

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BK-YL-2007-0004**

**ÖDEMİŞ BÖLGESİNDE ÜRETİMİ YAPILAN PATATES
YUMRULARINDA PVY, PVX, PVS ve PLVR' LERİNİN
RT-PCR YÖNTEMİYLE SAPTANMASI**

HAZIRLAYAN: Mustafa KÖKTEN

DANIŞMAN: Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ

AYDIN-2007

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
İNTİHAL BEYAN SAYFASI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vii
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
EKLER DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
2.KAYNAK ÖZETLERİ	3
3. MATERYAL VE YÖNTEM	15
3.1 Materyal	15
3. 2. Yöntem	15
3.2.1. Total RNA Ekstraksiyonu	15
3.2.2. RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)	17
3.2.2.1. cDNA Sentezi	17
3.2.2.2. PCR Çalışması	18
3.2.3. Multiplex RT-PCR Çalışmaları	19
3.2.3.1. Multiplex PCR için cDNA Sentezi	19
3.2.4. Örneklerin Jelde Yürütülmesi	20
4. BULGULAR	21
4.1.1. RT-PCR ve Multiplex RT-PCR Uygulamalarının Sonuçları	21
4.1.1.1. RT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	21
4.1.2. Çeşitlerdeki RNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi	23
4.1.1.3.Multiplex RT-PCR Sonuçları	23
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	26
KAYNAKLAR	31

EKLER	38
ÖZGEÇMİŞ	43

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bitki Koruma Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Mustafa Kökten tarafından hazırlanan Ödemiş bölgesinde üretimi yapılan patates yumrularında PVY, PVX, PVS ve PLVR virüslerinin RT-PCR yöntemiyle saptanması başlıklı tez, (*Savunma Tarihi*) tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof. Dr. Serap Açıkgöz	Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye : Doç. Dr. Hidayet Bostan	Atatürk Üniversitesi	
Üye : Doç. Dr. Mustafa Gümüş	Ege Üniversitesi	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu (*Tezin Türü*) tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun.....sayılı kararıyla (*Tarih*) tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Serap Açıkgöz
Enstitü Müdürü

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.

Adı Soyadı :

İmza :

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖDEMİŞ BÖLGESİNDE ÜRETİMİ YAPILAN PATATES YUMRULARINDA PVY,PVX,PVS ve PLRV' LERİNİN RT-PCR YÖNTEMİYLE SAPTANMASI

MUSTAFA KÖKTEN
Adnan Menderes Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Serap Açıkgöz

Patates yetiştiriciliğinde virüsten temiz tohumluk elde etmek için virüsleri tanımlayabileceğimiz hızlı ve hassas testlerin kullanılması önemlidir. Patates yumrularındaki viral etmenleri tanılamakta RT-PCR yöntemi kullanılmaktadır. Ancak patates yumruları birden fazla virüsle bulaşık olduğunda tek seferde hızlı bir şekilde bu karışım virüsleri (Patates Y Virüsü = PVY, Patates X Virüsü = PVX, Patates S Virüsü = PVS, Patates Yaprak Kıvrılma Virüsü = PLRV) tanılamak için multiplex RT-PCR yönteminin kullanılabilirliğinin belirlenmesi bu çalışmanın amacını oluşturmuştur.

Bu amaçla, İzmir – Ödemiş bölgesinde en fazla tohumluk üretimi yapılan Agata, Konsul, Granola, Marabel ve Marfona çeşitlerine ait 25'er yumrudan total RNA'lar elde edilmiştir. Total RNA'lardaki PVY, PVX, PVS, PLRV'leri, bu virüslere spesifik primerler kullanılarak RT-PCR ve multiplex RT-PCR yöntemleri ile belirlenmiştir.

RT-PCR yöntemi uygulanarak beş patates çeşidinde dört viral etmenin (PVY, PVX, PVS ve PLRV) varlığı bulunmuştur. Ancak hiçbir yumruda dört viral etmen bir arada bulunmamıştır. Bu nedenle iki (PVX+PVS, PVX+PLRV, PVX+PVY, PVS+PLRV, PVS+PVY, PLRV+PVY) ve üç viral etmenin (PVX+PVS+PLRV, PVS+PVS+PVY, PVS+PLRV+PVY ve PVX+PLRV+PVY) bir arada bulunduğu örnekler için multiplex RT-PCR yöntemi uygulanmış ve örneklerde PVY hariç yöntemin kullanılabilir olduğu belirlenmiştir.

Bir yumruda üç viral etmenin multiplex RT-PCR ile belirlenmesinde PVY' ne ait herhangi bir sonuç alınamamış olsa da PVY' ne ait primer çiftleri ilk kez bu çalışmada denenmiştir.

RT-PCR ve multiplex RT-PCR sonuçları değerlendirildiğinde ise 125 adet yumrudan 75 adedinin dört viral etmeden en az biriyle enfekteli olduğu, buna karşın sadece 50 adet yumrunun sağlıklı olduğu belirlenmiştir.

2007, 43 sayfa

Anahtar sözcükler

Patates sertifikasyon, PLRV, PVY, PVX, PVS, RT-PCR

ABSTRACT

Ph.D Thesis

DETERMINATION OF PVY, PVX, PVS AND PLRV AT POTATO TUBERS WHICH WERE PRODUCED IN ÖDEMiŞ REGION WITH RT-PCR METHOD

MUSTAFA KÖKTEN

Adnan Menderes University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. Serap Açıkgöz

At potato production, for obtaining virus free seed it was important to use fast and sensitive test which defined viruses. RT-PCR method was used to define viral factors at potato tubers. But when the potato tubers infected more than one virus, at first time for obtaining mixture viruses (Potato Y Virus = PVY, Potato X Virus = PVX, Potato S Virus = PVS, Potato Leafroll Virus = PLRV) quickly, usefulness of multiplex RT-PCR method formed this study purpose.

For this purpose, in İzmir-Ödemiş region, total RNA's were extracted from 25 tubers belong to Agata, Consul, Granola, Marabel and Marfona kinds which were used mostly for seed. PVY, PVX, PVS, PLRV at total RNA's were determined using special primers to these viruses with RT-PCR and multiplex RT-PCR methods.

With RT-PCR method, four viral factors were found at five potato kinds. But it wasn't dedected four viral factor together at any tuber. For this reason multiplex RT-PCR method used for samples which have two (PVX+PVS, PVX+PLRV, PVX+PVY, PVS+PLRV, PVS+PVY, PLRV+PVY) and three viral factors (PVX+PVS+PLRV, PVS+PVS+PVY, PVS+PLRV+PVY ve PVX+PLRV+PVY) all together and it was determined that this method can use except PVY.

To determine of three viral factors at one sample with multiplex RT-PCR, for the first time it was tested specific primer pairs belong to PVY with the other viruses'es primer pairs in this study. But it wasn't taken conclusion.

To utilize the RT- PCR and multiplex RT-PCR results, it was determined that 75 of 125 tubers were infected with at least one of four viral factors. In spite of this 50 tubers were healthy.

2007, 43 pages

Key Words:

Potato certification, PLRV, PVS, PVX, PVY, RT-PCR

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın seçiminde, yürütülmesinde ve sonuçlandırılmasında benden yardımını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Serap Açıkgöz'e, bana çalışma süresince her konuda destek olan Sayın Doç. Dr. Hidayet Bostan'a, bana sağladığı imkanlardan dolayı Atatürk Üniversitesi, Bitki Koruma Bölümü'ne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER DİZİNİ

BA	Benzyl Adenin
CCC	Chlorocholine Chloride
dRT-PCR	duplex Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GA	Gibberalic Acid
IBA	Indol Butiric Acid
mRT-PCR	multiplex Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction
NASH	Nucleic Acid Spot Hybridization
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLRV	Potato Leafroll Virus (Patates Yaprak Kıvrılma Virüsü)
PVA	Potato Virüs A (Patates A Virüsü)
PVM	Potato Virüs M (Patates M Virüsü)
PVS	Potato Virus S (Patates S Virüsü)
PVX	Potato Virus X (Patates X Virüsü)
PVY	Potato Virus Y (Patates Y Virüsü)
RT-PCR	Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction
UV	Ultra Viole

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 4.1.** RT-PCR sonuçları. Agata, (PVS: 1, PLRV: 2, PVX: 3, PVY:4), Consul (PVS: 5, PLRV: 6, PVX: 7, PVY: 8), Granola (PVS: 9, PLRV: 10, PVX: 11, PVY: 12), Marabel (PVS: 13, PLRV: 14, PVX: 15, PVY: 16), Marfona (PVS: 17, PLRV: 18, PVX: 19, PVY: 20), M: Marker (Standart).....22
- Şekil 4.2.** Total RNA'lar 1:1 oranında seyreltildiğinde uniplex RT-PCR sonuçları. Agata (PVS: 1, PLRV: 2, PVX: 3, PVY:4), Consul (PVS: 5, PLRV: 6, PVX: 7, PVY: 8), Granola (PVS: 9, PLRV: 10, PVX: 11, PVY: 12), Marabel (PVS: 13, PLRV: 14, PVX: 15, PVY: 16), Marfona (PVS: 17, PLRV: 18, PVX: 19, PVY: 20), M: Marker (Standart).....23
- Şekil 4.3.** Multiplex RT-PCR sonuçları Agata (X+LR: 1, X+S : 2, X+Y: 3, S+Y: 4, LR+Y: 5, LR+S: 6) 1. Consule (X+LR: 7, X+S: 8, X+Y: 9, S+Y: 10, LR+Y: 11, LR+S: 12), 2, Granola: X+LR: 13, X+S : 14, X+Y: 15, S+Y: 16, LR+Y: 17, LR+S: 18), 19: PVS, 20, PLRV, 21:PVX, 22: PVY, M: Marker (Standart).....24
- Şekil 4.4.** Multiplex RT-PCR sonuçları Marabel (X+LR: 1, X+S : 2, X+Y: 3, S+Y: 4, LR+Y: 5, LR+S: 6) 1. Marfona (X+LR: 7, X+S: 8, X+Y: 9, S+Y: 10, LR+Y: 11, LR+S: 12), 13: PVS, 14, PLRV, 15:PVX, 16: PVY, M: Marker (Standart).....25

ÇİZELGELER DİZİNİ

- Çizelge 3. 1.** Çalışmalarda kullanılan primerler, polariteleri ve fragment uzunlukları.....18
- Çizelge 4. 1.** Ödemiş bölgesinde ekilen Agata, Consule, Granola, Marabel, Morfona çeşitlerin yumrularında PVX, PVS, PLRV, PVY ile enfekteli örnek sayısı.....21

1. GİRİŞ

Solanaceae familyası içerisinde yer alan patates (*Solanum tuberosum* L.), yumrularının % 20-30 nişasta, % 2 protein, B₁, B₂, B₆ ve C vitaminleri ile bazı besin elementlerini ihtiva etmesi nedeniyle gıda olarak insanlar, nişasta, alkol ve ispirto endüstrilerinin hammaddesini oluşturması münasebetiyle de endüstri için önemli bir kültür bitkisidir (Esendal, 1990).

Türkiye’de yaklaşık 200 000 hektar patates ekim alanından, yaklaşık 4-5 milyon ton ürün elde edilmekte olup, birim alandan elde edilen verim 20-25 Ton/ha’dır (Anonymous, 2005). Türkiye’de ticari patates üretimin yapıldığı başlıca iller ise Niğde, Nevşehir, Erzurum, İzmir olup, bu illerden İzmir’de patates ekim alanı yaklaşık 12.000 hektar toplam üretim ise 160.000 tondur (Anonymous, 2005).

Türkiye’de patates bitkisinden birim alandan elde edilen verimin arttırılamayışının başlıca nedenlerinden birisi kaliteli tohumluk kullanımındaki yetersizliktir. Tohumluğun kalitesi fizyolojik yaşına, yumru iriliğine, fungus, bakteri, virüs ve benzeri hastalık etmenleri ile bulaşık olup olmamasına bağlıdır (Çalışkan, 1985; Avila et al., 1989; Spiegel and Martin, 1993). Diğer yandan, patates, yumrularıyla üretilen bir kültür bitkisi olması nedeniyle fungus, bakteri, virüs ve benzeri bitki patojenlerine karşı daha duyarlı olup, bu kültür bitkisinde hastalığa neden olan virüsler tohumluk yumrular ile yıldan yıla, yıl içerisinde de bazıları vektörlerle, bazıları mekaniksel olarak ya da her iki şekilde taşınmak suretiyle 3-4 yıl içerisinde tohumluklarda yozlaşmaya neden olmakta, buna bağlı olarak da verimde ciddi derecede kayıplar meydana gelmektedir (Shepard and Claflin, 1975; Beukema and Van der Zaag, 1979; Hu and Wang, 1983; Azeri ve ark., 1985; Tovar et al., 1985; Hooker, 1986; Avila et al., 1989). Üstelik virüsler bitkilerdeki metabolizma faaliyetleri ile çok sıkı ilişki içerisinde olduğu için virüs hastalıklarının doğrudan kimyasal mücadele ile kontrol edilmesi de mümkün olmamaktadır (Walkey, 1991). Bu nedenle virüs hastalıklarından kaynaklanan verim kayıplarının önlenmesinde virüslerden arı tohumluk kullanımı büyük önem arz etmektedir (Jones, 1988; Matthews, 1993; Spiegel and Martin, 1993).

Türkiye'nin yıllık tohumluk patates ihtiyacı her 3-4 yılda bir tohumluk değiştirilmesi esas alındığında 125.000-150.000 ton civarındadır. Türkiye'de virüssüz tohumluk patates üreten özel ya da kamu kuruluşu olmadığı için ticari üretimin yapıldığı illerde tohumluk patates gereksinimi anaç kademesinde özel firmaların yurt dışından ithal edip çoğaltarak sattıkları tohumluklarla, ihtiyaca yönelik üretimin yapıldığı yerlerde ise çiftçilerin kendi üretimlerinden karşılanmaktadır. Buna bağlı olarak da Türkiye her yıl gelişmiş ülkelerden tohumluk ithal etmek zorunda kalmaktadır (Arslan, 1999).

Üretim maliyetleri ile nüfus artışı göz önüne alındığında patates tarımında virüslerden kaynaklanan verim kayıplarının önlenmesi ve birim alandan elde edilen verimin artırılması ülkemiz için bir zorunluluktur. Bunun için de virüslerden arı sertifikalı tohumluk kullanılması, tohumluk üretim alanlarının ticari üretim alanlarından ayrılması, tohumluk üretiminde doku kültürü tekniklerinin kullanılması, afit vektörlerin kontrolü, hem ithalat hem de çoğaltım aşamasında tohumlukların en azından bu virüsler açısından rutin olarak hassas teknikler kullanılarak teste tabi tutulması büyük önem taşımaktadır (Jones, 1988; Spiegel and Martin, 1993).

Günümüzde yaygın bir kullanım alanı olan PCR bitki virüslerinin sınıflandırılmasında, spesifik olarak virüslerin ya da ırklarının hatta izolatlarının odunsu dokularda (Korschineck et al., 1991; Rowhani et al., 1998); dormant patates yumrularında (Robertson et al., 1991; Barker et al., 1993; Spiegel and Martin, 1993; Russo et al., 1999); soğanlarda (Vunsh et al., 1991) ve afitlerde (Spiegel and Martin, 1993; Singh et al., 1996; Singh et al., 1997; Bostan et al., 2004) belirlenebilmesine imkan tanımaktadır.

Bu çalışmada birden fazla virüsün tek bir yumruda tanısı için multiplex RT-PCR' ın kullanılabileceği araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Yapılan çalışmalarda 30'a yakın virüsün ve bir viroid'in doğal olarak patatesi enfekte ettiği, ancak bu virüslerden çoğunun sınırlı bölgeler içerisinde kaldığı, sadece patates yaprak kıvrılma virüsü (Potato Leafroll Virus=PLRV), patates S virüsü (Potato Virus S=PVS), patates Y virüsü (Potato virus Y=PVY) ve patates X virüsünün (Potato Virus X=PVX) dünya genelinde şiddetli enfeksiyonlara neden oldukları ve ciddi derecede verim kayıpları oluşturdukları belirtilmiştir (Peters, 1981; McDonald, 1984; Hooker, 1986; Salazar, 1996; Van Regenmortel et al., 2000).

Dünyada patates tarımının yapıldığı her yerde bulunan ve patates bitkisindeki virüs hastalıkları içerisinde en fazla verim ve kalite kaybına neden olan PVY, Potyviridae grubunun bir üyesi olup, 730x11 nm boyutlarında, esnek çubuksu partiküllere sahiptir (Delgado-Sanchez and Grogan, 1970; Hooker, 1986). PVY'nün patates bitkisinde oluşturduğu semptomların ırka ve çeşitlere göre değiştiği, genel olarak ise yapraklarda mozaik, sararma yanında yaprakların alt yüzeyindeki damarlarda Y şeklinde nekrotik siyah çizgilere, sürgünlerin alt yapraklarında kurumalara ve çoğu kez de bitkilerde ölümlere neden olduğu kaydedilmiştir (Delgado-Sanchez and Grogan, 1970; Hooker, 1986). Enfekteli bitkilerden sağlıklı bitkilere mekaniksel olarak bitki öz suyu ile taşınabilen PVY'nün aynı zamanda patatesteki kolonize olan ya da olmayan çok sayıda afet türü tarafından da non persistent olarak taşınabildiği belirlenmiştir (MacGillivray, 1981; DiFonzo et al., 1996; Salazar, 1996; Ragdale et al., 2001; Alyokhin et al., 2002).

Patatesteki enfeksiyona neden olan virüslerden birisi de PVX'dir. Potexvirüs grubunda yer alan ve afetlerle taşınmayan PVX, esnek çubuk şeklinde, 515x13 nm boyutlarında, tek sarmal RNA'ya sahip olup (Bercks, 1970); doğal koşullarda temasla (yaprak, sürgün ve kök), hasat makineleriyle, yumruların kesiminde kullanılan bıçakla ve bazı böceklerin ağız parçalarıyla mekaniksel olarak kolayca hastalıklı bitkilerden sağlıklı bitkilere taşınabilmektedir (Hooker, 1986). PVX'in patates, domates ve tütün gibi Solanaceae familyasına mensup çok sayıda bitki türünde sistemik, Chenopodiaceae ve Amaranthaceae familyasına mensup bitki türlerinde ise lokal lezyona neden olduğu belirlenmiştir (Bercks, 1970; Mathews,

1970; Hooker, 1986). PVX'nün patatesten neden olduğu simptomların belirlenmesine yönelik yapılmış çalışmalarda ise bu virüsün bazı çeşitlerde cüceleşmeye, yaprak ebatlarında küçülmelere, yapraklarda farklı şiddetlerde mozaik simptomuna neden olduğu, simptomların gelişim ve şiddetinin çeşit ve diğer virüslerle birlikte bulunma durumuna göre değiştiği, bazı çeşitlerde ise belirgin herhangi bir simptoma neden olmadığı saptanmıştır (McDonald, 1984; Hooker, 1986).

Luteovirus grubunun bir üyesi olan ve dünyada patates tarımının yapıldığı her yerde en fazla verim kaybına neden olan PLRV, 24 nm çapında, isometrik partiküllü, tek sarmal RNA içeren bir virüstür (Peters, 1970). Dar bir konukçu çevresine sahip olan, konukçu bitkinin floem dokusunda yoğun olarak bulunan, mekaniksel olarak taşınmayan PLRV, bazı afit türleri tarafından persistent olarak taşınmakta olup, bu virüsün en etkili vektörü yeşil seftali afitidir (*Myzus persicae* Sulzer) (MacGillivray, 1981; Van den Hauvel et al., 1993; Woodford et al., 1995; Salazar, 1996; Singh and Kurz, 1997). PLRV'nün patates bitkisinin yapraklarında kıvrımalara, dikleşmeye, solgunluğa ve bazı çeşitlerde ise genç yapraklarda pembeleşmeye ve kırmızılaşmaya neden olduğu kaydedilmiştir (Wright et al., 1970; Mndolwa et al., 1984; Hooker, 1986; Van den Heuvel and Peters, 1989).

Patatesten dünya genelinde yaygın olan virüslerden bir diğeri de Carlavirus grubu içerisinde yer alan, 700x13 nm boyutlarında esnek çubuk şeklinde, tek sarmal RNA içeren PVS'dir. Doğal şartlarda bitkilerin kök, sürgün ve yapraklarının temasıyla mekaniksel olarak taşınabilen PVS aynı zamanda bazı afitler tarafından non persistent olarak taşınmakta olup, PLRV ve PVY'de olduğu gibi bu virüsün de en etkili vektörünün *M. persicae* olduğu bildirilmiştir (MacGillivray, 1981; Hooker, 1986; Woodford et al., 1995; DiFonzo et al., 1996; Salazar, 1996). Konukçu çevresi patates bitkisi ile sınırlı olan PVS'nin çoğu patates çeşidinde gözle görülür belirgin simptoma neden olmadığı, ancak bazı çeşitlerin yapraklarında derinleşmeye, "S" şeklinde kıvrımalara, sürgünlerde açık büyümeye neden olduğu belirlenmiştir (Hooker, 1986).

Bu virüslerin patates neden oldukları verim kaybının çeşide, virüse, virüslerin tek ya da birlikte bulunma durumlarına göre değişim gösterdiği belirtilerek; PVS'nin % 10-

20, PVX'in % 10-15, (Hooker, 1986); PVY'nin % 54-80, PLRV'nin ise % 45-90 oranında verim kaybına neden olduğu kaydedilmiştir (Wright, 1970; Beemster and Rozendaal, 1972; Pietrak, 1981; Çıtır, 1982; Hooker, 1986; Love and Tauer, 1988).

Tohumluk yumruların testlenmesi amacıyla kullanılacak tekniklerin duyarlı olması, hızlı sonuç vermesi, maliyetinin düşük olması yanında uygulamasının kolay olması gerektiği kaydedilerek (Avila et al., 1989; Samson et al., 1993); serolojik tekniklerden ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ile moleküler tekniklerden PCR'ın (Polymerase Chain Reaction) bu özellikleri taşıdıkları belirtilmiştir (Singh and Somerville, 1992; Barker et al., 1993; Spiegel and Martin, 1993).

Bununla birlikte, PCR tekniğinin ELISA'dan 100-10.000 kat daha duyarlı ve spesifik olduğu (Vunsh et al., 1990; Koerschinec et al., 1991; Rowhani et al., 1995), ELISA tekniğinin yeşil bitki aksamlarından virüslerin belirlenmesinde kullanışlı olmasına karşın, patatest virüslerin dormant yumrulardan, virüs konsantrasyonunun düşük olduğu bitki aksamlarından belirlenmesinde yeteri kadar hassas ve etkili olmadığı belirtilerek, dormant bitki aksamlarından virüslerinin belirlenmesinde PCR tekniğinin kullanılması gerektiği kaydedilmiştir (Singh and Somerville, 1992; Spiegel and Martin, 1993 Singh and Singh; 1996; Loebenstein et al., 1997).

PCR, 1985 yılında Saiki ve arkadaşları tarafından insanlarda kansızlık hastalığının tanısı için geliştirilmiş olup, günümüzde insan, hayvan ve bitkilerde hastalığa neden olan patojenlerin tanısı, farklı kaynaklardan elde edilen DNA'lar arasındaki genetik akrabalıkların saptanması, klonlama ve baz dizilişinin belirlenmesi gibi çok farklı alanlarda ve farklı amaçlarla kullanılmaktadır (White, 1993). PCR tekniğinin esası ise genetik materyalin (DNA ya da RNA) üzerinde seçilen bölgenin spesifik primerler (antisense=reverse ve sense=forward) ve *Taq* polimeraz enzimi kullanılarak bir otomatik "termocycle" sistemle (PCR cihazı) çoğaltılmasıdır (Mathews, 1993).

Bununla birlikte, patates bitkisindeki virüslerin PCR ile belirlenmesinde virüslerin enfekteli bitki dokusundaki konsantrasyonunun, üzerinde çalışılan çeşidin, dormant

patates yumrularının depolanma süresinin (Barker et al., 1993; Spiegel and Martin, 1993; Singh and Singh, 1996); bitki aksamının (Singh and Singh., 1998); bazı çeşitlere ait yumruların içerdiği pigmentlerin, polifenollerin ve polisakaritlerin (Korschineck et al., 1991; John, 1992; De Boer et al., 1995; Hanni et al., 1995; Singh and Singh, 1996; Nassuth et al., 2000; Menzel et al., 2002); nükleik asit ekstraksiyonunda kullanılan metodun, elde edilen RNA kalitesinin ve kullanılan primerlerin belirleyici olduğu kaydedilmiştir (Langeveld et al., 1991; Nicolas and Laliberte, 1991; Singh and Singh, 1996; Singh and Singh, 1997).

PCR çalışmalarının etkinliğini olumsuz yönde etkileyen bu unsurların ortadan kaldırılması için ise nükleik asit ekstraksiyonunda kullanılacak metodun ve içeriğinin önemli olduğu (Spiegel and Martin, 1993; Singh and Singh, 1996; Singh et al., 1996; Singh, 1999); bu maddelerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için ekstraksiyon tamponu içerisine PBS-Tween-20, sodyum sülfid ilave edilmesi (Barbara et al., 1995; Hanni et al., 1995; Singh and Singh, 1996; Singh et al., 2002); nükleik asitin çöktürülmesinde (ekstraksiyon esnasında) isopropenol kullanılması (Singh and Singh, 1996; Zhang et al., 1999), virüs konsantrasyonunun yüksek olması durumunda ise total RNA'nın seyreltilmesi (Singh and Singh, 1996); DNA'ya sahip virüslerle çalışırken RNA'nın; RNA'ya sahip virüslerle çalışırken DNA'nın elimine edilmesi ve cDNA sentezinde total RNA'nın optimizasyonu önerilmiştir (Nassuth et al., 2000; Singh et al., 2002).

Çok sayıda faktör optimize edildiğinde RT-PCR (Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction) tekniği kullanılarak çok sayıda virüs ve ırkının güvenilir şekilde tek ya da grup halinde dormant patates yumrularından belirlenebildiği yapılmış farklı çalışmalarla ortaya konulmuş olup, bu çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

RT-PCR tekniğinin etkinliği üzerinde yapılan çalışmalar başlangıçta o zamana kadar yaygın bir kullanımı olan ELISA ve NASH (Nükleik Asit Spot Hybridizasyon) teknikleri esas alınarak karşılaştırmalı araştırmalar, virüs ve çeşitler arasındaki farklılıklar üzerinde odaklanmıştır. Bu amaçla; Barker et al. (1993), PVY ile enfekteli farklı çeşitlere ait tarla şartlarında yetiştirilen bitkilerden toplanan yaprak örneklerinden, *in vitro* şartlarda yetiştirilen bitkilerden, mikro yumrulardan ve

farklı sürelerde 10 °C’ de depolanmış dormant yumrulardan virüsün belirlenmesinde ELISA ve RT-PCR tekniğini karşılaştırmışlardır. Sonuçta ELISA tekniği ile yapraklardan, *in vitro* şartlarda yetiştirilen bitkilerden ve mikro yumrulardan virüsün belirlenebildiği, dormant yumrulardan virüsün belirlenmesinde ELISA’nın yeteri kadar hassas olmadığını ancak yumruların % 50’sinde virüsün belirlenebildiğini, bu nedenle de dormant yumrularda bu virüsün belirlenmesine yönelik çalışmalarda RT-PCR tekniğinin kullanılmasını önermişlerdir. Aynı araştırmacılar çalışmalarında, PVY’nin RT-PCR ile belirlenmesinde 2-3 haftalık depolamalarda farklılığın olmadığını, 20 haftalık depolamalardan sonra ise ELISA tekniğinin duyarlılığında azalma meydana geldiğini belirlemişlerdir.

Yine Spiegel and Martin (1993), ELISA ve RT-PCR tekniklerinin hassasiyetlerini mukayese etmek amacıyla yaptıkları çalışmada materyal olarak PLRV ile enfekteli olduğu bilinen *in vitro* şartlarda yetiştirilmiş bitkicikler, mikro yumrular, dormant yumrular ve yaprak örnekleri kullanmışlardır. Araştırmada ELISA ile yapraklardan, *in vitro* şartlarda yetiştirilen bitkilerden ve mikro yumrulardan virüsün güvenilir şekilde belirlenebildiği, ancak dormant yumrulardan virüsün belirlenmesinde ELISA tekniğinin yeteri kadar hassas olmadığını belirleyerek dormant yumrularda bu virüsün belirlenmesine yönelik çalışmalarda RT-PCR tekniğinin kullanılmasını önermişlerdir.

Dormant patates yumrularından PLRV’nin belirlenmesinde RT-PCR tekniğinin etkinliğini ve hassasiyetini belirlemek amacıyla yapılan başka bir çalışmada virüsle enfekteli olduğu yaprak dokuları ELISA ile testlenerek belirlenmiş olan bitkilerden yumrular hasat edilip, RT-PCR ile testlenmiş ve RT-PCR’ın setifikasyon amacıyla güvenilir şekilde kullanılabileceği gösterilmiştir (Schoen et al., 1996).

Singh and Singh (1996), PVY’ın iki farklı patates çeşidinde belirlenmesi üzerine çeşitlerin, bitki aksamalarının, yumruların depolama sürelerinin RT-PCR üzerine etkilerini belirlemek için “Shepody” çeşidine ait yumruları farklı sürelerde (30, 45, 60 ve 90 gün) ve iki farklı sıcaklıkta (4 ve 10 °C) depolanmışlardır. Virüsün 10 °C de 60 güne kadar ki depolama süresince dormant yumrulardan RT-PCR ile belirlenmesinde herhangi bir düşüşün olmadığını; 60-90 günlük depolama süresinden

sonra duyarlılığın azaldığını, 4 °C’ de depolanan yumrulara virüsün bu teknikle belirlenmesinde duyarlılığın değişmediğini ancak virüs yoğunluğunun düştüğünü saptamışlardır. Yine aynı araştırmada “Atlantik”, “Russet Norkotah” ve “Shopody” çeşitlerine ait yumrulara PVY’nin adı ırkı olan PVY⁰’ın konsantrasyonu arasında farkın bulunup bulunmadığını araştırmışlardır. Sonuçta RT-PCR ile PVY⁰’ın nükleik asit yoğunluğu “Atlantik” ve “Russet Norkotah” çeşitlerinde 1:4096 seviyesinde seyreltilinceye kadar RT-PCR ile belirlenebilmesine karşın; “Shepody” çeşidinde bu oranın 1:16-1:32 oranında olduğunu ve virüs yoğunluğunun çeşitlerde farklılık gösterdiğini belirlemişlerdir.

RT-PCR çalışmalarının patatesteki virüslerin belirlenmesindeki etkinliklerinin artırılmasında belirleyici unsurlardan birisi de primer seçimi ve dizaynıdır (Singh and Singh, 1997). PVY⁰’ın RT-PCR ile dormant yumrulardan belirlenmesinde primerlerin seçileceği bölgenin ve primer yoğunluğunun etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla genomun 5’ ucundan 1040, 690, 412, ve 217 bp, 3’ ucundan ise 1016, 704, 388 ve 249 bp uzunluğunda nükleik asitleri sentezlemek için 4 farklı primerin farklı konsantrasyonlarını (10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 500 fg, 100 fg, 10 fg, 5 fg, 1 fg, ve 0.2 fg) denemişlerdir. Sonuçta 3’ bölgesinden düzenlenecek primerlerin 5’ den düzenlenenlere göre virüslerin düşük yoğunluklarının belirlenmesinde daha etkili olduğunu, sentezlenen bölge uzunluğunun virüslerin belirlenmesindeki duyarlılığı etkilediğini, amplifiye edilecek genom kısaltıkça hassasiyetin 2-64 kat arttığını ve primer konsantrasyonunun belirli bir dereceye kadar olumlu etki yaptığını belirlemişlerdir.

Singh et al. (1999), tarla şartlarında yetiştirilen sekiz farklı çeşide ait PVY’nin adı ırkı olan PVY⁰ ile enfekteli bitkilerden hasat edilen dormant yumrulara virüsün belirlenmesinde nükleik asit spot hybridizasyon (NASH), ELISA ve RT-PCR’ın hassasiyetini karşılaştırmışlardır. Çalışmada yaprak örneklerinden ve dormansisi kırılmış yumrulara virüsün belirlenmesinde ELISA’nın NASH ve RT-PCR kadar güvenilir sonuç verdiği, dormant yumrulara ise hassasiyetinin azaldığı, bu nedenle dormant yumrulara virüsün belirlenmesi amacıyla ya NASH ya da RT-PCR tekniğinin kullanılması gerektiği, şayet ELISA kullanılacaksa bu durumda yumruların dormansilerinin kırılması gerektiğini kaydetmişlerdir.

Singh (1999), patates bitkisinin yapraklarında, petiollerinde, sürgünlerinde, yumrularında ve tek bir afitte (*Myzus persicae*), PLRV'yi belirlemek için Triton X serisinden 7 iyonik olmayan deterjan kullanmış ve PLRV RNA'sının serbest kalmasında bunların en etkilisinin Triton X 405R olduğunu belirlemiştir. Aynı çalışmada yüksek virüs yoğunluğuna sahip olan "Atlantic" ve "Shebody" çeşitlerine ait dormant yumruların polifenol ve polisakkarit gibi maddeleri elemine etmek için nükleik asitlerin seyreltilmesinde 1 % PVP, BLOTTO, isopropanol çözeltisi ve PBS-Tween-20 kullanılmış ve sonuçları karşılaştırıldıklarında; en iyi sonuç cDNA sentezinde isopropanol çözeltisi ve PBS-Tween-20 içeren cDNA karışımından elde edilmiştir. Diğer taraftan, PVP ilavesinin sentezlenen bazı ürünlerde sonucu iyileştirdiği, bazılarında ise olumsuz etki gösterdiği, isopropanol çözeltisinin ise yalnız başına en iyi sonuç verdiğini saptamıştır.

Patatesteki virüslerin belirlenmesine yönelik yapılmış çalışmaların bir boyutunun da maliyetleri düşürmek, daha kısa sürede sonuç almak, iş gücü ve kimyasal tasarrufu sağlamak maksadıyla birden fazla virüsün aynı anda ve tek reaksiyonda belirlenebilmesini gerçekleştirmek için duplex RT-PCR (dRT-PCR = ikili) ve multiplex RT-PCR (mRT-PCR = ikiden fazla) kullanımı ve optimizasyonudur.

Aynı anda özellikle vejetatif olarak çoğaltılan çok sayıda kültür bitkisinde olduğu gibi patates bitkisi de birden fazla virüs ya da viroidin enfeksiyonuna maruz kalabilmekte, bu viral etmenlerin ayrı ayrı belirlenmeye çalışılması ise uygulamalardaki temel esaslar açısından problemler yaratmaktadır. Bu amaçla sertifikasyon ve sürvey çalışmalarında mRT-PCR tekniğinin kullanımının önemli fayda sağladığı belirtilmiştir (Bertolini et al.,2001). mRT-PCR tekniği çok sayıda primer çiftinin tek reaksiyonda kullanılması ve aynı anda birden fazla virüs ya da viroidin kullanılan primerlere bağlı olarak belirlenmesi esasına dayanmaktadır ki, bu her bir virüs için aynı işlemlerin tekrarlanmasını önlemekte ve aynı zamanda zaman kaybını, maliyeti ve kimyasal sarfiyatı da önlemektedir.

Bitkilerdeki virüs hastalıklarının belirlenmesinde çalışmaların son aşaması klasik PCR'da mRT-PCR iken; gerek ekstraksiyon esnasında kullanılan kimyasalların çevre ve insan sağlığı üzerine olan riskleri, gerekse diğer olumsuzlukları ortadan kaldırmak

için günümüzde çalışmalar real-time RT-PCR ile micro array tekniği üzerinde yoğunlaşmış durumdadır. Dünyada yapılan çalışmaların boyutu bu noktadayken, ülkemizde patates bitkisinde enfeksiyona neden olan virüsler ve virüslerden ari tohumluk üretimine yönelik çalışmaların sınırlı ve az sayıda olduğu görülmektedir.

Çıtır (1982), Türkiye’de patates bitkisindeki mevcut hastalıklara ilave olarak ithal edilen tohumluk yumrularla da bazı virüs hastalıklarının girdiğini, bu virüs hastalıklarından PVX, PVY, PLRV, PVS, PVM (patates M virüsü) ve PVA’nın (Patates A Virüsü) Türkiye’nin önemli üretim bölgelerinde yaygın olarak bulduklarını serolojik olarak belirlemiştir. Araştırmacı, bu virüslerin Erzurum yöresinde çiftçilerin kullandıkları tohumluk patates yumrularındaki yaygınlık oranını saptamak amacıyla yaptığı araştırmada; tohumluk yumruların % 43.6 PVX, % 40.5 PVY, % 5.9 PVS, % 10 PLRV ve ender olarak da PVA ile enfekteli olduğunu belirleyerek, çiftçilerin kullandıkları tohumluk yumruların % 47.8’lik kısmının tek bir virüsle, % 48’lik kısmının iki virüsle bulaşık olduğunu, genel olarak değerlendirildiğinde ise % 95.8’nin en fazla bir virüsle bulaşık olduğunu kaydetmiştir. Benzer şekilde Özbayram (1982), Türkiye’de yetiştiricilerin kullandıkları patates tohumluklarının % 96 oranında virüslerle bulaşık olduğunu kaydederek, enfeksiyon oranındaki bu yüksekliğin nedenini üreticilerin ekim nöbeti ve tohumluk üretim teknikleri konusunda yeterli bilgiye sahip olmamasına bağlamıştır.

Kayım and Koç (1991) *in vitro* şartlarda meristem uç kültürü tekniğini kullanarak 5 farklı patates çeşidine ait bitkilerden PVS ve PLRV virüslerden ari bitkisel materyal elde etmek ve bu çeşitlere ait meristemelerin gelişimini belirlemek için GA₃, (Gibberallic asit) BA (Benzyl Adenin) ve IBA’nın (Indol Butiric Asit) farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını kullanmışlardır. Araştırmada, meristemlerin gelişimi için GA₃ ve BA isteğinin çeşitlere, virüs eliminasyonunun ise çeşide ve virüse göre farklılık arz ettiğini, PLRV’nin farklı oranlarda bütün çeşitlerden elemine edilebilmesine karşın, PVS’nin bazı çeşitlerden elemine edildiğini, bazılarında ise elemine edilemediğini belirlemişlerdir.

Bostan and Açıkgöz (2000), PVX ve PVS virüslerinin bazı test bitkilerinde neden oldukları semptomları belirleyerek, bu virüslerin belirlenmesinde dsRNA analizinin kullanılıp kullanılmayacağını araştırmışlardır. Araştırmada dsRNA analizi ile PVX'in belirlendiği ancak PVS'nin belirlenemediği kaydedilmiştir.

Bostan and Demirci (2004), meristem uç kültürü tekniği kullanarak PVX, PVY ve PLRV ile enfekteli Granola, Pasinler 92 ve Caspar patates çeşitlerinden bu virüslerden arındırılmış mikro yumru elde edilip edilemeyeceğini araştırmışlardır. Bu amaç için çeşitlere ait meristemlerin gelişimi ve *in vitro* çoğaltım için en uygun ortamı belirlenmesinde BA ile GA₃'ün farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını; *in vitro* şartlarda mikro yumru üretiminde ise BA, Chlorocholine chloride (CCC) ve ışığın etkileri incelenmiş ve çalışmaların her aşamasında bitkiler ELISA ile testlenmiştir. Sonuçta, Granola, Pasinler 92 ve Caspar çeşitlerinde meristem gelişimi için 0.50/0.50; çoğaltım için 0.00/0.50 BA/GA₃, mikro yumru üretiminde ise karanlık ortamda 5.0/500 mg/l BA/CCC içeren uygulamanın en iyi sonucu verdiğini belirlemişlerdir. Diğer taraftan virüslerin eliminasyonuna yönelik çalışmalarda sadece meristem uç kültürü tekniği kullanılmış, Granola, Pasinler 92 ve Caspar çeşitlerinden PVX sırasıyla % 25.0, % 16.0, % 28.5; PVY % 40.0, % 41.6, % 33.3; PLRV ise % 60.0, % 46.1, % 50.0 oranlarında elemine edildiğini ELISA ile belirlemişlerdir.

Bostan and Demirci (2004), PVX ve PVY virüsleri ile enfekteli olduğunu ELISA ile belirledikleri Granola, Pasinler 92 ve Caspar patates çeşitlerini sera şartlarında yetiştirip, bu virüslerin neden oldukları semptomları izlemişlerdir. Çalışmada PVX ve PVY virüslerinin tek ve birlikte bulduklarında Granola çeşidine ait bitkilerin % 39'unda, Pasinler 92'de % 46'sında, Caspar çeşidinde ise % 25'inde fark edilebilir herhangi bir semptomun gözlenmediğini belirlemişlerdir.

Türkiye'nin önemli patates üretim alanlarında (Bolu, Erzurum, İzmir, Nevşehir ve Niğde) anaç kademesinde tohumluk şirketlerin ithal edip çoğaltıma tabi tuttukları ve takiben çiftçilere dağıttıkları tohumluk yumrulardaki enfeksiyon oranlarını belirlemek amacıyla ELISA tekniği kullanılarak yapılan çalışmada; tohumlukların

ortalama % 13.28 PLRV, % 6.4 PVS, % 6.9 PVX ve % 16.8 oranında ise PVY ile enfekteli olduğu saptanmıştır (Bostan and Haliloğlu, 2004).

Bostan et al. (2004), Marfona, Agata ve Granola çeşitlerine ait dormant yumrulardan, bu çeşitlere ait yaprak örneklerinden, sera şartlarında yetiştirilen PLRV ile enfekteli bitkilerde beslenen yeşil şeftali afiti (*Myzus persicae* Sulzer) ile tarladaki sarı su tuzaklarından toplanan kanatlı afitlerden PLRV'nin belirlenmesinde RT-PCR tekniğini kullanarak PLRV'nin Kanada izolatının genomuna göre dizayn edilmiş pirmer çiftinin virüsün Türkiye izolatının belirlenmesinde kullanılıp kullanılmayacağını test etmişlerdir. Araştırmacılar bu pirmer çifti ile patates bitkisinin farklı aksamlarından ve virüs ile enfekteli bitkilerden toplanan yeşil şeftali afitinden (*Myzus persicae* Sulzer) virüsü hem tek hem de gruptan (50 afitten) virüsü belirlerken; patates tarlalarına kurdukları sarı su tuzaklarından toplanan afitlerden nested RT-PCR uygulanmasına rağmen bu virüsü belirleyemediklerini kaydetmişlerdir.

Bostan ve Dumlupınar (2006), Türkiye'de PVY'nin PVY^{N/NTN} irkının coğrafik alt gruplarının orijinini belirlemek için spesifik primerler kullanarak RT-PCR ile yaptıkları çalışmada, Türkiye'deki izolatların Avrupa (EU-PVY^{N/NTN}) orijinli olduğunu, Kuzey Amerika (NA-PVY^{N/NTN}) izolatına ise rastlanılmadığını, bununda ülkemize tohumluk ithalatı yoluyla Avrupa ülkelerinden girdiğine bağlamışlardır.

Bostan et al. (2006), tohumluk üretimi için uygun yerlerden birisi olarak gösterilen Erzurum yöresinde tarla içerisindeki inokulum kaynağının afitlerle persistent olarak taşınan PLRV ve non persistent olarak taşınan PVY ve PVS'nin epidemiyolojisi anaç kademesinde ithal edilen tohumluklar kullanılarak araştırmışlardır. Araştırmada, başlangıçta PLRV, PVY ve PVS'nin sırasıyla % 3.40, % 6.47 ve % 5.30 oranında bu virüslerle enfekteli olduğu; ikinci yılda enfeksiyon oranının % 7.66, % 27.0 ve % 21.0'e yükseldiği ve üçüncü yılın sonunda ise bu oranın % 22.33, % 91.0 ve % 77.33 düzeyine ulaştığı belirlenerek tarla içerisinde inokulum olduğu sürece bu virüslerin birkaç yıl içerisinde % 100'e varan yaygınlığa ulaşabileceği belirlenmiştir.

Dünyada ve ülkemizde patatesteki önemli virüsler ile ilgili yapılmış bazı çalışmalar özetlendikten sonra, Türkiye’de patates yetiştiriciliğindeki başlıca problemlerden birisinin sertifikalı tohumluk problemi olduğu ve tohumluk sertifikasyonuna önem verilmesi gerektiği ortadadır.

Hastalıklardan arındırılmış temiz üretim materyalinin kullanılmaması, gelişmekte olan ülkelerde patates üretimini artırmada en önemli engellerden birisidir. Diğer taraftan tohumluk patates üretimi yavaş ve uzun bir süreç olup, bu işlemler aşamasında enfeksiyon kaynağı mevcut olduğu takdirde hastalık oranları artış göstermektedir (Uyen ve Zaag, 1983). Bu nedenle, virüs hastalıklarının hasat sonrası yayılışının engellenmesinin bir yolu dikimden önce tohumluklardaki virüslerin düşük yoğunluklarının bile güvenilir bir şekilde belirlenmesi büyük önem taşımakta olup, bu sertifikalı tohumluk üretiminin bir parçasıdır (Spiegel ve Martin, 1993; Lobenstein ve ark., 1997; Souza-Dias ve ark., 1999; Singh ve ark., 1999).

Virüsler ülkeler arasındaki tarımsal materyallerin özellikle üretim materyallerinin alışverişi ile taşınabilmekte ve bu nedenle çoğu zaman ülkelerin denetim mekanizmalarının işlerliğine ve sertifikasyon programlarındaki uygulamalara bağlı olarak önemli derecede zararlar ortaya çıkabilmektedir. Virüslerin bu şekilde taşınmalarının en aza indirilebilmesinde ve bu yolla ortaya çıkacak zararların önlenmesinde üretim materyallerinin ihraç ve ithal etmeden önce testlenmesi ve sertifikalandırılması büyük önem arz etmektedir. Bununla birlikte virüslerin belirlenmesinde kullanılacak teknik ya da tekniklerin duyarlılık, süratlilik, doğruluk, süreklilik, maliyet ve uygulamada kolaylık gibi özellikleri taşıması gerektiği belirtilerek patates yetiştiriciliğinde ülkemizde virüsten ari tohumluk elde etmek için virüsleri tanımlayabileceğimiz hızlı ve hassas testlerin kullanılması önemlidir (Avila ve ark., 1989; Samson ve ark., 1993).

Patates yumrularındaki viral etmenleri tanımlamakta kullanılan RT-PCR yöntemi hassas bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Aynı anda özellikle vejetatif olarak çoğaltılan çok sayıda kültür bitkisi birden fazla virüslerin enfeksiyonuna maruz kalabilmekte, bu viral etmenlerin ayrı ayrı belirlenmeye çalışılması ise uygulamalardaki temel esaslar açısından problemler yaratmaktadır. Bu amaçla

sertifikasyon ve srvey çalışmalarında m-RT-PCR tekniğinin geliştirilmesi önemli faydalar sağlamıştır (Bertolini et al.,2001). mRT-PCR tekniği çok sayıda primer çiftinin tek reaksiyonda kullanılması ve aynı anda birden fazla virüslerin kullanılan primerlere bağlı olarak belirlenmesi esasına dayanmaktadır ki bu her bir virüs için aynı işlemelerin tekrar tekrar yapılmasını önlemekte ve aynı zamanda zaman kaybını, maliyeti ve kimyasal sarfiyatını da önlemektedir.

Ancak patates yumruları birden fazla virüsle bulaşık olduğunda tek seferde hızlı bir şekilde bu karışım virüsleri (Patates Y Virüsü = PVY, Patates X Virüsü = PVX, Patates S Virüsü = PVS, Patates Yaprak Kıvrıcık Virüsü = PLRV) tanılmak için multiplex RT-PCR yönteminin kullanılıp kullanılmayacağının belirlenmesi bu çalışmanın amacını oluşturmuştur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

Çalışmada, ülkemizde en fazla patates tohumluk üretimi yapılan Ödemiş (İzmir) yöresinde çiftçilerin tohumluk olarak kullandıkları Agata, Konsul, Granola, Marabel ve Marfona çeşitlerine ait 50'şer yumru kullanılmıştır. Yumrular Ödemiş yöresinde patates yetiştiriciliği yapan 25 çiftçiden (her çiftçiden 10 adet) temin edilmiştir.

Toplam 250 adet yumru alınmış ve her çeşide ait 50 yumrudan tesadüfen seçilen 25'er yumru çalışmada kullanılmıştır.

Çalışma 2007 yılında, Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, laboratuvarının imkânlarından yararlanılarak tamamlanmıştır.

3.2. YÖNTEM

Toplam 125 yumrudan total RNA ekstrakte edilmiş ve bu total RNA'lar PVX, PVS, PLRV ve PVY virüslerinin belirlenmesi amacıyla RT-PCR ve multiplex RT-PCR çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2.1. Total RNA Ekstraksiyonu

Dormant yumrulardan total RNA Singh et al. (2002), tarafından önerilen, içeriği örnek sayısına göre Sodyum Sülfid Metodu kullanılarak elde edilmiştir. Buna göre:

1. Yumrulardan Tuber Slicer (Electrowerk, Behcke and Co., Hannover, Germany) kullanılarak 6 damla öz suyu (150-180 µl) içerisinde 300 µl ekstraksiyon bufferi bulunan [(0.1 M Tris HCl, pH 7.4, 2.5 mM MgCl₂, 0.65 % Na₂SO₃ ve 10 U of RNase-free DNase I (Roshe)] eppendorf tüplerinde toplanmıştır. Ekstraksiyon esnasında örneklerin toplanacağı buffer buz içerisinde muhafaza edilmiştir.

Ekstraksiyon bittikten sonra ise her örnek 15-20 saniye vortexlenmiş ve 37 °C' de 10 dakika sıcak su banyosunda bekletilmiştir.

2. Takiben örnekler su banyosundan alınmış ve her bir örnek üzerine 200 µL steril deiyonize su (dH₂O) ile doyurulmuş fenol ilave edilip, örnekler 20 saniye vortexlenmiş ve 12.000 rpm'de +4 °C'de 15 dakika süreyle santrifüjlenmiştir.

3. Örnekler santrüfüjdeyken numaralandırılmış eppendorf tüplerinin içerisine 200 µl d₂H₂O ile doyurulmuş fenol ile 200 µl kloroform : isoamyl alkol (24:1) ilave edilmiştir. Daha sonra örnekler santrüfüjden çıkarılmış ve her örnekten yaklaşık 600 µl üst faz (süpernatant) yeni tüplere transfer edilerek 15-20 saniye vortexlenmiş ve 12.000 rpm'de +4°C'de 15 dakika santrüfüjlenmiştir.

4. Örnekler santrüfüjdeyken boş tüplere 50 µl 3 M NaAc (Sodyum Asetat) ile 500 µl isopropanol ilave edilip, santrüfden alınan örneklerden yaklaşık 500 µl süpernatant örnek numarasına göre bu tüplere nakledilmiş ve 1 gece -20°C'de bekletilmiştir.

5. İnkubasyon periyodundan sonra örnekler 12.000 rpm'de + 4 °C'de 15 dakika santrifüje tabi tutulmuştur. Santrüfüjden sonra süpernatant (üst faz) atılmış ve pelet üzerine % 70'lik (30 ml d₂H₂O + 70 ml % 99.9'luk ethanol) 500 µl ethanol ilave edilmiş ve tekrar 12.000 rpm'de 4 °C'de 15 dakika santrifüjlenmek suretiyle pellet yıkanmıştır.

6. Yıkama işleminden sonra ethanol dökülüp, tüpler ters çevrilip kağıt havluya temas ettirmek suretiyle ethanol kalıntısı uzaklaştırılmış ve daha sonra peletlerin içinde bulunduğu tüpler vakumla (Eppendorf Konsantratör) + 30 °C' de kurutulmuştur. Bu aşamadan sonra yumrulardan elde edilen total RNA'lar 100 µl distile suda vortexlenerek çözülmüş ve RT-PCR için kullanılmak üzere -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

3.2.2.1. cDNA Sentezi

1. cDNA sentezine başlamadan önce sıcak su banyosu 42 °C'ye, ısı bloğu (heat blok) 65 °C'ye ayarlanmış, yeteri kadar buz temin edilip, bir kap içerisine konulmuş ve total RNA sayısı kadar steril eppendorf tüpü numaralandırılmıştır.

2. Total RNA'lar -20 °C' den alınmış ve oda şartlarında çözünmeleri sağlanmıştır. Takiben total RNA'lar kullanılmadan hemen önce vortekslenmiş ve numara sırasına göre total RNA'lardan 2.50 µl alınarak steril eppendorf tüplerinin dip kısmına bırakılmıştır. Negatif kontrol olarak 2.5 µl d₂H₂O, pozitif kontrol olarak ise 2.5 µl daha önce pozitif olduğu belirlenen örnekler kullanılmıştır.

3. Örnekler standart heat blokta 65 °C' de, 5-6 dakika tutulup, buza alınmıştır. Bu süre sonucunda RT karışım [0.2 µl/µl PLRV için spesifik antisense primer (reverse), PVX, PVS ve PVY için 40 ng oligo dT primer 50 mM Tris-HCl (pH: 8.3), 75 mM KCl, 10 mM DDT, 2.5 mM MgCl₂, 1.5 mM dNTPs [(dATP, dCTP, dGTP, dTTP); (Promega)] 20 U RNasin (Promega, Madison, WI), 200 U M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus, Invitrogen)] hazırlanıp, vorteklenmiş ve bu karışımdan her örneğe 7.50 µl ilave edilmiştir. RT karışım total RNA üzerine ilave edildikten sonra pipetle bir kaç defa çekilip bırakılmak suretiyle iyice karıştırılmıştır.

4. Total RNA ve RT karışım 4-5 saniye santrüflendikten sonra sıcak su banyosunda 42 °C' de 1 saat tutulmuş ve reaksiyon 95 °C' de 2-3 dakika ısı bloğunda tutularak sonlandırılmıştır. Sentezlenen cDNA'lar bekletilmeden PCR için kullanılmak üzere -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.2. PCR Çalışması

1. PCR için cDNA'lar – 20 °C'den çıkarılarak oda sıcaklığında çözümleri sağlanmış ve daha sonra 5-6 saniye santrüfüje tabii tutulmuşlardır. Bu arada örnek sayısı kadar PCR tüpü çeşitlere göre numaralandırılmıştır.

2. Takiben örnek sayısına göre 1xPCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ikişer virus için 0.1 µg/µl antisense (reverse) ve 0.1 µg/µl sense primer (forward) (Çizelge 3.1) ile 0.625 U *Taq* polymeraz (Sigma) alınarak, PCR karışımı hazırlanmış ve her örnek için 23 µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Her örneğe numara sırasına göre cDNA'lardan 2 µl PCR tüplerine dağıtılmıştır. Çalışmada PVS için (Mateoušek et al., 2000), PLRV için (Singh ve Singh, 1998), PVX için (Skryabin et al., 1988) ve PVY için (Nie and Singh, 2002), tarafından dizayn edilmiş olan primer çiftleri kullanılmıştır.

3. PCR karışımı üzerine cDNA ilave edildikten hemen sonra örnekler daha önceden programlanmış olan PCR cihazına (Termocykl) konulmuştur. Simplex RT-PCR da amplifikasyon için başlangıçta denaturasyon 94 °C' de 2 dakika, döngü içerisindeki denaturasyon için 94 °C' de 1 dakika, primerlerin bağlanması (primer annealing) için 58 °C' de 45 saniye, sentezin tamamlanması (primer ekstention) için 72 °C' de 2 dakika tutulmuş ve amplifikasyon 35 döngüde gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.1). Son olarak tamamlanmayan bölgelerin tamamlanabilmesi için (Final ekstention) örnekler 72 °C' de 10 dakika tutulmuştur. PCR cihazının kapak ısı 105 °C' ye, program bitişinde inkubasyon sıcaklığı ise + 4 °C' ye ayarlanmıştır.

Çizelge 3. 1. Çalışmalarda kullanılan primerler, polariteleri ve fragment uzunlukları

Virüs	Sequens Primerler	Polarite	Fragment uzunluğu (bp)	Bağlanma Sıcaklığı (°C)
PVS	5'-TGGCGAACACCGAGCAAATG--3' 5'ATGATCGAGTCCAAGGGCACTG-3'	Sense Antisense	187	62
PLRV	5'- CGCGCTAACAGAGTTCAGCC-3' 5'-GCAATGGGGTCCAACATCAT-3'	Sense Antisense	336	62
PVX	5'-TAGCACAACACAGGCCACAG-3' 5'-GGCAGCATTTCATTTTCAGCTTC-3'	Sense Antisense	562	62
PVY	5'-AAGCTTCATACTCACCCGC-3' 5'-CATTGTGCCCCAATTGCC-3'	Sense Antisense	856	58

Program tamamlandığında örnekler PCR cihazından çıkarılmış ve her örneğin içerisine 1µl 6xDYE (% 60 Sucroz +% 0.25 Bromophenol Blue) ilave edilip, jele yüklenmiştir. Örnekler jele yüklenmediği zaman ise boya ilave edilip, kullanılmaya kadar -20 °C’ de muhafaza edilmişlerdir.

3.2.3. Multiplex RT-PCR Çalışmaları

İki ve ikiden fazla virüsle enfekteli olan total RNA’lar multiplex RT-PCR için kullanılmıştır.

3.2.3.1. Multiplex PCR için cDNA Sentezi

Her bir virüs için ayrı ayrı RT-PCR ile testlenen yumrulardan PVX, PVS, PLRV ve PVY virüslerinin her ikisi ya da üçü ile enfekteli olduğu belirlenen yumrulardan elde edilen total RNA’lar numaralandırılmış ve duplex RT-PCR çalışmalarında bu total RNA’lar kullanılmıştır. Duplex RT-PCR için cDNA sentezinde bir örnek için total RNA’dan 3.5 µl, PVS, PVX ve PVY için oligo dT primerin 40 ng/µl (0,5 µl), PLRV için ise spesifik antisense primerin 0.2µg/µl (0,5µl) dNTPs konsantrasyonu 10mM(2 µl) , M-MLV RT (0,5 µl), R Nasin(0,125 µl), DTT (1 µl), H₂O (0,875µl) ve 5x RT buffer(2 µl) olmak üzere 7.5 µl RT karışım kullanılmıştır.

Duplex PCR 4 µl cDNA ile H₂O (11,5 µl) , 10x PCR buffer (11,5 µl), 25 Mm MgCl₂ (4µl), dNTPs 10Mm (1µl), PVS antisense 0,1 µg/µl (0,5 µl), PVS sense 0,1 µg/µl (0,5 µl), PLRV antisense µg/µl (0,5 µl), PLRV sense µg/µl (0,5 µl) ve Taq Polymerase (0,45 µl) olmak üzere 21 µl PCR karışım kullanılmıştır.

PCR cihazında amplifikasyon için program virüslere spesifik primerlerin bağlanma sıcaklıklarına göre programlanmıştır. Buna göre:

İlk aşama denaturasyonu için 94 °C’ de 2 dakika, döngü içerisindeki denaturasyon için 94 °C’ de 45 saniye, primerlerin bağlanması (primer annealing) için 62 °C’ de 30 saniye, sentezin tamamlanması (primer ekstention) için 72 °C’ de 90 saniye olmak üzere 5 tekrarlı olacak şekilde programlanmıştır. İkinci aşama 94 °C’ de 45 saniye, 60 °C’ de 30 saniye, 72 °C’ de 90 saniye olmak üzere 10 tekrar; üçüncü aşamada ise 94

°C' de 45 saniye, 58 °C' de 30 saniye, 72 °C' de 90 saniye olmak üzere 20 tekrar ve son olarak 72 °C' de 10 dakika (final ekstention) tutulmak suretiyle amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Program bitişinde inkubasyon sıcaklığı ise + 4 °C' ye ayarlanmıştır.

3.2.4. Örneklerin Jelde Yürütülmesi

1. Jel yatağı ve tarakları yıkayıp kurulandıktan sonra yatağın açık kısımları izola bantla kapatılarak, düz bir zemin üzerine konulmuş ve % 1.5' lik agaroz jel hazırlanmıştır. Bunun için 150 ml 1xTAE buffer (20 ml 50xTAE Buffer + 980 ml Steril su) içerisine 2.225 g agaroz (invitrogen) tartılıp konulmuş ve hafifçe çalkaladıktan sonra ağzı açık olacak şekilde mikrodalga fırında yaklaşık 1.5 dakika tutulmak suretiyle granüllerinin iyice erimesi sağlanmıştır.

2. Mikro dalga fırından çıkarılan jelin içerisine 150 µl ethidium bromide (% 0.05) ilave edilmiş ve sonra yine hafifçe çalkalanmış ve 10 saniye kadar tekrar mikro dalga fırında tutulmuştur. Takriben oda sıcaklığında bir bez parçası üzerine bırakılarak bekletilmiştir. Sonra jel bez bir kumaş parçası üzerine konulmuş olan jel yatağına kenardan dökülüp, kabarcıklar bir pipet ucuyla toplanmıştır. Bu işlem tamamlandıktan hemen sonra taraklar düz kısmı karşıya gelecek şekilde jel içerisine yerleştirilmiş ve oda sıcaklığında katılaşmaya bırakılmıştır.

3. Jel katılaştıktan sonra üzerine az miktarda 1xTAE buffer ilave edilmiş ve taraklar jelden çıkarılmıştır. Takiben önceden içerisine 1xDYE ilave edilen ve pipet uçları içerisinde bırakılan örnekler 4-5 µl marker (Low DNA Mass Ladder, invitrogen) negatif ve pozitiflerle birlikte jele sırasıyla yüklenmiştir. Yükleme işleme bitirdikten sonra jel yatağının açık kısımlarındaki izola bantlar dikkatlice çıkarılmış ve içerisinde 1xTAE buffer bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

4. Jel yatağı tanka yerleştirildikten sonra kapağı iyice kapatılmış, güç ünitesiyle bağlantısı kurulmuş ve örnekler 70 V ve 100 mA'de 90 dakika yürütülmüştür. Bu sürenin sonunda jel tanktan alınmış ve UV'de (Ultra Viola) kontrol edildikten sonra fotoğraflanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. RT-PCR VE MULTİPLEX RT-PCR UYGULAMALARININ SONUÇLARI

4.1.1. RT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tohumluk yumrularında PVX, PVS, PLRV ve PVY virüslerin bulunma oranlarının belirlenmesi amacıyla 125 adet yumrudan toplam 125 adet total RNA ekstrakte edilmiş ve her bir Total RNA'dan oligo dT (PVX, PVS ve PVY) ve sipesifik primer (PLRV için) kullanılarak 125 adet cDNA sentezlenmiş ve aynı cDNA bu virüslerin dördü için RT-PCR'da kullanılmış sonuçlar Şekil 3.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Ödemiş bölgesinde ekilen Agata, Konsul, Granola, Marabel, Marfona çeşitlerin yumrularında PVX, PVS, PLRV, PVY ile enfekteli örnek sayısı

VİRÜSLER	ÇEŞİTLER					Toplam
	Agata	Konsul	Granola	Marabel	Marfona	
PVX	0	0	0	0	0	0
PVS	2	1	2	2	0	7
PLRV	3	0	0	1	0	4
PVY	5	5	5	3	4	22
PVX+PVS	0	1	1	0	2	4
PVX+PLRV	0	1	1	0	0	2
PVX+PVY	1	1	2	1	2	7
PVS+PLRV	0	1	2	1	2	6
PVS+PVY	2	3	3	1	4	13
PLRV+PVY	0	1	2	1	2	6
PVX+PVS+PLRV	0	0	0	0	0	0
PVX+PVS+PVY	0	0	0	0	1	1
PVS+PLRV+PVY	0	0	0	0	1	1
PVX+PLRV+PVY	0	1	1	0	0	2
Sağlıklı	12	10	6	15	7	50

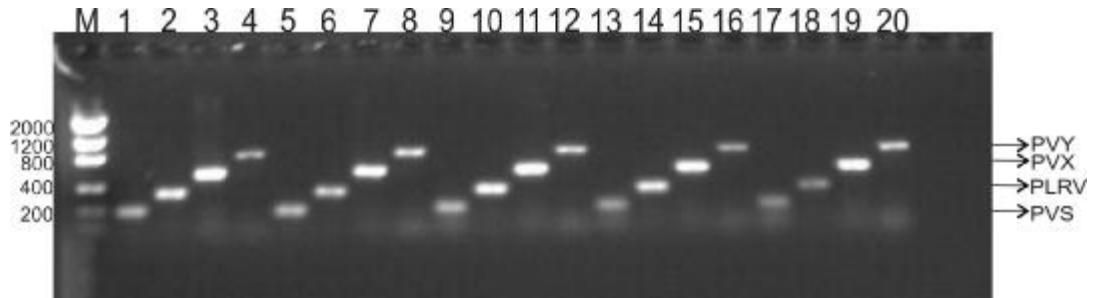
Sonuçlar virüslerin birlikte bulunmalarına göre değerlendirildiğinde Agata, Konsul, Granola, Marabel ve Marfona çeşitlerine ait yumrulardan sırasıyla PVS+PVY; 13, PVX+PVY; 7, PVS+PLRV; 6, PLRV+PVY; 6, PVX+PVS; 4, PVX+PLRV; 2 adet örneğin enfekteli olduğu görülmüştür (Çizelge 4.1).

Çeşitlere ait yumrularda virüslerin 2 den fazla bulunma oranları değerlendirildiğinde ise PVX+PVS+PLRV'nın birlikte bulunduğu belirlenemezken, sadece Marfona çeşidinde 1 yumrunun PVX+PVS+PVY, 1 yumrunun PVS+PLRV+PVY, Konsul ve Granola çeşidinde ise 1 yumrunun PVX+PLRV+PVY ile enfekteli olduğu belirlenmiştir. Buna karşı çeşitlerin hiç birisinde dört virüs birlikte bulunamamıştır (Çizelge 4.1).

Sonuçlar virüsler açısından genel olarak değerlendirildiğinde ise 125 adet yumrudan 75 adedi PVX, PVS, PLRV ve PVY ile en az biriyle enfekteli olduğu, buna karşın sadece 50 adet yumrunun sağlıklı olduğu belirlenmiştir.

Sonuçlara virüsler açısından bakıldığında, bütün çeşitlerde en yaygın virüsün PVY olduğu, bu virüsü PVS ve PLRV' nin takip ettiği, buna karşın PVX' in yoğunluk oranının yok denecek kadar düşük seviyelerde olduğu belirlenmiştir.

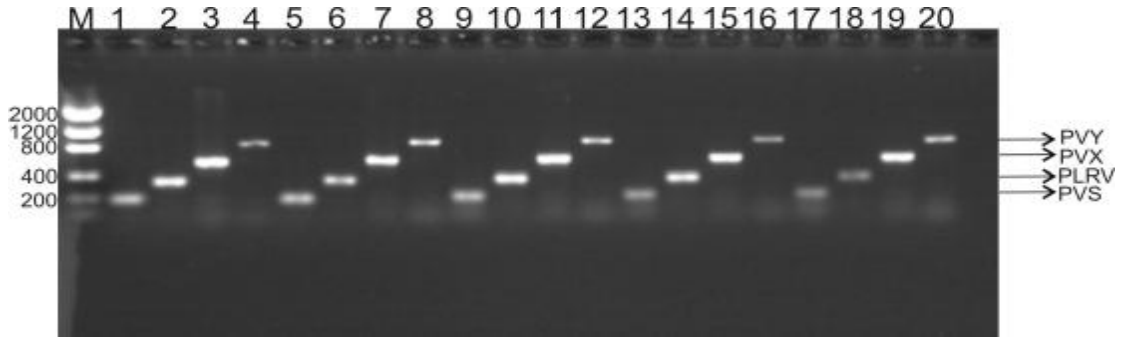
Çalışmada kullanılan bütün virüsler için yumrular RT-PCR ile test edildiğinde UV'de elde edilen bantlar fotoğraflanacak kadar net ve belirgin olarak elde edilmiştir. Çeşitler kendi aralarında mukayese edildiğinde ise standart RT-PCR uygulamasında herhangi bir fark gözlenmemiştir.



Şekil 4. 1. RT-PCR sonuçları. Agata, (PVS: 1, PLRV: 2, PVX: 3, PVY:4), Konsul (PVS: 5, PLRV: 6, PVX: 7, PVY: 8), Granola (PVS: 9, PLRV: 10, PVX: 11, PVY: 12), Marabel (PVS: 13, PLRV: 14, PVX: 15, PVY: 16), Marfona (PVS: 17, PLRV: 18, PVX: 19, PVY: 20), M: Marker (Standart).

4.1.2. Çeşitlerdeki RNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan Agata, Konsul, Granola, Marabel ve Marfona çeşitlerine ait yumrularında virüslerin konsantrasyonlarının yeterli olup olmadığının ve PCR'ı inhibe eden bileşikler içerip içermediklerinin saptanmasında her çeşitten bir adet total RNA 1:1 oranında seyreltmeye tabii tutulduğunda bantların yoğunluğunun seyreltmeye tabii tutulmayanlara göre bütün çeşitlerde belirgin olmasa da azaldığı RT-PCR ile saptanmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. Total RNA'lar 1:1 oranında seyreltildiğinde RT-PCR sonuçları. Agata (PVS: 1, PLRV: 2, PVX: 3, PVY:4), Konsul (PVS: 5, PLRV: 6, PVX: 7, PVY: 8), Granola (PVS: 9, PLRV: 10, PVX: 11, PVY: 12), Marabel (PVS: 13, PLRV: 14, PVX: 15, PVY: 16), Marfona (PVS: 17, PLRV: 18, PVX: 19, PVY: 20), M: Marker (Standart).

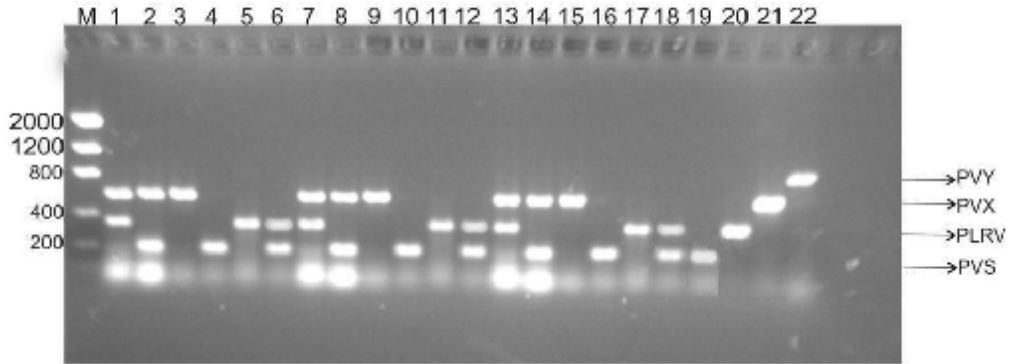
4.1.3. Multiplex RT-PCR Sonuçları

Multiplex RT-PCR ile bu virüslerden ikiden fazlası ile enfekteli olduğu belirlenen total RNA'lar multiplex RT-PCR'ın etkinliğinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Bunun için PVX+PVS için Konsul, Granola ve Marfona çeşitlerinden 1, 1, 1, PVX+PLRV için Konsul, Granola çeşitlerinden 1,1, PVX+PVY için Agata, Konsul, Granola, Marabel ve Marfona için sırasıyla 1, 1, 2, 1, 2, PVS+PLRV için Konsul, Granola, Marabel ve Marfona çeşitlerinden sırasıyla 1, 2, 1, 2; PVS+PVY için Agata, Konsul, Granola, Marabel ve Marfona çeşitlerinden 2, 3, 3, 1 ve 4; PLRV+PVY için Konsul, Granola, Marabel ve Marfona çeşitlerinden 1, 2, 1 ve 2 PVX+PVS+PVY ve PVS+PLRV+PVY için Marfona çeşidinden 1,1, PVX+PLRV+PVY için Konsul ve Granola çeşitlerinden 1,1, olmak üzere her bir

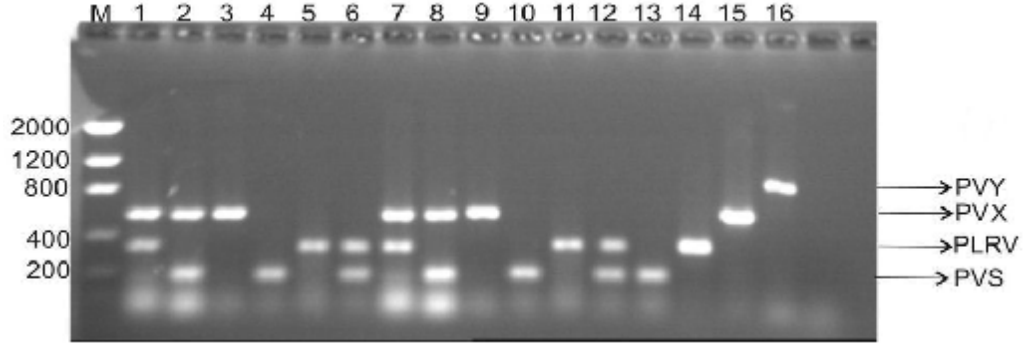
bulaşık örnek yumrudan birer tanesi alınarak toplam 27 örnek kullanılmıştır (Çizelge 4.1).

PVX+PVS, PVX+PLRV'nin birlikte bulunmadığı Agata ve Marabel; PVS+PLRV ile PLRV+PVY'nin birlikte bulunmadığı Agata çeşitlerinde bu virüslerin multiplex RT-PCR ile belirlenmesinde çeşitlerde bu virüslerin belirlendiği total RNA'lar 1:1 oranında karıştırılıp kullanılmıştır.

Her çeşit için birden fazla iki ve daha fazla virüsle bulaşık örnekten birer tanesi alınarak; PVX+PVS, PVX+PLRV, PVS+PLRV PVX+PVY, PVS+PVY ve PLRV+PVY ile enfekteli olduğu RT-PCR ile belirlenen sırasıyla 7, 13, 6, 3, 2, 6 olmak üzere toplam 37 örnekten 23 örnek ve üç virüsle bulaşık 4 örneğin tamamında(Çizelge 4.1) virüsler multiplex RT-PCR ile belirlenebilmiştir. Buna karşın PVX, PVS, ve PLRV'ye spesifik bantlar elde edilirken kombinasyonların hiç birisinde PVY virüsüne spesifik bant görüntülenememiştir (Şekil 4.1, Şekil 4.2).



Şekil 4. 3. Multiplex RT-PCR sonuçları Agata (PVX+PLRV: 1, PVX+PVS : 2, PVX+PVY: 3, PVS+PVY: 4, PLRV+PVY: 5, PLRV+PVS: 6) 1. Konsul (PVX+PLRV: 7, PVX+S: 8, PVX+PVY: 9, PVS+PVY: 10, PLRV+PVY: 11, PLRV+PVS: 12), 2. Granola: PVX+PLRV: 13, PVX+PVS : 14, PVX+PVY: 15, PVS+PVY: 16, PLRV+PVY: 17, PLRV+PVS: 18), 19: PVS, 20: PLRV, 21:PVX, 22: PVY, M: Marker (Standart).



Şekil 4. 4. Multiplex RT-PCR sonuçları Marabel (PVX+PLRV: 1, PVX+PVS : 2, PVX+PVY: 3, PVS+PVY: 4, PLRV+PVY: 5, PLRV+PVS: 6) 1. Marfona (PVX+PLRV: 7, PVX+PVS: 8, PVX+PVY: 9, PVS+PVY: 10, PLRV+PVY: 11, PLRV+PVS: 12), 13: PVS, 14, PLRV, 15:PVX, 16:PVY, M: Marker (Standart).

PCR ürünü 10 µl olarak jelde yürütüldüğünde PVX+PLVR, PVX+PVS, PLRV+PVS kombinasyonlarında virüslere ait bantlar bütün çeşitlerde UV' de görüntülenebilirken; PVY' nin kombinasyonlarında PVY spesifik bant görüntülenememiştir. PCR ürünleri 20 µl olarak jele yüklendiğinde ise yine PVY'nin kombinasyonlarında diğer virüslerden (PVX, PVS ve PLRV) bantlar elde edilirken PVY' ye ait spesifik görüntüler alınamamıştır.

Sonuç olarak gerek RT-PCR gerekse multiplex RT-PCR çalışmaları çeşitler arasında herhangi bir farkın olmadığını ve bu çeşitlere ait dormant yumrulardan PVX, PVS ve PLRV virüslerinin kombinasyonlarında sertifikasyon amacıyla güvenilir şekilde kullanılabilceği, ancak PVY'nin multiplex PCR yerine RT-PCR kullanılarak belirlenmesi gerektiği ortaya konulmuştur. Bunlara ilaveten, bu virüslerin farklı ülkelerdeki izolatların genomları dikkate alınarak dizayn edilmiş olan bu primer çiftlerinin, virüslerin Türkiye'deki izolatlarının belirlenmesinde de kullanılabilceği ortaya konulmuştur.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Testlenen örnek sayısının sınırlı olmasına karşın RT-PCR sonuçları anaç kademedeki ithal tohumluk girişinin en yoğun olduğu Ödemiş (İzmir) yöresinde çiftçilerin kullandıkları tohumluk yumruların ciddi derecede virüslerle enfekteli olduğunu ortaya koymuştur. Bunun nedeni anaç kademedeki ithal edilen tohumlukların bu virüslerle düşük oranda da olsa enfekteli oluşu ya da ticari üretim alanları ile tohumlukların çoğaltıldığı ekim alanlarının aynı bölge içerisinde gerçekleştiriliyor olması ile açıklanabilir. Nitekim daha önce Çıtır (1982) ve Özbayram (1982), Türkiye'ye ithal edilen tohumluk yumrularla virüslerin girdiğini ve çiftçilerin kullandıkları tohumluk yumruların yaklaşık % 95'nin en fazla bir virüsle bulaşık olduğunu kaydetmiştir. Benzer durum ticari patates üretiminin yaygın olduğu illerde firmalar tarafından çiftçilere satılan anaç kademesindeki tohumluk için Bostan and Haliloğlu (2004), tarafından da kaydedilmiştir. Bunun başlıca nedeni gerek ithal edilen, gerekse ithal edildikten sonra çoğaltım aşamasında tohumluk yumruların virüsler açısından teste tabi tutulmayışdır. Patates yumruları ile çoğaltılan bir bitki olması nedeniyle, virüs hastalıkları tohumluk yumrular ile yıldan yıla ve yıl içerisinde de mekaniksel olarak veya vektörlerle taşınarak hızlı bir şekilde yayılış gösterebilmektedir (Cortbaoui, 1984).

Elde edilen sonuçlarda PVX'in yoğunluk düzeyinin afitler tarafından non persistent olarak taşınan PVY ve PVS ile persistent olarak taşınan PLRV'ye oranla düşük oluşunun nedeni PVX'in sadece mekaniksel olarak taşınmasından kaynaklanabilir.

PVY'nin PVS ve PLRV'den daha yoğun oluşunun nedeni ise bu virüslerin taşınma şekillerinin farklılığı ile virüslerin taşınmasında rol oynayan afit türlerinin mevcudiyeti ve popülasyon yoğunluklarından ileri gelebilir. Nitekim PVY'nin enfekteli bitkilerden sağlıklı bitkilere mekaniksel olarak taşınabilmesine ilaveten patatesteki kolonize olan ya da olmayan fakat patatesi ziyaret eden ellinin üzerinde afit türünün kanatlı formları tarafından non persistent olarak taşınabildiği kaydedilmiştir (MacGillivray, 1981; DiFonzo et al., 1996; Ragsdale et al., 2001; Alyokhin et al., 2002). Buna karşın, PLRV'nin 10'dan fazla afit türü tarafından persistent olarak

taşıdığı ve virüsün en etkili vektörü *Myzus persicae* afiti olduğu belirlenmiştir (MacGillivray, 1981; Slack, 1995; Salazar, 1996; Singh and Kurz, 1997; Gildow et al., 2000). PVS'nin PLRV'den daha yoğun oluşu ise yine bu virüsün taşınma şeklinin farklılığı ile açıklanabilir. Nitekim, afitlerle non persistent olarak taşınan PVY ve PVS'nin persistent olarak taşınan PLRV'den daha hızlı bir yayılış gösterdiği belirlenmiştir (Bostan et al., 2006).

Multiplex RT-PCR çalışmalarında, PVS, PVX, PLRV ve PVY kombinasyonlarında, PVX, PVS ve PLRV'ye spesifik bantlar elde edilirken, PVY'e spesifik bant elde edilememesinin nedeninden birincisi bu virüsün belirlenmesinde kullanılan primer çiftinin amplifiye ettiği bölgenin diğerlerinden daha uzun olmasından kaynaklanabilir. Nitekim Singh and Singh (1997), PVY^o'ın RT-PCR'in hassasiyeti üzerinde kullanılacak primer çiftlerinin amplifiye ettikleri fragment uzunlukları arttıkça bant yoğunluğunun azaldığını belirleyerek mümkün olduğu kadar primerlerin amplifiye ettikleri gen uzunluğunun 200-400 bp arasında tutulması gerektiğini ileri sürmüşlerdir. Hâlbuki bu çalışmada PVY için kullanılan primer çiftinin amplifiye ettiği fragment uzunluğu 856 bp iken, PVX için kullanılan primer çiftinin amplifiye ettiği uzunluk 562, PLRV için 336, PVS içinse 187 bp'dir. PVY'den spesifik bant elde edilemeyişinin ikinci nedeni de kullanılan primer çiftinin bu virüsün bütün ırklarını belirlemeye yönelik geniş spektrumlu oluşu olabilir. Bunun sonucu olarak çok sayıda ırkta primerlerin bağlanacağı bölgelerde baz uyumsuzluğu amplifikasyonda gecikmeye buna bağlı olarak da diğer virüslerin amplifikasyonu ile rekabet edememesi olabilir. Üçüncü bir neden ise PVY'nin diğer virüslerle kıyasla doku içerisindeki konsantrasyonunun düşüklüğü olabilir. Zira, Brunt (1988), farklı virus gruplarının bitki dokusu içerisindeki konsantrasyonlarının farklılık gösterdiği Potexvirus grubunda yer alan PVX'in 250-3000 mg/kg, Carlavirus grubu içerisinde yer alan PVS'nin 30-1000 mg/kg ve Potyvirus grubu içerisinde yer alan PVY'nin ise 5-200mg/kg bulunduğunu belirlenmiştir.

Bu çalışmada PVY virüsüne spesifik bant multiplex RT-PCR da elde edilemezken, Nie and Singh (2001), tarafından yapılan çalışmada elde edilmesinin nedeni araştırmacıların sadece bu virüsün PVY^o ırkına spesifik 2 çift primer kullanmaları, kullanılan primerin sadece bir ırka spesifik oluşu, amplifiye ettiği bölge uzunluğunun

kısa oluşu ve kullanılan ekstraksiyon metodunun farklılığından kaynaklanabilir. Nitekim araştırmacıların kullandıkları primer çiftlerinden bir çifti 410 diğeri ise 460 bp olup, sadece PVY'nin PVY^o ırkına spesifiktir. Bizim çalışmada kullandığımız primer çifti ise PVY'nin bütün ırklarını belirleyebilen 856 bp'lik bir uzunluğu amplifiye eden primerlerdir. Diğeri bir neden ise total RNA'nın ekstraksiyonunda kullanılan metodun farklılığıdır. Bizim kullandığımız metot 6 damla özsuynunun rutin saflaştırılması ile gerçekleştirilirken; Nie and Singh (2001) tarafından kullanılan metot 15 damla öz suyunun ilave saflaştırmasını gerektiren bir metottur. İlave saflaştırma işleminin ilave kimyasallara ve iş gücüne gereksinim duyması ise metodun rutin kullanımında maliyet ve hassasiyet açısından kullanılabilirliğini sınırlandıran bir faktördür.

Sonuç olarak, bu virüslerin kombinasyonlarında multiplex RT-PCR ile PVY'ye özellikli bantların görüntülenemeyişi yukarıda bahsedilen sebeplerin biri yada bir kaçından kaynaklanabilir.

Ekstraksiyonda olduğu gibi RT-PCR çalışmalarında da seçilecek metodun hızlı sonuç vermesi yanında ekonomik olması geniş çaplı örnek testlemesinde önemlidir. Birden fazla virüsün tek tek RT-PCR ile belirlenmesi her bir virüs için aynı işlemlerin tekrarlanmasını gerektirdiği için hem zaman ve iş gücü gerektirmekte, hem de maliyetleri artırmaktadır. Bu amaçla, günümüzde aynı patates tohumluk yumrularında birden fazla virüsün belirlenmesi amacıyla multiplex-RT-PCR (m-RT-PCR) tekniği kullanılmaktadır. Multiplex-RT-PCR (mRT-PCR) tekniği çok sayıda primer çiftinin tek reaksiyonda kullanılması ve aynı anda kullanılan primerlere bağlı olarak dokudaki virüslerin belirlenmesi esasına dayanmakta ve bu teknik her bir virüsün belirlenmesi için aynı işlemlerin tekrar tekrar yapılmasını önlediği gibi zaman kaybını, maliyeti ve kimyasal madde sarfiyatını da azaltmaktadır.

Multiplex RT-PCR ilk olarak DNA içeren dokuz farklı virüs (Chamberlain and Chamberlain, 1994); ve RNA içeren 5 farklı virüsün arılaştırılmış RNA'ları kullanılarak uygulanmıştır (Bariana et al., 1994). Takiben taş çekirdekli meyve ağaçlarında (Saade et al., 2000), şeker pancarı ile turplarda (Hauser et al., 2000) ve

zeytinlerde enfeksiyona neden olan virüslerin belirlenmesinde kullanılmıştır (Bertolini vd., 2001).

Patateste ise bu teknik PVX, PVY, PLRV, PVS, PVA (patates A virüsü=potato virus A) ve PSTVd'i (patates iğ yumru viroidi=potato spindle tuber viroid) ile enfekteli patates bitkilerinden elde edilen dormant patates yumrularından bu virüslerin belirlenmesi amacıyla kullanılmış ve her bir virüse sipesifik primer kullanımı yerine genomlarının 3' ucunda poly A kuyruğu (3'-polyadenylatet tract) olan PVY, PVS, PVX ve PVA için cDNA sentezi aşamasında random primer poly A kuyruğu olmayan PLRV ve PSTVd için ise spesifik reverse primer kullanılarak aynı anda bu virüsler mRT-PCR ile belirlenmiştir (Nie ve Singh, 2001).

PCR'da primerlerin seçildiği bölgeye bağlı olarak virüslerin ya da ırklarının karışık enfeksiyonları da belirlenebilmektedir (Langeveld et al., 1991). Singh ve Singh (1998), farklı çeşitlerin yumru ve yapraklarından patates M virüsü (PVM), patates S virüsü (PVS), patates X virüsü (PVX), PVY^o, PVY^N, PVY^{NTN}, PLRV, ve patates iğ yumru viroid (PSTV)'inin nükleik asitlerini ekstrakte etmişler ve PVA genomundan düzenlenen primer çiftleri ile sentezlenip sentezlenemediğini araştırmışlardır. Sonuçta bu primerlerin PVA'nın haricindeki diğer virüsler ile amplifiye olmadığını belirleyerek seçilen primerler ile sadece bir virüsün diğer virüslerden ayırt edilebileceğini göstermişlerdir.

Görüldüğü üzere yapılan çalışmalarda farklı primerlerle multiplex RT-PCR çalışmayı yapmış ancak çalışma metodolojik bir çalışma olarak kurgulanmıştır. Bu çalışmada ise hem metod hem de kullanılan primerler ile materyal pratiğe uygulanabilirlik açısından denenmesi çalışmanın özgün tarafıdır. PVY'nin belirlenmesinde kullanılan primer çiftleri multiplex RT-PCR'da diğer virüslere spesifik primerlerle ilk bu çalışmada birlikte kullanılmıştır.

PCR ile aynı virüsün izolatları arasındaki benzerlik ve farklılıkları da belirlenebilmektedir. Souza-Dias et al., (1999a), 5 farklı coğrafi bölgeden toplanmış ve baz dizimleri belirlenmiş PLRV genomlarının farklı bölgelerinden düzenledikleri 3 primer çiftini kullanarak Brezilya'dan topladıkları PLRV

izolatlarının diğere ÷lkelerdeki izolatlarla akrabalık ilişkilerini araştırmışlardır. Sonuçta Brezilya'dan toplanan izolatların % 99 oranında birbiri ile % 97 oranında Avrupa ve Kanada izolatlarıyla ve % 95 oranında ise Amerika ve Avustralya izolatları ile homolog bölgelere sahip olduğunu saptayarak, seçilecek primerler ile izolatlar arasındaki farklılık ve benzerliklerin belirlenebileceğini göstermişlerdir. Yapılan çalışmada kullanılan primerlerin Türkiye izolatlarına uygunluğu da saptanmıştır.

Bu çalışma paralelindeki öneriler aşağıda sıralanmıştır;

1. Yurt dışından anaç kademedede ithal edilen tohumlukların hem ithalat aşamasında hem de çoğaltım aşamasında örnekleme yöntemiyle RT-PCR ile teste tabi tutulması ve bu amaçla donanımlı bir sertifikasyon laboratuvarının kurulması;
2. Türkiye şartlarına adapta olmuş fakat üretimden kaldırılmış çeşitlerin gerektiğinde tohumluk üretimi yapan firmalara virüslerden ari materyal temini amacıyla muhafazası ve çoğaltımı için donanımlı bir doku kültürü laboratuvarının kurulması ve bu çeşitlere ait materyallerin bu laboratuvarında muhafaza edilmesi;
3. Tohumluk üretim alanlarının ticari üretim alanlarından ayrı yerlerde gerçekleştirilmesi ve bu alanların periyodik olarak değiştirilmesi;
4. Mastır ve doktora programlarında sertifikasyon konusunda eleman yetiştirilmesi;
5. Tohumluk ithal eden, çoğaltan ve satan firmaların rutin olarak denetime tabi tutulması önerilebilir.
6. Multiplex RT-PCR çalışmalarında güvenli sonuç için PVY'nin ayrı teste tabi tutulması gerekebilir.

KAYNAKLAR

- Alyokhin, A., Gary S. and Eleanor G., 2002. Aphid abundance and potato virus Y transmission in imidacloprid-treated Potatoes. *Amer. J. of potato*. 79:225-262.
- Anonymous, 2005. <http://www.fao.org>.
- Arslan, N., M. Uyanık ve A. Gümüşçü, 1999. Türkiye'nin patates tohumluğu ithalatı ve patatesteki tohumluk problemleri. II. Ulusal Patates Kongresi, 28-30 Haziran, 1999, Erzurum, 1-9.
- Avila A.C., Salazar L.F., Hidalgo O.A., Nakashima J. and Dusi, A.N., 1989. Serological techniques and Antiserum Production. *International Potato Center*, 17, 1-8.
- Azeri, T., Yalçın, O., Gündoğdu, M. ve Kaya, N., 1985. Tohumluk patates tarımının zirai mücadele yönünden sorunları. Türkiye Sertifikalı ve Kontrollü Tohumluk Üretim ve Dağıtım Sorunları Sempozyumu, 8-10 Şubat, 1985, İzmir, 451-461.
- Barbara, D.J., Morton, A., Spence, N.J. and Miller, A. 1995. Rapid differentiation of closely related isolates of two plant viruses by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Virol. Methods*, 55: 121-131.
- Barker, H., Webster, K.D. and Reavy, B., 1993. Detection of potato virus Y in potato tubers: a comparison of polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. *Potato Res.* 36, 13-20.**
- Barriana, H.S., Shannon, A.L., Chu, W.G. and Waterhouse, P.M. 1994. Detection of five seed borne legume viruses in one sensitive multiplex polymerase chain reaction test. *Phytopathology*, 84:1201-1205.
- Beemster, A.B.R. and Rozendaal, A., 1972. Potato viruses: properties and symptoms. *Viruses of Potatoes and Seed-Potato Production*, (ed) by, J.A. Baks, PUDUC, Wageningen, p115-142.
- Bercks, R., 1970. Potato Virus X. CMI/AAB. *Descriptions of Plant Viruses* No:4.
- Bertolini, E., Olmos, A., Martinez, M.C., Gorris, M.T. and Cambra, M., 2001. Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees. *J. Virol. Methods*, 96:33-41.
- Beukema, H. P. and Van der Zaag, D. E., 1979, Potato improvement: some factors and facts. *International Agricultural Centre, Wageningen*, p 115-142.

- Bostan, H. and Açıkgöz, S., 2000. Determination of PVX and PVS symptoms on some test plants and identification of these viruses using dsRNA analysis. *The Journal of Turkish Phytopathology*, 29(1): 41:47.
- Bostan, H. and Haliloglu, K., 2004. Distribution of PLRV, PVS, PVX, and PVY (PVY^N, PVY^o and PVY^c) in the seed potato tubers in Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(7):1140-1143.
- Bostan, H. and Demirci, E., 2004. Obtaining PVX, PVY and PLRV-Free Micro Tuber From Granola, Pasinler 92 and Caspar Potato (*Solanum tuberosum* L.) Cultivars. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(7):1135-1139.
- Bostan, H., Xianzhou, N. and Singh, R.P., 2004. An RT-PCR Primer Pair for the Detection and its Application in Surveying Ornamental Plants for Viroids. *J. Virol. Methods*, 116, 189-193.
- Bostan, H. and Dumlupınar, R., 2006. Determination of the incidence rate of geographical sub-groups of PVY^{N/NTN} in seed potato tubers in Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, (in press).
- Bostan, H., Guclu, C., Ozturk, E., Ozdemir, I., and Ilbagi, H., 2006. Influence of aphids on the epidemiology of potato virus diseases (PVY, PVS and PLRV) in the high altitude areas of Turkey, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, (in press).
- Brunt, A. A., 1988. Purification of filamentous Viruses and Virus-Induced Noncapsid Proteins. In: *The Plant Viruses 4* (ed. R. G. Milne). Plenum Press. Newyork and London, 85-110.
- Çalışkan 1985, Türkiye’de tohumluk patates üretim teknolojisi ve sorunları. Türkiye Sertifikalı ve Kontrollü Tohumluk Üretim ve Dağıtım Sorunları Sempozyumu, 8-10 Şubat, 1985, İzmir, 107-116.
- Chamberlain, J.S. and Chamberlain, J.R., 1994. Optimization of multiplex PCR. In: Mullis, K.B., Ferre, F., Gibbs, R.A. (Eds.), *The Polymerase Chain Reaction*. Burkhauser,
- Çıtır, A., 1982. Erzurum ve çevresinde tohumluk patateslerdeki virus hastalıkları ve bunların tanınması üzerinde bazı araştırmalar. *Doğa Bilim Dergisi* 6(3): 99-109.
- Cortbaoui, R., 1984. Roguing potatoes. Technical Information Bulletin 5, International Potato Center (CIP). Lima, Peru, p13.
- De Boer, S.H., Ward, L.J., Li, X. and Chittaranjan, S., 1995. Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of BLOTTO. *Nucleic Acids Res.*23, 2567-2568.**

- Delgado-Sanchez, S. and Grogan, R.G., 1970. Potato Virus Y. C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses. No:37.
- DiFonzo, C.D., Ragsdale, D.W., Radcliffe, E.B., Gudmestad, N.C. and Secor, G.A., 1996. Crop borders reduce potato virus Y incidence in seed potato. *Ann Appl Biol.*, 129:289-302.
- Esendal, E., 1990. Nişasta Şeker Bitkileri ve Islahı I Patates. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Yayınları, No: 49,220s.
- Gildow, F. E., Reavy, B., Mayo, M.A., Duncan, G.H., Woodford, J.A.T., Lamb, W.J. and Hay, R.T., 2000. Aphid acquisition and cellular transport of *Potato leafroll virus-like* particles lacking P5 read through protein. *The American Phytopathological Society*, 90:1153-1159.
- Hanni, C., Brosseau, T., Laudet, V. and Stephelin, D., 1995. Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts. *Nucleic Acid Res.*, 23:881-882.**
- Hauser, S., Weber, C., Vetter, G., Stevens, M., Monique Beuve, and Lemaire, O., 2000. Improved detection and differentiation of poleroviruses infecting beet or rape by multiplex RT-PCR. *J. Virol. Methods*, 89:11-21.
- Hooker, W.J., 1986. Compendium of Potato Diseases. American Phytopathological Society Press., St. Paul, Minnesota, 125p.
- Hu, C.Y. and Wang P.J., 1983. Meristem, Shoot Tip and Bud Cultures. In: Handbook of Plant Cell Culture I. Techniques for Propagation and Breeding (Eds. Evans, D.H., Sharp, W.R., Ammirato, P.V., Yawada, Y.) McMillian Publ. Co., New York and London, 970p.
- John, M.E., 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Res.*, 20:2381
- Jones, E.D., 1988. A current assessment of *in vitro* culture and other rapid multiplication methods in North America and Europe. *Am. Potato J.*, 65, 209-220.
- Kayım, M. and Koç, N.K., 1991. Obtaining of virus-free potato (*Solanum tuberosum* L.) planting stock material through meristem culture. *Doğa Türk Tarım ve Ormancılık Dergisi*, 16(2):380-391.
- Koerschneck I., Himmler G., Sagl R., Steinkellner H. and Katinger H. 1991. A PCR membrane spot assay for the detection of plum pox virus RNA in bark of infected trees *Journal of Virological Methods*, 31:139-146

- Langeveld, S.A., Dore, J.M., Memmelink, J., Derks, A.F.L.M. and Vlugt, V., 1991. Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *J. Gen. Virol.*, 72:1531-1541.
- Loebenstein, G., Berger, P.H., Brunt, A.A. and Lawson, R.H. (eds), 1997, *Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Production of Seed-potatoes*. Huwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 237-270.
- Love, J.M. and Tauer, L.W., 1988, Biotechnology and the economics of reducing viral disease losses in U.S. potato and tomato production. *Applied Agricultural Research*, 3, 187-194.
- MacGillivray, M.E. 1981. Aphids. *In*: Hooker, W.J. (ed), *Compendium of Potato Diseases*. American Phytopathological Society, St. Paul. pp' 101-103.
- Matthews, R. E. F., 1970, *Plant Virology*. Academic Press New York and London. 778 p.
- Matthews, R. E. F., 1993. *Diagnosis of Plant Virus Diseases*. CRS Press, N.W., Boca Raton, Florida. 374 p.
- McDonalds J. G., 1984. Viruses associated with mosaic symptoms in Russet Burbank potato. *Can J. of Plant Path.*, 6, 224-226
- Menzel, W., Jelkmann, W. and Maiss, E., 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *J. Virol. Methods*, 99:81-92.
- Mndolwa, D., Bishop, G., Corsini, D. and Pavek, J., 1984, Resistance of potato clones to the green peach aphid and potato leafroll virus. *Am. Potato J.*, 61, 713-722.
- Nassuth, A., Pollari, E., Helmetczy, K., Stewart, S. and Kofalvi, S.A., 2000. Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. *J. Virol. Methods*, 90:37-49
- Nicolas, O. and Laliberte, J.F., 1991. The use of PCR for cloning of large cDNA fragments of turnip mosaic potyvirus. *Journal of Virological Methods*, 32, 57-66.
- Nie, X. and Singh, R.P., 2001. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves and tubers. *J. Virol. Methods*, 91:37-49

- Özbayram, Ç., 1982, Türkiye’de yetiştirici elinde bulunan patates tohumluğunun virüs hastalıklarıyla bulaşıklık oranının saptanması üzerine araştırmalar, EBZAE, Menemen, İzmir.
- Peters, D., 1970, Potato Leafroll Virus. C.M.I./Å.A.B. Descriptions of Plant Viruses. No:36.
- Peters, D. 1981. An updated list of plant species susceptible to tospoviruses. Pages 107-110
- Pietrak, J., 1981, Effect of the presence of viruses M and S in potato plants . On tuber infection by viruses X and Y. Biuletyn Instytutu Ziemniaka, 26, 25-31.
- Ragsdale, D. W., Radcliffe, E.B. and DiFonzo, CD. 2001. Epidemiology and field control of PVY and PLRV. *In*: Loebenstein, G., P. Berger, A. A Brunt, and R. Lawson (eds), Virus and Virus-like Diseases of Potatoes and Production of Seed-Potatoes. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 237-270.
- Robertson, N.L., Frech, R. and Gray, S.M., 1991. Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. *J. General Virol.*, 72:1473-1477.
- Rowhani, A., Maningas, M.A., Lile, L.S., Daubert, S.D. and Galino, D.A., 1995. Development of a detection system for viruses of wood plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology*, 85:347-352.
- Rowhani, A., Biardi, L., Routh, G., Daubert, S.D. and Galino, D.E., 1998. Development of a sensitive colorimetric-PCR assay for detection of viruses in woody plants. *Plant Diseases*, 8: 880-884.
- Russo, P., Miller, L., Singh, R.P. and Slack, S.A., 1999. Comparison of PLRV and PVY deduction in potato seed samples tested by Florida winter field inspection and RT-PCR. *Amer. J of Potato Res.*, 76:313-316.
- Saade, M., Aparicio, F., Sánchez-Navarro, J.A., Herranz, M.C., Myrta, A., DiTerlizzi, B., and Pallas, V. 2000. Simultaneous detection of the three ilaraviruses affecting stone fruit trees by nonisotopic molecular hybridization and multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 90:1330-1336.
- Samson, R.G., T.C. Allen, J.L. Whitworth, 1993. Evaluation of direct tissue blotting to detect potato viruses. *Am. Potato J.*, 70, 257-265.
- Salazar, L.F. 1996. Potato Viruses and Their Control. CIP, Lima. 214 pp.
- Samson, R.G., Allen, T.C. and Whitworth, J.L., 1993. Evaluation of direct tissue blotting to detect potato viruses. *Am. Potato J.*, 70, 257-265.
- Schoen, C.D., Knorr, D. and Leone, G., 1996. Detection of potato leafroll virus in dormant potato tubers by immunocapture and a fluorogenic 5’ nuclease RT-PCR assay. *Phytopathology*, 86:993-999.

- Shepard, J.F. and Claflin, L.E., 1975. Critical Analyses of the Principles of Seed Potato Certification. *Ann. Rev. Phytopathology* 13: 271-293.
- Singh, R.P. and Somerville, T.H., 1992. Evaluation of the enzyme-amplified ELISA for the deduction of potato viruses A, M, S, X, Y and leafroll. *Am. Potato J.*, 69: 21-30.
- Singh, M. and Sing R.P., 1996. Factors affecting detection of PVY in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction and nucleic acid spot hybridization. *Journal of Virol. Methods*, 60:47-57.
- Singh, R.P., Kurz, J. and G. Boiteau, 1996. Detection of styled-borne and circulative potato virus in aphids by duplex reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application. *J. Virol. Methods*, 59:189-196.
- Singh, M. and Sing, R.P., 1997. Potato virus Y deduction: sensitivity of RT-PCR depends on the size of fragment amplified. *Can J. Plant Pathology*, 19:149-155.
- Singh, R.P., Kurz, J., Boiteau, G. and Moore, L.M., 1997. Potato leafroll virus detection by RT-PCR in field-collected aphids. *American Potato Journal*, 74:305-313.
- Singh, R.P. and Kurz, J., 1997. Potato leafroll virus detection by RT-PCR in field-collected aphids. *Am. Potato J.*, 74:305-313.
- Singh, R.P. and Singh, M., 1998. Specific dedection of Potato virus A in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction. *Plant Diseases*, 82:230-234.**
- Singh, R.P., 1999. A solvent-free, rapid and simple virus RNA-release method for pototo leafroll virus detection in aphids and plants by reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Virol. Methods*, 83:27-33.
- Singh, M., Singh, R.P. and Moore, L., 1999. Evaluation of NASH and RT-PCR for the detection of PVY in dormant tubers and its comparison with visual symptoms and ELISA in plants. *Amer. J. of Potato Res.*, 75:61-66.
- Singh, R.P., Nie, X., Singh, M., Coffin, R., and Duplessis., P., 2002. Sodium Sulphite inhibition in nucleic acid extraction for virus detection by RT-PCR. *J. Virol. Methods*, 99:123-131.
- Skryabin, K. G., Morozov, S. Yu., Kraev, A. S., Rozanov, M. N., Chernov, B. K., Lukashva, L. I. and Atabekov, J. G., 1988. Conserved and variable elements in RNA genomes of potexviruses. *FEBS Letters*, Volume 240, Issues 1-2, 33-40.

- Slack, S.A., 1995. Potato viruses with some implications for production and processing in the United States: a history of problems and solutions. *Summa. Phytopathol.*, 21:273-275.
- Spiegel, S., and Martin, R.P., 1993. Improved detection of potato leafroll virus in dormant potato tubers and micro tubers by the polymerase chain reaction and ELISA. *Ann. Appl. Biol.* 121:493-500.**
- Tovar, P., Estrada, R., Schilde-Rentschler, L. and Dodds, J.H., 1985. Induction and use of *in vitro* potato tubers. *Internasyonel Potato Center*, 13(4):1-3.
- Van den Heuvel, J.F.J.M. and Peters, D., 1989, Improved deduction of potato leafroll virus in plant material and in aphids. *Phytopathology*, 79, 963-967.
- Van den Heuvel, J.F.J.M., Dirven, J.A.A.M. and Peters, D., 1993. Acquisition of potato leafroll virus by *Myzus persicae* from secondarily-infected potato plants of different genotypes. *Potato Res.*, 36:89-96.
- Van Regenmortel, M. H. V, Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E.B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Moniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R., and Wickner, R. B. 2000. Virus taxonomy. Pages 599-621 in: Seventh Report of the ICTV. Academic Press, New York.
- Vunsh, R.A, Roster, A. and Stein, A., 1990. The use of the polymerase chain reaction (PCR) for detection of bean yellow mosaic virus in gladiolus. *Ann. Appl. Biol.* 117:561-569.
- Vunsh, R., Roster, A. and Stein, A., 1991. Detection of bean yellow mosaic virus in gladioli corms by the polymerase chain reaction. *Annals of Applied Biology.* 119:289-294.
- Walkey, D.G.A., 1991. *Applied Plant Virology*. St. Edmundsbury Press, Bury St. Edmunds, Suffolk, USA, 338p.
- White, B.A., 1993. *PCR protocols; current methods and applications*, 397 pp. Humana Press, New Jersey, USA.
- Woodford, J.A.T., Jolly, C.A. and Aveyard, C.S., 1995. Biological factors influencing the transmission of potato leafroll virus by different aphid species. *Potato Res.*, 38:133-141.
- Wright, N.S. 1970, Combined effects of potato viruses X and S on yield of Netted Gem and White Rose potatoes. *Am. Potato J.*, 47, 475-478.
- Wright, N.S., McCarthy, H.R. and Forbes, A.R., 1970, Epidemiology of potato leaf roll virus in the fraser river delta of British Columbia. *Am. Potato J.*, 47, 1-8.

Zhang, X.S., Holt, J. and Colvin, J., 1999. mathematical models of host plant infection by helper-dependent virus complexes: why are helper viruses always avirulent. Analytical and Theoretical Plant Pathol., 90:85-93.

EKLER

EK 1. Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanışı

EK 1.1. 1 L 1 M Tris-HCl Stok pH:7.4 Hazırlanışı

1. 121.1 g Tris Base tartılmıştır.
2. 800 ml d_2H_2O da iyice çözülmüştür.
3. pH 7.4 ayarladıktan sonra otoklav edip +4 °C' de muhafaza edilmiştir. pH'ın 7.4'e ayarlanmasında 250 ml hacim için, 17.5 ml HCl ilave edilmiştir.

EK 1.2. 100 ml Stok 25 mM Stok $MgCl_2$ Hazırlanışı

1 M $MgCl_2$ 'den 100 ml hazırlamak için;

1. 20.3 gr $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ tartılmıştır.
2. 80 ml de çözüp, d_2H_2O 100 ml' ye tamamlanmıştır.

Otoklav ve PH ayarı yapılmamaktadır. Hazırladıktan sonra + 4 °C ' de muhafaza edilmiştir.

EK 1.3. 100 ml % 10'luk Stok Sodium Sulfite Solüsyonun Hazırlanışı

1.10 gr $Na_2 SO_3$ tartılmıştır.

2.90 ml d_2H_2O ile çöz ve d_2H_2O ile 100 ml ye tamamlanmıştır.

Otoklav ve pH ayarı yapılmamaktadır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

EK 1.4. DNase I (RNase free)

Olduğu gibi kullanılmıştır ve -20 °C' de muhafaza edilmiştir. Diğer enzimlerde olduğu gibi daima buzda tutulmuştur. Kullanılmadan önce üzerindeki unite değeri hesaplanmıştır.

EK 1.5. d₂H₂O Saturated Phenol Hazırlanışı

1. 500 gr phenol tart ve behere bırakılmıştır.
2. Beherde son hacim 400 ml olacak şekilde d₂H₂O ilave et ve beheri 40-45 C sıcaklıktaki bir su kabında 1 gece bekletilmiştir. Takiben 500 ml' ye tamamlanmış ve + 4 °C de muhafaza edilmiştir. Kullanırken şişe içerisinde iki faz görünür daima alt kısımdaki fazı kullanılmıştır.

EK 1.6. 100 ml Chloroform:Isoamyl alkol (24:1) Hazırlanışı

Hem cloroformu hem de izoamyl alkol direkt kullanılmıştır. Bunun için 96 ml Chloroformu ölçüp ağzı sıkıca kapanabilen bir kaba bırakılmış ve üzerine 4 ml isoamyl alkol ilave edip karıştırılmıştır. Hazırlandıktan sonra kabın ağzı sıkı şekilde kapatılmıştır.

EK 1.7. 100 ml, 3 M NaAc 3 H₂O (Sodium Asetat) pH:5.2 hazırlanışı

1. 40.8 gr NaAc. 3 H₂O tartılmıştır.
2. 80 ml' de suda çözülmüş ve 3 M Acetik Acid ile pH' ı 5.2'ye ayarlanmış ve hacmi d₂H₂O 100 ml' ye tamamlanmıştır.

EK 1.8. Isopropanol

Olduğu gibi kullanılmış ve daima + 4 °C' de muhafaza edilmiştir.

EK 1.9. 0 % Ethanol

70 ml saf Ethanol alınmış ve 30 ml d_2H_2O ile 100 ml' ye tamamlanmış $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ' de muhafaza edilmiştir. Daima soğuk kullanılmıştır.

EK 1.10. d_2H_2O

Otoklav edilmiş ve olduğu gibi kullanılmıştır. Bu amaç için ticari olarak satılan sular kullanılmıştır.

EK 2. RT-PCR Aşamasında Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışı**EK 2.1. dNTPs Hazırlanışı (dATP, dGTP, dCTP, dTTP):**

Her biri 100 mM'lık ayrı kaplarda geldiği gibi bazı firmaların hazır kitleri kullanılmıştır. Arzu edilen konsantrasyona göre d_2H_2O ilave edilmiştir.

5 mM'lık dNTPs Hazırlamak için;

100 mM'lık dNTPs'lerin her birinden 50 μl alınmış bir eppendorf tüpüne bırakılmıştır. Takiben üzerine 800 μl d_2H_2O ilave edilip 1000 μl 'ye tamamlanmış ve kullanılmıştır. Kullanmadan önce mutlaka vortexlenmiştir. Daima $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ' de muhafaza edilmiştir.

EK 2.2. Primerlerin Hazırlanışı:

Primerler bazen liyofilize, bazen ise sıvı olarak gelmiştir. Üzerindeki değere göre arzu edilen konsantrasyonda su ilavesi ile hazırlanmıştır. Hazırlandıktan sonra daima $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ' de muhafaza edilmiştir.

EK 3. Jel Aşamasında Kullanılan Solüsyonların Hazırlanışı

EK 3.1. 50xTAE Stok Hazırlanışı:

Tris Base: 242 g

Borik Asit: 55 g tartılıp 800 ml d₂H₂O içerisinde iyice çözülmüş ve üzerine 0.5 M EDTA (pH: 8.0) Solüsyonundan 100 ml ilave edilmiş ve pH: 8.5 ayarlanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiş, kullanmadan önce iyice çalkalanmıştır. Elektroforez için ise bu stoktan 1XTAE hazırlayıp kullanılmıştır.

EK 3.2. 1 Litre 1XTAE bufferın Hazırlanışı (Elektroforez Bufferı)

50XTAE Bufferdan 20 ml alınıp, 980 ml d₂H₂O ilave edilerek 1 litreye tamamlanıp elektroforezde kullanılmıştır. Direncin fazla olması ve voltajın düşük olması istendiğinden 1XTAE buffer seyreltilerek kullanılmıştır. + 4 °C' de muhafaza edilmiştir.

EK 3.3. Ethidium Bormide:

% 0.01'lik konsantrasyonlarda firmalardan alınmış ve 150 ml'lik jel için 150 µl ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

EK 3.4. 100 ml Stok 6xDYE Hazırlanışı:

40 g Sucroz tartılıp ağzı kapaklı bir şişeye bırakılmıştır. Üzerine 60 ml d₂H₂O ilave edilip, iyice çözülmüştür. Üzerine % 0.25 Bromophenol Blue tartılmış, ilave edildikten sonra son hacmi 100 ml' ye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

EK 3.5. M-MLV-RT:

Hazır kit olarak gelmiştir. Daima – 20 °C’ de tutulmuştur.

EK 3.6. RNasin:

RT aşamasında kullanılmış ve daima – 20 °C’ de muhafaza edilmiştir. Olduğu gibi kullanılmıştır.

EK 3.7. Taq DNA Polimerase:

Daima buzda ve -20 °C’ de muhafaza edilmiştir. Amaca göre farklı firmaların ürünleri seçilmiştir. Kullanılırken ünite değerleri hesaplanmıştır. Bazı firmalarda bufferlar ayrı ayrı bazılarında ise karışık olarak verilmiştir.

EK 3.8. Low DNA Mass Ladder (Marker=Standart) Hazırlanması

5 Kısım Standart üzerine 1 kısım 1xDYE ilavesi ile hazırlanmıştır. Boya ilavesinden sonra + 4 °C’ de muhafaza edilmiştir. 4-5 µl kullanılmıştır.

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mustafa Kökten
Doğum Yeri ve Tarihi : Ödemiş 19.10.1976

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi
Yüksek Lisans Öğrenimi : Dokuz Eylül Üniversitesi, Biyoloji Öğretmenliği
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

- a) Yayınlar
 - SCI
 - Diğer
- b) Bildiriler
 - Uluslararası
 - Ulusal
- c) Katıldığı Projeler

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : May Tohum Grubu, 2003-

İLETİŞİM

E-posta Adresi : mustafakokten@hotmail.com
Tarih :