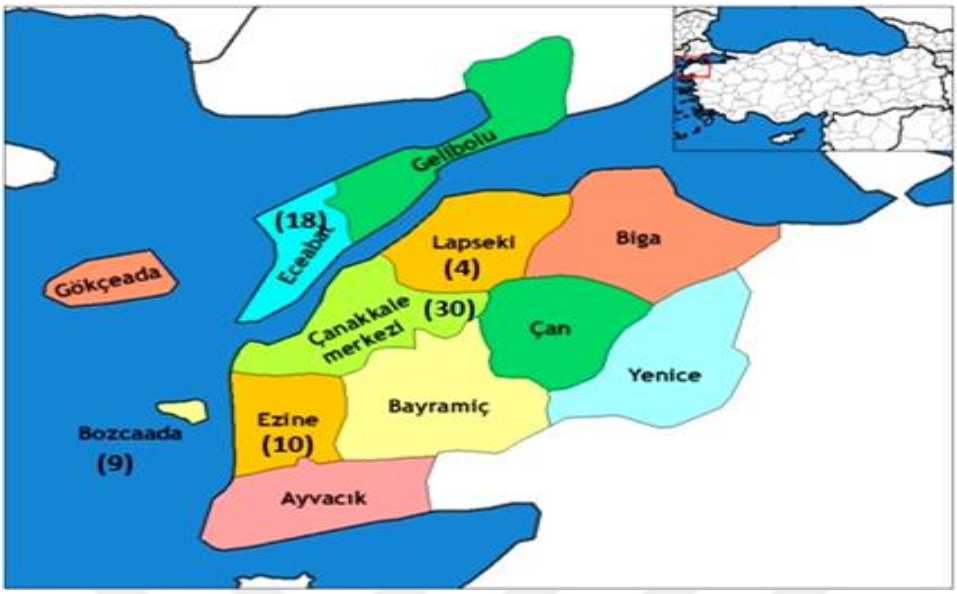
Arazi çalışmaları Çanakkale'de 2018-2019 bahar sezonlarında gerçekleştirilmiştir. Arazi çıkışı yapılan alanlar rastgele seçilmiş ve bitkiler görsel olarak incelenerek bunlardan RYVV benzeri simptom gösteren güllerden örnekler alınmıştır. Örnekleme yapılan simptomlu bitkiler Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6. Arazide *Rose yellow vein virus* benzeri simptom gösteren ve örnekleme yapılan bazı gül yaprakları (A: Damarlarda renk açılması; B: Yaprak uçlrındaki damarlarda sararma; C: Yapraklarda renk değişimi; D: Damarlarda ve yapraklarda sararma)

Yapılan arazi çalışmaları sonucunda toplamda 71 örnek toplanmıştır (Tablo 7). Örneklemeler Çanakkale Merkez, Eceabat, Lapseki, Ezine ve Bozcaada ilçelerindeki park ve bahçelerden RYVV benzeri simptom gösteren gül yapraklarından yapılmıştır. Çalışma kapsamında Çanakkale Merkez'den 30, Eceabat'tan 18, Lapseki'den 4, Ezine'den 10,

Bozcaada' dan 9 örnek alınmıştır (Şekil 7). Alınan örnekler PCR ile testlenmek üzere laboratuara getirilmiştir.



Şekil 7. Arazi çalışmalarının gerçekleştirildiği Çanakkale ilçeleri (Parantez içindeki rakamlar toplanan örnek sayılarını göstermektedir)

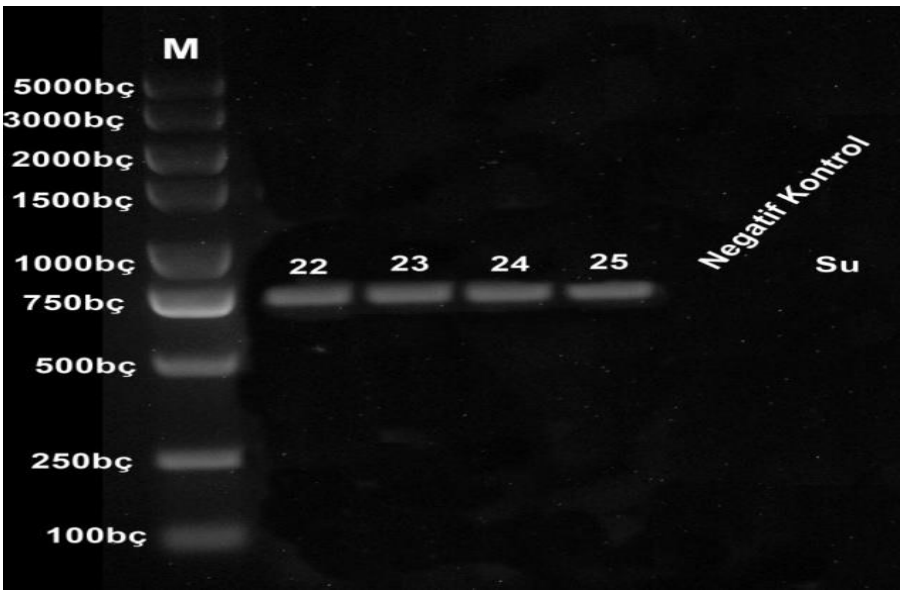
Tablo 7.
Tez çalışmasında kullanılan Çanakkale'den alınan örneklere ait bilgiler

Örnek Sayısı	İzolasyon No	Orijin (Çanakkale)	Sonuç		Örnek Sayısı	İzolasyon No	Orijin (Çanakkale)	Sonuç
1	5	Merkez	-		37	41	Merkez	+
2	6	Eceabat	-		38	42	Merkez	-
3	7	Eceabat	-		39	43	Merkez	-
4	8	Eceabat	-		40	44	Merkez	-
5	9	Eceabat	-		41	45	Ezine	-
6	10	Eceabat	-		42	46	Ezine	+
7	11	Eceabat	+		43	47	Bozcaada	-
8	12	Eceabat	+		44	48	Bozcaada	-
9	13	Eceabat	-		45	49	Bozcaada	-
10	14	Eceabat	+		46	50	Bozcaada	-
11	15	Eceabat	+		47	51	Ezine	+
12	16	Eceabat	-		48	52	Eceabat	-
13	17	Eceabat	+		49	53	Merkez	-
14	18	Merkez	+		50	54	Merkez	-
15	19	Merkez	-		51	55	Merkez	+
16	20	Lapseki	-		52	56	Merkez	-
17	21	Merkez	-		53	57	Merkez	-
18	22	Merkez	+		54	58	Ezine	-

19	23	Merkez	+	55	59	Ezine	+
20	24	Merkez	-	56	60	Merkez	-
21	25	Merkez	-	57	61	Bozcaada	-
22	26	Merkez	+	58	62	Bozcaada	-
23	27	Merkez	+	59	63	Bozcaada	-
24	28	Lapseki	+	60	64	Bozcaada	-
25	29	Lapseki	+	61	65	Bozcaada	-
26	30	Merkez	-	62	66	Ezine	-
27	31	Merkez	-	63	67	Ezine	-
28	32	Merkez	-	64	68	Ezine	-
29	33	Merkez	-	65	69	Eceabat	-
30	34	Merkez	-	66	70	Eceabat	-
31	35	Merkez	-	67	71	Eceabat	-
32	36	Ezine	-	68	72	Eceabat	-
33	37	Ezine	-	69	73	Eceabat	-
34	38	Merkez	-	70	74	Merkez	-
35	39	Lapseki	+	71	75	Merkez	-
36	40	Merkez	+				

4.2. PCR Analizleri ile Virüs Tanılama Çalışmaları

Yapılan PCR testleri sonucunda 71 örneğin 19'u RYVV ile enfekteli olarak bulunmuştur. PCR çalışmalarında enfekteli bulunan örnekler virüse özgü 766 bç büyüklüğünde bant oluşturmuştur. Negatif kontrol ve su örneğinde ise herhangi bir bant oluşmamıştır (Şekil 8).



Şekil 8. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmesi sonucunda oluşan bant görüntüleri. (M: Marker; 22, 23, 24, 25: *Rose yellow vein virus* ile enfekteli izolatlara

ait numaralar)

Virüs tanılama çalışmalarında herhangi bir zorlukla karşılaşılmamış, enfekteli örneklerde istenen büyüklük ve parlaklıkta bandlar elde edilmiştir. PCR virüslerin tanısında yaygın olarak ve başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Duyarlılığı çok yüksek olup, kısa sürede sonuç alınmaktadır. Karanfil ve diğerleri (2018) yaptıkları bir ön çalışmada Çanakkale ve Ankara illerinden topladıkları gül örneklerini RYVV için PCR ile testelemişler ve testlemeler sonucunda etmenin varlığını belirlemişlerdir. Bu çalışma RYVV için ülkemizde ilk kayıt olarak rapor edilmiştir.

Çalışma kapsamında Merkez ilçeden toplanan 30 örneğin 8'i, Eceabat'tan toplanan 18 örneğin 5'i, Lapseki'den toplanan 4 örneğin 3'ü ve Ezine'den toplanan 10 örneğin 3'ü RYVV ile enfekteli olarak bulunmuştur. Bozcaada'dan toplanan 9 örneğin hiçbirinde RYVV bulunamamıştır. Toplanan örneklerde ilçe bazında en yüksek enfeksiyon oranı %75,0 ile Lapseki'den elde edilirken bunu %30.0 ile Ezine, %27,7 ile Eceabat ve %26,6 ile Merkez ilçe izlemiştir. Toplamda enfeksiyon oranı %26,8 olmuştur (Tablo 8).

Tablo 8
Çanakkale ili ve ilçelerinden alınan örnek sayıları, enfekteli örnek sayıları ve enfeksiyon oranları

Örnek alınan ilçeler	**Enfekteli örnek sayısı / Alınan örnek sayısı**	**Toplanan örneklerdeki etnfeksiyon oranı (%)**
Merkez	8/30	26,6
Eceabat	5/18	27,7
Lapseki	3/ 4	75,0
Ezine	3 /10	30,0
Bozcaada	0/9	0
Toplam	**19/71**	**26,8**

Arazi çalışmaları kapsamında güllerde yapraklarda çizgili lekeler, rozetleşme, solgunluk, halkalı lekeler, yaprak kıvırcıklığı, cücelik, çiçeklerde ise renk açılmaları ve şekil bozukluklarına benzer belirtiler gözlenmiştir. Örnekleme yapılırken tüm yapraklar fotoğraflanmış ve simptom belirtileri not edilmiştir. PCR çalışmaları sonucunda yapraklarda tipik simptom gösteren gül bitkileri RYVV ile enfekteli olarak bulunmuştur (Şekil 9). Toplanan örnekler içerisinden RYVV benzeri simptom gösteren ancak enfekteli bulunmayan örneklerin büyük olasılıkla başka virüs ya da virüslerle enfekteli olduğu

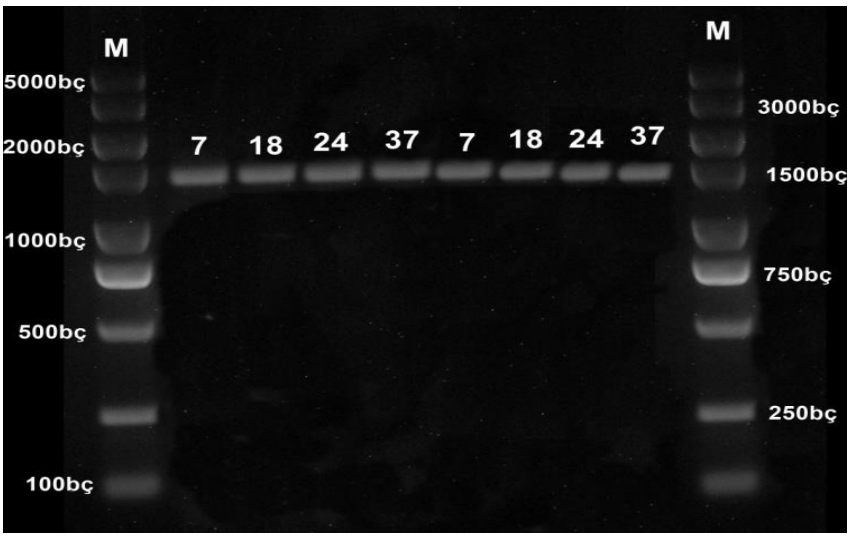
düşünülmekedir. Nitekim Horst ve Cloyd (2007), çalışmalarında güllerde görülen 11 farklı virüs hastalığını tanımlamışlardır. Bunlar arasında en yaygın olanlarını ApMV, PNRSV ve ArMV olarak belirtmişlerdir. Bununla birlikte güllerde cüceliğe, şekil bozukluklarına ve köşeli sarı yaprak lekelerine neden olan SLRSV'yi ise bir başka virüs hastalığı olarak rapor etmişlerdir.



Şekil 9. *Rose yellow vein virus* ile enfekteli olduğu tespit edilen gül bitkisi

4.3. Moleküler Karakterizasyon Çalışmaları

Moleküler karakterizasyon çalışmaları için RYVV ile enfekteli olduğu bulunan 4'er örnek RYVV'nin CP ve MP gen bölgelerine spesifik primer çiftleri ile amplifiye edilmiştir (Şekil 10). CP ve MP gen bölgeleri PCR ile amplifiye edilen izolatlardan bir tanesi seçilerek sekans analizi çift yönlü olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 10. Moleküler karakterizasyon için kullanılan izolatların oluşturduğu bant görüntüleri (M:Marker; 7, 18, 24, 37 *Rose yellow vein virus* enfekteli izolatlar

RYVV CP ve MP gen bölgesi amplifiye edilerek sahip olduğu sekans dizilimleri belirlenen RYVV-CNK (18 numaralı izolat) izolatının nükleotit dizilimleri kullanılarak kodladıkları amino asit dizimleri de belirlenmiştir. Elde edilen bu nükleotid ve amino asit dizilimleri benzerlik ve filogenetik analizlerde kullanılmıştır.

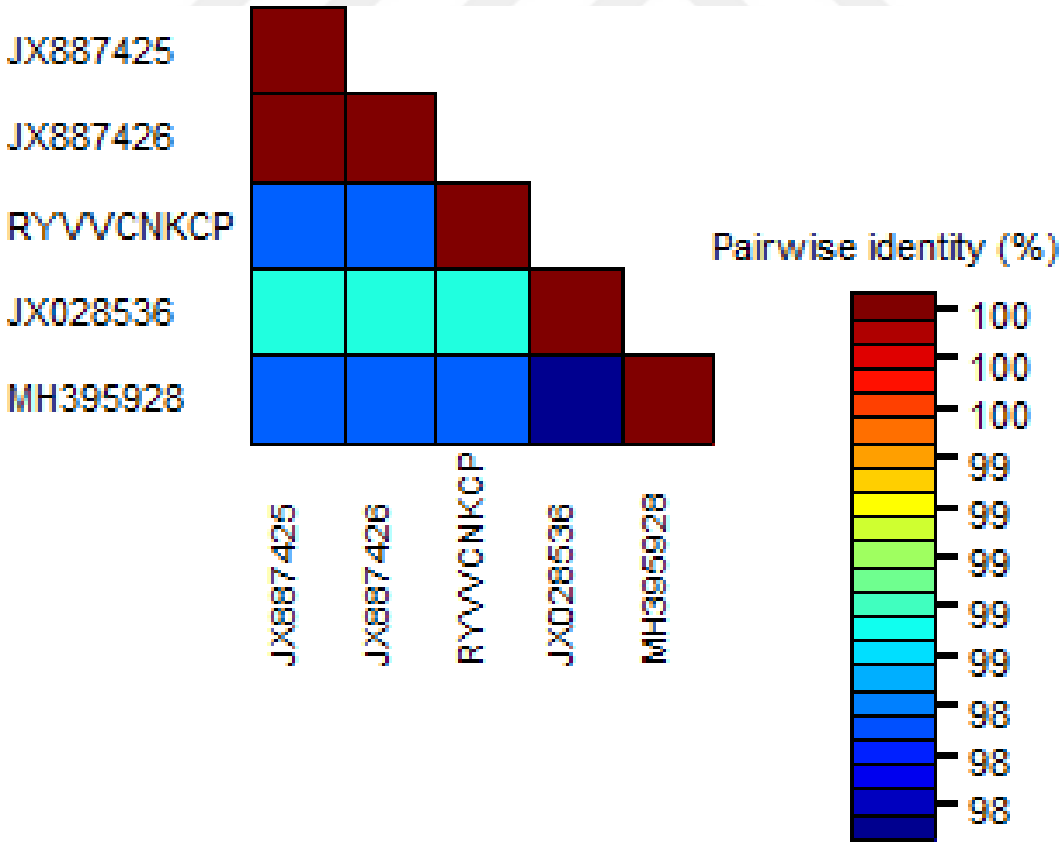
4.4. Dizi Analizleri ve Filogenetik Soy Ağaçlarının Oluşturulması

Gen bankası veri tabanlarında dünyanın farklı üretim bölgelerinden elde edilen sınırlı sayıda RYVV izolatının CP ve MP genlerini içeren bölgelerinin dizilimi bulunmaktadır. Gen bankasında bulunan bu genlerin nükleotid ve amino asit dizilimleri alınarak Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen RYVV izolatı CP ve MP genlerinin nükleotid ve amino asit dizilimleri ile karşılaştırarak RYVV-CNK izolatının diğer uluslararası izolatlar ile gösterdiği benzerlik oranları ve filogenetik ilişkileri belirlenmiştir.

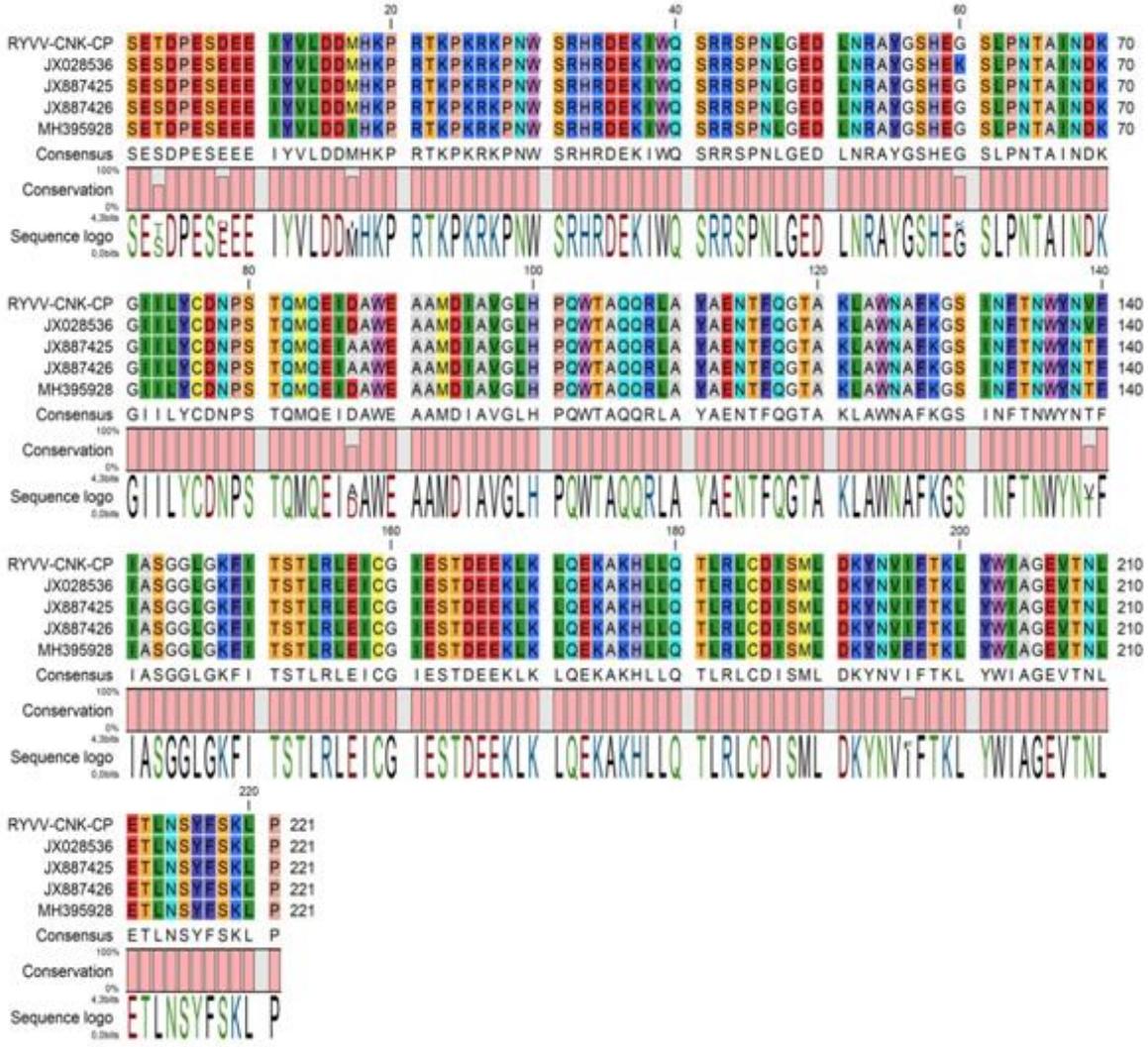
4.4.1. Amino Asit Dizi Analizleri

Kılıf Protein Geni

Amino asit temelli benzerlik dizi analizlerinde RYVV-CNK izolatının CP geni amino asit benzerlikleri incelendiğinde en yüksek benzerliği %99 oranla JX028536 numaralı Amerikan izolatı ile göstermiştir (Şekil 11 ve 12).



Şekil 11. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatı ile dünyadaki RYVV izolatlarının kılıf protein amino asit dizilerinin benzerlik oranları



Şekil 12. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatı ile dünyadaki RYVV izolatlarının kılıf protein amino asit dizilerinin hizalanması

Benzer bir çalışma da Karanfil ve diğerleri (2018), tarafından ülkemizde gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre amino asit dizilerinin karşılaştırılmasıyla Türk RYVV izolatı ile dünya RYVV izolatları arasında %97-98 oranında benzerlik olduğunu belirtmişlerdir.

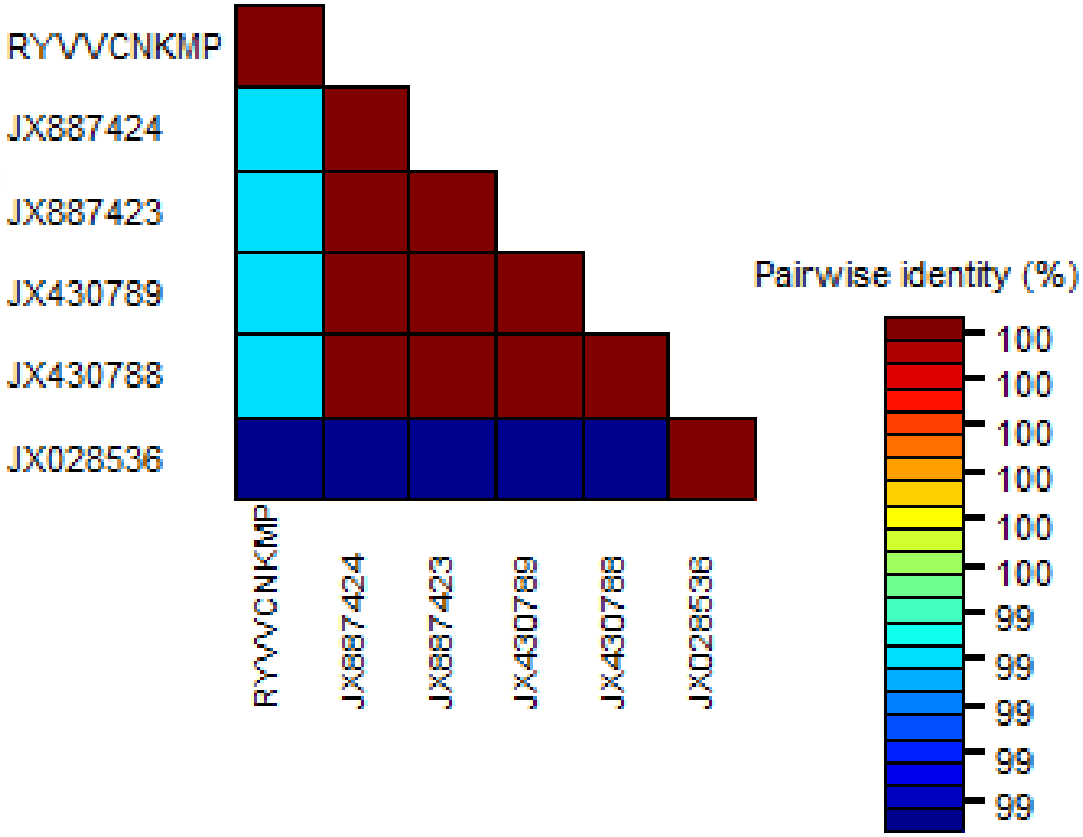
Perez Egusquiza ve diğerleri (2012) tarafından Yeni Zelanda'da gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise Yeni Zelenda RYVV izolatı CP geninin %96 oranlarında benzerlikler gösterdiğini tespit etmişlerlerdir. Her iki çalışmada elde edilen sonuçlar ile bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar birbirini destekler niteliktedir.

RYVV ile aynı familyada yer alan bir başka virüs ise *Fig badnavirus-1* (FBV-1)'dir. FBV-1 üzerinde gerçekleştirilen dizi analizi çalışmalarında İran'da yürütülen bir çalışmada FBV-1 izolatlarının (KM610208 ve KM610209), dünya izolatları ile nükleotid ve amino

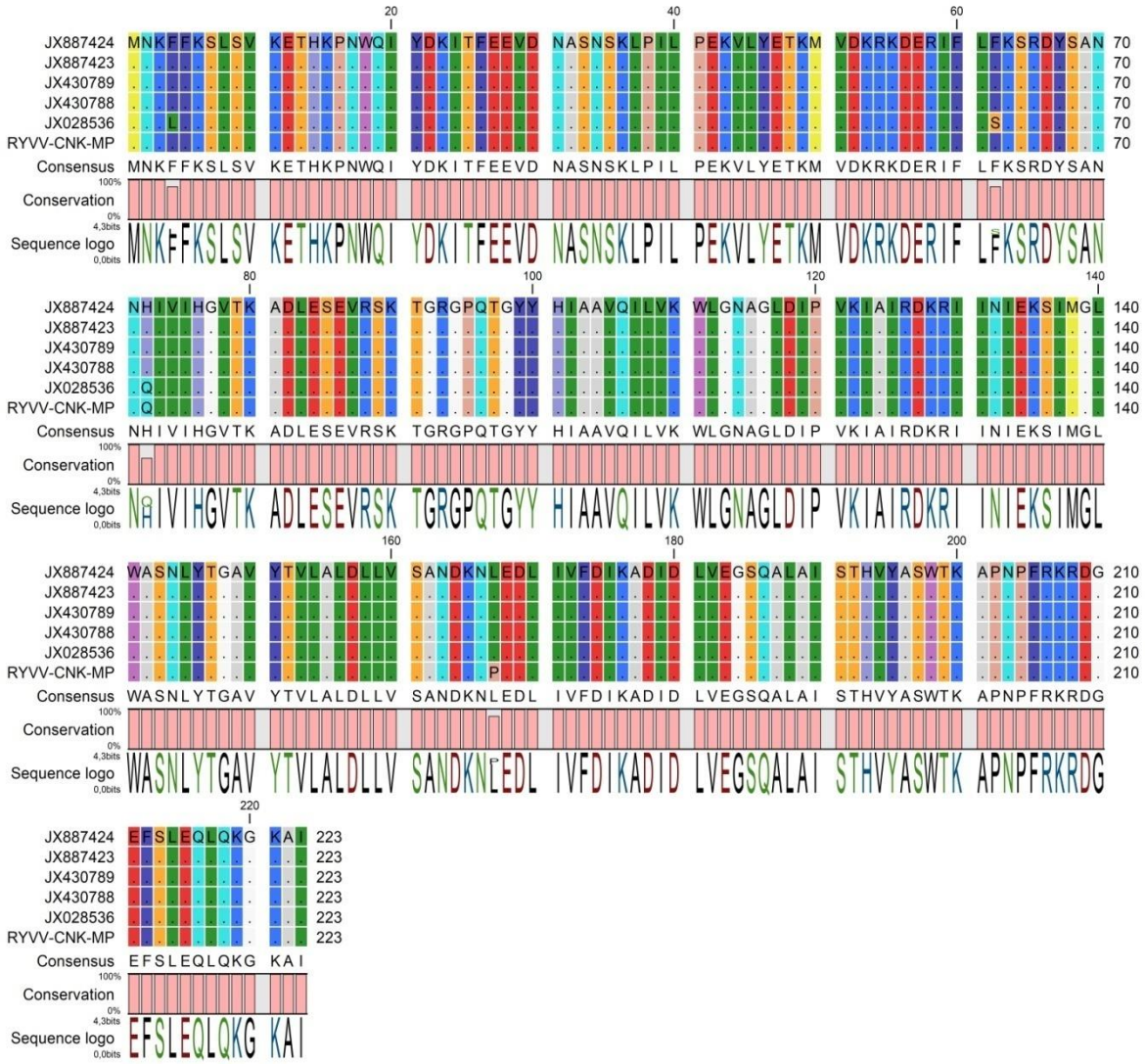
asit seviyelerinde sırasıyla %98 ve %91-97 oranlarında benzerlik gösterdiği belirtilmiştir (Alimoradian ve diğerleri, 2014). Aynı ya da aynı grup içinde olan benzer virüslerde birbirine yakın benzerlik oranı göstermişlerdir.

Hareket Proteini Geni

RYVV hareket proteini genlerine göre yapılan amino asit temelli benzerlik analizleri sonucunda RYVV dünya izolatları ile Çanakkale izolatı arasında %99 oranla benzerlik bulunduğu görülmüştür (Şekil 13 ve Şekil 14).



Şekil 13. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatı ile dünyadaki RYVV izolatlarının hareket proteini amino asit dizilerinin benzerlik oranları



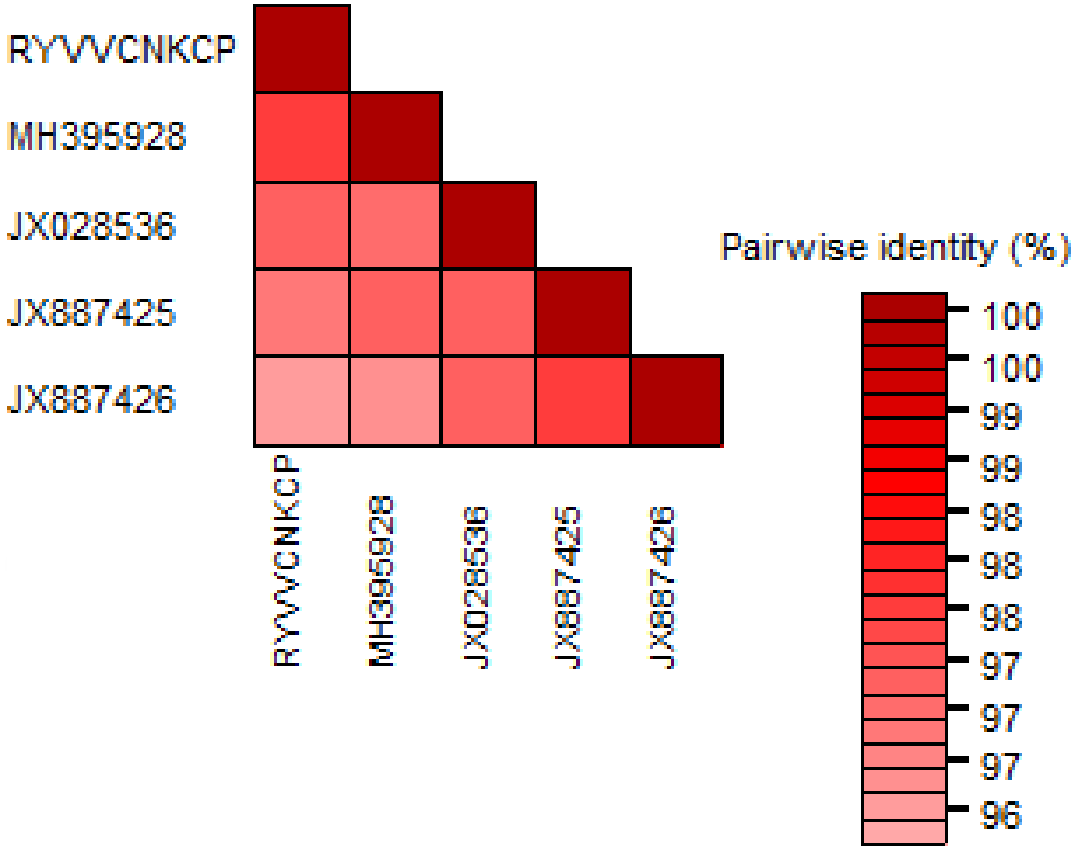
Şekil 14. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatı ile dünyadaki RYVV izolatlarının hareket proteini amino asit dizilerinin hizalanması

Perez Egusquiza ve diğerleri (2012) tarafından Yeni Zelanda'da gerçekleştirilen çalışmada hareket proteini amino asit dizi analiz sonuçlarına göre dünya RYVV izolatları ile %98 oranında benzerlikler gösterdiği belirtilmiştir. Bizim elde ettiğimiz bulgularla bu çalışmada elde edilen bulgular birbiriyle uyumlu görünmektedir.

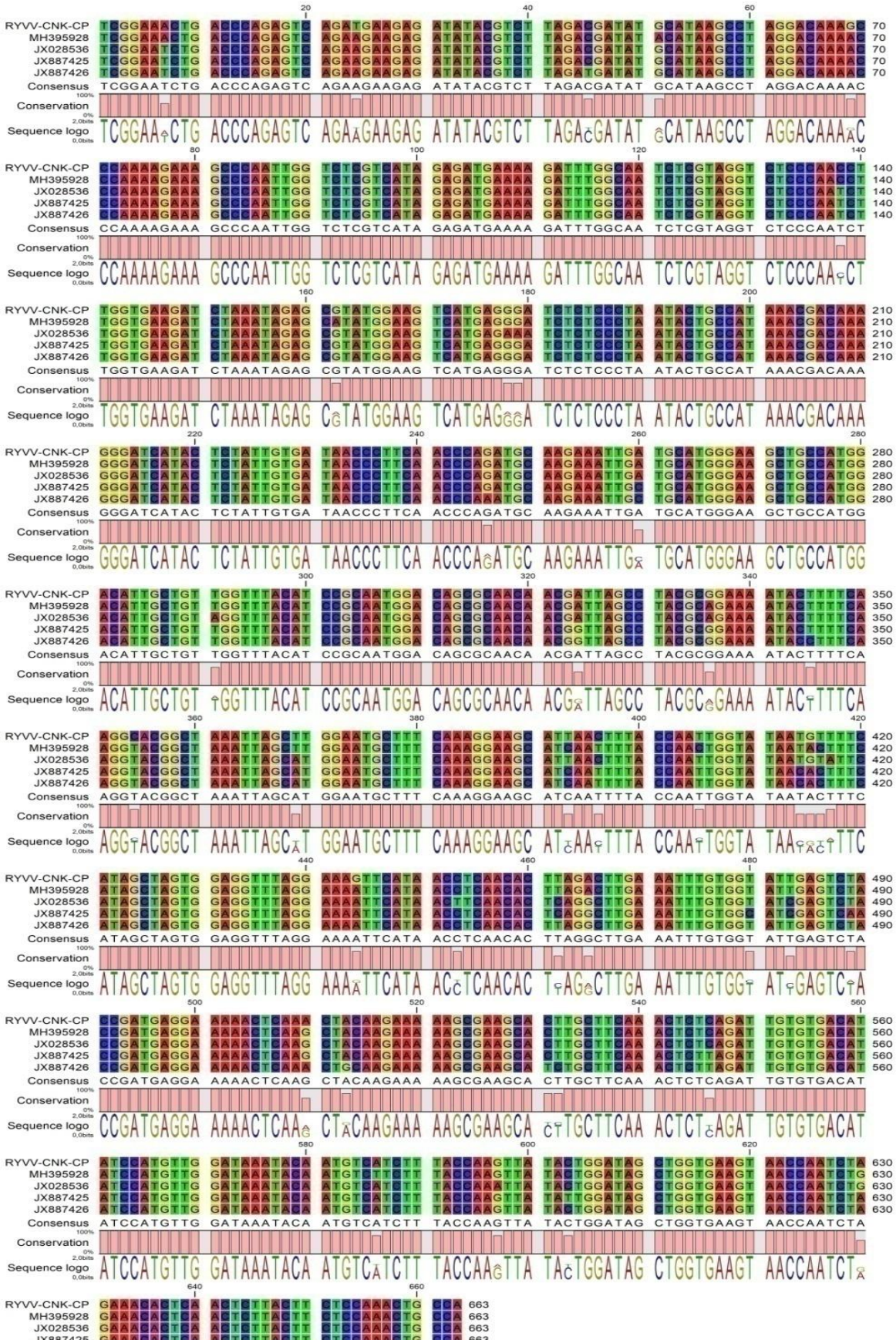
4.4.2. Nükleotid Dizi Analizleri

Kılıf Protein Geni

Nükleotid temelli dizi analizi incelemelerinde CP genine göre Çanakkale RYVV izolatı ile dünya izolatlarının benzerlik oranları karşılaştırıldığında en yüksek benzerliğin %98 oranla RYVV-CNK-CP ile MH395928 izolatları arasında olduğu görülmüştür. Bu iki izolat da ülkemize aittir ve yüksek oranla benzerlik gösterdikleri belirlenmiştir. İkinci en yüksek benzerlik oranının ise RYVV-CNK-CP ile JX028536 numaralı Amerika izolatı arasında olduğu saptanmıştır (Şekil 15 ve Şekil 16).



Şekil 15. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatı ile dünyadaki RYVV izolatlarının kılıf protein nükleotid dizilerinin benzerlik oranları



Şekil 16. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatı ile dünyadaki RYVV izolatlarının kılıf protein nükleotid dizilerinin hizalanması

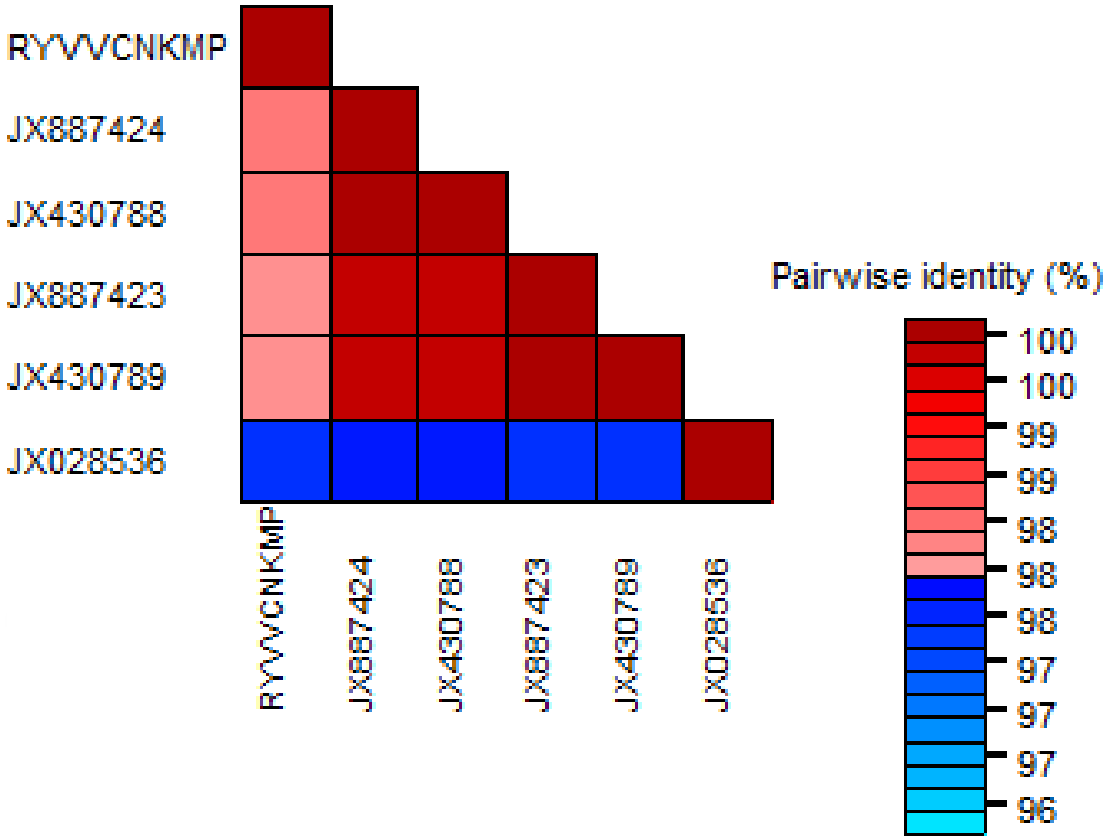
Karanfil ve diğerleri (2018) tarafından gerçekleştirilen çalışmada Türk RYVV izolatı ile dünya izolatlarının nükleotid dizilimlerinin karılaştırılması sonucunda %96-97 benzerlik olduğu tespit edilmiştir.

Ülkemizde gerçekleştirilen benzer bir çalışma da RYVV ile aynı familyada bulunan *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) izolatlarıyla gerçekleştirilmiştir. Tuzlalı (2012), Çanakkale ilinde CaMV izolatlarının karakterizasyonu amacıyla gerçekleştirdiği çalışmada kullandığı 6 Çanakkale CaMV izolatı ve 9 ayrı dünya CaMV izolatının kılıf protein genlerine ait nükleotid dizilimlerini karşılaştırmıştır. Dizilimlerin karşılaştırılması sonucunda Çanakkale CaMV izolatları ile dünya izolatları %92-97 arasında değişen oranlarda benzerlik gösterdiğini belirtmiştir. Benzerlik oranlarının incelenmesiyle en fazla benzerliğin %97 oranla Çanakkale'ye ait CaMV 26 olarak adlandırılan izolat ile Amerika'ya ait MCACGDH izolatı arasında olduğunu belirtmiştir.

Benzer şekilde *Grapevine roditis leaf discoloration-associated virus* **(**GRLDaV) de *Caulimoviridae* familyasında Badnavirus cinsinin bir üyesidir. Ulubaş Serçe ve diğerleri (2017) tarafından gerçekleştirilen çalışmada GRLDaV Türk izolatı Yunanistan ait GRLDaV izolatları ile (sırasıyla erişim no. KT965859 ve HG940503) nükleotit dizilerine göre sırasıyla %90-92 benzerlik göstermiştir. Ülkemizde gerçekleştirilen bu çalışmalardan da anlaşılacağı üzerine Caulimoviridae familyası üyelerinin birbirleri ile yüksek oranlarda sekans homolojisine sahip olduğu görülmektedir.

Hareket Proteini Geni

MP genine göre benzerlik oranları incelendiğinde RYVV-CNK izolatının diğer dünya izolatları ile %97-98 arasında benzerlik gösterdiği görülmüştür. En az benzerlik oranının Çanakkale izolatı ile ABD izolatı arasında %97 oranında olduğu belirlenmiştir. Çanakkale izolatı ile en fazla benzerlik oranının ise JX887424 erişim numaralı Yeni Zelanda izolatı ile %98 oranında göstermiştir. Genel olarak en fazla benzerliğin %100 oranla JX887424 erişim numaralı ve JX430788 erişim numaralı Yeni Zelanda izolatlarının birbirleri arasında olduğu görülmüştür (Şekil 17 ve Şekil 18).



Şekil 17. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatı ile dünyadaki RYVV izolatlarının hareket proteini nükleotit dizilerinin benzerlik oranları



Şekil 18. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatı ile dünyadaki RYVV izolatlarının hareket proteini nükleotit dizilerinin hizalanması

4.4.3. Filogenetik Analizler

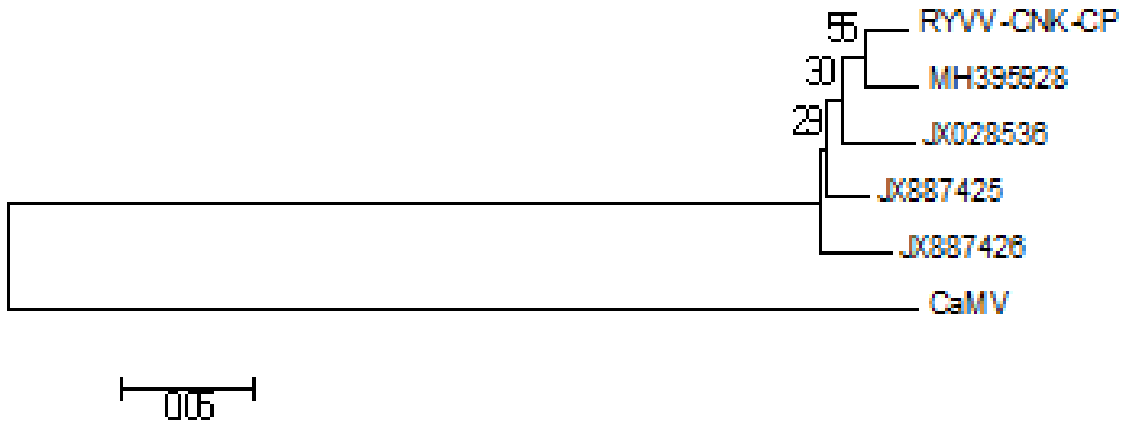
RYVV-CNK izolatının filogenetik soy ağacının belirlenmesi için yapılan çalışmalar kapsamında Çanakkale iline ait RYVV izolatı ile dünyanın birçok farklı bölgesinden elde edilen farklı izolatların genetik ilişkilerini belirlemek için nükleotid ve amino asit dizileri kullanılarak filogenetik analizler gerçekleştirilmiştir.

Filogenetik ilişkilerinin belirlenmesinde oluşturulan filogenetik soyağaçlarının doğruluğunu arttırmak için *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) dış grup olarak kullanılmıştır.

Amino Asit Dizilimlerine Göre Filogenetik Soyağaçlarının Oluşturulması

Kılıf Proteini

Kılıf proteini amino asit dizilimlerine göre oluşturulan filogenetik soyağacı 2 ana gruptan oluşmuştur. Birinci ana grupta yalnızca JX887426 izolatı yer alırken ikinci ana grup Yeni Zelanda, ABD ve Türkiye izolatlarını içermektedir. RYVV Çanakkale izolatı ile Türkiye izolatı olan MH395928 aynı alt grupta yer almıştır. Bu da izolatlar arasındaki benzerlik oranlarını aynı zamanda doğrulamıştır. Çanakkale RYVV izolatı ve dünya izolatlarının kılıf protein amino asit dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı Şekil 19'da verilmiştir.

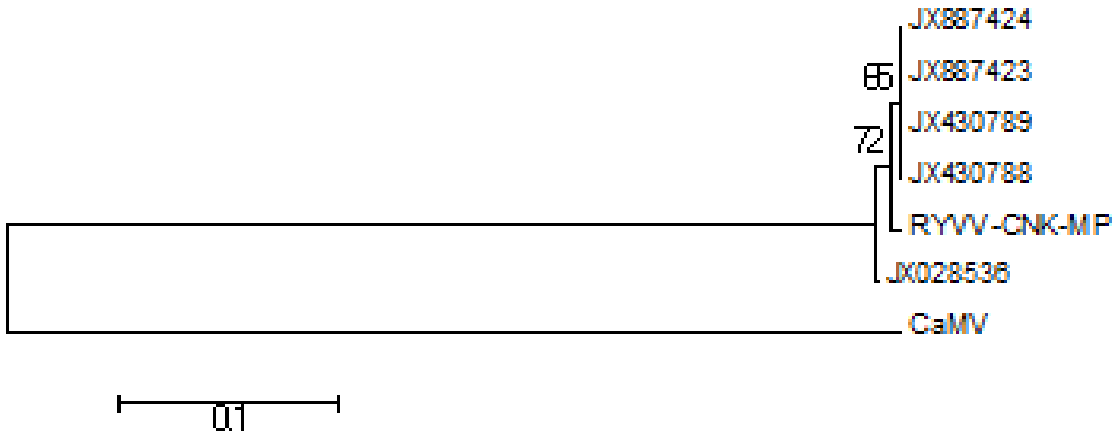


Şekil 19. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatının kılıf protein geninin amino asit dizimleri kullanılarak neighbor joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı

Caulimoviridae familyasından olan CaMV izolatları ile ilgili yapılan bir çalışmada Yunanistan, İran, Türkiye ve Japonya'dan toplanan 67 CaMV izolatının genom analizi yapılmıştır. Filogenetik analizlerde soyağacının A ve B olmak üzereiki ana gruba ayrıldığı belirtilmiştir. A Grubu; İran, Japon, Kuzey Amerika, Avrupa, B Grubu; Yunanistan, Türkiye ve İran izolatlarının bulunduğu alt gruplarından oluştuğu ifade edilmiştir (Yasaka ve diğerleri, 2014).

Hareket Proteini

Hareket proteini amino asit dizilimlerine göre şekillenen filogenetik soyağacının 2 ana gruptan oluştuğu görülmektedir. JX887424, JX887423, JX430789, JX430788 ve RYVVCNKMP izolatları birinci ana grupta yer alırken, ikinci ana grupta yalnızca ABD izolatı olan JX028536 yer almıştır. Birinci ana grup da kendi içerisinde iki gruba ayrılmıştır. Ayrılan iki ana gruptan biri Yeni Zelanda izolatlarından oluşurken, diğer grupta Çanakkale izolatından yer almıştır. Çanakkale RYVV izolatı ve dünya izolatlarının hareket proteini amino asit dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı Şekil 20'de verilmiştir.



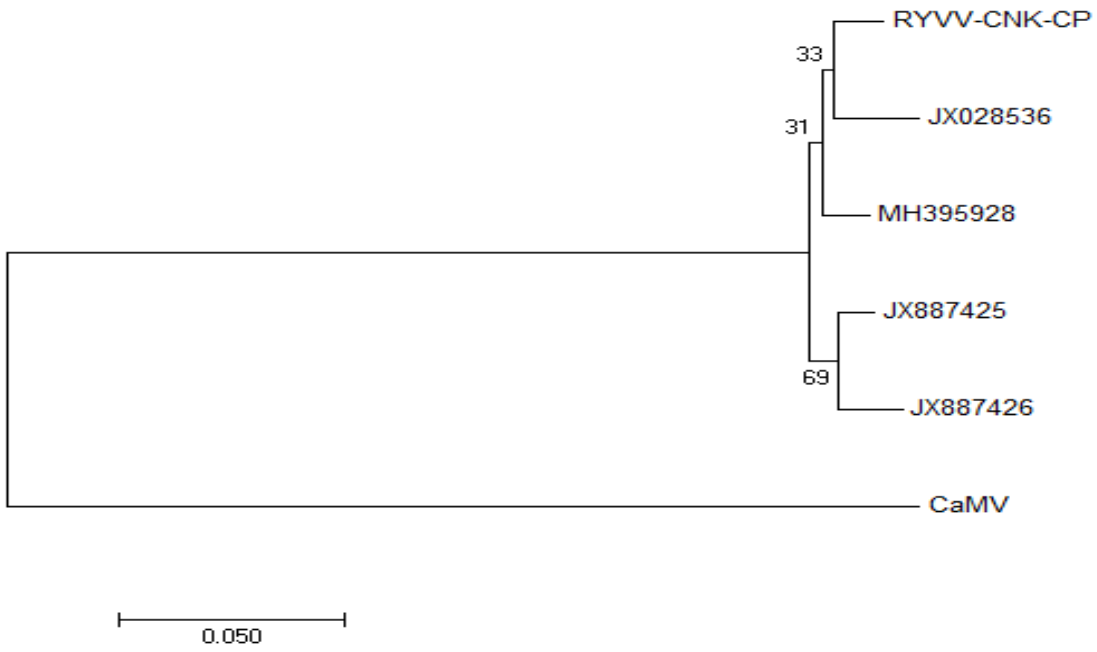
Şekil 20. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatının hareket proteini geninin amino asit dizimleri kullanılarak neighbor joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı

Nükleotid Dizilimlerine Göre Filogenetik Soyağaçlarının Oluşturulması

Kılıf Proteini

Çanakkale ili RYVV izolatı ve dünyadaki farklı coğrafi bölgelerden elde edilen izolatların nükleotid düzeyinde oluşturdukları filogenetik soyağaçları oluşturularak incelenmiştir.

Kılıf protein genleri nükleotit dizilimlerine göre incelendiğinde 2 ana gruba ayrıldığı görülmüştür. Birinci ana grup RYVV-CNK-CP, JX028536, MH395928 olmak üzere 3, ikinci ana grup JX887425 ve JX887426 olmak üzere 2 izolat içermektedir. Birinci ana grupta Çanakkale, Türkiye ve ABD izolatları yer alırken ikinci grup Yeni Zelanda izolatlarından oluşmuştur. Çanakkale RYVV izolatı ve dünya izolatlarının kılıf protein genine göre nükleotid dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı Şekil 21'de verilmiştir.

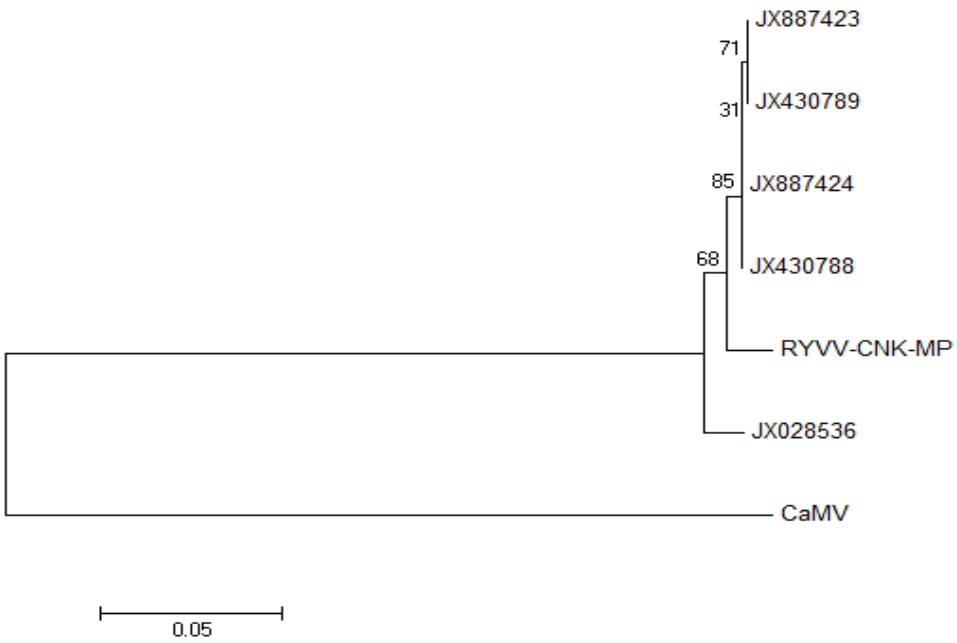


Şekil 21. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatının kılıf protein geninin nükleotid dizimleri kullanılarak neighbor joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı

RYVV ile aynı familyada bulunan bir başka virüs de Karnabahar mozaik virüsüdür. CaMV, *Caulimovirus* grubu üyesi olup dünya genelinde *Brassicacea* familyasına ait bitkilerde rastlanan bir virüstür (Tompkins, 1937). Tuzlalı (2012), gerçekleştirdiği çalışmada kullandığı izolatların filogenetik ilşkilerini incelemiştir. Bu incelemeler sonucunda en yakın ilişkilerin Çanakkale CaMV 26 izolatı ile Amerika izolatı ve Çin izolatı arasında olduğunu belirtmiştir.

Hareket Proteini

Çanakkale RYVV izolatı ile dünya izolatlarının hareket proteini genine göre nükleotid dizilimleri kullanılarak oluşturulan filogenetik soyağacı Şekil 22' de verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi filogenetik soyağacı 2 ana gruptan oluşmuştur. Birinci ana grupta JX887423, JX430789, JX887424, JX430788 ve RYVV-CNK-MP olmak üzere 5, ikinci ana grupta JX028536 olmak üzere 1 izolat yer almıştır. Yeni Zelanda ve Çanakkale izolatları aynı ana grupta yer alırken ABD izolatı diğer ana gruba dahil olmuştur. Çanakkale RYVV izolatının bazı dünya izolatları ile oluşturduğu soy ağacının dalları 31-85 arasında değişen boostrap değerleri ile doğruluğu desteklenmiştir. Bu değerler, sonuçların tesadüfi olmadığını ve soyağacındaki dallardan birçoğunun istatistiksel açıdan desteklendiğini göstermiştir.



Şekil 22. Çanakkale *Rose yellow vein virus* izolatının hareket proteini geninin nükleotid dizimleri kullanılarak neighbor joining yöntemi ile oluşturulan filogenetik soyağacı

Alan (2012) yaptığı bir çalışmada, CaMV ile infekteli olduğu belirlenen karnabahar bitkisinden izole etmiş olduğu CaMV-1 izolatının, filogenetik analizlerin yapılması sonucunda CaMV-1 izolatının AF140604.1 erişim numaralı Çin izolatı ile aynı grupta yer aldığını belirlerken, şalgam bitkisinden elde edilen D00335.1 izolatı ile farklı gruplarda yer aldığını belirtmiştir.

Farzadfar ve diğerleri (2007), İran'nın farklı coğrafik bölgelerinden topladıkları RYVV ile aynı familyadan olan 9 CaMV izolatının moleküler özelliklerini belirlemek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada yapılan filogenetik analizler sonucunda İran izolatları soyağacında tek bir grup altında dallanmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında filogenetik soy ağacına ilişkin elde edilen gruplandırma aynı grup içerisinde bulunan benzer virüslere ilişkin yapılan çalışmalara benzerlik gösterdiği görülmektedir. Bununla birlikte RYVV ile ilgili çok az sayıda çalışma olması elde ettiğimiz bulguların tartışılmasını da sınırlandırmıştır.

BÖLÜM 5
SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında Çanakkale ili ve ilçelerinden RYVV benzeri simptom gösteren ve virüs ile enfekteli olduğundan şüphelenilen güllerden toplam 71 adet örnek üzerinde çalışılmıştır. Örnek alınan bitkilerde görülen tipik simptomlar damarlarda sararma şeklindedir. Örneklemeler tesadüfi olarak belirlenen park ve bahçelerden yapılmıştır. Örneklemelerde gül çeşidi dikkate alınmamıştır. Hastalık simptomu gösteren bitki sayısına bağlı olarak en çok örnekleme Merkez ilçeden 30 farklı bitki örneği alınarak, en az örnekleme ise Lapseki'den 4 bitki örneği alınarak yapılmıştır.

Toplanan 71 adet örneğe PCR testi uygulanmış ve 71 adet gül örneğinin 19'unda (%26,8) RYVV tespit edilmiştir. Yapılan PCR testleri sonucunda Çanakkale ilinde RYVV varlığı tespit edilmiş olup, etmenin enfeksiyon oranı ilçelere göre farklılık göstermiştir. En yüksek enfeksiyon oranı Lapseki'de (%75,0) tespit edilmiştir. Bu oran örnek sayısının az olması, 4 örneğin 3 tanesinin pozitif çıkmasıyla ilişkilidir. Bunu sırayla Ezine (%30,0), Eceabat (%27,7) ve Merkez (%26,6) ilçeleri takip etmiştir. Bozcaada'dan RYVV benzeri simptomlar gösteren örnekler alınmasına rağmen testlemeler sonucunda RYVV enfeksiyonuna rastlanmamıştır.

PCR çalışmalarında enfekteli bulunan örnekler virüse özgü 766 bç büyüklüğünde band oluşturmuştur. PCR testi sonuçları pozitif olan örnekler içerisinden bir izolat seçilerek, ilgilenilen MP ve CP gen bölgeleri PCR ile amplifiye edilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri kullanılarak seçilen izolata ait amplifiye edilmiş olan MP ve CP genlerinin nükleotid dizileri hizmet alımı ile belirlenmiştir. RYVV MP ve CP genlerine ait nükleotit dizilimlerinin kullanılmasıyla amino asit dizilimleri çıkarılmıştır. Bu dizilimler kullanılarak Çanakkale izolatının dünya RYVV izolatları ile moleküler ilişkileri ortaya konmuştur.

Gen bankasında bulunan dünya RYVV CP ve MP genlerinin nükleotid ve amino asit dizilimleri alınarak Çanakkale ili ve ilçelerinden elde edilen RYVV izolatı CP ve MP genlerinin nükleotid ve amino asit dizilimleri birbirleri ile karşılaştırılarak Çanakkale RYVV izolatının diğer uluslararası izolatlar ile benzerlik oranları belirlenmiştir. Yapılan karşılaştırmalarda ülkemiz Çanakkale RYVV izolatının nükleotid temelli dizi analizi incelemelerinde CP genine göre Çanakkale RYVV izolatı ile dünya izolatlarının benzerlik oranları karşılaştırıldığında en yüksek benzerliğin %98 oranla RYVV-CNK-CP ile MH395928 izolatları arasında olduğu görülmüştür. MP genine göre benzerlik oranları

incelendiğinde RYVV-CNK izolatının diğer dünya izolatları ile %97-98 arasında benzerlik gösterdiği görülmüştür. En az benzerlik oranının Çanakkale izolatı ile ABD izolatı arasında %97 oranında olduğu belirlemiştir. Çanakkale izolatı ile en fazla benzerlik oranının ise JX887424 erişim numaralı Yeni Zelanda izolatı ile %98 oranında göstermiştir. Amino asit temelli benzerlik dizi analizlerinde RYVV-CNK izolatının CP geni amino asit benzerlikleri incelendiğinde en yüksek benzerliği %99 oranla JX028536 numaralı Amerikan izolatı ile göstermiştir. RYVV hareket proteini genlerine göre yapılan amino asit temelli benzerlik analizleri sonucunda RYVV dünya izolatları ile Çanakkale izolatı arasında % 99 oranla benzerlik bulunduğu görülmüştür

Gerçekleştirilen filogenetik analizler sonucunda ise Çanakkale RYVV izolatının dünya RYVV izolatları ile yakın ilişkili olduğu hem nükleotit hem de amino asit temelli CP ve MP gen bölgesi dizilimlerine göre gerçekleştirilen filogenetik analizlerde belirlenmiştir. Ancak gen bankası veri tabanında oldukça sınırlı sayıda izolata ait sekans verisi olduğu için, kesin sonuçlara varmak için çok daha fazla izolata ait sekans verileri kullanılarak gerçekleştirilmesi gerektiği düşünülmektedir. Bu tez çalışması ile ülkemizde ilk defa RYVV Çanakkale izolatının iki gen bölgesine göre moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Uzun yıllardır kültürümüzde ve geleneklerimizde yer alan güllerin ülkemiz için değeri ve önemi her geçen gün artmaktadır. Kesme çiçek ihracatında dünyada 26. sırada olan ülkemizde üretim arttırılırken aynı zamanda çeşitlilik de sağlanmalıdır. Bununla ilgili olarak teşvik programları ve bilinçli üretim sağlanmalıdır. Güller yalnızca evimizin bahçesini süslemekle kalmayıp daha geniş alanlarda bilinçli üretimi sağlanarak ülke ekonomisine katkısı daha da arttırılmalıdır. Güllerde hastalığa neden olan etmenler konusunda gerek taşınma yolları, gerekse korunma ve mücadele yöntemleri ile ilgili farkındalık oluşturulmalıdır. Virüs hastalıklarına karşı herhangi bir kimyasal mücadele bulunmamaktadır. Bundan dolayı en önemli mücadele yolu olarak bazı kültürel önlemler ve virüsten ari üretim materyali veya dayanıklı çeşitleri kullanmak görülmektedir.

Bitki virüslerini tanımak, streynlerin ive konukçu dizilerini belirlemek ayrıca hızlı tanı yöntemleri ile etmeni tanımlamak kontrol açısından önem arz etmektedir. Herhangi bir gül fidanı üretimine başlandığı zaman, üretim materyallerinin viral hastalıklar açısından kontrolü üretim yerinde serolojik ve moleküler düzeyde mutlaka yapılmalıdır. Bölgedeki diğer gül virüsleri tespit edilmelidir. Sonuç olarak güller kültürel bir değerdir. Gül yetiştiriciliğinin teşvik edilmesi ve geliştirilerek arttırılması, yurtiçi ve uluslararası pazarlarda rekabet gücünün arttırılması kırsal kalkınma ve sürdürülebilirlik açısından

oldukça önemli rol oynamaktadır.

KAYNAKLAR

Acıduman, A., Er, U. ve Belen, D. (2007). Osmanlı Döneminden "Yazarı Bilinmeyen Cerrâhnâme" ve Nöroşirurji ile İlgili Bölümleri. Türk Nöroşirürji Dergisi, Cilt: 17, Sayı: 3, s.162-169.

Akpınar, G. (2009). Türkiye'de Trakya Bölgesi'nde Güllerde Görülen Virüslerin Biyolojik ve Serolojik Yöntemlerle Saptanması Üzerine Araştırmalar

Aktan, S. ve Sağdıç, O. (2004). Dried rose (*Rosa damascena* Mill.) dreg: An Alternative Litter Material In Broiler Production. South African Journal of Animal Science 34 (2): pp.75-79.

Alan, B. (2012). Doğu Akdeniz Bölgesi'nde Yetiştirilen Bazı Kışlık Sebzelerde Görülen Virüslerin Tanılanması ve Karakterizasyonu. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

Alimoradian, M.R., Rakhshandehroo, F. ve Shams-Bakhsh, M. (2014). First Record of Fig Badnavirus-1 in Fig Trees in Iran. Journal of Plant Pathology 2014, 96 (4, Supplement), S4.s.124.

Anonim, (2015). Doğu Akdeniz Kalkınma Ajansı(DOĞAKA), TR 63 Bölgesi Kesme Çiçek Sektör Raporu. Erişim adresi:http:///www.dogaka.gov.tr.Kesme-cicek-Sektor-Raporu, Erişim tarihi: 31.08.2017

Anonim, (2016). Türkiye İstatistik Kurumu, TÜİK .http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id1001 Erişim tarihi: 23.08.2017

Anonim, (2017). Gümrük ve Ticaret Bakanlığı, Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü, 2017 Yılı Gül Çiçeği Raporu.

Anonim, (2018). Türkiye İstatistik Kurumu,TÜİK.

Babu,B., Washburn, B.K., Miller, S.H., Poduch, K., Sarigul, T., Knox, G.W., Ochoa-Corona, F.M. ve Paret, M.L. (2017). A rapid assay for detection of *Rose rosette virus* using reversetranscription recombinase polymerase amplification using multiplegene targets. Journal of Virological Methods 240 (2017) pp.78–84.

Brierley, P. (1953). Viruses of Roses. Edited in Yearbook of Agriculture. U:S: Department of Agriculture. Washington D.C., The U.S. Government Printing Office, pp.636-642.

Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. (1996).Viruses of Plants. Description and Lists from the VIDE Database. University Press, Cambridge, U. K., pp. 1484 .

Cairns, T., Young, M., Adams, J. ve Edberg, B. (2000). Modern Roses IX: The World

Encyclopedia of Roses. Academic Press, San Diego, CA., U.S.A.

Chakraborty,P., Das, S., Saha, B., Karmakar, A., Saha,D. ve Saha, A. (2017). *Rose rosette virus*: Anemerging pathogen of garden roses in India.Australasian Plant Pathol. (2017) 46: pp.223–226. DOI 10.1007/s13313-017-0479-y

Çıtır, A. ve Ilbağı, H. (2000). Identitification of Virus and Virus-like Diseases of Ornamental Plants by Using Symptomatological and Biological Features in Amasya, Samsun and Tokat Provinces in Turkey. Proceeding of 6. Symposium of Deutsch Turkische Agrarforschung 27 September-2 October 1999. Justus-Liebig universitat Giessen Germany. pp. 109-116.

Demirözer, O., Kaydan, M.B., Karaca, I. ve Ben-Dov, Y. (2009). First records of armoured scale insects (Hemiptera: Coc-coidea: Diaspididae) from the oil-rose, *Rosa damascena*, in Turkey. Hell. Plant Prot. J., 2, pp.33–35.

Donner, J. ve Çolak, A.H. (2007). Türkiye Bitkileri Yayılış Haritaları: P.H. Davis, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Cilt 1-10'a Göre Lazer Ofset Matbaa Tesisleri San. Ve Tic. Ltd Şti., Ankara.

Douglas, M. (2001). Rosa, *Rosa damascena*, trigintipetala. New Zealand Institute for Crop &Food Research. Broadsheet. March 2001, No. 29. Edinburgh University Press, pp.106-128.

Elçi, E., Ulubaş, Serçe, Ç., Gazel, M., ve Çağlayan, K. (2012). Molecular Detection and Comparative Sequence Analysis of Viruses Infecting Fig Trees in Turkey. Journal of Phytopathology 160: s.418–423.

Ercişli, S. (1996). Selection and Propagation of Rose Hips are Naturally Grown in Gümüshane District, PhD thesis, Ataturk University, Erzurum, pp. 167.

Erlich, H.A., D.H., Gelfand, J. ve Sninsky,J. (1991). Recent Advences in Polymerase Chain Reaction. Science, 252: pp.1643-1650.

Farzadfar, S., Ahounmanesh, A., Mosahebi, G.H., Oshima, K., Koohi-Habibi, M., Pourrahim,R. ve Golnaraghi A.R. (2007). Partialbiolaogical and molecular characterization of *Cauliflowermosaicvirus* Isolates in Iran. Plant Pathology Journal6: pp.291-298.

Güran, S. (2007). Şanlıurfa İlinde Güllerde (*Rosa* spp.) Erik Nekrotik Halkalı Leke Virüsü (PNRSV)'nün ELISA ve RT-PCR Yöntemleriyle Saptanması.

Hadidi, A., Levy L. ve Podleskis, E.V. (1995). Polymerase Chain Reaction Technology in Plant Pathology. In: *Molecular Methods in Plant Pathology*, pp.167-187. Eds. R. P. Singh, U. S. Singh. Boca Raton: CRS Press.

He, Y., Yang, Z., Hong, N., Wang, G,. Ning, G., Xu, W. (2015).Deep sequencing reveals a novel closterovirus associated with wild rose leaf rosette disease**.**Molecular Plant Pathology(2015) 16(5), 449–458. DOI: 10.1111/mpp.12202

Horst, RK., Cloyd, R. (2007). Compendium of Rose Disease and Pests. Second Edition A.P.S.Press. St Paul, MN, U.S.A pp.96 .

Innis, M.A. ve Gelfand, D.H. (1990). Optimization of PCRs In Innis, M.A, Gelfand, D.H., Sninsky, J.J.and White T.J. PCR Protocols A Guide To Methods And Applications. Academic Press.pp.3-12.

Karanfil, A., Randa-Zelyüt, F., Ertunç, F. ve Korkmaz, S. (2018). First report of *Rose yellow vein virus* for Europe and Asiain Turkey. New Disease Report.38, s:11.http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2018.038.011.

Khatri, S., Nahid, N.,Fauquet, C.M.,Mubin, M. ve Nawaz-ul-Rehman, M.S. (2014).A betasatellite dependent begomovirus infects ornamental rose: characterization of begomovirus infecting rose in Pakistan. Virus Genes (2014) 49:124–131. DOI 10.1007/s11262-014-1076-6

Kibar, H. (2014). Yalova İli Kesme Çiçek Üretimi Yapılan Alanlarda *Tomato Spotted Wilt Virus*(TSWV), *Dasheen Mosaic Virus* (DsMV) ve *Cucumber Mosaic Virus*(CMV)'lerinin Saptanması Üzerine Araştırmalar.

Kılıç, H., Yardımcı, N. ve Gübür, Ş. (2017). Serological, Biological and Molecular Detection of *Prunus necrotic ringspot virus* on *Rosa damascena* Mill. In Turkey, Acta Sci. Pol.Hortorum Cultus, 16(1) 2017, pp. 145-150.

Klinkowski, M. ve Sahtiyancı, S. (1972). Bitki Virüs Hastalıkları Bölge Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü, Göztepe-İstanbul.s. 364.

Korkmaz, M., Özçelik H., Kandemir A. ve İlhan V. (2013). Erzincan ve Çevresinde Yayılış Gösteren Doğal Gül (*Rosa* L.) Taksonları, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitisü Dergisi 17(1): s. 49-59.

Korkut, A. B. (1998). Gül Yetişitiriciliği. Hasad Yayıncılık s. 28-43.

Li, R., Mock, R., Huang, Q. ve Abad, J. (2008). Hartung, J.; Kinard, G. A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. J Virol Methods 154, pp. 48–55.

Lockhart, B., Zlesak, D. ve Fetzer, J. (2011). Identification and partial characterization of six new viruses of cultivated roses in the USA. Acta Hort 901: pp.139–147.

Milleza, E.J.M., Ward, L.I., Delmiglio, C., Tang, J.Z., Veerakone, S. ve Perez-Egusquiza, Z. (2013). Received: A survey of viruses infecting Rosa spp. in New Zealand

Australasian Plant Pathology, May 2013, Volume 42, Number 3, pp.313-320. DOI: 10.1007/s13313012-0191-x.

Mollov, D., Lockhart, B. ve Olszewski, N. (2012). Complete nucleotide sequence of *Rose yellow vein virus*, a member of the family Caulimoviridae having a novel genome organization.Arch Virol., doi:10.1007/s00705-012-1547-9.

Mollov, D., Lockhart, B., Zlesak, D. C. ve Olszweski, N. (2013). Arch Virol 158: pp.877–880.

Moran, J. R., Faragher, J. D. ve Baker, D. M. (1988). The Effects of *Prunus Necrotic Ringspot Virus* on production and quality of rose flowers. VII. International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants. Acta Horticulture. pp.234.

Moury, B., Cardin, L., Onesto, J.P., Candresse, T. ve Poupet, A. (2001). Survey of *Prunus necrotic ringspot virus* in Rose and its Variability in Rose and Prunus spp.Phytopathology, 91(1) : pp.85–91.

Mullis, K. B. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. Scientific American, April: pp.56-61.

Nilsson, O. (1972). Rosa. In P.H. Davis , Flora of Turkey and the East Aegean Islands,Vol.4.

Örmeci-Kart, M.Ç., Ikiz, M. ve Demircan, V.(2012). Development Of Oil Rose (*Rosa damascena*) Production and Trade in Turkey. Süleyman Demirel Univ. J. Faculty of Agriculture 7(1), pp.124–134.

Özçelik, H. (2010). New Records and Systematical Contributions to Garden Roses of Turkey, The Herb Journal of Systematic Botany, 17(1): pp. 9-42.

Özçelik, H. ve Korkmaz, M. (2015). Çeşitli Yönleriyle Türkiye Gülleri.SDU Journal of Science (E-Journal), 2015, 10 (2): 1-26.

Özçelik, H., Muca, B. ve Özavcı, A.G.M. (2011). Isparta Yağ gülü (*Rosa damascena* Mill.) Yağı ve Çiçeklerinin Strese Bağlı Nörolojik ve Psikiyatrik Hastalıklara Etkileri, BİBAD, Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi 4,2: s. 99-105.

Özkan, B. ve Karagüzel, O.(1997). Antalya'da kesme çiçek üretiminin mevcut durumu. Derim Dergisi,14(2): 50-61 Antalya Rehber E. 2013. Tarım Ekonomisi, Ekin Yayınevi, Bursa. s. 225-226.

Perez-Egusquiza, Z., Liefting, L. W. ve Ward, L.I.(2012). First Report of *Rose yellow vein virus*in *Rosa* sp. in New Zealand. APS Journals. Plant Disease. August 2013, Volume 97, Number 8. pp.1122. https://doi .org/10.1094/PDIS-10-12-0981-PDN Pharmacy and the History of Medicine Series, No: 1, Portakal Basım A.Ş., İstanbul.

Rivera, P.A. ve Engel, E.A. (2010). Presence of rose spring dwarf-associated virus in Chile: partial genome sequence and detection in roses and their colonizing aphids. Virus Genes (2010) 41:295–297. DOI 10.1007/s11262-010-0510-7

Sabanadzovic, S. ve Ghanem-Sabanadzovic, N.A.(2018).Molecular Characterization And Detection Of A Tripartite Cryptic Virus From Rose. Journal of Plant Pathology, Vol. 90, No. 2 (July 2008), pp. 287-293.

Saiki, R. K., Scharf,S., Faloona,F., Mullis,K. B., Horn,G.T., Erlich,H. A. ve Arnheim,N.(1985).Enzymatic Amplification of B-globulin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. Science, 230: pp.1350-1354.

Sipahioğlu, H.M., Çağlar, B.K. ve Baloğlu, S. (2001). Determination Of the Incidence of PNRSV and ApMV Rose Viruses in Rose by ELISA In The Eastern Mediterranean Region. IX. Congress of Phytopathology. 3-8 September, Tekirdağ, pp.572-577.

Tapkı, N., Kızıltuğ, T. ve Çelik, A.D. (2018). Türkiye Kesme Çiçek Üretim ve Ticaretinde Mecvut Durum, Sorunlar ve Çözüm Önerileri. Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 6(3): s. 321-333.

Taşcıoğlu, Y. ve Sayın, C. (2005). Türkiye'de kesme çiçek üretim ve ihracat yapısı. Akdeniz Üniv. Ziraat Fak., Derg., 18(3): s.343-354.

Temel, M. ve Öztürk, M. (2016). Türkiye kesme çiçek üretimi ve dış ticareti, XII. Ulusal Tarım Ekonomisi Kongresi Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Ekonomisi Bölümü 25-27 Mayıs Isparta s: 2147-2154

Titiz, S., Çakıroğlu, N., Yıldırım, T.B. ve Çakmak, S.(2000). Süs Bitkileri Üretim ve Ticaretindeki Gelişmeler. Türkiye Mühendisler ve Mimarlar Odası Ziraat Mühendisleri Odası, Kongresi, Ankara.

Tompkins, C.M. (1937). A Transmissible Mosaic Disease of Cauliflower *J. Agric. Res.* 55pp: 33-46.

Türkoğlu, T. ve Fidan, Ü. (1992). Ege Bölgesi'nde Süs Bitkilerinde Görülen Virüs Hastalıkları:I. Karanfil, Glayöl ve Gerberalarda Görülen Virüs Hastalıklarının Tanıtılması. Bitki Koruma Bülteni 32(1-4): s.19-26.

Tuzlalı, H. T.(2012). Çanakkale İlinde Karnabahar mozaik virüsü (*Cauliflower mosaic virus*; CaMV) İzolatlarının Tanılanması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Ulubaş, Serçe Ç., Altan, B., Bolat, V., Ayyaz, M., Çifçi, O., Önder, S., Öztürk Gökçe, Z.N. ve Maliogka, V.I. (2017). First Report of Grapevine Rodetis leaf discoloration

associated virus Infecting Grapevine (*Vitis vinifera*) in Turkey. PlantDisease/APS Journals.https://doi.org/10.1094/PDIS-06-17-0927-PDN

Watson, J. D., Gilman,M., Witkowsk,J. veZoller,M.(1992). The Polymerase Chain Reaction In: Recombinant DNA. Second Edition. New York. pp.79-98.

Widrlechner, M.P. (1980). History and Utilization of Rosa damascena, Economic Botany, 35(1), 1981, pp. 42-58.

Wong, S. M. ve Horst, R.K. (1988). Comparison of Direct and Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Procedures For The Detection of Three Isolates of Rose MosaicVirus in Rose. VII. International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants. Acta Horticulture, 237.

Wong, S.M., Horst, R.K. ve Langhans, R.W. (1988). Simptomatology and occurence of Apple Mosaic and Prunus Necrotic Ringspot Viruses on Rose in Newyork. VII. International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants. Acta Horticulture. 234: s. 437-439.

Yardımcı, N. ve Çulal, H. (2009). Occurence and Incidence *of Prunus necrotic ringspot virus*, *Arabis mosaic virus* and*Apple mosaic virus on oil rose* (*Rosa damascena*) in the Lakes Region of Turkey. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science.Vol.37: pp. 95-98.

Yardımcı, N. ve Kılıç, H.(2010). Isparta İlinde Yağlık Güllerde (*Rosa damascena*) *Strawberry latent ringspot virus*.Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 5(2): s.22-26, 2010. ISSN 1304-9984, Araştırma Makalesi.

Yasaka, R., Nguyen, H.D., Ho, S.Y.W., Duchene, S.ve Korkmaz, S. (2014). The Temporal Evolution and Global Spread of Cauliflower mosaic virus, a Plant Pararetrovirus. PLoS ONE 9(1): e85641. doi:10.1371/journal.pone.0085641.

Yazgan, M.E., Korkut, A.B., Barış, E., Erkal, S., Yılmaz, R., Erken, K., Gürsan, K. ve Özyavuz, M.(2005). Süs Bitkileri Üretiminde Gelişmeler. Ziraat Mühendisleri Odası VI. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, Ankara.

Yılmaz, İ. (2009). Avrupa Birliği'ne Uyum Sürecinde Türk Kesme Çiçek Sektörünün Swot (Gtzf)Analizi. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 22(1):103–112.

Yılmaz, S. ve Devran, Z.(2016). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Bitki Biyoteknolojisinde Yaygın Uygulamaları.www.dergipark.org.tr

Zlesak, D.C.(2006). Rose, Rose x Hybrida in Anderson, Flower Breeding and Genetics, Springer, Chapter 26, Netherlands, pp. 695-738.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Nazlı Gürsel

Doğum Yeri : Sakarya

Doğum Tarihi : 26.07.1995

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 2017

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, 2020

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

İLETİŞİM

E-posta Adresi : ngursel3@gmail.com.tr