

Detection of Several Important Viral Agents by Real-time PCR in Aegean Vineyards*

Serkan ÖNDER¹ İsmail Can PAYLAN² Mustafa GÜMÜŞ²

¹Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Bitki Sağlığı Bölümü 45125 Yunusemre, MANİSA

²Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü 35100 Bornova, İZMİR

Corresponding author email: onderserkan@gmail.com

Accepted for publication 1 July 2016

ABSTRACT

In this study, *Grapevine fanleaf nepovirus* (GFLV), *Grapevine leafroll associated-virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll associated-virus 2* (GLRaV-2) and *Grapevine leafroll associated-virus 3* (GLRaV-3) which were the most important viral diseases in Aegean viticulture production areas were determined with Syber Green I based Real-time PCR methods in a rapid and reliable way. For this purpose, separately GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2 and GLRaV-3 infected grapevine samples were used which were previously detected by DAS-ELISA and conventional RT-PCR. Healthy plant sample was also used for negative control. The results of Syber Green I based Real-time PCR were confirmed by melting curve analyses which were performed to each samples right after Real-time PCR protocol. Result of melting curve analyses, non specific amplifications such as primer dimers were determined and false positive results were ignored. Detection of all above virus agents were successfully performed after optimisation assays with Syber Green I based Real-time PCR.

Key words: GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, grapevine.

ÖZET

Ege Bölgesi Bağ Alanlarında Sorun Olan Bazı Viral Etmenlerin Real-time PCR ile Teşhisi

Bu çalışma ile Ege Bölgesi bağ alanlarında sorun olan önemli bazı viral etmenlerden; *Grapevine fanleaf nepovirus* (GFLV), *Grapevine leafroll associated-virus 1* (GLRaV-1), *Grapevine leafroll associated-virus 2* (GLRaV-2) ve *Grapevine leafroll associated-virus 3* (GLRaV-3)'ün Syber Green I temelli Real-Time PCR yöntemi kullanılarak hızlı ve güvenilir teşhisleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla daha önceden serolojik (DAS-ELISA) ve konvansiyonel RT-PCR tanı yöntemleriyle GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2 ve GLRaV-3 virüsleri açısından enfekteli olduğu tespit edilen örnekler kullanılmıştır. Sağlıklı bitki örnekleri ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Syber Green I temelli Real-time PCR sonuçlarının doğrulanması ise Real-time PCR protokolünün hemen ardından her bir örneğe uygulanan melting (erime eğrisi) analizleri ile yapılmıştır. Gerçekleştirilen erime eğrisi analizleri sonucunda primer dimerleri gibi spesifik olmayan amplifikasyonlar tespit edilerek yalancı pozitif sonuçlar bertaraf edilmiştir. Optimizasyon çalışmalarından sonra, sözkonusu tüm virüs etmenlerinin Syber Green I temelli Real-time PCR yöntemi ile başarılı bir şekilde teşhisleri gerçekleştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, asma

* Bu çalışma 25-29 Ağustos 2015 tarihleri arasında Çanakkale'de düzenlenen VII. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi'nde poster bildiri olarak sunulmuş olup kongre kitabında kısa özet olarak basılmıştır.

GİRİŞ

Ege Bölgesi, ülkemiz bağ alanlarının % 30'unu (140.598 ha.) içermekte ve toplam üzüm üretimimiz olan 4.011.409 tonun 1.738.714 tonunu (% 43) tek başına sağlayarak bağcılık sektöründe ülke lideri konumunda bulunmaktadır. (TÜİK, 2013). Bölgenin alan ve üretim değerlerindeki liderliğine karşın bölge bağcılığında üretimi tehdit eden çok sayıda fitopatolojik ajan bulunmaktadır. Ürün kalite ve kantite kayıpları hakkında genel bir değerlendirme yapıldığında virüslerin funguslardan sonra ikinci sırada yer aldığı bilinmektedir. Dünyada bağ virüs ve virüs benzeri hastalık etmenleri ile ilgili çalışmalar 1960'lı yıllardan sonra hız kazanmaya başlamış, yalnızca 2 tane olan virüs hastalıklarının sayısı 1997'de 43'e 1998'de 46'ya çıkmıştır. Son yıllarda virüslerin tanısında ileri moleküler yöntemlerin kullanılmasıyla günümüzde bu sayının 60'dan fazla olduğu bilinmektedir. Ülkemizde ise bağ virüsleri ile ilgili çalışmalar 1950'li yıllarda başlamıştır (Martelli and Boudon-Padieu, 2006).

Secoviridae familyasının *Nepovirus* cinsine dahil olan *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), bağların en eski virüs hastalıklarından biri olup özellikle sofralık çeşitlerde irili ufaklı tane oluşumu nedeniyle üzümün ticari değerinin düşmesiyle %80'lere varan oranlarda zarara neden olabilmektedir. Bunun yanında yelpaze yaprak oluşumu, boğum aralarının kısalması, anormal sülük ve yaprak oluşumu, sürgünlerde yassılaşıma, yapraklarda derin dilimlilik, diş oluşumu ve küçülmeler, sararma ve damar bantlaşması, sürgünlerde zigzag yapı oluşumları sıkça rastlanan semptomları arasında yer almaktadır (Anonim, 1999).

Ülkemiz; Ege, Akdeniz, İç Anadolu, Güneydoğu Anadolu Bölgeleri bağlarında yapılan bazı araştırmalar sonucunda GFLV'nin %47'ye varan enfeksiyon oranı ile ilk sırada bulunduğu farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Akdoğan, 1956; Erdiller, 1982; Martelli, 1987; Azeri ve Fidan 1988; Özaslan ve ark., 1991; Özaslan, 1995; Akbaş ve Erdiller, 1993; Azeri ve Çiçek, 1995; Çığışar ve Yılmaz, 1998; Çığışar, 2002; Çığışar ve ark., 2002; Kaya ve Erilmez, 2014).

Bağların en önemli virüs hastalıkları arasında yer alarak üzüm verimini %14-40 oranında azaltan, sürgünlerde lignifikasyon gecikmesine neden olarak aşı potansiyeli ve gücünü olumsuz olarak etkileyen, kuru maddenin %43'e varan oranda azalmasına ve meyvelerin düzensiz ve geç olgunlaşmasına neden olan *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV)'ün farklı serotipleri dünyada ve ülkemizde bağcılık yapılan farklı bölgelerden bildirilmiştir (Martelli, 1987; Teliz et al.,1987; Zee et al.,1987; Monette et al.,1989; Azeri, 1990; Hu et al.,1990; Gürsoy, 1991; Özaslan ve ark., 1991; Akbaş ve Erdiller., 1993; 1998; Azeri ve Çiçek., 1995; Özaslan ve Yılmaz., 1995; Yılmaz ve ark., 1997; Çığışar ve Yılmaz., 1998; Köklü, 1999; Digiario et al., 2000; Köklü ve Baloglu., 2000; Çığışar, 2002; Çığışar ve ark., 2002; Sarpkaya, 2003; Akbaş ve ark., 2007; Buzkan ve ark., 2010; Kaya ve Erilmez, 2014; Önder ve Gümüş, 2014). *Closteroviridae* familyası içinde yer alan *Grapevine leafroll-associated virus-1* (GLRaV-1) ve *Grapevine leafroll-associated virus-3* (GLRaV-3) *Ampelovirus* cinsine dahil iken *Grapevine leafroll-associated virus-2* (GLRaV-2) ise *Closterovirus* cinsi içerisinde yer almaktadır.

Bağ virüsleri açısından ülkemizde yapılan sözkonusu çalışmalar incelendiğinde bölge genelinde en yaygın olarak görülen virüslerin GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2 ve GLRaV-3 olduğu anlaşılmaktadır. Sözkonusu virüs hastalıklarının hızlı ve güvenilir tanısını gerçekleştirebilmek çok sayıda örnekle çalışan tanı laboratuvarları açısından büyük önem taşımaktadır. Ayrıca virüslerle ilgili günümüzde eradikasyon ve kültürel önlemler dışında herhangi bir mücadele yönteminin olmayışı, virüslerin tanısının modern teknikler kullanılarak erken dönemde hızlı ve güvenilir tanı yöntemleriyle başarılı bir şekilde yapılmasının ne kadar önemli olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Son zamanlarda başta zirai karantina laboratuvarları olmak üzere bazı laboratuvarlar bitki virüslerinin analizinde Real-time PCR sistemleri kullanımı konusunda çalışmalara başlamışlardır. Real-time PCR yöntemi, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesiyle, kantitatif sonuç alınabilen, özgülüğü son derece yüksek olan bir PCR yöntemidir (Mackay et al., 2002).

Bu çalışmayla daha önce DAS-ELISA ve konvansiyonel RT-PCR ile GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2 ve GLRaV-3 virüsleri tespit edilen bazı izolatların Syber Green I temelli Real-time PCR yöntemiyle hızlı ve güvenilir tanıların gerçekleştirilmesi ve sözkonusu etmenler açısından Real-time PCR yöntemiyle ilgili optimizasyon çalışmalarının yapılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Çalışmada virüs kaynağı ve negatif kontrol olarak 2012 ve 2013 yıllarında Ege Bölgesi bağ alanlarından elde edilen GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2 ve GLRaV-3 etmenleri açısından enfeksiyon durumları DAS-ELISA ve konvansiyonel RT-PCR ile önceden tespit edilmiş örnekler kullanılmıştır. Çalışmada altı GFLV; dört GLRaV-1; yedi GLRaV-2 ve yedi GLRaV-3 izolatu kullanılmıştır (Çizelge 1).

Çizelge 1. Real-time PCR çalışmasında kullanılan izolatların DAS-ELISA ve konvansiyonel RT-PCR sonuçları.

İzolatlar	GFLV	GLRaV-1	GLRaV-2	GLRaV-3
	DAS-ELISA RT-PCR	DAS-ELISA RT-PCR	DAS-ELISA RT-PCR	DAS-ELISA RT-PCR
P13	+	x	x	x
R2	-	x	x	x
R3	-	x	x	x
R9	+	x	x	x
R13	+	x	x	x
R22	+	x	x	x
P4	x	-	x	x
P9	x	-	x	x
R49	x	+	x	x
Y2	x	+	x	x
İ9	x	x	+	x
İ10	x	x	+	x
İ23	x	x	+	x
İ39	x	x	-	x
İ41	x	x	-	x
M12	x	x	+	x
R10	x	x	+	x
D59	x	x	x	-
İ37	x	x	x	+
L6	x	x	x	+
O6	x	x	x	+
O8	x	x	x	+
R23	x	x	x	-
U6	x	x	x	+

+: İlgili etmen açısından enfekteli, -: İlgili etmen açısından sağlıklı, x: Test edilmedi.

Metot

Total RNA Ekstraksiyonu

GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2 ve GLRaV-3 etmenleri açısından enfekteli ve sağlıklı olduğu bilinen asma örneklerinden toplam RNA'lar ZR Plant RNA MiniPrep™ RNA ekstraksiyon kiti (Zymo, katalog no: R2024) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon amacıyla 150 mg yaprak dokusu lysis tüpleri içerisine konulmuş ve üzerlerine 800 µl lysis buffer eklenerek homojenize edilmiştir. Homojenizasyonun ardından lysis tüpleri 12.000 g'de 2 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından lysis tüpleri içinden alınan 400 µl süpernatant, koleksiyon tüpü üzerine yerleştirilmiş Zymo spin IIC filtresine pipetle aktarılmış ve 8.000 g'de 1 dk santrifüj edilerek sıvının koleksiyon tüpüne geçmesi sağlanmıştır. Santrifüjden sonra filtreden koleksiyon tüpüne geçen sıvıya 320 µl %96'lık etil alkol eklenerek karıştırılmış ve bu karışım pipet yardımıyla Zymo IIC filtresine aktarılmıştır. Aktarımdan sonra tüpler 12.000 g'de 1 dk. santrifüj edilerek koleksiyon tüpüne geçen sıvı kısım dökülmüş ve Zymo IIC filtresi üzerine 400 µl RNA preb buffer eklenmiştir. Tüpler 12.000 g'de 1,5 dk. santrifüj edilmiş, ardından koleksiyon tüpüne geçen sıvı dökülerek Zymo IIC filtresi üzerine 800 µl RNA wash buffer eklenmiş ve bu tüpler 12.000 g'de 1 dk. santrifüj

DETECTION OF SEVERAL IMPORTANT VIRAL AGENTS BY REAL-TIME PCR IN AEGEAN VINEYARDS

edilmiştir. Santrifüjün ardından koleksiyon tüpüne geçen sıvı dökülerek Zymo IIC filtresi üzerine 400 µl RNA wash buffer eklenmiş ve bu tüpler önce 12.000 g'de 1 dk. ardından 12.000 g'de 2,5 dk. santrifüj edilmiş ve koleksiyon tüpü içerisindeki sıvı ile birlikte atılmıştır. Zymo IIC filtresi 1,5 ml'lik eppendorf tüp içerisine yerleştirilmiş ve filtre üzerine 35 µl nuclease free su eklenmiş ve 1 dk beklenmiştir. Son olarak bu tüpler 10.000 g'de 1 dk. santrifüj edilmiş ve elde edilen Total RNA'lar bir sonraki aşama için kullanılmaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Elde edilen Total RNA'lardan komplementer DNA (cDNA)'lar Thermo Scientific RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, katalog no: K1632) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 6 µl Total RNA, 1 µl oligo (dT)₁₈ primer ve 7 µl nuclease free su PCR tüpleri içerisine eklenmiş ve vortex yardımıyla karıştırıldıktan sonra 1000 rpm'de 5 sn. santrifüj edilmiştir. Tüpler PCR cihazına yerleştirildikten sonra 65 °C'de 5 dk. inkübe edilmiş ve buz üzerine alınarak 1 dk. bekletilmiştir. Tüplerin içerisine sırasıyla 1 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 u/ µl), 1 µl RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/ µl), 2 µl 10 mM dNTP Mix ve 4 µl 5X Reaction buffer eklenerek vortex yardımıyla karıştırılmış ve 1000 rpm'de 10 sn. santrifüjün ardından tekrar PCR cihazına yerleştirilerek önce 42 °C'de 60 dk. inkübe edilmiş ardından reaksiyonu sonlandırmak amacı ile 70 °C'de 5 dk. inkübe edilmiştir. Elde edilen cDNA'lar kullanılmaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Real-time PCR Aşamaları

Real-time PCR çalışmaları, Roche LightCycler® Nano Real-Time PCR sistemi ve Roche FastStart Essential DNA Green Master Mix kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çizelge 1'de detayları yer alan GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2 ve GLRaV-3 virüs izolatlarına ait cDNA'lar Çizelge 2'de yer alan spesifik primer dizileri kullanılarak ilgili etmenler açısından Syber Green I temelli Real-time PCR yöntemi ile test edilmiştir. Bu amaçla PCR tüpleri içerisine 0,3 µl 20 µM forward primer, 0,3 µl 20 µM reverse primer, 1 µl cDNA ve 10 µl 2x FastStart Essential DNA Green Master Mix eklenerek nuclease free su ile son hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır. Her koşulda 1 tüp olası kontaminasyon riskine karşı örnek eklenmeden negatif kontrol olarak çalışmaya eklenmiştir. Tüpler Real-time PCR sistemine yerleştirildikten sonra Çizelge 2'de yer alan etmenler için spesifik döngü programları uygulanmıştır.

Çizelge 2. Real-time PCR çalışmasında kullanılan primerler ve Real-time PCR döngüleri.

Hedef virüs / primer	Oligonükleotid dizisi (5' 3') ve referans	Ürün büyüklüğü	Real-time PCR döngüleri
GFLV_CP2_671f1 GFLV_CP2_671f2 GFLV_CP2_822r	GTTGTGTGTTAGGTATGGGAGGTACTATTA TGTGTTTTGGGTATGGGAGGTACTATTA TTCCACATACACCCCGGATA (Osman and Rowhani, 2006)	151 bp	1 X (95 °C 10 dk) 45 X (95 °C 10 sn / 59 °C 15 sn / 72 °C 15 sn)
GLRaV-1_LR1 417F GLRaV-1_LR1 737R	GAGCGACTTGC GACTTATCGA GGTAAACGGGTGTCTTCAATTCT (Osman et al., 2007)	320 bp	1 X (95 °C 10 dk) 45 X (95 °C 10 sn / 60 °C 15 sn / 72 °C 32 sn)
GLRaV-2_LR2-L2/F GLRaV-2_LR2-U2/R	ATAATTCGGCGTACATCCCCACTT GCCCTCCGCGCAACTAATGACAG (Osman et al., 2007)	331 bp	1 X (95 °C 10 dk) 45 X (95 °C 10 sn / 64 °C 15 sn / 72 °C 33 sn)
GLRaV-3_LC1/F GLRaV-3_LC2/R	CGCTAGGGCTGTGGAAGTATT GTTGTCCCGGTACCAGATAT (Osman and Rowhani, 2006)	546 bp	1 X (95 °C 10 dk) 45 X (95 °C 10 sn / 59 °C 15 sn / 72 °C 55 sn)

Melting (Erime eğrisi) Analizleri

Syber Green I temelli Real-time PCR sonuçlarının yorumlanması PCR işleminden sonra Roche LightCycler® Nano Real-Time PCR sistemiyle gerçekleştirilen erime eğrisi analizlerine göre yapılmıştır. Gerçekleştirilen erime eğrisi analizleri ile çoğaltılan DNA örneğinin sıcaklığını yavaş yavaş artırılarak floresan sinyalin sıcaklığa bağlı değişimini gösteren bir grafik elde edilmiş ve floresan sinyalin ani düşüşünden kaynaklanan pikler aracılığıyla, DNA iplikçiklerinin birbirlerinden ayrıldıkları sıcaklık değerleri tespit edilmiştir. Analiz

sonucunda primer dimerleri gibi spesifik olmayan ürünlerin yanlış pozitif verme durumları bertaraf edilmiş ve Real-time PCR işlemi sonucunda çoğaltılan DNA'nın hedef bölge olup olmadığı belirlenmiştir (Chou ve ark., 1992; Zipper ve ark., 2004). Bu amaçla, Real-time PCR çalışmalarında kullanılan Roche FastStart Essential DNA Green Master Mix protokolünde belirtildiği üzere çoğaltılan PCR ürünü 60-65 °C'den 95 °C'ye kadar saniyede 0,1 °C'lik artışlarla ısıtılmış ve PCR ürünüdeki çift zincirli DNA'nın hangi sıcaklık derecesinde denatürasyona uğradığı kullanılan Roche FastStart Essential DNA Green Master Mix içerisindeki Syber Green I floresan boyanın verdiği ışığa sonucunda tespit edilmiştir. Erime eğrisi analizleri sonucunda belirlenen erime sıcaklığı altında kalan örnekler negatif, üzerinde kalan örnekler ise pozitif olarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Real-time PCR ve Melting (Erime eğrisi) Analizi Sonuçları

GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2 ve GLRaV-3 etmenleri açısından gerçekleştirilen Real-time PCR analizi sonuçlarının yorumlanmasında öncelikle söz konusu izolatlarda amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği, gerçekleştiyse eğer kaçınıcı döngü sonunda başladığı tespit edilmiştir.

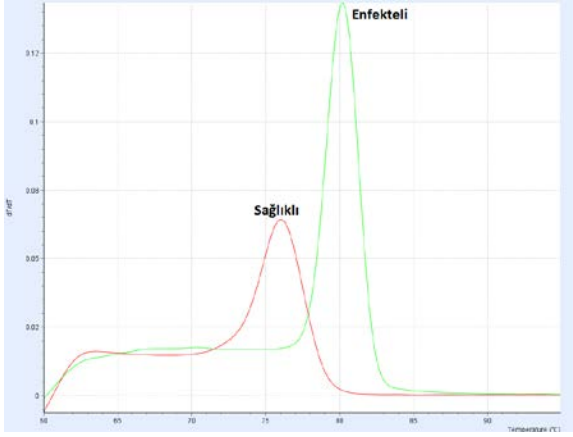
Real-time PCR analizi sonucu elde edilen Quantitation cycle (Cq) değerleri Çizelge 3'te yer almaktadır. Real-time PCR analizi sonucu Cq değerleri elde edilemeyen izolatlar ilgili etmenler açısından sağlıklı olarak değerlendirilmiştir. Cq değerleri elde edilen izolatlar ise amplifikasyon sonucu elde edilen ürünün hedef ürün olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla, etmen bazında her bir izolat için gerçekleştirilen erime eğrisi analizi sonuçlarına göre belirlenmiştir.

Real-time PCR analizi sonucunda gerçekleştirilen erime eğrisi analizi sonuçlarında GFLV etmeni açısından sağlıklı izolatların 76,5 °C'de denatüre olduğu enfekteli izolatlarda ise bu değer 80,5 °C olduğu belirlenmiştir (Şekil 1). GFLV için gerçekleştirilen erime eğrisi analizi sonucunda 80,5 °C'de pik veren izolatlar enfekteli olarak değerlendirilirken 76,5 °C'de pik veren izolatlar ise sağlıklı olarak değerlendirilmiştir.

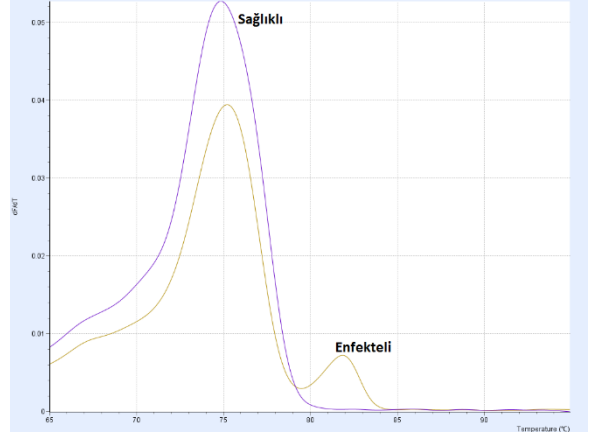
GLRaV-1 etmeni açısından ise sağlıklı izolatların 75,5 °C'de denatüre olduğu enfekteli izolatlarda ise bu değer 82 °C olduğu belirlenmiştir (Şekil 2). GLRaV-1 için gerçekleştirilen erime eğrisi analizi sonucunda 82 °C'de pik veren izolatlar enfekteli olarak değerlendirilirken 75,5 °C'de pik veren izolatlar ise sağlıklı olarak değerlendirilmiştir.

GLRaV-2 etmeni açısından ise sağlıklı izolatların 79 °C'de denatüre olduğu enfekteli izolatlarda ise bu değer 84 °C olduğu belirlenmiştir (Şekil 3). GLRaV-2 için gerçekleştirilen erime eğrisi analizi sonucunda 84 °C'de pik veren izolatlar enfekteli olarak değerlendirilirken 79 °C'de pik veren izolatlar ise sağlıklı olarak değerlendirilmiştir.

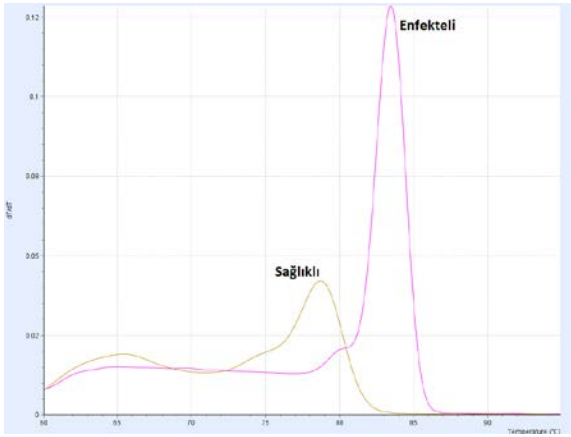
DETECTION OF SEVERAL IMPORTANT VIRAL AGENTS BY
REAL-TIME PCR IN AEGEAN VINEYARDS



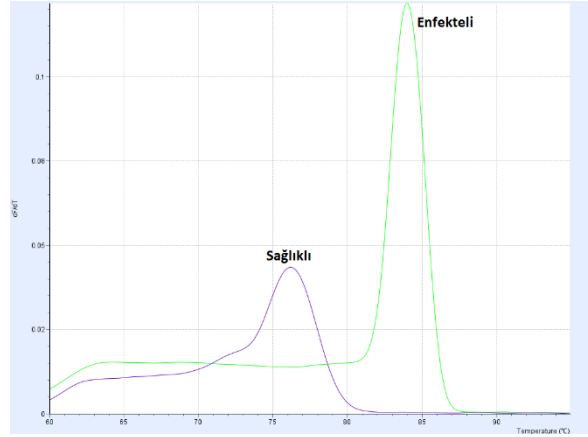
Şekil 1. GFLV ile enfekteli ve sağlıklı izolatların erime eğrisi analizi sonuçları.



Şekil 2. GLRaV-1 ile enfekteli ve sağlıklı izolatların erime eğrisi analizi sonuçları.



Şekil 3. GLRaV-2 ile enfekteli ve sağlıklı izolatların erime eğrisi analizi sonuçları.



Şekil 4. GLRaV-3 ile enfekteli ve sağlıklı izolatların erime eğrisi analizi sonuçları.

GLRaV-3 etmeni açısından ise sağlıklı izolatların 76,5 °C'de denatüre olduğu enfekteli izolatlarda ise bu değer 84 °C olduğu belirlenmiştir (Şekil 4). GLRaV-3 için gerçekleştirilen erime eğrisi analizi sonucunda 84 °C'de pik veren izolatlar enfekteli olarak değerlendirilirken 76,5 °C'de pik veren izolatlar ise sağlıklı olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 3. Real-time PCR analizlerine ait sonuçlar.

İzolatlar	GFLV		GLRaV-1		GLRaV-2		GLRaV-3	
	Cq değeri	Erime eğrisi analizi sonucu	Cq değeri	Erime eğrisi analizi sonucu	Cq değeri	Erime eğrisi analizi sonucu	Cq değeri	Erime eğrisi analizi sonucu
P13	32.88	+	x	x	x	x	x	x
R2	35.51	-	x	x	x	x	x	x
R3	39.79	-	x	x	x	x	x	x
R9	28.41	+	x	x	x	x	x	x
R13	31.18	+	x	x	x	x	x	x
R22	37.58	+	x	x	x	x	x	x
P4	x	x	40.70	-	x	x	x	x
P9	x	x	0	-	x	x	x	x
R49	x	x	36.96	+	x	x	x	x
Y2	x	x	37.08	+	x	x	x	x
İ9	x	x	x	x	26.17	+	x	x
İ10	x	x	x	x	33.78	+	x	x
İ23	x	x	x	x	32.97	+	x	x
İ39	x	x	x	x	38.98	-	x	x
İ41	x	x	x	x	43.19	-	x	x
M12	x	x	x	x	33.28	+	x	x
R10	x	x	x	x	28.12	+	x	x
D59	x	x	x	x	x	x	0	-
İ37	x	x	x	x	x	x	32.38	+
L6	x	x	x	x	x	x	28.72	+
O6	x	x	x	x	x	x	29.90	+
O8	x	x	x	x	x	x	33.01	+
R23	x	x	x	x	x	x	36.88	-
U6	x	x	x	x	x	x	37.62	+

+: İlgili etmen açısından enfekteli, -: İlgili etmen açısından sağlıklı, x: Test edilmedi. 0: Amplifikasyon tespit edilmedi.

Çizelge 3'te yer alan Syber Green I temelli Real-time PCR analizi sonucunda elde edilen Cq değerleri incelendiğinde GFLV etmeni için P13, R2, R3, R9, R13 ve R22; GLRaV-1 etmeni için P4, R49 ve Y2; GLRaV-2 etmeni için İ9, İ10, İ23, İ39, İ41, M12 ve R10; GLRaV-3 etmeni için ise İ37, L6, O6, O8, R23 ve U6 numaralı izolatlarda amplifikasyon tespit edildiği görülmektedir. Ancak amplifikasyon tespit edilen bu izolatların içerisinde DAS-ELISA ve konvensiyonel RT-PCR sonucunda sağlıklı olduğu bilinen GFLV için R2 ve R3; GLRaV-1 için P4; GLRaV-2 için İ39 ve İ41 ile GLRaV-3 için ise R23 numaralı izolatlar da bulunmaktadır. Syber Green I temelli Real-time PCR sonucunda elde edilen Cq değerleri, Real-time PCR ardından gerçekleştirilen erime eğrisi analiz sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde DAS-ELISA ve konvensiyonel RT-PCR sonucunda sağlıklı olduğu bilinen izolatlarda tespit edilen amplifikasyonların hedef dışı ürünlere ait olduğu belirlenmiş ve bu izolatlar sözkonusu etmenler açısından sağlıklı olarak değerlendirilmiştir.

GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2 ve GLRaV-3 etmenleri açısından gerçekleştirilen Real-time PCR çalışmaları sonucunda Çizelge 3'te yer alan izolatların teşhisleri ve optimizasyon çalışmaları başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Real-time PCR ve sonrasında gerçekleştirilen erime eğrisi analizleri sonuçları, DAS-ELISA ve konvensiyonel RT-PCR sonuçlarıyla paralellik göstermiştir. Günümüzde sözkonusu etmenlerin Real-time PCR ile tanısı birçok araştırmacı tarafından başarılı bir şekilde gerçekleştirilmektedir (Osman and Rowhani, 2006; Osman et al., 2007; Osman et al., 2008). Real-time PCR, saptama limitleri açısından konvensiyonel RT-PCR ile kıyaslandığında son derece düşük, oldukça hızlı ve daha güvenilir bir tanı yöntemidir. Ayrıca Real-time PCR, konvensiyonel RT-PCR'dan sonraki jel elektroforez ve görüntüleme işlemlerine ihtiyaç duymamakta, dolayısıyla jel elektroforez aşamasındaki olası kontaminasyon riski ve pipetleme hatalarını ortadan kaldırmakta, ayrıca emek ve zaman açısından ciddi kazanımlar sağlamaktadır. Ayrıca Syber Green I temelli Real-time PCR yöntemi açısından optimizasyonu yapılan viral etmenlerin "Meyve ve Asma Fidanı ile Üretim Materyallerinde Bitki Sağlığı Standartları Talimatı"nda yer alıyor olması sertifikasyon analizleri açısından yetkilendirilmiş tanı laboratuvarlarının yöntemi kullanarak hızlı ve güvenilir sonuçlar vermesi açısından da önem taşımaktadır. Son dönemde Syber Green I benzeri floresan boyaları içeren Real-time PCR reaktiflerinin fiyatlarının düşmesiyle örnek başı maliyetler firmalara

DETECTION OF SEVERAL IMPORTANT VIRAL AGENTS BY
REAL-TIME PCR IN AEGEAN VINEYARDS

göre değişmekle birlikte konvansiyonel RT-PCR maliyetleriyle hemen hemen aynı seviyelere gerilemiştir. Bu avantajlarının yanında bu çalışmada da olduğu gibi Syber Green I benzeri florosan boyaların kullanıldığı durumlarda sıklıkla primer dimerlerinden kaynaklı çoğalan hedef dışı bir takım ürünler de tespit edilebilmekte ve bu durum sonuçların hatalı yorumlanmasına neden olabilmektedir. Ortaya çıkabilecek hedef dışı ürünleri belirleyebilmek ve olası hatalı sonuçları elemine edebilmek amacıyla elde edilen Cq değerleri mutlaka erime eğrisi analizleri sonuçlarıyla birlikte değerlendirilmelidir.

LİTERATÜR LİSTESİ

- Abad, Z. G., Abad, J. A., Cacciola, S. O., Pane, A., Faedda, R., Moralejo, E., Perez-Sierra, A., Abad-Campos, P., Alvarez-Bernaola, L. A., Bakonyi, J., Jozsa, A., Herrero, M. L., Burgess, T. I., Cunnington, J. H., Smith, I. W., Balci, Y., Blomquist, C., Henricot, B., Denton, G., Spies, C., Mcleod, A., Belbahri, L., Cooke, D., Kageyama, K., Uematsu, S., Kurbetli, I., and Değirmenci, K. 2014. *Phytophthora niederhauserii* sp. nov., a polyphagous species associated with ornamentals, fruit trees and native plants in 13 countries. *Mycologia*, 106:431-447.
- Anonymous 2015. Agricultural Production Statistics of Turkish Statistical Institute. (Web Page: <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>) (Date Accessed: January 2016).
- Browne, G. T., and Viveros, M. A. 1998. Diverse symptoms and losses associated with *Phytophthora* spp. in California almonds. *Acta Horticulturae*, 470:570-575.
- Akbaş, B. and Erdiller, G. 1993. Researches on Grapevine Virus Diseases and Determination of Their Incidences in Ankara, Türkiye. *Journal of Turkish Phytopath. Soc.* V. 22(2-3): 47-54.
- Akbaş, B. ve Erdiller, G., 1998. Karaman, Konya ve Nevşehir ili bağ alanlarında görülen virüs hastalıkları. Türkiye VIII. Fitopatoloji Kongresi, 149-153. 21-25 Eylül 1998, Ankara.
- Akbaş B, Kunter B. and Ilhan D., 2007. Occurrence and distribution of grapevine leafroll associated viruses 1,2,3 and 7 in Turkey. *J Phytopathol* 155:122-124.
- Akdoğan, N. 1956. Kısa Boğum (Degeneressans Infecteus). *Sakarya Ziraat Mücadele Enstitüsü Halk Broşürleri* No:5 İstanbul. 6. S.
- Hu, J. S., Gonsalves, D. and Teliz, D., 1990. Characterization of Closterovirus like particles associated with grapevine leafroll diseases. *J. Phytopathol.* 128:1-14.
- Anonim, 1999. Bağ Entegre Mücadele Teknik Talimatı. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Ankara, 1999.
- Azeri, T., 1990. Detection of Grapevine Leafroll Virus in Different Grapevine Varieties by Indexing. *Journal of Turkish Phytopathological Society*, 19 (3):103-110.
- Azeri, T. ve Çiçek, Y. 1995. İntrodüksiyon ve Klon Seleksiyonuyla Elde Edilmiş Bazı Bağ Çeşitleri ve Anaçlarındaki Virüs ve Virüs Benzeri hastalıkların Saptanmasına Yönelik Araştırmalar. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi. Adana. 26-29 Eylül 1995, s. 374-377.
- Azeri, T. and Fidan, Ü. 1988. Virus and Virus-Like Diseases Effecting Grapevine and Growing Virus-Free Grapes in the Aegean Coast. *Proc. Of the V. Congress of Turk. Phyt. Soc.* Oct. 1988, Antalya, Türkiye.
- Buzkan, N., Karadağ, S. Öztekin, V., Kaya, A., Mınafra, A. and Ben-Dov, Y. 2010. First Report of the Occurrence OF Grapevine Leafroll Associated Virus-5 in Turkish Vineyards. *J. Phytopathol.* 158: 448-449.
- Chou, Q., Russel, M., Birch, D., Raymond, J. and Bloch., W., 1992. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acid Res.* 20 (7), 1717-1723.
- Çiğşar, İ., 2002. Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Nevşehir İllerinde Bağlarda Zararlı Virüs ve Virüs Benzeri Hastalıkların Biyolojik ve Serolojik Yöntemlerle Saptanması ve İki Yeni Nepovirüsün Karakterizasyonu. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 111 s.

- Çiğşar, İ., G.P. Martelli and Digiario, M. 2002. Sanitary Status of Grapevines in South-eastern and Central Anatolia (Turkey). OEPP/EPPO Bulletin 32: 471-475.
- Çiğşar, İ. ve Yılmaz, M.A. 1998. Güneydoğu Anadolu Bağlarında Görülen Virüs Hastalıklarının Serolojik Yöntemlerle Saptanması. Türkiye VIII. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri. Ankara, 21-25 Eylül 1998, s. 154-157.
- Digiario, M., Martelli G.P. and Savino V., 2000. Phloem-limited viruses of the grapevine in the Mediterranean and Near East. Extended Abstracts 13th ICGV, Adelaide, pp. 75-76.
- Erdiller, G. 1982. Kısa Boğum Hastalık Etmeninin Morfolojik ve Serolojik Özellikleri ve Standart Irklarla Karşılaştırılması Üzerine Araştırmalar. A.Ü. Zir. Fak. Yayınları. 834 Bil. Araş. ve İncelemeler 496 s.
- Gürsoy, Y.Z. 1988. Vein Necrosis: A New Virus Like Diseases in Turkish Vineyards. Journal of Turkish Phyt. Soc. V. 17 (1): 43-46.
- Gürsoy, Y.Z., 1991. Asma Yaprak Kıvrılma Virüsü (Grapevine Leafroll Virus Tip I ve III)'nun Bazı Üzüm Çeşitlerinde ELISA testi ile Saptanması. VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi. İzmir, 7-11 Ekim 1991, s.397-400.
- Kaya, A. ve Erilmez, S., 2014. Detection of Viruses in Aegean Region Grapevines. J. Turk. Phytopath. Vol:43 No:1-3, 45-57.
- Köklü, G. 1999. Trakya Bölgesi Bağlarında Asma Yaprak Kıvrılma Virüs Hastalığının Karakterizasyonu ve Surveyi. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, 142 s.
- Köklü, G. and Baloğlu, S., 2000. Determination of Incidence of Grapevine leafroll Associated Viruses in Some Grapevine Varieties Grown in Thrace Region. The Journal of Turkish Phytopathology 29 (2-3), 85-94.
- Mackay, L.M., Arden, K.E. ve Nitsche, A. 2002. Survey and Summary Real-time PCR in Virology. Nucleic Acids Research, Vol.30, No:6, 1292-1305.
- Martelli, G.P. 1987. Virus and Virus-like Diseases of Grapevine in Turkey. A Report to the Government of Turkey. Published by FAO: Rome 1987.
- Martelli, G.P. and Boudon-Padieu, E., 2006. Directory of Infectious Diseases of Grapevines and Viroses and Virus-like Diseases of the Grapevine: Bibliographic Report 1998-2004, Chiam, 2006.
- Monette, P.L., James, D. and Godkin, S.E., 1989. Comparison of RNA extracts from in vitro shoot tip cultures of leafroll-affected and leafroll-free Grapevine Cultivars. Vitis, 28:229-235.
- Osman, F., Leutenegger, C., Golino, D. and Rowhani, A., 2007. Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of Grapevine leafroll associated viruses 1-5 and 9. J. Virol. Methods 141, 22-29.
- Osman, F., Leutenegger, C., Golino, D. and Rowhani, A., 2008. Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan® RT-PCR in detection of grapevine viruses. J. Virol. Methods 149, 292-299.
- Osman, F. and Rowhani, A., 2006. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). J. Virol. Methods 133, 130-136.
- Önder, S. ve Gümüş, M. 2014. Ege Bölgesi Bağ Alanlarında Yaprak Kıvrılması Hastalığı ile İlişkili 4 Yeni Ampelovirus. V. Türkiye Bitki Koruma Kongresi Bildirileri, s:200, 03-05 Şubat 2014, Antalya.
- Özaslan, M. 1995. Adana, Tarsus, Gaziantep, Şanlıurfa ve Adıyaman Bölgelerinde Yetiştirilen Bağlarda Zararlı Virüs Hastalıklarının Serolojik ve Biyolojik Yöntemlerle Saptanması. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü., Doktora Tezi., 102 s.
- Özaslan, M., Baloğlu. S. ve Yılmaz, M.A. 1991. Kahramanmaraş Bölgesi'nde Lokal Olarak Yetiştirilen Üzüm Çeşitlerinde Virüs Hastalıkları. VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi. Bildiriler, (401-406 S), Türkiye Fitopatoloji Derneği.
- Özaslan, M. ve Yılmaz, M., 1995. Adana, Tarsus, Gaziantep, Şanlıurfa ve Adıyaman Bölgelerinde Yetiştirilen Bağlara Zarar Veren Virüs Hastalıkları. VII. Türkiye Fitopatoloji Kongresi. Adana, 26-29 Eylül 1995, s.306-312.

DETECTION OF SEVERAL IMPORTANT VIRAL AGENTS BY
REAL-TIME PCR IN AEGEAN VINEYARDS

- Sarpkaya, K., 2003. Gaziantep ili ve ilçelerinde bağ virüs hastalıklarının serolojik yöntemlerle saptanması. Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 56 s.
- Teliz, D., Tanne, E., Gonsalves, D. and Zee, F., 1987. Field serology of viral antigens associated with grapevine leafroll disease. *Plant Dis.*, 71: 704-709.
- TÜİK, 2013, Türkiye İstatistik Kurumu, Bitkisel Üretim İstatistikleri 2013, Erişim Tarihi: 28 Temmuz 2015.
- Yılmaz, M.A., Yurtmen, M., Çığışar İ. and Özaslan, M., 1997. A Survey Of Grapevine Viruses In Turkey. 12th Proc. of ICVG. Lisbon, Portugal. 28 Sep.2 Oct, 1997. P 113.
- Zee, F., Gonsalves, D., Goheen, A., Kim, K. S., Pool, R. and Lee, R. F., 1987. Cytopathology of leafroll-diseased grapevines and the purification and serology of associated closterovirus-like particles. *Phytopathology.* 77:1427-1434.
- Zipper, H., Brunher, H. and Bernhagen, J., 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acid Res.* 32 (12), e103.