

Comparison of Conventional RT-PCR and Real-time RT-PCR Assays for Diagnosis of *Grapevine fanleaf nepovirus* (GFLV)*

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 by December 1, 2016

ABSTRACT

Recently advances in biotechnology and molecular biology have played a significant role in development of serological and molecular assays for detection of plant viruses. However, specificity and sensitivity of them may show variation according to pathogens and hosts. In this study, *Grapevine fanleaf nepovirus* (GFLV) which was the most prevalent viral agent in Aegean viticulture production areas was used to compare conventional RT-PCR and real-time RT-PCR. For this purpose, 8 infected and 5 healthy, totally 13 symptomatic grapevine samples which have been detected by DAS-ELISA were used. After the conventional RT-PCR and real-time PCR assays, results were evaluated agarose gel electrophoresis and melting analysis respectively. The conventional RT-PCR results showed that 10 out of 13 samples were infected with GFLV, whereas 11 out of 13 samples were found infected with real-time RT-PCR. At the end of this study, the real-time RT-PCR assays were found more sensitive, reliable and rapid than conventional RT-PCR.

Keywords: Grapevine, GFLV, RT-PCR, real-time PCR

Grapevine fanleaf nepovirus (GFLV)'ün Tanınmasında Konvansiyonel RT-PCR ile Real-Time RT-PCR Tekniklerinin Karşılaştırılması

ÖZET

Biyoteknoloji ve moleküler biyolojideki son gelişmeler, bitki virüslerinin tanınmasında kullanılan serolojik ve moleküler yöntemlerin gelişmesinde önemli bir rol oynamıştır. Bununla birlikte bu metotların spesifiklikleri ve duyarlılıkları patojenlere ve konukçulara göre değişim gösterebilmektedir. Bu çalışmada, Ege Bölgesi bağ alanlarında yaygın olarak görülen *Grapevine fanleaf nepovirus* (GFLV)'ün konvansiyonel RT-PCR ve real-time PCR yöntemleriyle karşılaştırmalı tanıları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, daha önce DAS-ELISA yöntemiyle test edilen 8 enfekteli, 5 sağlıklı toplam 13 adet semptom gösteren asma örneği kullanılmıştır. Sonuçlar, konvansiyonel RT-PCR'in ardından agaroz jel elektroforez sistemi ile real-time PCR'dan sonra ise melting (erime eğrisi) analizi ile değerlendirilmiştir. Konvansiyonel RT-PCR sonucunda 13 örnekten 10'u enfekteli olarak bulunurken real-time PCR yönteminde 13 örnekten 11'i enfekteli olarak saptanmıştır. Gerçekleştirilen bu çalışmanın sonucunda real-time RT-PCR yönteminin konvansiyonel PCR'a göre oldukça duyarlı, güvenilir ve hızlı bir yöntem olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Asma, GFLV, RT-PCR, real-time PCR

*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, üzüm üretimimizin 1.738.714 ton ile %43'ünü sağlayarak ülkemiz bağcılığında ilk sırada yer almaktadır (TÜİK, 2013). Bağlarda üretimi sınırlayan faktörlerin içerisinde hastalık ve zararlıların payı önemli bir yer tutmaktadır. Bağlarda görülen hastalık ve zararlılar incelendiğinde virüs ve virüs benzeri etmenlerin verim ve kalite kayıpları açısından önemli bir yere sahip olduğu görülmektedir. *Grapevine fanleaf nepovirus* (GFLV), bağların bilinen en eski ve en önemli, dünya çapında yaygın olarak görülen virüs hastalıklarından birisidir. Avrupa literatüründe bu hastalığa ait yaklaşık 150 yıl öncesine dayanan kayıtlar bulunmaktadır. GFLV hakkındaki ortak görüş, bu hastalığın asma yetiştiriciliği yapılan en erken dönemden günümüze kadar geçen süre boyunca Akdeniz Havzası ve Yakın Doğu'da var olduğu şeklindedir (Martelli and Boudon-Padieu, 2006). Günümüzde ise etmenin dünyada bağ yetiştiriciliği yapılan hemen her yere yayıldığı ve neredeyse tüm *Vitis* türlerini enfekte ettiği bilinmektedir (Martelli and Savino, 1990; Martelli et al., 2001).

GFLV'nin asmalarda neden olduğu belirtiler arasında yelpaze yaprak oluşumu, boğum aralarının kısalması, anormal sülük ve yaprak oluşumu, sürgünlerde yassılaşıma ve zigzag yapı oluşumları, yapraklarda derin dilimlilik, diş oluşumu ve küçülmeler, sararma ve damar bantlaşması yer almaktadır. GFLV, özellikle sofralık çeşitlerde irili ufaklı tane oluşumu nedeniyle üzümün ticari değerinin düşmesi sonucunda %80'lere varan oranlarda zarara neden olabilmektedir (Anonim, 1999).

GFLV; arazi koşullarında budama alet ve ekipmanları, kök kaynaşması ve vektör nematodlardan *Xiphinema index* ve *X. italiae* ile taşınabilmektedir. Vektör nematodlar bünyelerine aldıkları virüsü 10-12 ay süresince taşıyabilmektedirler (Martelli et al., 2001). GFLV'nin uzak mesafelere taşınması ise genellikle enfekteli üretim materyali ile olmaktadır (Martelli and Savino, 1990).

Ülkemizde bağ yetiştiriciliği yapılan farklı bölgelerde gerçekleştirilen sörvey çalışmaları sonucunda, GFLV'nin %47'ye varan enfeksiyon oranı ile bağlarda yaygın olarak tespit edilen virüs hastalıkları arasında ilk sırada yer aldığı farklı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Akdoğan, 1956; 1958; 1965; Erdiller, 1982; Martelli, 1987; Azeri and Fidan 1988; Özaslan ve ark., 1991, Özaslan et al., 1993; Özaslan ve Yılmaz, 1995; Akbaş ve Erdiller, 1993; Azeri ve Çiçek, 1995; Çiğşar ve Yılmaz, 1998; Çiğşar, 2002; Çiğşar ve ark., 2002; Kaya ve Erilmez, 2014).

Günümüzde GFLV'nin tanısı serolojik yöntemlerden "Double-Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay" (DAS-ELISA) ve moleküler yöntemlerden ise konvansiyonel RT-PCR yöntemi kullanılarak yapılmaktadır. Serolojik tanı yöntemlerinden DAS-ELISA günümüzde rutin laboratuvar örneklerinin testlenmesi amacıyla standart test protokolü olarak kullanılmakta ancak floemde lokalize olan ve düşük virüs konsantrasyonuna sahip örneklerde ve/veya kullanılan antiserumun akraba virüslerle çapraz reaksiyon göstermesi gibi bazı durumlarda zaman zaman güvenilir olmayan sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Borja and Ponz, 1992; Golino et al., 1992; Rowhani et al., 1992). Zaman zaman yaşanan bu olumsuzluklar testlerin tekrarlanması ve/veya sonuçların daha duyarlı bir yöntemle teyit edilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu amaçla moleküler yöntemlerden konvansiyonel RT-PCR yöntemi birçok laboratuvarında kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemde de başlangıçtaki hedef genetik materyal miktarının çok düşük olması durumunda amplifikasyonun gerçekleşmemesi, PCR'dan sonra elektroforez aşamasına bağımlılık, elektroforez aşamasındaki olası kontaminasyon riskleri ve pipetleme hataları, amplifikasyon seviyesinin düşük olduğu durumlarda oluşan PCR ürünlerinin görüntülenmesinde agaroz jelin yeterli hassasiyete sahip olamaması, emek yoğun işgücü kullanımı ve çok fazla zaman alması gibi bir takım olumsuzluklarla karşılaşılabilir (Anonim, 2009).

Teknolojinin hızla gelişmesiyle birlikte önceleri sadece insan sağlığında kullanılan real-time PCR yöntemi günümüzde bitki virolojisinde de kendisine kullanım alanı bulmuştur. Karantina analizlerinde olduğu gibi oldukça fazla sayıda örnekle çalışan laboratuvarlarda bitki virüs hastalıklarının hızlı ve güvenilir tanısı oldukça büyük önem taşımaktadır. Real-time PCR yöntemi, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan

sinyalinin ölçülmesiyle, kantitatif sonuç alınabilen, özgüllüğü son derece yüksek olan bir PCR yöntemidir (Mackay et al., 2002).

Bu çalışmada GFLV açısından DAS-ELISA yöntemiyle enfekteli ve sağlıklı olduğu önceden bilinen bazı izolatlar seçilmiş ve konvansiyonel RT-PCR ve real-time RT-PCR yöntemiyle GFLV etmeni açısından tanılarının gerçekleştirilmesi ve her iki moleküler tanı yöntemiyle de elde edilen sonuçların duyarlılıklarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Çalışmada virüs kaynağı ve negatif kontrol olarak 2012 ve 2013 yıllarında Ege Bölgesi bağ alanlarından elde edilen ve GFLV etmeni açısından enfeksiyon durumları DAS-ELISA ile önceden belirlenmiş izolatlar kullanılmıştır (Çizelge 1).

Bunun dışında Total RNA ekstraksiyon kitleri, cDNA sentez kitleri, konvansiyonel PCR ve real-time PCR çalışmaları için enzimler, GFLV'nin moleküler yöntemlerle tanısında kullanılan spesifik oligonükleotidler, laboratuvarlarda rutin olarak kullanılan farklı özellik ve markalardaki sarf malzemeleri (Eldiven, homojenizasyon tüpleri, mikro pipet uçları, PCR ve mikrosantrifüj tüpleri v.b.) ve laboratuvar cihazları (soğutmalı santrifüj, ısıtıcı kuru blok, konvansiyonel PCR ve real-time PCR sistemi) de analizlerin gerçekleştirilmesi sırasında kullanılan diğer materyalleri oluşturmuştur.

Yöntem

Total RNA Ekstraksiyonu

Konvansiyonel ve real-time RT-PCR çalışmalarında kullanılacak asma örneklerine ait total RNA'lar Zymo firmasından temin edilen ZR Plant RNA MiniPrep™ RNA ekstraksiyon kiti (R2024) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon protokolü içinde yer alan santrifüj işlemlerinin tümü +4 °C'ye ayarlı soğutmalı santrifüj kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla, ufak parçalara ayrılmış 150 mg yaprak dokusu lysis tüpleri içerisine konulmuş ve üzerlerine 1000 µl lysis buffer eklenerek homojenize edilmiştir. Homojenizasyonun ardından lysis tüpleri 12.000 g'de 2dk. 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 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 mikrosantrifüj tüp içerisine yerleştirilmiş ve filtre üzerine 45 µl nuclease free su eklenerek 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 kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır. Her iki PCR yöntemi için de aynı yöntemle elde edilen total RNA'lar kullanılmıştır.

Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Elde edilen Total RNA'lardan komplementer DNA (cDNA)'lar Fermantas firmasından temin edilen Thermo Scientific RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1632) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. GFLV,

COMPARISON OF CONVENTIONAL RT-PCR AND REAL-TIME RT-PCR ASSAYS FOR DIAGNOSIS OF *GRAPEVINE FANLEAF NEPOVIRUS (GFLV)*

genomunda poly (A) kuyruğu içermektedir (Sánchez et al., 1991). cDNA aşamasında daha spesifik bir sentez gerçekleştirilmesi amacıyla oligo (dT)₁₈ primer kullanılmıştır. Bu amaçla, 6µl 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 thermocycler'a yerleştirildikten sonra 65 °C'de 5dk. inkübe edilmiş ve soğuk blok üzerine alınarak 1 dk. bekletilmiştir. Ardından tüpler, 1000 rpm'de 10 sn. santrifüj edilmiş ve tekrar soğuk blok üzerine alınmıştır. 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 thermocycler'a yerleştirilerek önce 42 °C'de 60dk. inkübe edilmiş ardından reaksiyonu sonlandırmak amacı ile 70 °C'de 5dk. inkübe edilerek cDNA'lar elde edilmiştir. Elde edilen cDNA'lar kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır. Elde edilen cDNA'lar her iki PCR yöntemi için de başlangıç materyali olarak kullanılmıştır.

Konvansiyonel PCR Yöntemi

Konvansiyonel PCR yöntemi, Applied Biosystems GeneAmp® 9700 PCR sistemi ve Thermo PCR Master Mix (2X) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar Çizelge 1'de yer alan spesifik primer dizileri kullanılarak konvansiyonel PCR sistemi ile GFLV etmeni açısından test edilmiştir. Çalışmada GFLV'nin farklı ırklarının genomlarına bağlanabilen, GFLV_CP2_822r reverse primeri (5' TTCCACATACACCCCGGGATA 3') ile uyumlu, GFLV_CP2_671f1 (5' GTTGTGTGTTAGGTATGGGAGGTACTATTA 3') ve GFLV_CP2_671f2 (5' TGTGTTTTGGGTATGGGAGGTACTATTA 3') forward primerleri (Osman and Rowhani, 2006) kullanılmıştır. Bu amaçla PCR tüpleri içerisine 0,5 µl 20 µM GFLV_CP2_671f1 ve GFLV_CP2_671f2 primerleri ile 0,5 µl 20 µM GFLV_CP2_822r primeri, 1 µl cDNA ve 25 µl 2x Thermo PCR Master Mix eklenerek nuclease free su ile son hacim 50 µl'ye tamamlanmıştır. Her koşulda 1 tüp olası kontaminasyon riskine karşı örnek eklenmeden negatif kontrol olarak çalışmaya eklenmiştir. Tüpler konvansiyonel PCR sistemine yerleştirildikten sonra, önce 95 °C 5 dk. ön ısıtma yapılmış ardından 45 döngü; 94 °C'de 30 sn, 57 °C'de 30 sn ve 72 °C'de 45 sn ve son olarak 72 °C 10 dk.'lık spesifik döngü programları kullanılarak PCR gerçekleştirilmiştir. Çizelge 2'de yer alan spesifik döngü programları uygulanmıştır.

Agaroz Jel Elektrophorez Yöntemi

Konvansiyonel PCR'ın ardından kullanılan primerlere spesifik 151 bp'lik ürünün belirlenmesi amacıyla örnekler %1,5'lük agaroz jelde yürütülmüştür. Örnekler jele yüklenirken 10 µl örneğe 2 µl yükleme tamponu eklenerek yükleme yapılmış ve elektrophorez 1X TAE tamponu içerisinde 100 V'da 60 dk. olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Jel Dökümantasyon Sisteminde Sonuçların Değerlendirilmesi

Jel dökümantasyon sisteminde sonuçların değerlendirilmesi DNR MiniBIS Pro jel dökümantasyon sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, agaroz jel elektrophorez yönteminin ardından jel, ethidium bromide ile boyanmış ve jel dökümantasyon sisteminde görüntülenmiştir.

Real-time PCR Yöntemi

Real-time PCR yöntemi, Roche LightCycler® Nano real-time PCR sistemi ve Roche FastStart Essential DNA Green Master Mix kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örnekler için cDNA'lar "Konvansiyonel PCR Yöntemi" kısmında belirtilen GFLV'ye spesifik primer dizileri kullanılarak real-time PCR sistemi ile test edilmiştir. Bu amaçla PCR tüpleri içerisine 0,2 µl 20 µM GFLV_CP2_671f1, GFLV_CP2_671f2 ve GFLV_CP2_822r primerleri, 2 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 önce 95 °C 10 dk. ön ısıtma yapılmış ardından 45 döngü; 95 °C'de 20 sn, 57 °C'de 20 sn ve 72 °C'de 15 sn olacak şekilde spesifik döngü programları kullanılarak real-time PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir.

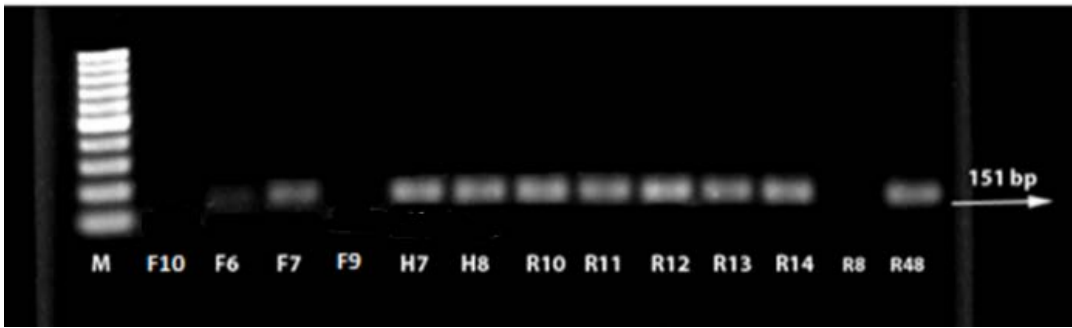
Melting (Erime eğrisi) Analizi

Real-time PCR sonuçlarının yorumlanması PCR işleminin ardından Roche LightCycler® Nano real-time PCR sistemiyle gerçekleştirilen melting (erime eğrisi) analizine göre yapılmıştır. Gerçekleştirilen melting analizi 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 et al., 1992; Zipper et al., 2004). Bu amaçla, real-time PCR çalışmalarında kullanılan Roche FastStart Essential DNA Green Master mix protokolünde belirtildiği üzere çoğaltılan PCR ürünü 62 °C'den 95 °C'ye kadar saniyede 0,1 °C'lik artışlarla ısıtılmış ve PCR ürünündeki çift zincirli DNA'nın hangi sıcaklık derecesinde denatürasyona uğradığı SYBR Green I floresan boyanın verdiği ışımaya sonucunda tespit edilmiştir. Melting analizi sonucunda enfekteli ve sağlıklı örnekler için elde edilen erime sıcaklığı değerlerine göre sonuçlar değerlendirilerek enfeksiyon durumları belirlenmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Konvansiyonel PCR Yönteminin Sonuçları

Agaroz jel elektroforez yönteminin ardından jel dökümantasyon sistemi ile elde edilen jel fotoğrafı incelendiğinde F6, F7, H7, H8, R10, R11, R12, R13, R14 ve R48 kodlu izolatlarda beklenen hedef ürün olan 151 bp büyüklüğünde DNA bantlarının elde edildiği ve bu izolatların GFLV ile enfekteli olduğu; R8, F10 ve F9 kodlu izolatlarının ise sağlıklı olduğu belirlenmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. GFLV'nin konvansiyonel PCR ile tanısı sonucunda jel dokümantasyon sistemi ile elde edilen jel fotoğrafı (M:100 bp DNA ladder).

Şekil 1'de yer alan bantlar dikkatli bir şekilde incelendiğinde F6 ve F7 kodlu izolatlara ait bantların H7, H8, R10, R11, R12, R13, R14 ve R48 numaralı izolatlara ait bantlardan daha düşük yoğunlukta olduğu anlaşılmaktadır.

Çalışmaya dahil edilen izolatların Çizelge 1'de yer alan DAS-ELISA ile karşılaştırmalı sonuçları incelendiğinde DAS-ELISA tanı yöntemiyle sağlıklı olduğu bilinen F6 ve F7 numaralı izolatların konvansiyonel PCR sonucunda GFLV açısından enfekteli olduğu tespit edilmiştir. DAS-ELISA tanı yöntemi sonucunda söz konusu izolatların sağlıklı olarak tespit edilmesinin bu örneklerdeki virüs konsantrasyonunun çok düşük seviyelerde olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. DAS-ELISA tanı yöntemiyle ilgili yaşanan bu gibi durumlar farklı birçok araştırmacı tarafından da bildirilmiştir (Borja and Ponz, 1992; Golino et al., 1992; Rowhani et al., 1992).

COMPARISON OF CONVENTIONAL RT-PCR AND REAL-TIME RT-PCR ASSAYS FOR DIAGNOSIS OF
GRAPEVINE FANLEAF NEPOVIRUS (GFLV)

Çizelge 1. GFLV'nin farklı yöntemlerle tanılarında elde edilen sonuçlar.

İzolatlar	DAS-ELISA	Konvansiyonel PCR	Real-time PCR
F6	S	E	E
F7	S	E	E
F9	S	S	S
F10	S	S	S
H7	E	E	E
H8	E	E	E
R8	S	S	E
R10	E	E	E
R11	E	E	E
R12	E	E	E
R13	E	E	E
R14	E	E	E
R48	E	E	E

Konvansiyonel PCR, DAS-ELISA ile karşılaştırıldığında oldukça duyarlı bir yöntem olduğu için F6 ve F7 numaralı izolatlarda etmeni başarılı bir şekilde tanımlayabilmiştir. Buna rağmen söz konusu iki izolatın jel görüntüsündeki bantlarının enfekteli olarak tespit edilen diğer izolatlara göre silik oluşu amplifikasyon sonucu oluşan hedef ürün miktarının gerçekten de az olduğunun bir göstergesi olarak bu durumu doğrular niteliktedir.

Real-time PCR ve Melting Analizi Sonuçları

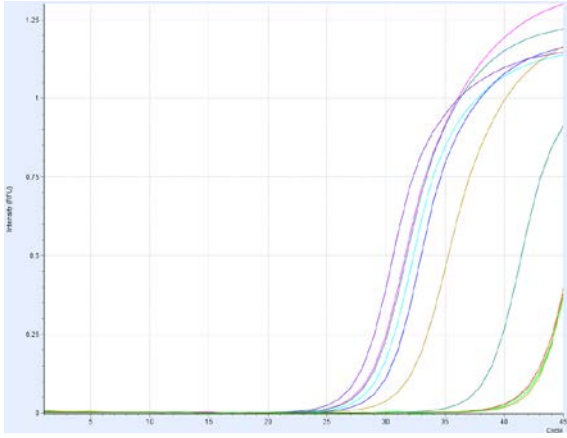
GFLV etmeni açısından gerçekleştirilen real-time PCR analizi sonuçlarının yorumlanmasında öncelikle söz konusu izolatlarda amplifikasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği, gerçekleştiyse eğer kaçınıcı döngü sonunda başladığı tespit edilmiştir (Şekil 2).

Real-time PCR analizi sonucu elde edilen quantitation cycle (Cq) değerleri Çizelge 2'de yer almaktadır. Real-time PCR analizi sonucu Cq değerleri elde edilemeyen izolatlar GFLV açısından sağlıklı olarak değerlendirilmiştir. Cq değerleri elde edilen izolatlar ise amplifikasyon sonucu elde edilen ürünün hedef ürün olup olmadığının tespit edilmesi amacıyla her bir izolat için gerçekleştirilen melting analizi sonuçlarına göre belirlenmiştir.

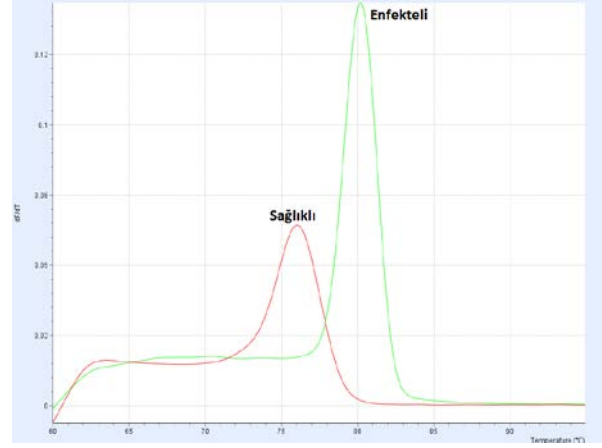
Real-time PCR analizi sonucunda gerçekleştirilen melting analizi sonuçlarında GFLV etmeni açısından sağlıklı örneklerin 76,5 °C'de denatüre olduğu enfekteli örneklerde ise bu değer 80,5 °C olduğu belirlenmiştir (Şekil 3). GFLV için gerçekleştirilen melting analizi sonucunda 80,5 °C'de pik veren örnekler enfekteli olarak değerlendirilirken 76,5 °C'de pik veren örnekler ise sağlıklı olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 2'de yer alan Real-time PCR analizi sonucunda elde edilen Cq değerleri incelendiğinde F6, F7, F10, H7, H8, R8, R10, R11, R12, R13, R14 ve R48 numaralı izolatlarda amplifikasyon tespit edildiği görülmektedir. Ancak amplifikasyon tespit edilen bu izolatların melting analizi sonuçları incelendiğinde F10 numaralı örnekte gerçekleşen amplifikasyonun hedef dışı ürüne ait olduğu belirlenmiş ve bu örnek sağlıklı olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4).

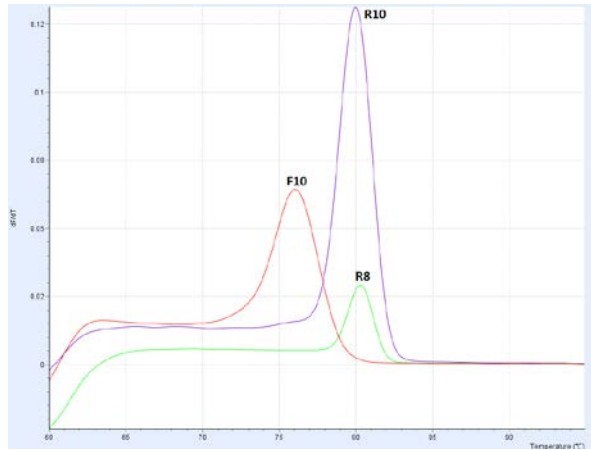
Çizelge 1'de yer alan karşılaştırmalı sonuçlar incelendiğinde çalışmaya dahil edilen F6 ve F7 numaralı izolatların DAS-ELISA sonuçlarına göre GFLV açısından sağlıklı olduğu bilinmesine karşın konvansiyonel PCR yönteminde elde edilen sonuçlara benzer şekilde söz konusu iki izolatın real-time PCR yöntemi sonucunda da enfekteli olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında hem DAS-ELISA hem de konvansiyonel PCR sonucunda sağlıklı olduğu tespit edilen R8 numaralı izolatın ise gerçekleştirilen real-time PCR tanı yöntemi sonucunda enfekteli olduğu tespit edilmiştir. R8 numaralı izolatın, virüs konsantrasyonunun düşük olmasından dolayı jel elektroforez aşaması sonucunda enfekteli olarak tespit edilemediği düşünülmektedir. R8 numaralı izolat için gerçekleştirilen melting analizi sonuçları da bu durumu doğrular niteliktedir.



Şekil 2. Real-time PCR analizi sonucu elde edilen Cq grafiği.



Şekil 3. GFLV ile enfekteli ve sağlıklı izolatların melting analizi sonuçları.



Şekil 4. F10, R8 ve R10 numaralı izolatların melting analizi sonuçları.

Çizelge 2. Real-time PCR ve melting analizlerine ait sonuçlar.

İzolatlar	Cq değeri	Melting analizi sonucu
F6	34.73	E
F7	32.73	E
F9	0	S
F10	36.81	S
H7	24.66	E
H8	22.81	E
R8	41.91	E
R10	26.70	E
R11	27.69	E
R12	29.11	E
R13	31.18	E
R14	27.82	E
R48	27.03	E

E: Enfekteli, S: Sağlıklı, 0: Amplifikasyon tespit edilmedi.

COMPARISON OF CONVENTIONAL RT-PCR AND REAL-TIME RT-PCR ASSAYS FOR DIAGNOSIS OF GRAPEVINE FANLEAF NEPOVIRUS (GFLV)

Şekil 4'te yer alan melting analizi sonuçları incelendiğinde R8 numaralı izolatin denatürasyonu sonucu açığa çıkan floresan ışımaya miktarının R10 numaralı izolata göre çok düşük seviyelerde kaldığı görülmektedir. Çizelge 2'de yer alan Cq değerleri incelendiğinde yine benzer bir şekilde R8 numaralı izolattan ilk floresan sinyalin 41,91. döngüde alındığı bu değer R10 numaralı izolat için 26,70 olduğu görülmektedir. Bu durum R8 numaralı izolatta amplifiye olan hedef ürün miktarının dolayısıyla da virüs konsantrasyonunun oldukça düşük seviyelerde olduğunu göstermektedir. Real-time PCR sistemi moleküler tanı araçları arasında saptama limitleri açısından son derece duyarlı bir yöntem olup çok düşük kopya sayısındaki başlangıç materyalini bile başarılı bir şekilde çoğaltıp enfeksiyon durumunu tespit edebilmektedir. Konvansiyonel PCR ile real-time PCR tanı yöntemleri arasında karşılaşılan duyarlılık farklılıklarıyla ilgili bu durum farklı çalışmalarda da bildirilmiştir (Osman et al., 2007, Osman et al., 2008).

GFLV etmeninin konvansiyonel PCR ve real-time PCR yöntemleri ile tanısı sonucunda DAS-ELISA tanı yöntemi sonucu sağlıklı olarak tespit edilmiş olan F6 ve F7 numaralı izolatların her iki moleküler yöntemle de enfekteli olduğu belirlenmiştir. Konvansiyonel PCR ve real-time PCR yöntemlerinin sonuçları birlikte değerlendirildiğinde bu durumun virüs konsantrasyonu ile ilgili olduğu anlaşılmaktadır. DAS-ELISA tanı yöntemiyle ilgili yaşanan bu gibi durumlar farklı birçok araştırmacı tarafından da bildirilmiştir (Borja and Ponz, 1992; Golino et al., 1992; Rowhani et al., 1992).

R8 numaralı izolat ise DAS-ELISA ve konvansiyonel PCR tanı yöntemleri sonucunda sağlıklı olarak bulunmasına rağmen real-time PCR tanı yöntemi sonucunda enfekteli olarak tespit edilmiştir. Bu durum, real-time PCR tanı yönteminin saptama limitlerinin konvansiyonel PCR'a göre oldukça düşük olduğunu doğrular niteliktedir. Karşılaşılan bu durum yapılan farklı çalışmalarda da bildirilmiştir (Osman et al., 2007, Osman et al., 2008). Nitekim, R8 numaralı izolat için gerçekleştirilen melting analizi ve elde edilen Cq değerleri, yüksek virüs konsantrasyonuna sahip R10 numaralı izolatla karşılaştırıldığında bu durumu doğrulamaktadır. Çalışmaya dahil edilen F6, F7 ve R8 dışındaki diğer 10 izolatta ise her üç tanı yönteminin de birbirleriyle paralel sonuçlar verdiği görülmektedir.

Real-time PCR, saptama limitleri konvansiyonel RT-PCR ile kıyaslandığında son derece düşük, oldukça hızlı ve daha güvenilir bir tanı yöntemidir. Ayrıca, PCR'dan sonraki jel elektroforez ve görüntüleme işlemlerine ihtiyaç duymamakta dolayısıyla jel elektroforez aşamasındaki olası kontaminasyon riski ve pipetleme hatalarını da ortadan kaldırmaktadır. Analiz süresi açısından konvansiyonel PCR ile sonuçların alınması yaklaşık 4,5-5 saat gibi bir süre alırken real-time PCR yöntemiyle 1,5-2 saat kadar bir sürede sonuçlar elde edilebilmektedir. Son dönemde real-time PCR sistemlerinin ve reaktiflerinin fiyatlarının düşmesiyle örnek başı maliyetler firmalara göre değişmekle birlikte konvansiyonel RT-PCR maliyetleriyle hemen hemen aynı seviyelerde seyretmektedir. Bu avantajlarının yanında bu çalışmada da olduğu gibi SYBR Green I benzeri floresan 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 melting analizi sonuçlarıyla birlikte değerlendirilmelidir. Real-time PCR yönteminin analiz süresi ve özellikle de saptama limitleri açısından sağladığı avantajların fazla sayıda örnekle çalışan başta karantina laboratuvarları olmak üzere hemen her laboratuvar için oldukça büyük bir fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

LİTERATÜR LİSTESİ

- 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.
- Akdoğan, N. 1956. Kısa Boğum (Degeneressans Infecteus). Sakarya Ziraat Mücadele Enstitüsü Halk Broşürleri No:5 İstanbul. S.6.

- Akdoğan, N. 1958. Kısa Boğum "Bulaşık Soysuzlaşma". Ziraat Vekaleti T.E.S.C. 102.
- Akdoğan, N. 1965. Bağlarda Bulaşık Soysuzlaşma (Kısa Boğum) ve Korunma Çareleri. Yenilik Basımevi, İstanbul s 8.
- Anonim, 1999. Bağ Entegre Mücadele Teknik Talimatı. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı. Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Ankara, 1999.
- Anonim, 2009. Real-time PCR Kursu Ders Notları, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarları, Ankara.
- 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.
- Borja, M.J. and Ponz, F. 1992. An appraisal of different methods for the detection of the walnut strain of cherry leaf roll virus. *Journal of Virological Methods*, 36:73-83.
- 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, s.111.
- 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.
- 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.
- Golino, D.A., Verdegaal, P., Rowhani, A. and Walker, M.A. 1992. Sampling procedures to find nepoviruses in grapevines need improvement. *Calif. Agric.*, 46:11-13.
- Kaya, A. ve Erilmez, S. 2014. Detection of Viruses in Aegean Region Grapevines. *J. Turk. Phytopath.* Vol:43 No:1-3, 45-57.
- Mackay, L.M., Arden, K.E. and 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, CHIEAM, 2006.
- Martelli, G.P., Walter, B. and Pink, L. 2001. Grapevine fanleaf virus. CMI/AAB Description of Plant Viruses No. 385, Kew, Surrey, Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists.
- Martelli, G.P. and Savino, V. 1990. Fanleaf degeneration. In: Pearson RC, Goheen AC (eds), Compendium of Grape Diseases, St. Paul, MN, APS Press, pp. 48-49.
- 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.

COMPARISON OF CONVENTIONAL RT-PCR AND REAL-TIME RT-PCR ASSAYS FOR DIAGNOSIS OF
GRAPEVINE FANLEAF NEPOVIRUS (GFLV)

- 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.
- Özaslan, M., Baloğlu. S. ve Yılmaz, M.A. 1991. Kahramanmaraş Bölgesi'nde Lokal Olarak Yetiştirilen Üzüm Çeşitlerinde Virüs Hastalıkları. VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi. Türkiye Fitopatoloji Derneği. Bildiriler, s.401-406.
- Özaslan, M., Baloğlu. S. and Yılmaz, M.A. 1993. Virus Diseases of Grapevine in South-eastern Anotolian Region in Türkiye. 11.Th Proc. Of. Icvg. Montreux, Switzerland. No:62 Ep. P. 122.
- 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.
- Rowhani, A., Walker, M.A. and Rokni, S. 1992. Sampling strategies for the detection of grapevine fanleaf virus and the grapevine strain of tomato ringspot virus. *Vitis*, 31:35-44.
- Sánchez, F., Chay, C., Borja, M. J., Riwhani, A., Romero, J., Bruening, G., and Ponz, F. 1991. cDNA sequence of the capsid protein gene and 3' untranslated region of a fanleaf isolate of grapevine fanleaf virus. *Nucleic acids research*, 19(19), 5440-5440.
- TÜİK, 2013, Türkiye İstatistik Kurumu, Bitkisel Üretim İstatistikleri 2013, Erişim Tarihi: 28Temmuz 2015.
- 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.