DORMANT PATATES YUMRULARINDAN PVX, PLRV, PVS ve PVY VİRÜSLERİNİN BELİRLENMESİNDE MULTİPLEX RT-PCR TEKNİĞİNİN KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Pınar Kübra PEKER

Yüksek Lisans Tezi
Bitki Koruma Anabilim Dalı
Doç. Dr. Hidayet BOSTAN
2007
Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DORMANT PATATES YUMRULARINDAN PVX, PLRV, PVS VE PVY VİRÜSLERİNİN BELİRLENMESİNDE MULTİPLEX RT-PCR TEKNİĞİNİN KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Pınar Kübra PEKER

BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

ERZURUM
2007
Her hakkı saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DORMANT PATATES YUMRULARINDAN PVX, PLRV, PVS ve PVY VİRÜSLERİNİN BELİRLENMESİNDE MULTİPLEX RT-PCR TEKNİĞİNİN KULLANILABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Pınar Kübra PEKER

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hidayet BOSTAN

PLRV, PVS, PVX ve PVY virüslerinin hepsi ile enfekteli olduğu belirlenen Agria, Granola ve Morfano çeşitlerine ait dormant yumrulardan elde edilen total RNA'lar (2.50 µl total RNA +7.5 µl RT karışım ve 2 µl cDNA +23 µl PCR mix) uniplex RT-PCR ile test edildiğinde her üç çeşitten de bütün virüsler için fotoğraflanabilecek yoğunlukta bantlar elde edilmiştir. Multiplex RT-PCR çalışmasında cDNA total RNA'nın 2.5, 3.5 ve 5 µl'lik miktarları kullanılarak sentezlendiğinde en iyi sonuç 5 µl total RNA uygulamasından; PCR aşamasında ise cDNA ve PCR karışımın farklı miktarları (2 µl cDNA +23 µl PCR karışım, 5 µl cDNA +25 µl PCR karışım ile 5 µl cDNA 20 µl PCR karışım) mukayese edildiğinde en iyi sonuç 5 µl cDNA +25 µl PCR karışımdan elde edilmiştir. Bununla birlikte PVX, PLRV ve PVS için UV de görüntülenebilecek yoğunluktaki bantlar ancak PCR ürünlerinin 25 µl olarak jele yüklenmesinden elde edilirken hiçbir uygulamadan PVY'ne spesifik bant elde edilememiştir.

Sonuç olarak; multiplex RT-PCR dormant yumrulardan PVX, PVS, PLRV ve PVY'nün belirlenmesi amacıyla kullanılacaksa cDNA aşamasında 0.4 ng/µl oligo dT pirimer, 20 µg/µl spesifik pirimer (PLRV için) ve 5 µl total RNA kullanılarak sentezlenmesinin, PCR aşamasında ise cDNA'nın en az 3.5 µl kullanılması, PCR ürününün jele 25 µl yüklenilmesi, jelin %1.5'lik hazırlanıp mümkün olduğu kadar ince dökülmesinin UV'de daha iyi bir görüntü elde edilmesi açısından gerekli olduğu saptanmıştır. Bunlara ilaveten PVY'nin mümkünse aynı cDNA kullanılarak ayrı olarak PCR'a tabi tutulması önerilmektedir.

2007, 37 sayfa
Anahtar Kelimeler: VİRÜS**,** PCR, m-RT-PCR, PATATES, SERTİFİKASYON.

ABSTRACT

Master Thesis

THE İNVESTİGATİON THE USAGE OF THE TECHNİC MULTİPLEX RT-PCR, WHİCH DEFİNES THE VIRUSES PVX, PLRV, PVS and PVY FROM İNACTİVE POTATO TUBERS

Pınar Kübra PEKER

Atatürk University
Natural Sciences Institute
Department of Plant Protection

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hidayet BOSTAN

The total RNAs (2.50 µl total RNA +7.5 µl RT mix and 2 µl cDNA +23 µl PCR mix), obtained from dormant tubers belonging to the cvs Agria, Granola and Morfano which were infected with PLRV, PVS, PVX and PVY, were tested with uniplex RT-PCR and the bands, were taken from each of these three cvs intensive enough to be photograph. In the multiplex RT-PCR working cDNA was synthesized with 2.5, 3.5 ve 5 µl for all uses of the total RNA, but the best result was found when 5 µl RNA were synthesizes. At the PCR stage when the different quantities of the cDNA and PCR mixture (2 µl cDNA +23 µl PCR mix, 5 µl cDNA +25 µl PCR mix with 5 µl cDNA 20 µl PCR mix) were compared the best result was obtained from the mixture 5 µl cDNA +25 µl PCR. At the same time the bands, which were intensive enough to be displayed in UV for PLRV, PVS and PVX were only obtained if 25 µl of PCR product was loaded to gel and no spesific band determining to PVY was obtained from any practice. As a result if m-RT-PCR will be used for defining the viruses PLRV, PVS, PVX and PVY from dormant tubers, in order to have beter display in UV, at the cDNA stage it must be synthesized by using 0.4 ng/µl oligo dT primer, 20 µg/µl spesific primer (for PLRV), 5 µl total RNA and at the PCR stage the least 3.5 µl of cDNA must be used, the product of PCR must be loaded to gel 25 µl, %1.5 gel must be prepared and it must be spilled thinly. In addition to these it is suggested that if it is possible, PVY must be dependent on PCR differently by using the same cDNA.

2007, 37 pages
KeyWords: VIRUS**,** PCR, m-RT-PCR, POTATO, CERTIFICATION.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması ve yürütülmesinde yardımını gördüğüm danışmanım Sayın Doç. Dr. Hidayet BOSTAN'a (Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü Öğretim Üyesi) teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam esnasında göstermiş olduğu idari kolaylıklarından dolayı Bölüm Başkanım Sayın Prof. Dr. İrfan ARSLAN'a (Atatürk Üniversitesi, Bitki Koruma Bölümü Öğretim Üyesi), manevi desteklerinden dolayı Sayın Arş. Gör. Arzu GÖRMEZ'e ve arkadaşım Fatih DADAŞOĞLU'na ve eğitimimin her aşamasında sonsuz desteğini gördüğüm canım aileme teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Pınar Kübra PEKER

Ağustos 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET……..... i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
SİMGELER DİZİNİ v
ŞEKİLLER DİZİNİ vi
ÇİZELGELER DİZİNİ vii
1.GİRİŞ……... 1
2. KAYNAK ÖZETLERİ……... 8
3. MATERYAL ve YÖNTEM…… 14
3.1. Materyal ……... 14
3.2. Yöntem ……..... 14
3.2.1. Total RNA ekstraksiyonu ……..... 14
3.2.2. Extraksiyon ortamında kullanılan solüsyonların hazırlanması ……... 16
3.2.3. RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction)çalışmaları 18
3.2.3.1. Uniplex RT-PCR ……..... 18
3.2.3.2. cDNA sentezi (Reverse Transkriptase=RT) …….. 18
3.2.3.3 PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) …….. 19
3.2.4. Multiplex RT-PCR çalışmaları …… 21
3.2.4.1. Multiplex RT- PCR için standart cDNA sentezi …… 21
3.2.4.2. Primer konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi …… 22
3.2.4.3. Total RNA miktarının etkisinin belirlenmesi……. 22
3.2.4.4. PCR Üzerine cDNA miktarının etkisinin belirlenmesi ……. 23
3.2.5. Örneklerin jelde yürütülmesi …… 25
4. ARAŞTIRMA BULGULARI …… 27
4.1. Uniplex RT-PCR sonuçlarının değerlendirilmesi ……... 27
4.2. Multiplex RT-PCR çalışmaları ……... 27
4.2.1. Primer konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi ……..……. 27
4.2.2. Total RNA'nın etkisinin belirlenmesi …….……. 28
4.2.3. cDNA miktarının etkisinin belirlenmesi …….. 29
5. TARTIŞMA ve SONUÇ…… 31
KAYNAKLAR…… 33
ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
cDNA	Komplementer DNA
cm	Santimetre
dRT-PCR	Duplex Reverse transcriptase polymerase chain reaction
d_2H_2O	Deiyonize su
dk	Dakika
DNA	Deoxiribonükleikasit
gr	Gram
h	Saat
L	Litre
mA	Miliamper
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mol	Mol
mRT-PCR	Multiplex Reverse transcriptase polymerase chain reaction
ng	Nanogram
nm	Nanometre
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
s	Saniye
V	Volt

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Dormant yumrulardan yapılan uniplex RT-PCR sonuçları ....……27

Şekil 4.2. cDNA 20 ng oligo dT ile 40 ng oligo dT primer kullanıldığı zaman, elde edilen bantların UV görüntüsü ……...28

Şekil 4.3. cDNA total RNA 2.5 µl, 3.5 µl ve 5 µl kullanıldığı zaman elde edilen bantların UV görüntüsü……...29

Şekil 4.4. PCR, 2 µl cDNA+23 µl PCR, 5 µl cDNA+25 µl PCR, 5µl cDNA+20 µl PCR karışım kullanıldığı zaman elde edilen bantların UV görüntüsü……30

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Ekstraksiyon bufferının içeriği ve örnek sayısına göre kullanılan miktarları …..15
Çizelge 3.2. Unipleks RT karışımda kullanılan solüsyonlar ve miktarları (2.5 µl total RNA +7.5 µl RT karışım) ……....19
Çizelge 3.3. Uniplex PCR' da kullanılan solüsyonlar ve miktarları (2 µl total RNA +23 µl RT karışım) ..…….20
Çizelge 3.4. Çalışmalarda kullanılan primerler, polariteleri ve fragment uzunlukları …….21
Çizelge 3.5. RT-karışım (2.5 µl total RNA+ 7.5 µl karışım) ……...……21
Çizelge 3.6. RT-karışım (5 µl total RNA+ 6.725 µl RT karışım) …….…….. 22
Çizelge 3.7. 4plex PCR (2 µl cDNA + 23 µl PCR karışım) …….23
Çizelge 3.8. 4plex PCR (5 µl cDNA+ 25 µl PCR karışım) ……..24
Çizelge 3.9. 4plex PCR (5 µl cDNA+ 20 µl PCR karışım) ……...……...24

1. GİRİŞ

Solanaceae familyası içerisinde yer alan patates (*Solanum tuberosum* L.) yumrularının nişasta, protein, B_1, B_2, B_6 ve C vitaminlerine ilaveten bazı besin elementlerini ihtiva etmesi nedeniyle insanlar için temel bir gıda kaynağı olması yanında, nişasta, alkol ve ispirto endüstrilerinin hammaddesini oluşturan önemli bir kültür bitkisidir (Esendal 1990).

Türkiye'de toplam patates dikim alanı yaklaşık 200 000 hektar, toplam üretim ise 4-5 milyon ton civarında olup, birim alandan elde edilen verim 2606 kg/da'dır (Anonymous 2005). Dünyada birim alandan elde edilen ortalama verim 1842 kg/da iken; bu değer gelişmiş ülkelerden Hollanda'da 4156, Almanya'da 4198, ABD' de ise 4351 kg/dekardır (Anonymous 2005). Türkiye'de birim alandan elde edilen verim dünya ortalamasının üzerindeyken, gelişmiş ülkelerin ise oldukça altında olup, bunun başlıca nedenlerinden birisi patateste virüs hastalıklarından arî tohumluk kullanımındaki yetersizliktir.

Patates, yumrularıyla üretilen bir kültür bitkisi olduğu için bu kültür bitkisinde enfeksiyona neden olan virüsler tohumluk yumrular ile yıldan yıla, yıl içerisinde de mekaniksel olarak ya da vektörlerle taşınıp hızlı bir şekilde yayılarak (Jones 1988; Bostan *et al*. 2006); tohumluğun çok kısa sürede yozlaşmasına neden olmakta, genelde üç yıldan sonra aynı tohumluğun kullanılması durumunda ise enfeksiyon oranındaki artışa bağlı olarak verimde önemli kayıplar meydana gelmektedir (Spiegel and Martin 1993; Slack 1995).

Diğer yandan virüsler bitkilerdeki metabolizma faaliyetleri ile çok sıkı bir 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 ari tohumluk kullanımı büyük önem taşımaktadır.

Yapılan çalışmalarda 25'den fazla virüsün ve bir viroid'in doğal olarak patatesi enfekte ettiği (Salazar 1996) ancak bu virüslerden çoğunun sınırlı bölgeler içerisinde kaldığı, sadece patates X virüsü (PVX), patates yaprak kıvrılma virüsü (PLRV), patates S virüsü (PVS) ve patates Y virüsünün (PVY) dünya genelinde şiddetli enfeksiyonlara sebep olarak, önemli verim kayıplarına neden oldukları kaydedilmiştir (McDonald 1984; Hooker 1986; Shukla *et al*. 1994; Salazar 1996; Brunt 2001). Üstelik tarla içerisinde enfeksiyon kaynağı mevcut olduğu sürece bu virüslerden bazıları mekaniksel olarak bazıları vektörlerle ya da her iki şekilde de taşınarak kısa süre içerisinde patates bitkisi aynı anda bu virüslerden bir kaçının enfeksiyonuna maruz kalmaktadır (McDonald 1984; Singh 1999).

Dünyada patates tarımının yapıldığı her yerde yaygın olduğu belirtilen virüslerden birisi olan PVX esnek çubuk şeklinde, 515x13 nm boyutlarında, tek dizin pozitif RNA'ya (ssRNA) sahiptir (Bercks 1970). Bitkilerin yaprak, sürgün ve köklerinin temasıyla, hasat makineleriyle, yumruların kesiminde kullanılan araçlarla (bıçakla) ve bazı böceklerin ağız parçalarıyla mekaniksel olarak kolayca taşınabilmesine karşın, PVX vektörle taşınamamaktadır (Hooker 1986). PVX patates, domates ve tütün gibi Solanaseae familyası içerisinde yer alan çok sayıda bitki türünde sistemik enfeksiyona neden olmaktadır (Hooker 1986). PVX'in bazı patates çeşitlerinde cüceleşmeye, yaprak ebatlarında küçülmelere, yapraklarda farklı şiddetlerde mozaik simptomuna neden olduğu, simptomların şiddetinin çeşit ve diğer virüslerle birlikte bulunma durumuna, bitkinin biyolojik dönemine ve çevre şartlarına göre değiştiği; bazı çeşitlerde ise belirgin bir simptoma neden olmadığı kaydedilmiştir (McDonald 1984; Hooker 1986; Bostan ve Demirci 2001).

Patates bitkisinde en fazla verim kaybına neden olan virüslerden birisi PLRV'dir. Luteovirus grubunun bir üyesi olan PLRV, isometrik partiküllü, 24 nm çapında, tek dizin pozitif RNA (ssRNA) içeren bir virüstür (Peters 1970; Hooker 1986). Mekaniksel olarak taşınmayan, konukçu bitkinin floem dokusunda yoğun olarak bulunan ve dar bir konukçu çevresine sahip olan PLRV, 10'dan fazla afit türü tarafından persistent olarak taşınmakta olup, bu virüsün en etkili vektörü yeşil şeftali afitidir (*Myzus percicae*

Sulzer) (MacGillivray 1981; Slack 1995; Salazar 1996; Singh *et al.* 1997; Gildow *et al*. 2000). PLRV'nin patates bitkisinin yapraklarında dikleşmeye, kıvrılmalara, solgunluğa ve bazı çeşitlerde ise genç yapraklarda pembeleşmeye ve kırmızılaşmaya neden olduğu kaydedilmiştir (Mndolwa *et al*. 1984; Hooker 1986; Van den Heuvel and Peters 1989).

Carlavirus grubu içerisinde yer alan, 700x13 nm boyutlarındaki PVS tek dizin pozitif RNA (ssRNA) içeren bir virüstür (Hooker 1986). PVS doğal şartlarda bitkilerin kök, sürgün ve yapraklarının temasıyla mekaniksel olarak ve bazı afitler tarafından non persistent olarak taşınmakta olup, bu virüsün en etkili vektörünün *M. persicae* olduğu kaydedilmiştir (MacGillivray 1981; Hooker 1986; Woodford *et al*. 1995; DiFonzo *et al*. 1996). Konukçu çevresi patates bitkisi ile sınırlı olan PVS'nün çoğu patates çeşidinde gözle görülür belirgin simptoma neden olmadığı, ancak bazı çeşitlerin yapraklarında derinleşmeye, S şeklinde kıvrılmalara, sürgünlerde açık büyümeye neden olduğu kaydedilmiştir (Hooker 1986).

Patates bitkisinde enfeksiyona neden olan ve dünyada patates tarımının yapıldığı her yerde ciddi derecede verim kayıpları oluşturan virüslerden birisi olan PVY, *Potyviridae* familyası içerisinde yer alan *Potyvirus* cinsinin bir üyesi olup, 730x11 nm boyutlarında tek dizin RNA içeren, esnek çubuksu partiküllere sahiptir (Delgado-Sanchez and Grogan 1970; Hooker 1986). Farklı ırkları (PVY^{o}, PVY^{N}, PVY^{C}) olan PVY'nün çoğunluğu *Solanaceae* familyası içerisinde yer alan 60'dan fazla bitki türünde enfeksiyona neden olduğu belirtilmiştir (Hooker 1986). Enfekteli bitkilerden sağlıklı bitkilere mekaniksel olarak bitki öz suyu ile taşınabilen PVY, aynı zamanda patateste kolonize olan *M. persicae*; *Macrosiphum euphorbiae* (Thom.), *Aphis nasturtii* (Kaltenb.) (Ragsdale *et al*. 2001; Alyokhin *et al*. 2002) ve kolonize olmayan fakat patatesi ziyaret eden *Aulocorthum solani* (Kaltenb.), *Aphis gossypii* (Kaltenb.), *Aphis fabae* (David.), *Rhopalosiphoninus latysiphon* (David.) *Capitophorus elaeagni* (delGuerc.), *Diuraphis noxia* (Kurdj.), *Metopolophium dirhodum* (Walk.), *Rhopalosiphum maidis* (Fitch.), *Rhopalosiphum padi* (L.), *Sitobion avenae* (Fab.), *Schizaphis graminum* (Rond.), *M. persicae* (Sulz.), *Brevicoryne brassicae* (L.), *Acyrthosiphon pisum* (Harr.) gibi ellinin üzerinde afit türünün kanatlı formları

tarafından non persistent olarak taşındığı belirlenmiştir (MacGillivray 1981; Halbert *et al*. 1993; Slack 1995; DiFonzo *et al*. 1996; Heimback *et al*. 1998; Alyokhin *et al*. 2002). PVY'nün patates bitkisindeki simptomlarının ırka ve çeşitlere göre değiştiği, genelde bitkilerin yapraklarında mozaik, sararma yanında yaprakların alt yüzeyindeki damarlarda nekrotik siyah çizgilere, sürgünlerin alt yapraklarında kurumalara ve çoğu kez de bitkilerin ölümüne neden olduğu belirlenmiştir (Delgado-Sanchez and Grogan 1970; Hooker 1986; Bostan ve Demirci 2001).

PVX, PLRV, PVS ve PVY virüslerinin patateste neden oldukları verim kaybının virüslerin tek yada birlikte bulunma durumlarına, çeşide ve enfeksiyon zamanına göre değiştiği belirtilerek PVX'nün %10–15, PVS'nün %10–20, PLRV'nün %45–90, PVY'nün %54–80, PVX ile PVM'nün (Patates M Virüsü) birlikte %20, PVX ile PVS'nün %10–30, PVX ile PVY'nin ise birlikte bulunduğu zaman verim kaybının daha yüksek olduğu kaydedilmiştir (Özalp 1964; Wright 1970; Beemster and Rozendaal 1972; Pietrak 1981; Hooker 1986; Love and Tauer 1988; Whirdworth *et al*. 1993).

Ciddi derecede verim kaybı oluşturan bu virüsler; tarla içerisinde inokulum kaynağı mevcut olduğu sürece mekanisel olarak ya da vektörler vasıtasıyla yayılış göstermektedir. Tarla içerisinde ya da yakınlarında inokulum kaynağı mevcut olmadığı durumda non persistent olarak taşınan PVS ve PVY'nin yayılışını engellemek mümkün iken, persistent olarak taşınan PLRV 40–150 km uzaklıktan rüzgâr esiş yönünde sürüklenen *M. persicae*'nin kanatlı formları tarafından taşınabilmektedir (Radcliffe and Ragsdale 2002; Nault 1997). Vektörlerle taşınan PVS, PLRV ve PVY virüslerinin kontrolünde ise tohumluk üretim alanları ile ticari üretim alanlarının birbirinden ayrılması dışarıdan gelebilecek bulaşmaların engellenmesi bakımından önem arz etmektedir. Sadece mekaniksel olarak taşınan ve vektörlerle taşınmayan PVX'nün kontrolü için ise bu virüsten ari tohumluk kullanımı yeterli olmaktadır.

Patates üretiminde virüs hastalıklarından kaynaklanan verim kayıplarının önlenmesi için alınması gereken önlemlerden bir diğeri de gerek ithal edilen gerekse ithal edildikten

sonra ülke içerisinde çoğaltılan tohumluk yumruların virüs hastalıkları açısından rutin teste tabi tutulmasıdır (Jones 1988; Matthews 1993; Spiegel and Martin 1993).

Bu amaçla dormant yumrulardan virüslerin belirlenmesinde kullanılacak tekniklerin duyarlılık, süratlilik, maliyet ve uygulamada kolaylık gibi özellikleri taşıması gerektiği belirtilerek (Avila *et al*. 1989; Samson *et al*. 1993) RT-PCR'ın (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) bu özellikleri taşıdığı kaydedilmiştir (Barker *et al*. 1993; Spiegel and Martin 1993). RT-PCR'ın sürvey çalışmalarında yaygın bir kullanımı olan ELISA'ya (Enzyme Linked Imminosorbent Assay) göre 100–10.000 kat daha duyarlı ve spesifik olduğu (Vunsh *et al*. 1990; Koerschinec *et al*. 1991; Rowhani *et al*. 1995), ELISA tekniğinin virüslerin yumrulardan belirlenmesinde yeteri kadar hassas ve etkili olmadığı ve ELISA'nın kullanılabilmesi için yumruların dormansilerinin kırılmasına ihtiyaç duyulduğu kaydedilmiştir (Barker *et al*. 1993; Spiegel and Martin 1993).

Günümüzde yaygın bir kullanım alanı olan PCR bitki virüslerinin sınıflandırılmasında, grup yada spesifik olarak 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); soğanlarda (Vunsh *et al*. 1991) ve afitlerde (Spiegel and Martin 1993; Singh *et al*. 1996; Singh *et al*. 1997; Bostan *et al*. 2006) belirlenebilmesini mümkün kılmaktadır. Üstelik patates bitkisinde enfeksiyona neden olan virüslerin seçilen primerlere bağlı olarak aynı anda ve tek reaksiyonda belirlenebildiği kaydedilmiştir (Nie and Singh 2001).

PCR genetik materyalin (DNA yada 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).

PCR vasıtasıyla virüsler tek tek (uniplex) belirlenebildiği gibi aynı anda birden fazlası da (multiplex-PCR) belirlenebilmektedir. Bu amaçla ilk defa m-RT-PCR Chamberlain and Chamberlain (1994) tarafından DNA içeren dokuz farklı virüsün DNA kalıpları kullanılarak uygulanmış; takiben Bariana *et al*. (1994) bu tekniği 5 farklı virüsün ayrı

ayrı izole edilmiş pürüfiye RNA'larını kullanarak bitki virüsleri için adapte etmiş ve sonra virüslerin direk dokudan belirlenmesinde (Singh *et al*. 1996; Jacobi *et al*. 1998) kullanmıştır. Daha sonra aynı ya da farklı gruplarda yer alan iki ya da daha fazla virüs ile viroidin belirlenmesinde elmalarda (Menzel *et al*. 2002); havuçlarda (Vercruysse *et al*. 2000); muzlarda (Sharman *et al*. 2000); turp ve şeker pancarında (Hauser *et al*. 2000); zeytinlerde (Bertolini *et al*. 2001); ladin ve çamlarda (Jakobi *et al*. 1998), farklı bitki türlerindeki viroidlerde (Ito *et al*. 2002; Bostan *et al*. 2004); afitlerde (Singh *et al*. 1996) ve patateste (Singh and Singh 1996; Nie and Singh 2001) uygulanmıştır.

Günümüzde bitki virüs hastalıkları açısından RT-PCR tekniğinin en yaygın kullanıldığı alan ekonomik önemi olan, vejetetif olarak çoğaltılan ve birden fazla virüsün konukçusu durumundaki bitkilerde virüslerin belirlenmesine yönelik sertifikasyon programlarıdır. Aynı anda özellikle vejetatif olarak çoğaltılan çok sayıda kültür bitkisi 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 m-RT-PCR tekniğinin geliştirilmesi önemli faydalar sağlamıştır (Bertolini *et al*. 2001). m-RT-PCR tekniği çok sayıda primer çiftinin tek reaksiyonda kullanılması ve aynı anda kullanılan primerlere bağlı olarak dokudaki virüslerin belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Bu tekniğin uygulamada sağladığı en önemli avantaj maliyeti düşürmesi, kimyasal sarfiyatı ile zaman kaybını önlemesidir.

Multiplex RT-PCR'da cDNA sentezi aşamasında her bir virüs için ayrı ayrı antisense primerlerin kullanımı yerine 3' ucunda poly A kuyruğuna sahip olan virüsler için oligo dT (deoxy-oligonucleotides=common primer) kullanılabilmektedir. Oligo dT'nin kullanımı maliyeti düşürmekte, sentezin daha kısa sürede ve daha iyi gerçekleşmesini sağlamaktadır (Singh *et al*. 2000). Bu durumda birden fazla virüsün belirlenmesinde m-RT-PCR kullanılacaksa belirlenmek istenen virüslerin poly A kuyruğuna sahip olup olmadıklarının bilinmesi ve sahip olmayanlar için RT aşamasında spesifik antisense primerlerin oligo dT primer ile birlikte kullanılması, sonuçların jelde yorumlanmasını

kolaylaştırmak için farklı uzunluklarda amplifikasyonu sağlayacak olan primerlerin dizayn edilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (Singh *et al.* 1998; Menzel *et al*. 2002).

Diğer yandan bu tekniğin rutin olarak kullanımında çok sayıda parametrenin optimize edilmesi gerekmektedir. Zira m-RT-PCR tekniğinin uygulanmasındaki en önemli ve belirleyici faktörler; farklı uzunluklarda spesifik primerlerin dizayn edilmesi, amplifikasyon sıcaklığının primerlerin baz içeriğine göre optimizasyonu, primerlerin sentezleneceği bölgelerin baz sayısının saptanması, farklı gruplardaki virüslerin doku içerisindeki konsantrasyonu, cDNA ve PCR aşamasında kullanılacak olan kimyasalların optimizasyonudur.

Diğer yandan bazı bitki dokuları içerisinde yer alan ve PCR'da reaksiyonu inhibe eden bileşiklerin (polisakkarit, renk maddeleri, polifenoller gibi bileşikleri) olumsuz etkilerinin azaltılması gerekmektedir (Nassuth *et al*. 2000; Menzel *et al*. 2002). Bu tip maddelerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için ise; ekstraksiyon metodunun bitki dokusu ve virüse göre seçilmesi, ya da ekstraksiyon bufferı içerisine bu tip maddelerin etkisini azaltan kimyasalların (PVP–40, merkaptoethanol, sodyum sülfit) ilave edilmesi, total RNA'nın presipitasyonunda isoproponolün kullanılması (Henson and French 1993; Rowhani *et al*. 1993; Singh and Singh 1996), RNA içeren virüslerle çalışırken DNA'nın; DNA içeren virüsler ile çalışırken RNA'nın elemine edilmesi ve cDNA sentezinde total RNA'nın optimize edilmesi önerilmektedir (Nassuth *et al*. 2000; Singh *et al*. 2002).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Patateste enfeksiyona neden olan virüslerin RT-PCR ile belirlenmesine yönelik çalışmalar dormant tohumluk yumruların testlenmesi esası üzerine kurulmuş olup, bu amaçla yapılmış farklı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Barker *et al*. (1993); PVY ile enfekteli farklı çeşitlere ait tarla şartlarında yetiştirilen bitkilerden toplanan yaprak örneklerinden, doku kültürü ortamında yetiştirilen bitkicikler ile mikro yumrulardan ve farklı sürelerde 10°C de depolanmış dormant yumrulardan virüsün belirlenmesinde ELISA ve RT-PCR tekniklerininin hassasiyetlerini karşılaştırmışlardır. Sonuçta ELISA ile yaprak örneklerinden, in vitro şartlarda yetiştirilen bitkiler ile mikro yumrulardan virüsün belirlenebildiği, ancak dormant yumrulardan virüsün belirlenmesinde ELISA tekniğinin yeteri kadar hassas olmadığını, bu nedenle de dormant yumrularda bu virüsün belirlenmesine yönelik çalışmalarda RT-PCR tekniğinin kullanılmasını önermişlerdir.

PLRV ile enfekteli dormant yumrulardan ve bu virüsle enfekteli bitkilerde beslenen *M. percicae* afit türünden virüsün RT-PCR ile belirlenip belirlenemeyeceğine yönelik yapılan çalışmada, PLRV dormant yumrulardan, -70ºC de ve oda şartlarında %70'lik ethanolde farklı sürelerde muhafaza edilen tek afitten belirlenebilmiştir (Singh *et al.* 1995).

Singh and Singh (1996); PVY^{o}'ın iki farklı patates çeşidinde belirlenmesi üzerine çeşitlerin, bitki aksamlarının, yumruların depolama sürelerinin RT-PCR üzerine etkilerini saptamak için yaptıkları çalışmada; RT-PCR'rın etkinliğinin çeşitlere göre değiştiğini, virüs konsantrasyonundan ziyade bitki dokusunun PCR'ı inhibe eden bileşikleri içerip içermediğinin belirleyici olduğunu total RNA'yı farklı oranlarda seyreltmeye tabi tutup takiben RT-PCR uygulayarak belirlemişlerdir.

PVY^{o} ile enfekteli farklı çeşitlere ait patates bitkilerinden hasat edilen dormant

yumrulardan virüsün belirlenmesinde ELISA, NASH (nükleik asit spot hybridizasyon) ve RT-PCR tekniklerinin mukayese edildiği çalışmada; yaprak örneklerinden ve dormansileri kırılmış yumrulardan virüsün belirlenmesinde ELISA'nın NASH ve RT-PCR kadar hassas olduğunu, dormant yumrularda ise ELISA'nın hassasiyetinde azalmanın meydana geldiği, bu nedenle dormant yumrularda virüsün belirlenmesi amacıyla ya NASH ya da RT-PCR tekniğinin kullanılması gerektiği, şayet ELISA kullanılacaksa bu durumda yumruların dormansilerinin kırılmasına ihtiyaç olduğu belirlenmiştir (Singh 1999).

Singh *et al*. (2000); PLRV ve PVY'nün duplex RT-PCR ile belirlenmesi üzerine cDNA sentezi aşamasında kullanılan dNTP'nin (0.1, 0.2, 0.5, 1.0 ve 1.5 mM) antisense primer konsantrasyonunun (0.28, 0.83, 0.90 ve 0.97 μM) PCR aşamasında primerlerin bağlanma sıcaklığı (57 ºC ve 60ºC) ve taq polimeraz miktarının etkisini araştırmışlardır. dNTP konsantrasyonun 1.0 mM'ın altındaki konsantrasyonda hem PVY hemde PLRV' den görünebilir bir bant elde edilemediği, 1.0 mM konsantrasyonda PVY'nün belirlenebildiği PLRV'nin ise belirlenemediği, ancak 1.5 mM konsantrasyonda her iki virüsün belirlenebildiğini saptamışlar ve dNTP konsantrasyonun cDNA aşamasında önemli olduğunu saptamışlardır. Yine aynı araştırmacılar antisense primer konsantrasyonunda cDNA aşamasında önemli olduğunu, 57ºC'ye göre 60ºC primer bağlanma sıcaklığının daha iyi sonuç verdiğini ve taq polimeraz konsantrasyonun ise iki katı kullanılmasının sonucu olumlu yönde etkilediğini saptamışlardır.

Patateste enfeksiyona neden olan virüslerin m-RT-PCR ile belirlenmesine yönelik olarak Nie and Singh (2001) tarafından yapılan çalışmada PLRV ve PSTVd (patates iğ yumru viroidi=potato spindle tuber viroids) hariç PVX, PVY, PVA ve PVS'nün cDNA sentezinde oligo dT kullanarak bu virüsleri tek reaksiyonda belirlemişler ve cDNA aşamasında işlemleri kolaylaştırmak için oligo dT primer kullanımının işlerliğini ve bu amaçla kullanılabileceği kaydetmişlerdir.

Multiplex RT-PCR ile farklı gruplarda yer alan virüsler aynı reaksiyonda belirlenebildiği gibi bir virüsün farklı izolatları da belirlenebilmektedir. Nitekim Nie

and Singh (2002a) PVY'nün farklı ırklarını (PVY^{o}, PVY^{N}, EU-PVY^{NTN}, NA- PVY^{NTN}) multiplex RT-PCR ile tek reaksiyonda belirlenebildiğini göstermişlerdir.

Dünyada patateste enfeksiyona neden olan virüslerle ilgili çalışmaların sertifikasyon amacıyla dormant yumrulardan belirlenmesine, ırkların ayrımına, çalışmaların hassasiyet ve güvenilirliği ile maliyetlerin düşürülmesine yönelik yapıldığı, bu amaçla PCR tekniğinin rutin olarak kullanıldığı, klasik PCR çalışmalarının yerini real-time PCR ile microarray tekniğine bırakmak üzere olduğu bu alanda yapılıp yayınlanmış çalışmalardan anlaşılmaktadır. Buna karşın ülkemizde halen donanımlı bir doku kültürü laboratuarı ile işler halde bir sertifikasyon laboratuarının bulunmadığı ve bu alanda yapılan çalışmaların da yeterli olmadığı özetleri sunulan araştırmalardan anlaşılmaktadır.

Bostan ve Demirci (2004); Granola, Pasinler 92 ve Caspar patates çeşitlerinde PVX ve PVY virüslerinin tek ve birlikte bulundukları durumda neden oldukları simptomları belirlemek amacıyla bu virüslerle enfekteli olduğunu ELISA ile belirledikleri bitkileri sera şartlarında yetiştirmiş ve bitkilerde bu virüslerin neden oldukları simptomları izlemişlerdir. Yapılan gözlemlerde, PVX ile enfekteli Granola çeşidine ait bitkilerin %39'unda, Pasinler 92'de %46'sında ve Caspar'da %25'inde fark edilebilir herhangi bir simptomun görülmediğini; diğer bitkilerde mozaik simptomu görüldüğünü kaydetmişlerdir. PVY ile enfekteli Granola çeşidinde bitkilerin %32'sinde, Pasinler 92'de %39'unda, Caspar'da ise %26'sında belirgin bir simptom görülmezken; Granola çeşidinde %68, Pasinler 92'de %55 ve Caspar çeşidinde ise bitkilerin %52'sinde yapraklarda hafif bir sarılık gözlendiği kaydedilerek patateste bu virüslerin gözlemsel olarak güvenilir bir şekilde belirlenemeyeceğini, mutlaka spesifik test tekniklerine gereksinim olduğunu vurgulamışlardır.

Türkiye'nin başlıca ticari patates üretiminin yapıldığı Bolu, Erzurum, İzmir, Nevşehir ve Niğde illerinde anaç kademesinde tohumluk şirketlerin ithal edip çoğaltıma tabi tutukları ve takiben çiftçilere dağıttıkları tohumluk yumrulardaki PVX, PVY, PVS ve PLRV virüslerinin enfeksiyon oranlarını belirlemek amacıyla ELISA tekniği

kullanılarak yapılan araştırmada; tohumlukların ortalama %16.8 PVY, %13.28 PLRV, %6.9 PVX ve %6.4 oranında ise PVS ile enfekteli olduğu belirlenmiştir (Bostan ve Haliloğlu 2004).

Bostan *et al*.(2006) PLRV'nin Kanada izolatının genomuna göre dizayn edilmiş primer çiftinin virüsün Türkiye izolatının belirlenmesinde kullanılıp kullanılamayacağını Morfona, Agria ve Granola çeşitlerine ait dormant yumrularda, bu çeşitlere ait yaprak örneklerinde, sera şartlarında yetiştirilen PLRV ile enfekteli bitkilerde beslenen yeşil şeftali afiti (*Myzus percicae* Sulzer) ile tarladaki su tuzaklarından toplanan kanatlı afitlerde denemişlerdir. Sonuçta bu primer çifti ile virüsün Türkiye izolatının patates bitkisinin farklı aksamlarından ve virüs ile enfekteli bitkilerden toplanan yeşil şeftali afitinden belirlenebildiğini ancak tarla şartlarından toplanan afitlerden ise belirlenemediğini kaydetmişlerdir.

Türkiye'de patatesteki virüslerle ilgili yapılmış çalışmalardan biriside Bostan ve Dumlupınar (2006) tarafından PVY'nün alt grubu olan $PVY^{N/NTN}$ ırkının coğrafik izolatlarının orijinini belirlenmesine yönelik yapılan çalışmadır. 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, bunun da ülkemize tohumluk ithalatı yoluyla Avrupa ülkelerinden girdiğini kaydetmişlerdir.

Türkiye'de patates tarımında karşılaşılan sorunlardan birisi de tohumluk üretimi için uygun yerlerin hala belirlenememiş olmasıdır. Tohumluk üretimi için uygun yerlerden birisi olarak kabul edilen Erzurum ili rakımı yüksek, kışları uzun ve soğuk olan, virüslerin taşınmasında rol oynayan yeşil şeftali afiti için kışlama konukçusu olan *Prunus* türlerinin sınırlı ve bitki çeşitliliğinin az olduğu bir ildir. Tohumluk üretimi için uygun yerlerden birisi olarak gösterilen Erzurum yöresinde afitlerle non persistent olarak taşınan PVY ve PVS ile persistent olarak taşınan PLRV'nin epidemiyolojisi anaç kademesinde ithal edilen tohumluklar kullanılarak araştırılmıştır. Bostan *et al.* (2006) tarafından yapılan bu araştırmada, başlangıçta tohumluk yumrularda PLRV, PVY ve

PVS'nün sırasıyla %3.40, %6.47 ve %5.30 oranında virüslerle enfekteli olduğu; ikinci yılda enfeksiyon oranının %7.66, %27.0 ve %21.0'a ulaştığı ve üçüncü yılın sonunda ise enfeksiyon oranının %22.33, %91.0 ve %77.33 düzeyinde gerçekleştiği belirlenerek tarla içerisinde inokulum olduğu sürece bu virüslerin birkaç yıl içerisinde %100'e varan yaygınlığa ulaşabileceğini belirlemişlerdir.

Dünyada ve ülkemizde yapılmış çalışmalar özetlendikten sonra ülkemizde patates yetiştiriciliğindeki başlıca problemlerden birisinin virüslerden ari sertifikalı tohumluk kullanımın yetersizliği ile sertifikasyona yönelik düzenlemelerin olmadığı anlaşılmaktadır. Hâlbuki virüs hastalıklarından kaynaklanan verim ve kalite kayıplarının önlenmesinde virüssüz sertifikalı tohumluk kullanılması, hem anaç kademede ithal edilen hem de çoğaltılan tohumluk yumruların farklı aşamalarda virüs hastalıkları yönünden teste tabii tutulması ve denetimlerin arttırılması büyük önem taşımaktadır.

Her üç yılda bir tohumluk değiştirilmesi esas alındığında, Türkiye'nin yıllık tohumluk patates ihtiyacı 125.000 ton civarındır. Türkiye'de virüssüz tohumluk patates üreten özel ya da kamu kuruluşu olmadığı için tohumluk patates gereksinimi anaç kademesinde özel firmaların yurt dışından ithal edip çoğaltarak sattıkları tohumluklarla karşılanmakta ancak, birkaç yıl içerisinde bu tohumluklar çoğaltım aşamasında virüslerle enfekte olmak suretiyle tohumluk özelliğini yitirmektedir. Ticari üretimin yapıldığı illerde durum bu iken, ihtiyaca yönelik üretimin yapıldığı yerlerde ise tohumluk talebi çiftçilerin kendi üretimlerinden karşılanmaktadır. Fakat patates tohumluk üretimi yavaş bir süreç olduğu için, üretim ve çoğaltım aşamasında özellikle virüs ve virüs benzeri patojenlerin neden oldukları hastalıkların enfeksiyon oranları artmakta, buna bağlı olarak verim ve kalitede önemli derecede düşüşler meydana gelmektedir. Bu nedenle Türkiye her yıl gelişmiş ülkelerden tohumluk ithal etmek zorunda kalmaktadır.

Mevcut durumda patates tarımındaki sorunlardan birisi de ülkemizin ekolojik şartlarına uygunluğu tescil edilmiş çeşitlerin virüslerden ari olarak *in vitro* şartlarda muhafazasının yapılacağı ve gerektiğinde tohumluk şirketlerine virüssüz materyal temin

edileceği doku kültürü laboratuarın olmayışı, diğeri ise gerek ithal edilen gerekse ithal edildikten sonra çoğaltılıp üreticilere satılan tohumluk yumruların testlenebileceği donanımlı bir sertifikasyon laboratuarının hala kurulamamış olmasıdır.

Yapılan bu çalışmada, dünyada olduğu gibi ülkemizdeki patates ekim alanlarında da yaygın olduğu farklı araştırmalarla ortaya konulmuş olan PVX, PVS, PLRV ve PVY virüslerinin farklı çeşitlere ait dormant yumrulardan multiplex RT-PCR tekniği ile belirlenmesi üzerine etkili faktörleri optimize etmek amaçlanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışma 2005–2007 yılları arasında, Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü laboratuarında yürütülmüş ve tamamlanmıştır.

Çalışmada bitki materyali olarak daha önceki çalışmalarda PVX, PLRV, PVS ve PVY virüslerinin hepsi ile enfekteli olduğu ELISA ve RT-PCR kullanılarak belirlenmiş ve sera şartlarında çoğaltılarak muhafaza edilmiş olan Agria, Granola ve Marfona patates çeşitlerine ait dormant yumrular kullanılmıştır.

3.2.Yöntem

3.2.1. Total RNA ekstraksiyonu

Dormant yumrulardan total RNA içeriği Çizelge 3.1'de verilmiş olan Sodyum Sülfit Metodu (Singh *et al*. 2002) kullanılarak izole edilmiştir.

Çizelge 3.1. Ekstraksiyon bufferının içeriği ve örnek sayısına göre kullanılan miktarlar

Kimyasallar	Test edilen örnek sayısına göre miktarlar (µl)							
	15 örnek	20 örnek	25 örnek	30 örnek	35 örnek	40 örnek	45 örnek	50 örnek
Tris-HCl 1M Stok pH:7.4µL	450	600	750	900	1050	1350	1350	1500
MgCl2 25 mM µL	450	600	750	900	1050	1350	1350	1500
DNase µL	9	12	15	18	21	27	24	30
Sodium Sulfit % 10 Stok µL	293	391	489	587	684	880	782	978
H2O µL	3307	4409	5511	6614	7716	9920	8818	11023

Total RNA izolasyonunda izlenen yöntem aşağıda sırası ile verilmiştir.

1. Yumrulardan Tuber Slicer (Electrowerk, Behcke and Co, Hannover, Germany) kullanılarak 7 damla öz suyu (150–180 µl) içerisinde 300 µl ekstraksiyon bufferı bulunan [(0.1 M Tris HCl, pH 7.4, 2.5 mM $MgCl_2$, %0.65 Na_2SO_3 ve 10 U RNase-free DNase I (Roshe)] eppendorf tüplerinde toplanmış ve örnek 10–15 s vortexlendikten sonra 37°C de 10 dakika sıcak su banyosunda bekletilmiştir.

2. Örnekler sıcak su banyosunda bekletilirken daha önceden örnek sayısına göre numaralandırılmış eppendorf tüpleri içerisine 200 µl steril deiyonize su ile doyurulmuş fenol ilave edilip, örnekler 10-15 saniye vortekslenip, 12.000 rpm'de 4°C'de 15 dakika süreyle santrifüjlenmiştir.

3. Santrüfüjden sonra her örnekten yaklaşık olarak 600 µl üst faz (süpernatant) yeni tüplere transfer edilerek üzerine 200 µl d_2H_2O ile doyurulmuş fenol ile 200 µl kloroform**:**isoamyl alkol (24:1) ilave edilmiş, 10-15 saniye vortekslenmiş ve 12.000 rpm'de 4°C'de 15 dakika santrüfüjlenmiştir.

4. Santrüfüjden sonra yaklaşık 500 µl süpernatant, 500 µl isopropanol ile 50 µl 3 M NaAc (Sodyum Asetat) ilave edilmiş olan tüplere transfer edilerek 1 gece -20 ^{o}C 'de inkübasyona bırakılmıştır.

5. İnkübasyondan sonra örnekler 12.000 rpm'de +4°C'de 15 dakika santrifüjlenmiş, süpernatant (üst faz) atılmış ve pelet üzerine %70'lik 500 µl ethanol ilave edilerek ve tekrar 12.000 rpm'de 4°C'de 15 dakika santrifüjlenmek suretiyle yıkanmıştır.

6. Yıkama işleminden sonra ethanol dökülüp, pelet vaccumla (Eppendorf Concentrator) +30°C de kurutulmuş, 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. Extraxiyon ortamında kullanılan solüsyonların hazırlanışı

1 M Tris-HCl stok hazırlanışı pH: 7.4

121.1 g Tris Base tartılmış, 800 ml d_2H_2O da çözündürülmüş, pH: 7.4'e ayarlanmış, otoklav edilerek +4ºC de muhafaza edilmiştir.

25 mM stok $MgCI_2$ hazırlanışı

20.3 gr $MgCI_2$ 6 H_2O tartılmış, 80 ml d_2H_2O'da çözündürülmüş ve d_2H_2O ile 100 ml'ye tamamladıktan sonra otoklav edilmiştir. PH ayarı yapılmadan kullanılmıştır.

100 ml %10'luk stok sodium sulfit solüsyonun hazırlanışı

10 gr Na_2SO_3 tartılmış, 90 ml d_2H_2O'da çözündürülmüş ve d_2H_2O ile 100 ml ye tamamlanmıştır. Otoklav edilmeden ve pH ayarı yapılmadan kullanılmıştır.

DNase I (RNase free): olduğu gibi kullanılmış ve -20ºC de muhafaza edilmiştir.

d_2H_2O saturated phenol hazırlanışı

500 gr phenol tartılmış, hacim d_2H_2O ile 500 ml tamamlanmış, içerisinde çözündürülmüş ve 1 gece sıcak su banyosunda bekletilmiştir. Kullanılmadığı zaman +4ºC de muhafaza edilmiştir.

100 ml Chloroform: Isoamyl alkol (24:1) hazırlanışı

96 ml Chloroform: 4 ml isoamyl alkol ile karıştırılarak hazırlanmıştır. Hazırlandıktan sonra kabın ağzı sıkı bir şekilde kapatılmıştır.

100 ml, 3 M NaAc 3 H_2O (sodium asetat) pH:5.2 hazırlanışı

40.8 gr NaAc. 3 H_2O tartılmış, 80 ml d_2H_2O' da çözündürülmüş ve 3 M Acetik Acid ile pH'ı 5.2'ye ayarlanarak son hacmi 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Isoprophenol: Olduğu gibi kullanılmıştır.

%70 Ethanol: 70 ml saf Ethanol alınmış, 30 ml d_2H_2O ile 100 ml'ye tamamlanmış ve -20ºC de muhafaza edilmiştir.

d_2H_2O: Otoklav edilip olduğu gibi kullanılmıştır.

3.2.3. RT-PCR (Reverse Transcrition Polymerase Chain Reaction) çalışmaları

3.2.3.1. Uniplex RT-PCR

3.2.3.2. cDNA sentezi (Reverse Transcriptase=RT)

Yapılan işlemler aşağıda sırası ile verilmiştir.

1. cDNA sentezine başlamadan önce sıcak su banyosu 42ºC'ye, ısı bloğu (heat blok) 65 ºC'ye ayarlanmış, örnek sayısına göre steril eppendorf tüpleri numaralandırılmıştır.

2. Total RNA'lar -20°C den alınmış ve oda şartlarında çözünmeleri sağlanmıştır. Total RNA'lardan 2.50 µl alınarak numara sırasına göre steril eppendorf tüplerinin dip kısmına bırakılmıştır. Negatif kontrol olarak 2.5 µl d_2H_2O, pozitif kontrol olarak ise 2.5 µl daha önce pozitif olduğu belirlenen örnekler kullanılmıştır.

3. Örnekler ısı bloğunda 65°C de, 5-6 dakika tutulup buza alınmıştır. Bu süre sonucunda Çizelge 3.2'de verilen oranlarda RT karşım PVX, PVY ve PVS için 20 ng oligo dT primer, PLRV için ise 0.1 µg/µl spesifik antisense primer (reverse), 50 mM Tris-HCl (pH: 8.3), 75 mM KCl, 10 mM DDT, 2.5 mM $MgCl_2$, 1.5 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Promega) 20 U RNasin (Promega, Madison, WI), 200 U M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus, Invitrogen) bir eppendorf tüpüne konulup vortekslendikten sonra her örneğe 7.50 µl olacak şekilde ilave edilmiştir.

4. RT karışım ve total RNA'ların konulduğu eppendorf tüpleri 3-5 saniye santrüfüjlendikten sonra sıcak su banyosunda 42°C' de 1 saat tutulmuş ve reaksiyon 95°C de 3 dakika ısı bloğunda tutularak sonlandırılmış ve takiben örnekler PCR için kullanılmak üzere -20°C de muhafaza edilmiştir. Uniplex RT karışımda kullanılan solusyonlar ve miktarları ile ilgili gerekli bilgiler Çizelge 3.2 de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Unipleks RT-karışımda kullanılan solüsyonlar ve miktarları (2.5 µl total RNA + 7.5 µl RT karışım)

Kimyasallar	Test edilen örnek sayısına göre miktarlar (µl)				
	10 örnek	20 örnek	30 örnek	40 örnek	50 örnek
5 x RT buffer	20	40	60	80	100
H_2O	8.75	17.5	26.25	35	43.75
DTT	10	20	30	40	50
dNTPs 5mM each	20	40	60	80	100
Oligo dT	5	10	15	20	25
Antisense primer (PLRV)	5	10	15	20	25
M-MLV RT	5	10	15	20	25
RNasin	1.25	2.5	3.75	5	6.25

3.2.3.3. PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

Yapılan işlemler aşağıda sırası ile verilmiştir.

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

2.Örnek sayısına göre Çizelge 3.3'deki kimyasallardan 1xPCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.1 µg/µl antisense (reverse) ve 0.1 µg/µl sense primer (forward) (Çizelge 3.3) ile 0.625 U *Taq* polymeraz (Sigma) alınarak PCR karışımı hazırlanmış ve her örnek için 23 µl olacak şekilde tüplere dağıtılmıştır. Takiben hızlı bir şekilde her örneğe numara sırasına göre cDNA'lardan 2 µl PCR karışımının üzerine transfer edilmiştir. Çalışmada PVS için (Mateoušek *et al*. 2000), PLRV için (Singh *et al*. 1998), PVX için (Skryabin et al. 1988) ve PVY için (Nie and Singh 2002b) tarafından dizayn edilmiş olan primer çiftleri kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. Unipleks PCR'da kullanılan solüsyonlar ve miktarları (2 µl total RNA + 23 µl PCR karışım)

Kimyasallar	Test edilen örnek sayısına göre miktarlar (µl)				
	10 örnek	20 örnek	30 örnek	40 örnek	50 örnek
H_2O	168.75	337.5	506.25	675	843.75
10x PCR buffer	25	50	75	100	125
25mM $MgCI_2$	15	30	45	60	75
dNTPs 5 mM each	10	20	30	40	50
Forward primer(Spesifik)	5	10	15	20	25
Reverse primer (Spesifik)	5	10	15	20	25
Taq Polymerase	1.25	2.5	3.75	5	6.25
Total	230	460	690	920	1150

3. 23 µl PCR karışımı üzerine 2 µl cDNA ilave edildikten hemen sonra örnekler daha önceden programlanmış olan PCR cihazına (Termocycle) konulmuştur. RT-PCR da başlangıç denaturasyonu için 94ºC de 2 dakika, döngü içerisindeki denaturasyon için 94ºC de 1 dakika, primerlerin bağlanması (primer anneling) için 58ºC de 30 saniye, sentezin tamamlanması (primer ekstention) için 72ºC de 2 dakika tutulmuş ve amplifikasyon 35 döngüde gerçekleştirilmiştir. Son olarak tamamlanmayan bölgelerin tamamlanabilmesi için örnekler 72ºC de 10 dakika (final extention) tutulmuştur. PCR cihazının kapak ısısı 105ºC'ye, program bitişinde inkübasyon sıcaklığı ise +4ºC'ye ayarlanmıştır.

Program tamamlandığında örnekler PCR cihazından çıkarılmış ve her örneğin içerisine 1µl Bromophenol Blue ilave edilip jele yüklenmiştir. Örnekler jele yüklenmediği zaman ise boya ilave edilip, kullanılıncaya kadar -20ºC de muhafaza edilmişlerdir. Çalışmalarda kullanılan primerler, polariteleri ve fragment uzunlukları Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Çalışmalarda kullanılan primerler, polariteleri ve fragment uzunlukları

Virüs	Sequens	Polarite	Fragment	Primerlerin bağlanma sıcaklığı
PVS	5'-TGGCGAACACCGAGCAAATG-3'	Sense	187 bp	62ºC
	5'-ATGATCGAGTCCAAGGGCACTG-3'	Antisense		
PLRV	5'- CGCGCTAACAGAGTTCAGCC-3'	Sense	336 bp	62ºC
	5'-GCAATGGGGGTCCAACTCAT-3'	Antisense		
PVX	5'-TAGCACAACACAGGCCACAG-3'	Sense	562 bp	62ºC
	5'-GGCAGCATTCATTTCAGCTTC-3'	Antisense		
PVY	5'-AAGCTTCCATACTCACCCGC-3'	Sense	856 bp	58ºC
	5'-CATTTGTGCCCAATTGCC-3'	Antisense		

3.2.4. Multiplex-RT-PCR çalışmaları

3.2.4.1. Multiplex -RT-PCR için standart cDNA sentezi

Standart olarak cDNA sentezinde 25 örnek için kullanılan kimyasalların içerik ve miktarları Çizelge 3.5'de verilmiştir. Buna göre total RNA miktarı 2.50 µl RT karışım ise 7.50 µl olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.5. RT-karışım (2.5 µl Total RNA + 7.5 µl RT-karışım)

Kimyasallar	Test edilen örnek sayısına göre miktarlar (µl)
	25 örnek
5 x RT buffer	50
H_2O	21.875
DTT	25
dNTPs 5mM each	50
Oligo dT primer (20 ng/µl)	12.5
Revers primer (0.1 µg/µl'lik PLRV)	12.5
M-MLV RT	12.5
RNasin	3.125
Toplam	187.5

3.2.4.2. Primer konsantrasyonun etkisinin belirlenmesi

Bunun için cDNA sentezinde Oligo dT primer konsantrasyonu 20 ng/µl yerine 40 ng/µl'ye PLRV için kullanılan antisense konsantrasyonu ise 0.1 µg/µl yerine 0.2 µg/µl olarak kullanılmış olup, karışımdaki diğer kimyasalların miktarı sabit tutulmuştur.

3.2.4.3. Total RNA miktarının etkisinin belirlenmesi

Total RNA miktarının etkisinin belirlenmesi amacıyla cDNA sentezinde, total RNA'nın 2.50 ve 5.0 µl'lik miktarları mukayese edilmiştir. Total RNA miktarı 2.50 ve 5 µl kullanıldığında ise RT karışım Çizelge 3.6'da verildiği şekilde değiştirilmiştir. (Yani 2.50 µl total RNA +7.50 µl RT karışım; 5 µl total RNA +6.725 µl RT karışım olacak şekilde kullanılmıştır).

Çizelge 3.6. RT-karışım (5 µl Total RNA +6.725 µl RT-karışım)

Kimyasallar	Test edilen örnek sayısına göre miktarlar (µl)
	25 örnek
5 x RT buffer	50
H_2O	0.0
DTT	25
dNTPs 10 mM each	50
Oligo dT primer (0.4 µg/µl'lik)	12.5
Revers primer(0.2 µg/µl'lik PLRV)	12.5
M-MLV RT	15.0
RNasin	3.125
Toplam	168.125

Multiplex RT-PCR için cDNA sentezi Çizelge 3.5 ve 3.6'da verilen şekilde sentezlendikten sonra PCR Çizelge 3.7'de içerikleri ve miktarları verilen şekilde gerçekleştirilmiştir. Diğer işlemler ve kimyasallar sabit tutulmuştur.

Çizelge 3.7. Multiplex PCR (23 µl PCR karışım +2 µl cDNA)

Kimyasallar		Test edilen örnek sayısına göre miktarlar (µl)
		25 örnek
H_2O		207.4
10x PCR Buffer		75
25mM $MgCI_2$		120
dNTPs 5 mM each		75
PVS Sense	0.1 µg/µl	22
PVS Antisense	0.1 µg/µl	22
PLRV Sense	0.1 µg/µl	22
PLRV Antisense	0.1 µg/µl	22
PVY Sense (genel primer)	0.1 µg/µl	22
PVY Antisense (genel primer)	0.1 µg/µl	22
PVX Sense	0.1 µg/µl	22
PVX Antisense	0.1 µg/µl	22
Taq Polymerase		9.6
Toplam		575

3.2.4.4. PCR üzerine cDNA miktarının etkisinin belirlenmesi

PCR aşamasında cDNA'nın 2 ve 5 µl'lik miktarları denenmiştir. Bunun için 2 µl cDNA +23 µl PCR karışım (Çizelge 3.7) 5 µl cDNA +25 µl PCR karışım(Çizelge 3.8) ve 5 µl cDNA 20 µl PCR karışım (Çizelge 3.9) mukayese edilmiş olup, diğer işlemlerde her hangi bir değişiklik yapılmamıştır.

Çizelge 3.8. Multiplex PCR karışımı (5 µl cDNA +25 µl PCR karışım)

Kimyasallar		Test edilen örnek sayısına göre miktarlar (µl)
		25 örnek
H_2O		169
10x PCR Buffer		75
25mM $MgCI_2$		120
dNTPs 10 mM		75
PVS Sense	0.1 µg/µl	22
PVS Antisense	0.1 µg/µl	22
PLRV Sense	0.1 µg/ µl	22
PLRV Antisense	0.1 µg/µl	22
PVY Antisense (genel)	0.1 µg/µl	22
PVY Sense (genel)	0.1 µg/µl	22
PVX Sense	0.1 µg/µl	22
PVX Antisense	0.1 µg/µl	22
Taq Polymerase		10
Toplam		625

Çizelge 3.9. Multiplex PCR karışımı (5 µl cDNA +20 µl PCR karışım)

Kimyasallar		Test edilen örnek sayısına göre miktarlar (µl)
		25 örnek
H2O		44
10x PCR Buffer		75
25mM MgCI2		120
dNTPs 10 mM		75
PVS Sense	0.1 µg/µl	22
PVS Antisense	0.1 µg/µl	22
PLRV Sense	0.1 µg/ µl	22
PLRV Antisense	0.1 µg/µl	22
PVY Antisense (genel)	0.1 µg/µl	22
PVY Sense (genel)	0.1 µg/µl	22
PVX Sense	0.1 µg/µl	22
PVX Antisense	0.1 µg/µl	22
Taq Polymerase		10
Toplam		500

PCR cihazında amplifikasyon için program virüslere spesifik primerlerin bağlanma sıcaklıklarına göre programlanmıştır. Buna göre: ilk aşama denaturasyonu için 94ºC de 2 dakika, döngü içerisindeki denaturasyon için 94ºC de 45 saniye, primerlerin bağlanması (primer anneling) için 62ºC de 30 saniye, sentezin tamamlanması (primer extention) için 72ºC de 90 saniye olmak üzere 8 tekrarlı olacak şekilde programlanıştır. İkinci aşama 94ºC de 45 saniye, 60ºC de 30 saniye, 72ºC de 90 saniye olmak üzere 12 tekrar; üçüncü aşamada ise 94ºC de 45 saniye, 58ºC de 30 saniye, 72ºC de 90 saniye olmak üzere 15 tekrar ve son olarak 72ºC de 10 dakika (final extention) tutulmak suretiyle amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Program bitişinde inkübasyon sıcaklığı ise +4C^{o}'ye ayarlanmıştır.

3.2.5. Örneklerin jelde yürütülmesi

Yapılan işlemler aşağıda sırası ile verilmiştir.

1. Jel yatağı ve tarakları yıkanıp 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 içerisine 2.225 gr agaroz (invitrogen) tartılıp konulmuş ve hafifçe çalkaladıktan sonra ağzı açık olacak şekilde mikrodalga fırında yaklaşık 1.5-2 dakika tutulmak suretiyle granüllerinin iyice erimesi sağlanmıştır.

2. Mikro dalga fırından çıkarılan jelin içerisine 250 µl Ethidium Bromide (%0.05 likten) ilave edilip, sonra hafifçe çalkalanmış ve 1 dakika oda sıcaklığında bir bez parçası üzerine bırakılarak bekletilmiştir. Sonra jel, jel yatağına kenardan dökülüp, kabarcıklar bir pipet ucuyla toplanmıştır. Bu işlem tamamlandıktan hemen sonra taraklar düz kısmı karşıya gelecek şekilde jel içerine yerleştirilmiş ve oda sıcaklığında katılaşmaya bırakılmıştır.

3. Jel katılaştıktan sonra üzerine az miktarda 1xTAE buffer ilave edilmiş ve taraklar jelden çıkarılmıştır. Takiben önceden içerisine boya ilave edilen ve pipet uçları

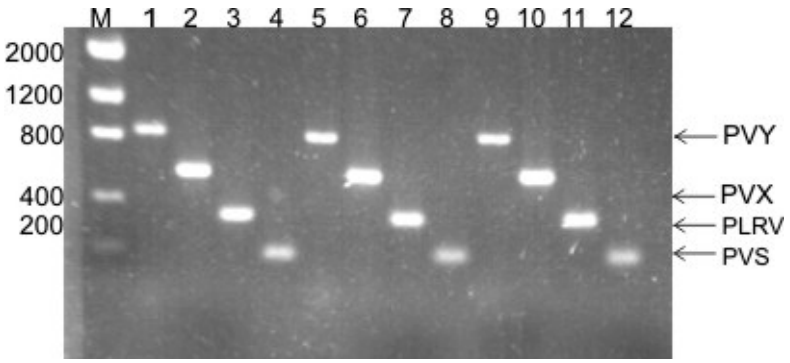
içerisinde bırakılan örnekler 4-5 µl marker (Low DNA Mass Ladder) ile birlikte jele sırasıyla yüklenmiştir. Yükleme işleme bitirildikten sonra jel yatağının açık kısımlarındaki izola bantlar dikkatlice çıkarılmış ve içerisinde 1xTAE buffer bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

4. Jel yatağı tanka yerleştirildikten sonra kapağı iyice kapatılmış, güç ünitesiyle bağlantısı kurulmuş ve örnekler 80 V ve 100 mA'de 1 saat 30 dakika yürütülmüştür. Bu sürenin sonunda jel tanktan alınmış ve UV (Ultra Viola) da kontrol edildikten sonra fotoğraflanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Uniplex RT-PCR sonuçlarının değerlendirilmesi

Çeşitlere ait dormant yumrular virüslere spesifik primerler kullanılarak uniplex RT-PCR ile spesifik olarak test edildiğinde her üç çeşitten de PVX, PVS, PLRV ve PVY'ne spesifik fotoğraflanabilecek yoğunlukta bantlar elde edilmiştir (Şekil 4.1). Uniplex RT-PCR uygulamalarında çeşitler arasında bir fark gözlenmemiştir.



Şekil 4.1. Dormant yumrulardan yapılan uniplex RT-PCR sonuçları. M: Marker, Agria, (PVY: 1, PVX: 2, PLRV:3, PVS: 4), Granola, (PVY: 5, PVX: 6, PLRV: 7, PVS: 8), Morfona, (PVY: 9, PVX: 10, PLRV: 11, PVS: 12)

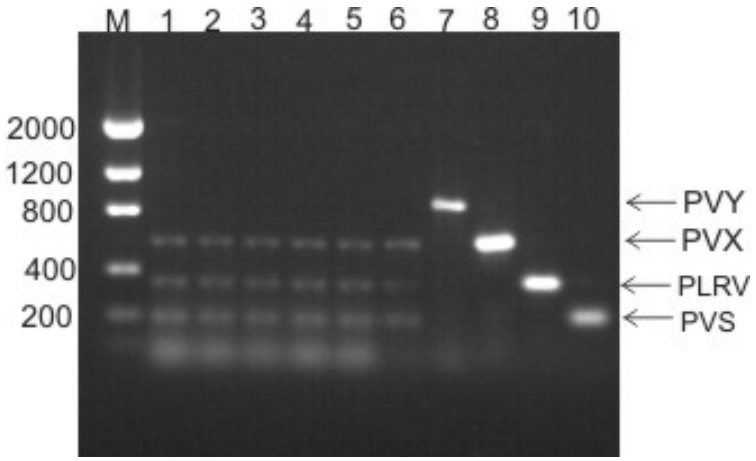
4.2. Multiplex-RT-PCR çalışmaları

4.2.1. Primer konsantrasyonunun etkisinin belirlenmesi

Standart m-RT-PCR çalışmasında uniplex RT-PCR'da olduğu gibi cDNA sentezinde 2.50 µl total RNA +7.50 µl RT-karışım; RT karışımda PVX, PVS ve PVY için 20 ng oligo dT, PLRV için 0.1 µg/µl spesifik primer, PCR aşamasında 2 µl cDNA +23 µl PCR karışım kullanılarak, diğer faktörler sabit tutulup, örnekler jele 20 µl

yüklendiğinde; PVS ve PVX'e spesifik bant UV'de görünürken, PLRV'ye spesifik bant çok silik olarak gözlenmiştir. Bu uygulamadan PVY'ne spesifik bant ise elde edilememiştir.

cDNA sentezinde Oligo dT primer konsantrasyonu 20 ng'dan 40 ng'a, PLRV için kullanılan antisense primer konsantrasyonu 0.1 µg/µl'den 0.2 µg/µl'ye çıkarılıp, diğer uygulamalar sabit tutulduğunda, PVS ve PVX'ne spesifik bant UV'de nispeten biraz daha yoğun görünürken, PLRV'ne spesifik bant biraz daha netleşmiş, PVY'ne spesifik bant ise görülememiştir**.** Diğer taraftan primer konsantrasyonunun arttırılmasına bağlı olarak jelin en alt kısmında moleküler ağırlığı küçük tali bantlar görünmüştür(Şekil 4.2).

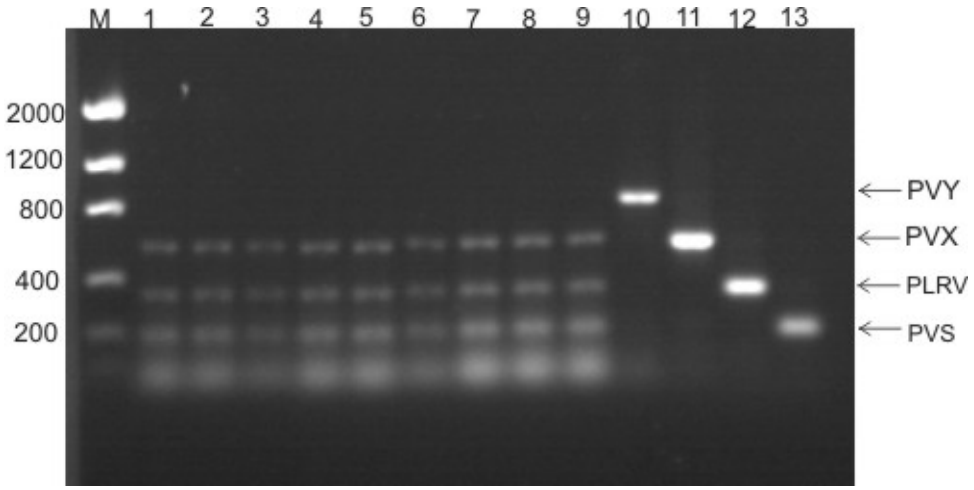


Şekil 4.2. cDNA sentezinde 20 ng oligo dT kullanıldığı zaman (M:Marker, Agria:1 Granola: 2, Morfona: 3), 40 ng oligo dT primer kullanıldığı zaman (Agria: 4, Granola: 5, Morfona:6), PVY kontrol: 7, PVX kontrol 8, PLRV kontol: 9, PVS kontrol 10

4.2.2. Total RNA'nın etkisinin belirlenmesi

cDNA sentezi aşamasında oligo dT primer konsantrasyonu 40 ng, PLRV için kullanılan spesifik antisense primer konsantrasyonu 0.2 µg/µl, total RNA'nın 2.5, 3.5 ve 5 µl'lik miktarları kullanılarak cDNA sentezlenip, PCR da 2 µl cDNA +23 µl PCR karışım kullanılarak örnekler jele 20 µl yüklenmek suretiyle sonuçlar mukayese edilmiştir.

Bu uygulamalardan en iyi sonuç 5 µl'lik total RNA uygulamasından elde edilmiş ve bunu 3.5 µl'lik uygulama izlemiştir (Şekil 4.3). Her iki uygulamadan elde edilen sonuçta PVS, PVX ve PLRV bantlarının netliği artmış, PVY'ne spesifik bant ise görüntülenememiştir. Total RNA'nın 3.5 ile 5.0 µl'lik miktarı arasında ise belirgin bir fark gözlenmemekle birlikte UV sistemde 5.0 µl'lik uygulamada biraz daha bantlar netleşmiştir. Bunun için takip eden denemelerde total RNA'nın 5.0 µl'lik miktarı kullanılmıştır.

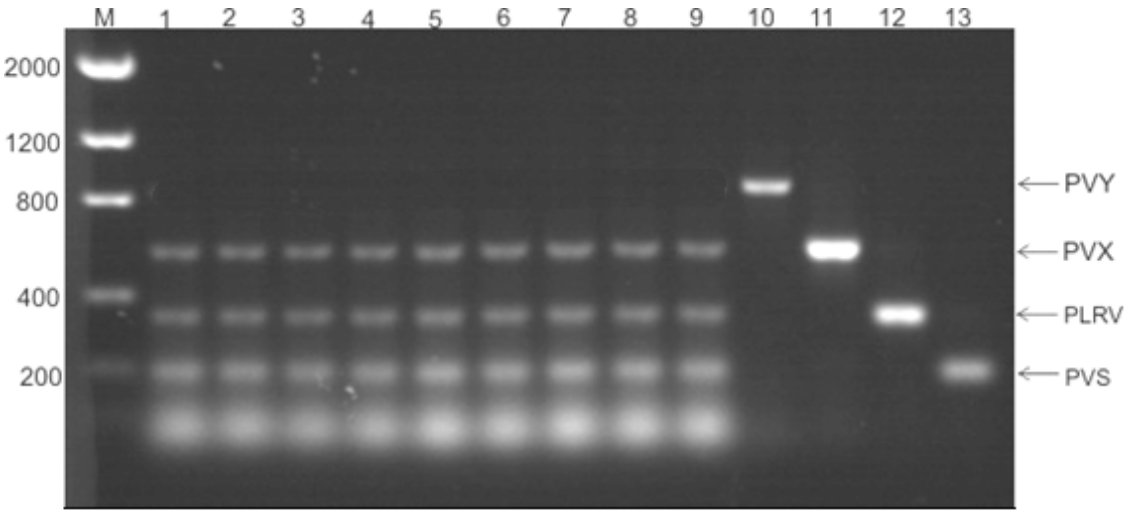


Şekil 4.3. cDNA sentezinde total RNA 2.5 µl kullanıldığında elde edilen bantların yoğunluğu (M:Marker. Agria: 1, Granola: 2, Morfona: 3), Total RNA 3.5 µl kullanıldığında elde edilen bantların yoğunluğu (Agria: 4, Granola: 5, Morfona:6), Total RNA 5.0 µl kullanıldığında elde edilen bantların yoğunluğu (Agria: 7, Granola: 8, Morfona: 9), PVY kontrol: 10, PVX kontrol:11, PLRV kontol: 12, PVS kontrol 13

4.2.3. cDNA miktarının etkisinin belirlenmesi

cDNA sentezinde en iyi sonucu veren 40 ng oligo dT primer, 0.2 µg/µl PLRV'ye spesifik antisense primer, 5 µl'lik total RNA kullanılarak sentezlenen cDNA miktarının PCR üzerine etkisi araştırılmıştır. Bunun için 2 µl cDNA +23 µl PCR karışım, 5 µl cDNA+20 µl PCR karışım ile 5 µl cDNA +25 µl PCR karışım kullanılarak elde edilen

ürünler konsantre edilip 25 µl olarak jele yüklenmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. PCR aşamasında 2 µl cDNA + 23 µl PCR karışım kullanıldığında elde edilen bantların yoğunluğu (M: Marker, Agria: 1, Granola : 2, Morfona: 3), 5 µl cDNA + 25 µl PCR karışım kullanıldığında elde edilen bantların yoğunluğu (Agria: 4, Granola : 5, Morfona: 6), 5 µl cDNA + 20 µl PCR karışım kullanıldığında elde edilen bantların yoğunluğu (Agria: 7, Granola : 8, Morfona: 9), PVY kontrol: 10, PVX kontrol 11, PLRV kontol: 12, PVS kontrol 13

Bu uygulamadan PVX, PVS ve PLRV için UV sistemde fotoğraflanabilecek yoğunlukta bantlar elde edilmişken PVY' ne spesifik bant elde edilememiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Agria, Granola ve Marfona patates çeşitlerine ait dormant yumrulardan elde edilen total RNA kullanılarak yapılan uniplex RT-PCR sonucunda PVX için 562, PLRV için 336, PVS için 187 ve PVY için ise 856 bp uzunluğunda fargmentler elde edilmiştir. Bu sonuç kullanılan primer çiftlerinin bu virüslerin Türkiye'deki izolatlarının belirlenmesinde de kullanılabileceğini göstermektedir. Diğer taraftan, virüslerden elde edilen bantların yoğunluğunun neredeyse bütün çeşitler için aynı yoğunlukta olması da materyal olarak kullanılan çeşitlere ait yumruların PCR' nunu inhibe edici maddeler içermediğini ortaya koymaktadır.

Sonuçlar multiplex RT-PCR açısından değerlendirildiğinde PVS, PVX ve PLRV'nden bantlar elde edilirken, PVY'nden bant elde edilememiştir. cDNA sentezi aşamasında oligo dT primer konsantrasyonu ile PLRV'ye spesifik primer konsantarasyonu iki katına çıkarıldığında, cDNA sentezinde total RNA, PCR aşamasında ise cDNA miktarı arttırıldığında PVX, PLRV ve PVS'ne spesifik bantların yoğunluğunda artış gözlenmiş ancak PVY'ne spesifik bant görüntülenememiştir. Diğer virüslerden bant elde edilirken, PVY'den bant elde edilemeyişinin nedenlerinden birisi; farklı gruplara ait olan bu virüslerin doku içerisindeki konsantrasyonlarının farklı olmasından yani PVY'nün konsantrasyonunun düşüklüğünden kaynaklanabilir. Nitekim, Brunt (1988) farklı virüs gruplarının bitki dokusu içerisindeki konsantrasyonlarını belirlemek maksadıyla yaptığı çalışmada, PVX'nün 250-3000 mg/kg, PVS'nün 30-1000 mg/kg ve PVY'nün ise 5-200mg/kg bulunduğunu belirlemiştir.

Diğer bir nedeni de kullanılan primerlerin amplifiye ettikleri bölge uzunlukları arasındaki fark olabilir. Zira PVS için kullanılan primer çiftinin amplifiye ettiği bölgenin uzunluğu 187, PLRV için 336, PVX için 562 bp iken, bu uzunluk PVY için 856 bp'dir. RT-PCR çalışmalarında amplifiye edilen bölge uzunluğu arttıkça bant yoğunluğunun azaldığı, fragment uzunluğu kısaldıkça bant yoğunluğunun arttığı saptanmıştır (Singh and Singh 1997).

Nie and Singh (2001) tarafından yapılan multiplex RT-PCR çalışmasında PVY ve diğer virüslere spesifik bantların elde edilip bizim çalışmamızda elde edilemeyişinin nedeni araştırmacıların PVY'nün PVY^{o} ırkına spesifik 2 çift primer kullanmaları, kullanılan primerin sadece bir ırka spesifik oluşu, primerlerin amplifiye ettikleri bölge uzunluklarının kısa oluşu ve kullanılan ekstraksiyon metodunun farklığından kaynaklanabilir. Zira araştırmacıların kullandığı ekstraksiyon metodu ilave saflaştırmayı ve daha fazla öz suyunu ihtiva etmektedir. Buna karşın araştırmacıların kullandıkları ekstraksiyon metodu hem zaman alıcı hem de pahalıdır. Ekstraksiyon medodunun değiştirilmesi ve ilave saflaştırma protokolünün uygulanması ise zaman kaybı ve maliyetleri arttırıcı niteliktedir. Bunun yerine cDNA'nın oligo dT primer ile sentezlenip, PVY için PCR çalışmasının tekrar edilmesi zaman kaybı ve maliyet açısından daha makul kabul edilebilir. Zira bizim kullandığımız ekstraksiyon metodu ilave saflaştırmayı içermeyen ve 6 damla öz suyu içeren, DNA'ların elemine edildiği bir metottur.

Sonuç olarak multiplex RT-PCR ile sertifikasyon amacıyla patatesteki virüslerin belirlenmesinde total RNA ekstraksiyonunda Sodyum Sülfit Metodunun (Singh *et al*. 2002) kullanılması**;** cDNA sentezinde oligo dT 40 ng, PLRV için spesifik antisense primer konsantrasyonunun 20 µg/µl, PCR aşamasında cDNA miktarının 5 µl, PCR karışımının ise 20 µl alınması, jelin %1.5'lik hazırlanıp ince dökülmesi ve örnekler en az 25 µl olarak yüklenmesi, PVY'nün ayrı olarak PCR' ının yapılması yada real-time RT-PCR tekniğinin kullanılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Alyokhin, A., Gary, S., 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.

Avila, A.C., Salazar, L.F., Hidalgo, O.A., Nakashima, J., Dusi, A.N., 1989. Serological techniques and Antiserum Production. International Potato Center, 17: 1-8.

Barker, H., Webster, K.D., Reavy, B., 1993. Dedection of potato virus Y in potato tubers: a comparison of polymerase chain reaction and enzyme-linked imminosorbent assay. Potato Res. 36: 13-20.

Barriana, H.S., Shannon, A.L., Chu, W.G., 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., 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.

Bostan, H. ve E. Demirci., 2001. Patates X ve Y virüslerinin bazı patates çeşitlerinde neden olduğu simptomlar. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg., 32 (1): 1-4.

Bostan, H., Xianzhou, N., and Singh, R.P., 2004. An RT-PCR primer pair for the detection of *Pospiviroid* and its application in surveying ornamental plants for viroids. J. Virol. Methods, 116:189-193.

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. and Haliloğlu 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 Dumlupınar R., 2006. Determination of the incidence rate of geographical subgroups of $PVY^{N/NTN}$ in seed potato tubers in Turkey. Pakistan Journal of Biological Sciences, 9(12):2362-2365.

Bostan, H., Guclu, C., Ozturk, E., I, Ozdemir., 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.

Brunt, A. A., 2001. The main viruses infecting potato crops, *In:* Loeben-stein, G., P.H. Berger, A.A. Brunt, and R.H. Lawson (eds), virus and virus-like diseases of potatoes and production of seed-potatoes. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 65-67

Chamberlain, J.S. and Chamberlain, J.R., 1994. Optimization of multiplex PCRs. In: Mullis, K.B., Ferre, F., Gibbs, R.A. (Eds.), The Polymerase Chain Reaction. Burkhauser, Boston, MA, pp. 38-46.

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., 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., 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.

Halbert, S.E., Connelly, J., Sandvol, L.E., 1993. Suction trapping of aphids in western North America (emphasis on Idaho). Acta Phytopathol Entomol Hungarica, 25: 411-422.

Hauser, S., Weber, C., Vetter, G., Stevens, M., Monique Beuve, Lemaire, O., 2000. Improved detection and differentiation of poleroviruses infecting beet or rape by multiplex RT-PCR. J. Virol. Methods, 89: 11-21.

Heimbach, U., Thieme, T., Weidemann, H.L., Thieme, R., 1998. Transmission of potato virus Y by aphid species which do not colonise potatoes. *In:* Nieto Nafria, J.M., and A.F.G. Dixon (eds), Aphids in Natural and Managed Ecosystems. Universidad de Leon, Leon, Spain, pp. 555-559.

Henson, J.M. and French, R.., 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Annu. Rev. Phytopathol. 31: 81-107.

Hooker, W.J., 1986. Compendium of Potato Diseases. American Phytopathologycal Society Press., St. Paul, Minnesota, 125p.

Ito, T., Teki, H., and Ozaki, K., 2002. Simultaneus detection of six citrus viroids and *apple stem grooving virus* from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction . J. Virol. Methods. 106: 235 -239.

Jacobi, V., Bachand, G.D., Hamelin, R.C., Castello, J.D., 1998. Development of multiplex immunocapture RT-PCR assay for detection and differentiation of tomato and tobacco mosaic tobamoviruses. J. Virol. Methods, 74: 167-178.

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.

Korschineck, I., Himmler, G.R., Sagl, H.S., Katinger, H., 1991. A PCR membrane spot assay for the dedection of plum pox virus RNA in bark of infected trees. Journal of Virological Methods, 31: 139-146.

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 Phytopathogical Society, St. Paul. pp' 101-103.

Matoušek, J., Schubert, J., Didic , P., Ptáèek,J., 2000. A broad variabilityof potato S clarvirus (PVS) revealed by analysis of RT-PCR – amplified virus sequences. Can J. Plant Pathol. 22.

Mathews, R. E. F., 1993. Diagnosis of Plant Virus Diseases. CRS Press, N.W., Boca Raton, Florida. 374 p.

McDonald, J. G., 1984. Viruses associated with mosaic symptoms in Russet Burbank potato. Can. J. of Plant Path. 6: 224-226.

Menzel, W., Jelkmann, W., 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., 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., Kofalvi, S.A., 2000. Improved RNA extraction an done-tube RT-PCR assay for simultanous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. J. Virol. Methods, 90: 37-49

Nault, L.R., 1997. Arthropod transmission of plant viruses: A new synthesis. Ann. Entomol.. Soc. Am. 90: 521-541.

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

Nie, X. and Singh, R.P., 2002a. Probably geographical grouping of PVY^{N} and PVY^{NTN} based on sequence variation in P1 and 5'-UTR of PVY genome and methods for differentiating North American PVY^{NTN}. J. Virol. Meth., 103: 145-156.

Nie, X. and Singh, R.P., 2002b. A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of potato virus Y by uniplex and multiplex RT-PCR. J. Virol. Meth. 104: 41-54.

Özalp, O., 1964. Patates Virüs Hastalıkları. Tarım Bakanlığı, Bornova Ziraai Mücadele Enstitüsü, Teknik Bül., 13, III, 35s.

Peters, D., 1970. Potato Leafroll Virus. C.M.I./À.A.B. Descriptions of Plant Viruses. No: 36.

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.

Radcliffe, E. and Ragsdale, D.W., 2002. Aphid-transmitted Potato Viruses: The Importance of Understanding Vector Biology. Amer. J. of Potato Res., 79: 353-386.

Ragsdale, D. W., Radcliffe, E.B., 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., Gray, S.M.,1991. Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. Journal of General Virol., 72:1473-1477.

Rowhani, A., Maningas, M.A., Lile, L.S., Daubert, S.D., 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., 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., 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.

Salazar, L.F. 1996. Potato Viruses and Their Control. CIP, Lima. 214 pp.

Samson, R.G., Allen, T.C., Whirdworth, J.L., 1993. Evaluation of direct tissue blotting to detect potato viruses. Am. Potato J., 70: 257-265.

Sharman, M., Thomas, E., Dietzgen, R.G., 2000. Development of a multiplex immunocapture PCR with colouimetric detection for viruses of banan. J. Virol.Methods, 89: 75-88.

Shukla, D.D., Ward, C.W., Brunt, A.A., 1994. The Potyviridae. Cambridge Universty Press. Cambridge.

Skaryabin, K.G., Kraev, A.S., Morozov, S.Yu., Rozanov, M.N., Chernov, B.K., Lukasheva, L.I., Atabekov, J.G., 1988. The nucleotide sequences of potato virus X RNA. Nucleic Acid Res. 16: 10929-10930.

Singh, R.P., J. Kurz, J., Boiteau, G., Bernard, G., 1995. Detection of potato leafroll virus in single aphids by reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application. J. Virol. .Methods, 55: 133-143.

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., Boiteau, G., 1996. Detection of stylet-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: sensitivy of RT-PCR depends on the size of fragment amplified. Can J. Plant Pathology, 19: 149-155.

Singh, R.P., Kurz, J., Boiteau, G., Moore, L.M., 1997. Potato leafroll virus detection by RT-PCR in field-collected aphids. American Potato Journal, 74: 305-313.

Singh, R.P., Singh, M., McDonald, J.G., 1998. Screening by a 3-primer PCR North American PVY^{N} isolates for European-type members of the tuber necrosis-inducing PVY^{NTN} subgroup. Can. J. Plant Pathol., 20: 227-233.

Singh, R.P., 1999. A solvent-free, rapid and simple virus RNA-release method for potato leafroll virus detection in aphids and plants by reverse transcription polymerase chain reaction. J. Virol. Methods, 83: 27-33.

Singh, R.P., Nie, X., Singh, M., 2000. Duplex RT-PCR reagent concentrations at reverse transcription stage affect the PCR performance. J. Virol. Methods 86: 121-129.

Singh, R.P., Nie, X., Singh, M., Coffin, R., Duplessis, P., 2002. Sodium Sulphite inhibition in nucleic acid extraction for virus detection by RT-PCR. J. Virol. Methods, 99: 123-131.

Slack, S.A., 1995. Potato viruses with some implications for production and processing in the United States: a history of problems and solutions. Summa Phytopathologica, 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.

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.

Vercruysse, P., Gibbs, M., Tirry, L., Höfte, M., 2000. RT-PCR using redundant primers to detect the three viruses associated with carrot motley dwarf diseases. J. Virol. Methods, 88:153-161.

Vunsh, R.A, Roster, A., Stein, A., 1991. Detection of bean yellow mosaic virus in gladioli corms by the polymerase chain reaction. Annals of Applied Biology. 119: 289-294.

Vunsh, R.A, Roster, A., 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.

Walkey, D.G.A., 1991. Applied Plant Virology. St. Edmundsbury Press, Bury St. Edmunds, Suffolk, USA, 338p.

Whirdworth, J.L., Samson, R.G., Allen ,T.C and Mosley, A.R., 1993, Deduction of potato leafroll virus by visual inspection, direct tissue blotting and ELISA techniques. Am. Potato J., 6: 497-503.

Woodford, J.A.T., Jolly, C.A., 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.

ÖZGEÇMİŞ

20.11.1982 tarihinde Erzincan'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Erzincan'da tamamladıktan sonra 2000 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitkisel Üretim Bölümü'nde yüksek öğrenimine başladı. 2004 yılında mezun oldu. Aynı yıl Bitki Koruma Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisansa başladı. Halen öğrenimine devam etmektedir.