



# T.C. TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI

INTERNATIONAL SEED FEDERATION (ISF) ve  
EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION  
ORGANIZATION (EPPO)

STANDARTLARI DOĞRULTUSUNDA

DOMATES VE BİBER BİTKİ VE TOHUMLARINDA  
DOMATES KAHVERENGİ BURUŞUK MEYVE VİRÜSÜ  
(*Tobamovirus fructirugosum*)  
(TOMATO BROWN RUGOSE FRUIT VIRUS / TOBRFV)  
TESPİTİ İÇİN

**METOT DOĞRULAMA (VERİFİKASYON) REHBERİ**

Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü

TEMMUZ 2024



## ÖNSÖZ

İnsan sağlığı üzerindeki ciddi etkileri ve sağlık sistemlerinde yol açtığı büyük zorluklar nedeniyle küresel ölçekte SARS, domuz gribi ve son olarak COVID-19 salgınları, viral kaynaklı patojenlerin hızlı ve güvenilir teşhisinin önemini bir kez daha gözler önüne sermiştir. Bitkiler, hayvanlar ve insanlar üzerindeki bu tür patojenlerin hızlı tanımlanması, salgınların kontrol altına alınmasında kritik bir rol oynamaktadır. Son yirmi yıl içerisinde, dünya genelinde yeni bitki virüs türlerinin ve ırklarının ortaya çıkışında belirgin bir artış görülmektedir. Bu tür viral etmenlerin tarımsal ekosistem içinde doğru teşhisi, mücadelenin en temel unsurlarından biridir.

Bu rehber, 2014 ve 2015 yıllarında sırasıyla İsrail ve Ürdün'de domates üretim alanlarında tespit edilen, daha sonra hızla yayılıp beş kıtada yaklaşık 40 ülkede görülen Domates Kahverengi Buruşuk Meyve Virüsü (*Tobamovirus fructirugosum*; Tomato brown rugose fruit virus; ToBRFV)'nün teşhis parametrelerini kapsamaktadır. Rehber, ToBRFV teşhisi yapan laboratuvarlar arasında kullanılan analiz yöntemlerinden kaynaklanan farklılıkları ortadan kaldırmayı, metot birlikteliği sağlamayı ve uluslararası standartlara uygun bir doğrulama (verifikasyon) rehberi oluşturmayı amaçlamaktadır.

ToBRFV, özellikle domates ve biber gibi ekonomik değeri yüksek tarımsal ürünlerde yaygın olarak görülmekte ve önemli üretim kayıplarına neden olmaktadır. Son yıllarda bu virüsün yayılımı, tarımsal ekosistemlerde ciddi tehditler oluşturmuş ve etkili yönetim stratejilerinin geliştirilmesini zorunlu hale getirmiştir. Virüsün hızlı yayılımı ve oluşturduğu etkiler nedeniyle dünya genelinde çeşitli önlemler alınmıştır. Bu önlemler arasında ülkemizin de bağlı olduğu Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Örgütü (European and Mediterranean Plant Protection Organization; EPPO), Ocak 2019'da ToBRFV'yi Alarm Listesi'ne eklemiş, ardından Mart 2019'da Bitki Sağlığı Önlemleri Panelinde Zararlı Risk Analizi (ZRA) için en yüksek öncelikli organizma olarak önermiştir.

Bu kapsamda, ülkemizde de ilk kez 2019 yılında Antalya'nın Demre ilçesinde tespit edilen ToBRFV için çeşitli koruyucu tedbirler alınmıştır. Bu tedbirler doğrultusunda, Genel Müdürlüğümüzün talimatları ile Hızlı ZRA hazırlanmış ve ToBRFV'nin Bitki Karantinası Yönetmeliğine eklenmesi öngörülmüştür. Ayrıca, etmen için zaman kaybedilmeden Sürvey Talimatı hazırlanarak ülke genelinde 81 İl Tarım ve Orman Müdürlüğü'ne dağıtılmıştır. Ülke içinde alınan bu tedbirlere ilaveten ToBRFV'nin sınır kapılarından girişini önlemek amacıyla ilgili uzmanlarının katılımıyla düzenlenen toplantılarda metot birlikteliği çalışması yapılmıştır. ToBRFV'nin teşhisinde EPPO üyesi ülkeler Uluslararası Tohum Federasyonu (International Seed Federation; ISF) ve yine EPPO'nun yayınladığı teşhis protokollerini kullanmaktadır. Sunulan bu rehber, mevcut uluslararası protokollere dayanarak Bakanlığımızın ithalat/ihracat ve yurt içi kontrollerinde yapılacak laboratuvar analizlerinin geçerliliğini sağlamak, tarımsal üretimde güvenliği artırmayı ve sürdürülebilir hastalık yönetimi stratejilerinin geliştirilmesine önemli katkıda bulunmayı hedeflemektedir.

Rehberin hazırlanmasında emeği geçen Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne bağlı Araştırma Enstitüsü Müdürlüklerindeki tüm araştırmacılara, Genel Müdürlüğümüze bağlı ilgili Laboratuvar Müdürlüklerindeki uzman personellerimize ve katkı sunan diğer tüm çalışanlarımıza teşekkür ederim. Çalışmalarımızın, ToBRFV'nin tespiti ve mücadelesinde etkili stratejilerin geliştirilmesine, dolayısıyla tarımsal üretimde verimliliğin artırılmasına önemli katkılar sağlayacağına inanıyorum. Bu metodun ilk olması sebebiyle bundan sonra yapılacak çalışmalara örnek teşkil etmesini ve hayırlı olmasını temenni ediyorum.

Dr. Ersin DİLBER  
Gıda ve Kontrol Genel Müdürü

**YÖNETİM KOMİTESİ**

Dr. Ersin DİLBER

Doç. Dr. Yunus BAYRAM

Fatih KAYA

Erhan DEMİR

Şehriban GÖREN

Genel Müdür

Genel Müdür Yardımcısı

Genel Müdür Yardımcısı

Bitki ve Bitkisel Ürünler Sınır Kontrol Daire Başkanı

Çalışma Grup Sorumlusu

**GÖREV ALANLAR VE KATKIDA BULUNANLAR (\*)**

Müdürlük	Adı Soyadı	Görevi
Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü	Doç. Dr. Yunus BAYRAM	Genel Müdür Yardımcısı
Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü	Fatih KAYA	Genel Müdür Yardımcısı
Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü	Erhan DEMİR	Daire Başkanı
Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü	Şehriban GÖREN	Çalışma Grup Sorumlusu
Ulusal Gıda Referans Laboratuvar Müdürlüğü	Dr. Hilal Duygu ÇALIM	Virolog
Adana Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	Dr. Pelin KELEŞ ÖZTÜRK	Türkiye Proje Koordinatörü
İzmir Zirai Karantina Müdürlüğü	Dr. Songül YALÇIN ATEŞ	Virolog
Ulusal Gıda Referans Laboratuvar Müdürlüğü	Ömer Hamza AKKAYA	Virolog
Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	Ali Ferhan MORCA	Virolog
İzmir Bornova Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	Dr. Serpil ERİLMEZ	Virolog
Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	Sevgi COŞKAN	Virolog
Antalya Zirai Karantina Müdürlüğü	Dr.Gözde ERKIŞ GÜNGÖR	Virolog
Antalya Zirai Karantina Müdürlüğü	Ebru ERKAN	Virolog
Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	Kübra YILDIZ	Virolog
İstanbul Zirai Karantina Müdürlüğü	Lilifer BAYIRDAR	Virolog
Adana Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	Dr. Şefika YAVUZ	Virolog
Mersin Zirai Karantina Müdürlüğü	Bengühan OĞUZ	Virolog
Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü	Bahadır GÜLBUDAK	Ziraat Mühendisi
Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü	Zeynep KUZUCANLI	Ziraat Yüksek Mühendisi



## İÇİNDEKİLER

<b>1. AMAÇ</b>	1
<b>2. KAPSAM</b>	1
<b>3. KULLANILAN TANIMLAR VE KISALTMALAR</b>	1
<b>4. GÜVENLİK ve SAĞLIK UYARILARI</b>	2
<b>5. ALET/EKİPMAN ve AKSESUARLAR</b>	3
<b>6. KİMYASAL MADDELER VE KONTROLLER</b>	3
6.3.1. IC: İnhibisyon Kontrol	4
6.3.2. NTC: Negatif Template Kontrol	5
6.3.3. PAC: Pozitif Amplifikasyon Kontrol	5
6.3.4. PEC: Pozitif Ekstraksiyon Kontrol (Internal amplifikasyon kontrol)	5
6.3.5. PIC: Pozitif İzolasyon Kontrol	5
6.3.6. NIC: Negatif İzolasyon Kontrol	5
<b>7. VERİFİKASYON PROSEDÜRÜ</b>	6
7.1. Analitik Hassasiyet	6
7.1.1. Bitki LOD Çalışması	6
7.1.1.1. Bitki LOD Sonuç Eldesi ve Değerlendirilmesi	9
7.1.2. Tohum LOD Çalışması	12
7.1.2.1. CaTa28 ve CSP1325 ve BaCV primerleri ile Kurulan Tohum LOD Çalışması	12
7.1.2.1.1. Tohum LOD CaTa28, CSP1325 ve BaCV Primerleri ile Yapılan LOD Sonuç Eldesi ve Değerlendirmesi	14
7.1.2.2. Tohum Analizlerinin Doğrulanmasında Kullanılan RT-qPCR Primerlerinin (Menzel&Winter 2021) LOD Çalışması	16
7.1.2.2.1. Tohum Analizlerinin Doğrulanmasında Kullanılan RT-qPCR Primerlerinin (Menzel&Winter 2021) LOD Sonuç Eldesi ve Değerlendirilmesi	17
7.2 Analitik Özgüllük (Kapsayıcılık ve Münhasırlık)	19
7.2.1. Analitik Özgüllük Analizi	19
7.2.2. Analitik Özgüllük Analizinin Değerlendirilmesi	20
7.3. Tekrarlanabilirlik	21
7.3.1. Tekrarlanabilirlik Çalışması Pleyt Dizaynı	23
7.3.2. Tekrarlanabilirlik Sonuçlarının Değerlendirilmesi	24
7.4. Tekrar Üretilbilirlik	28



7.4.1. Tekrar Üretilirlik Çalışması Pleyt Dizaynı	29
7.4.2. Tekrar Üretilirlik Sonuçlarının Değerlendirilmesi	33
<b>8. KAYNAKLAR</b>	<b>36</b>

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.</b> LOD Çalışma Grupları	6
<b>Şekil 2.</b> ToBRFV'den Ari Negatif RNA Örneğinin Ependorf Tüplere Dağıtılması ve Bulaştırılması	7
<b>Şekil 3.</b> ToBRFV Pozitif RNA Örneği ile Başlatılan Seri Dilüsyon Çalışması	8
<b>Şekil 4.</b> Örnek RT-qPCR Standart Eğrisi (standart curve)	11
<b>Şekil 5.</b> Örnek RT-qPCR Amplifikasyon Eğrisi (amplifikasyon curve)	11
<b>Şekil 6.</b> ToBRFV'den Ari Negatif RNA Örneğinin Ependorf Tüplere Dağıtılması ve Bulaştırılması	13
<b>Şekil 7.</b> ToBRFV Pozitif RNA Örneği ile Başlatılan Seri Dilüsyon Çalışması	13

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 1.</b> ISF ve EPP0 Protokollerinde Önerilen ve Verifikasyon Çalışmalarında Kullanılacak Primer ve Prob Setleri	4
<b>Çizelge 2.</b> Bitki LOD Çalışması için RT-qPCR Örnek Analiz Şablonu	9
<b>Çizelge 3.</b> Bitki LOD RT-qPCR Örnek Analiz Sonuç Şablonu	10
<b>Çizelge 4.</b> Bitki LOD RT-qPCR Örnek Analizi Kontrol Parametresi Sonuç Şablonu	10
<b>Çizelge 5.</b> Tohum LOD RT-qPCR Örnek Analiz Şablonu	14
<b>Çizelge 6.</b> Tohum LOD RT-qPCR 1. Örnek Analiz Sonuç Şablonu	15
<b>Çizelge 7.</b> Tohum LOD RT-qPCR 2. Örnek Analiz Sonuç Şablonu	15
<b>Çizelge 8.</b> Tohum LOD RT-qPCR Örnek Analizi Kontrol Parametresi Sonuç Şablonu	16
<b>Çizelge 9.</b> Mendel&Winter 2021 Primerlerin LOD RT-qPCR Örnek Analiz Şablonu	17
<b>Çizelge 10.</b> Mendel&Winter 2021 Primerlerin LOD RT-qPCR Örnek Analiz Sonuç Şablonu	18
<b>Çizelge 11.</b> Mendel&Winter 2021 Primerlerin RT-qPCR Örnek Analizi Kontrol Parametresi Sonuç Şablonu	18
<b>Çizelge 12.</b> ToBRFV Yakın Akraba Olduğu Bilinen İzolatlar ve Bu İzolatların	



Kaynak Kodları	19
<b>Çizelge 13.</b> Analitik Özgüllük RT-qPCR Örnek Analiz Şablonu	20
<b>Çizelge 14.</b> Analitik Özgüllük RT-qPCR Örnek Analiz Sonuç Şablonu	20
<b>Çizelge 15.</b> Analitik Özgüllük RT-qPCR Örnek Analizi Kontrol Parametresi Sonuç Şablonu	21
<b>Çizelge 16.</b> LOD Çalışmalarında Elde Edilen Tekrarlanabilirlik Verileri RT-qPCR Örnek Analiz Sonuç Şablonu	22
<b>Çizelge 17.</b> Tekrarlanabilirlik Çalışması İçin RT-qPCR Örnek Analiz Şablonu 1	23
<b>Çizelge 18.</b> Tekrarlanabilirlik Çalışması İçin RT-qPCR Örnek Analiz Şablonu 2 (Menzel&Winter 2021 Primerleri)	24
<b>Çizelge 19.</b> Tekrarlanabilirlik Çalışması İçin RT-qPCR Sonuçları (1)	25
<b>Çizelge 20.</b> Çizelge 17 için Bildirilen, Tekrarlanabilirlik Çalışması RT-qPCR Örnek Analizi, Kontrol Parametresi Sonuç Şablonu	26
<b>Çizelge 21.</b> Tekrarlanabilirlik Çalışması için RT-qPCR Sonuçları (2), (Menzel&Winter 2021 Primerleri)	27
<b>Çizelge 22.</b> Çizelge 18’de Bildirilen Tekrarlanabilirlik Çalışması için Menzel&Winter 2021 Primerlerin RT-qPCR Örnek Analizi, Kontrol Parametresi Sonuç Şablonu	28
<b>Çizelge 23.</b> <u>A Kişisine</u> Ait Tekrar Üretilbilirlik Çalışması için RT-qPCR Örnek Analiz Şablonu-1	29
<b>Çizelge 24.</b> <u>B Kişisine</u> Ait Tekrar Üretilbilirlik Çalışması için RT-qPCR Örnek Analiz Şablonu-1	30
<b>Çizelge 25.</b> <u>A Kişisine</u> Ait Tekrar Üretilbilirlik Çalışması için RT-qPCR Örnek Analiz Şablonu-2 (Menzel&Winter 2021 Primerleri)	31
<b>Çizelge 26.</b> <u>B Kişisine</u> Ait Tekrar Üretilbilirlik Çalışması için RT-qPCR Örnek Analiz Şablonu-2 (Menzel&Winter 2021 Primerleri)	32
<b>Çizelge 27.</b> Tekrar Üretilbilirlik Çalışması için A ve B Kişilerine ait RT-qPCR Sonuçları(1)	33
<b>Çizelge 28.</b> Çizelge 23 ve 24’te bildirilen Tekrar Üretilbilirlik Çalışması için, A ve B Kişilerine ait RT-qPCR Örnek Analizi, Kontrol Parametresi Sonuç Şablonu	34
<b>Çizelge 29.</b> Tekrar Üretilbilirlik Çalışması için A ve B Kişilerine ait RT-qPCR Sonuçları(2) (Menzel&Winter 2021 Primerleri)	35



**Çizelge 30.** Çizelge 25 ve 26’da bildirilen Tekrar Üretilebilirlik Çalışması için, A ve B Kişilerine ait RT-qPCR (Menzel&Winter 2021) Örnek Analizi, Kontrol Parametresi Sonuç Şablonu

35



## 1. AMAÇ

CaTa28 ve CSP1325 primerleri kullanılarak validasyonu ISF tarafından gerçekleştirilmiş ToBRFV RT-qPCR analiz yöntemi için,

- ✓ Uluslararası Tohum Federasyonu'nun (International Seed Federation; ISF) "Domates ve Biber Tohumlarında Domates Kahverengi Buruşuk Meyve Virüsü (Tomato brown rugose fruit virus; ToBRFV) Tespiti (2019)",
- ✓ Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Örgütü'nün ((European and Mediterranean Plant Protection Organization; EPPO)
  - "PM 7/146 (2) "Domates kahverengi buruşuk meyve virüsü (Tomato brown rugose fruit virus; ToBRFV) (2022)" ve
  - PM 7/98 (5) "Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity"
- ✓ Eupresco Project, (2021). "Validation of molecular tests for the detection of tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in seed of tomato and pepper" teşhis standartlarına göre;  
Analizi uygulayacak olan kullanıcı laboratuvarların verifikasyon çalışması yapılabilmesi amacı ile verifikasyon rehberi niteliği taşıyan deneysel basamakların açıklanması amaçlanmaktadır.

## 2. KAPSAM

Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)'ün RT-qPCR ile tespitinde kullanılan, CaTa28 ve CSP1325 primerleri ile tohum analizlerinin doğrulama basamağı olarak kullanılan Menzel& Winter 2021 primerlerinin bu prosedür de açıklanan verifikasyon basamakları,

- a. Analitik hassasiyet (LOD Çalışmaları)
- b. Analitik özgüllük (kapsayıcılık ve münhasırlık)
- c. Tekrarlanabilirlik
- d. Tekrar üretilebilirlik çalışmalarını kapsamaktadır.

## 3. KULLANILAN TANIMLAR ve KISALTMALAR

**DLVd:** *Dahlia latent viroid*

**EPPO:** European and Mediterranean Plant Protection Organization

**Fw:** Forward primer

**ISF:** International Seed Federation

**LOD:** Limit of Detection

**ÖR:** Örnek Numune

**PAC:** Pozitif Amplifikasyon Kontrolü

**PIC:** Pozitif İzolasyon Kontrolü

**Pr:** Prob

**RNA:** Ribonükleik asit





**mL:** mililitre

**$\mu$ L:** mikrolitre

**$\mu$ M:** mikromolar

**NTC:** Negatif Template Kontrolü

**ng:** nanogram

**NIC:** Negatif İzolasyon Kontrolü

**RT-PCR:** Reverse Transkriptaz - Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**RT-qPCR:** Real Time RT-PCR

**Rv:** Reverse primer

**SqMV:** Squash mosaic virus

**ToBRFV:** Tomato brown rugose fruit virus

#### 4. GÜVENLİK ve SAĞLIK UYARILARI

- 4.1. Laboratuvarda yapılan tüm çalışmalar sırasında mutlaka eldiven kullanılmalıdır. Özellikle numunelere direkt temas durumunda olunan çalışmalarda her numune geçişinde eldiven değiştirilmesi önemlidir.
- 4.2. Solüsyonlar uygun miktarlarda bölünüp kullanım miktarlarında ayrı ayrı tüplere konularak laboratuvardaki diğer reaktiflerden ayrı olarak muhafaza edilmelidir.
- 4.3. Nükleaz içermeyen (nuklease/free) laboratuvar malzemeleri kullanılmalıdır (örn. Pipetler, pipet uçları, eldivenler, reaksiyon tüpleri).
- 4.4. Numune ve reaktiflerin çapraz kontaminasyonunu önlemek için aerosol önleyici yeni pipet uçları kullanılmalıdır.
- 4.5. Reaktiflerin kontamine olmasını engellemek için stok solüsyondan çalışmak yerine her defasında yeni temiz bir tüp kullanılmalıdır.
- 4.6. Ependorf tüplerin yüzeyine dokunulmamalı ve tüpler daima eldivenli olarak pensle alınmalıdır.
- 4.7. Çapraz kontaminasyon ve analizlerin doğruluğu açısından tüm çalışmalarda filtreli pipet uçları kullanılmalıdır. İzolasyon, PCR karışımı ve nükleik asit ilavelerinin yapıldığı bölümlerin tamamında farklı pipet setleri yer almalıdır.
- 4.8. RNA izolasyonunun yapıldığı çalışma alanı ile PCR hazırlıklarının yapıldığı çalışma alanının ayrılması gerekmektedir.
- 4.9. Çapraz kontaminasyonu engellemek için, plate üzerine örnek ve negatif kontroller konulduktan sonra pozitif kontrol konulmalıdır.
- 4.10. Çalışmada insan sağlığına zararlı olabilecek kimyasal maddelerin ( $\beta$ -mercaptoethanol vb.) çeker ocak gibi güvenlik ekipmanları ile kullanılmalıdır.
- 4.11. Çalışmalarda iş güvenliğini etkileyebilecek kimyasal ya da farklı malzemeler (sıvı azot) kullanılacak ise koruyucu ekipmanlar kullanılmalıdır.



## 5. ALET/EKİPMAN ve AKSESUARLAR

- 5.1. FAM, VIC/HEX, ROX, Texas Red ve Cy5 deteksiyonuna uyumlu Real Time PCR cihazı.
- 5.2. Biyogüvenlik kabini
- 5.3. Vorteks.
- 5.4. Mini santrifüj.
- 5.5. Standart masa üstü mikrosantrifüj.
- 5.6. Masaüstü Plate santrifüj.
- 5.7. Mikropipetler.
- 5.8. Steril tek kullanımlık, filtrelili, nucleaz içermeyen, aerosol'e dayanıklı pipet uçları.
- 5.9. Süpernatant ve kimyasal hazırlıklar için steril reaksiyon (ependorf vb.) tüpleri.
- 5.10. Real time PCR uyumlu strip tüpler ve strip tüp kapatıcıları.
- 5.11. Real time PCR uyumlu plate ve "seal" adı verilen şeffaf plate kaplayıcı.

## 6. KİMYASAL MADDELER VE KONTROLLER

- 6.1. Yapılacak olan real time çalışmasına uygun Real-time PCR master miksi.
- 6.2. ISF ve EPPO protokollerinde önerilen primerler Enza Zaden BV (The Netherlands) tarafından geliştirilen CaTa28 primerler/probu, CSP Labs (ABD) tarafından geliştirilen CSP1325 primerler/probu ve Naktuinbouw (NL) tarafından geliştirilen BaCV primerler/probu kombinasyonuna dayanmaktadır. Tohum analizlerinin ToBRFV pozitif tespit edilmesi halinde, EPPO doğrulama testi önermektedir. Buna göre doğrulama analizlerinde EPPO PM 7/146 (2)'de yer alan Menzel & Winter, 2021'de belirtilen ToBRFV qs1 ve ToBRFVqas2 primerleri ile ToBRFVp1 probu verifikasyon çalışmasına dahil edilmiştir. Verifikasyon prosedüründe kullanılan primer prob setleri Çizelge 1 belirtildiği gibidir.



**Çizelge 1.** ISF ve EPPO Protokollerinde Önerilen ve Verifikasyon Çalışmalarında Kullanılacak Primer ve Prob Setleri

PRİMER ADI	SEKANS DİZİSİ	KAYNAK
CaTa28 Forward	5' / GGT GGT GTC AGT GTC TGT TT / 3'	ISF 2019
CaTa28 Reverse	5' / GCG TCC TTG GTA GTA ATG TT / 3'	
CaTa28 Probe	5' / 6FAM/AGA GAA TGG AGA GAG CGG ACG AGG/BHQ1 / 3'	
CSP1325 Forward	5' / CAT TTG AAA GTG CAT CCG GTT T / 3'	ISF 2019
CSP1325 Reverse	5' / GTA CCA CGT GTG TTT GCA GAC A / 3'	
CSP1325 Probe	5' / VIC – ATG GTC CTC TGC ACC TGC ATC TTG AGA /BHQ1 / 3'	
BaCV Forward	CGA TGG GAA TTC ACT TTC GT	ISF 2019
BaCV Reverse	AAT CCA CAT CGC ACA CAA GA	
BaCV Probe	TxR / CAA TCC TCA CAT GAT GAG ATG CCG / BHQ2	
ToBRFV qs1 Forward	5' / CAA TCA GAG CAC ATT TGA AAG TGC A / 3'	EPPO 2022
ToBRFV qas1 Reverse	5' / CAG ACA CAA TCT GTT ATT TAA GCA TC / 3'	
ToBRFV p1 Probe	5' / 6FAM/ACA ATG GTC CTC TGC ACC TG/BHQ1 / 3'	

### 6.3. Analiz sırasında kullanılan kontroller

#### 6.3.1. IC: İnhibisyon Kontrol

Tohum analizlerinde kullanılması gereken kontrollerden biridir. Enfekte olmamış tohumdan elde edilen ekstrakt içine, 28-32 Cq aralığına denk gelen, PEC bitki ekstraktının bulaştırılması ile elde edilir. Diğer tüm kontrol ve örneklerle birlikte RNA izolasyonu yapılır. RT-qPCR aşamasında diğer örnekler ve analiz kontrolleri ile birlikte ayrı bir kuyucukta kontrol parametresi olarak yüklenir.

**Not:** PEC'in Cq değeri, tüm örneklerde IC'nin Cq değerinin 3 döngü aralığında olmalıdır. Bu olmaz ise ToBRFV kaybı yaşanmış veya amplifikasyon aşamasında inhibisyon olmuş olabilir. IC'nin Cq değeri 28-32 aralığında olmalıdır.



### **6.3.2. NTC: Negatif Template Kontrol**

Tüm PCR reaktiflerini içeren ancak hedef veya spayk DNA, RNA veya PEC nükleik asitleri içermeyen ve RT-qPCR amplifikasyon esnasında kullanılan PCR grade su içeren örnek.

### **6.3.3. PAC: Pozitif Amplifikasyon Kontrol**

RT-qPCR amplifikasyon esnasında kullanılan ToBRFV pozitif olan sertifikalı izolat RNA'sı/ fragmenti.

### **6.3.4. PEC: Pozitif Ekstraksiyon Kontrol (Internal Amplifikasyon Kontrol)**

Yalnızca tohum içeren ToBRFV çalışması için yapılan her RNA izolasyonu esnasında numuneye spayk solüsyon olarak eklenen Bacopa chlorosis virus (BaCV), Dahlia latent viroid (DLVd) veya Squash mosaic virus (SqMV) pozitif olduğu bilinen bitki ekstraktı. PEC, her bir numune için aynı zamanda Internal Amplifikasyon Kontrol'dür.

#### **PEC Hazırlanışı:**

Spayk solüsyonu, BaCV, DLVd veya SqMV ile enfekteli bir bitkiden alınan örneğin tohumlara uygun buffer içerisinde ezilmesi ile hazırlanır. Her laboratuvar spayk solüsyonunu 28-32 Cq aralığında sonuç verecek konsantrasyonda dilüe etmelidir. Solüsyon, kullanılabildiği kadar tüplere bölünür ve -80 °C'de saklanır.

### **6.3.5. PIC: Pozitif İzolasyon Kontrol**

Domates ve biber bitki kısımları, meyve parçaları ve yaprak içeren ToBRFV çalışması için yapılan her RNA izolasyonu esnasında, numunelere ek olarak izolasyon aşamasında çalışmaya dahil edilen ToBRFV enfekteli bitki parçası.

### **6.3.6. NIC: Negatif İzolasyon Kontrol**

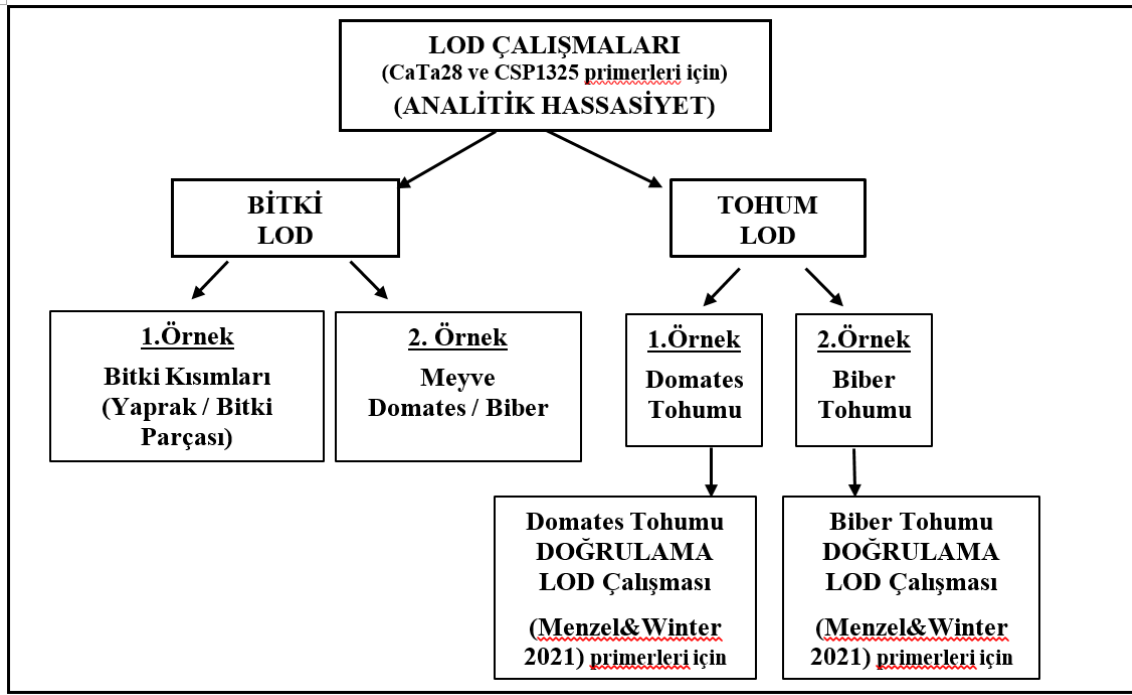
RNA izolasyonu esnasında ayrı bir örnek olarak izolasyona dahil edilen, ToBRFV'den arı olan bitki materyalidir. Ari materyalin bulunmadığı durumda ekstraksiyon buffer da kullanılabilir.

## 7. VERİFİKASYON PROSEDÜRÜ

### 7.1. Analitik Hassasiyet

Bu çalışmada CaTa28 ve CSP1325 primer-prob setleri ile ToBRFV'nin tespit edilebilen en küçük miktarı, yani tespit limiti (Limit of Detection; LOD) ölçümlerinin ortaya konulması hedeflenmektedir.

Analitik hassasiyet çalışmaları (LOD), bitki kısımları (meyve, bitki parçası, yaprak) ve tohum olmak üzere iki alt ana başlıkta gerçekleştirilecektir (Şekil 1). Her bir LOD çalışması için, LOD seviyesinin hemen üzerindeki üç bağımsız seyreltme serisinin verileri “**7.3 Tekrarlanabilirlik**” verifikasyon parametresinin hesaplanması aşamasında kullanılacaktır (ISF 2019). Tekrar edilebilirlik verisinin oluşabilmesi için, her bir LOD çalışması farklı personel tarafından yapılarak yürütülmelidir.

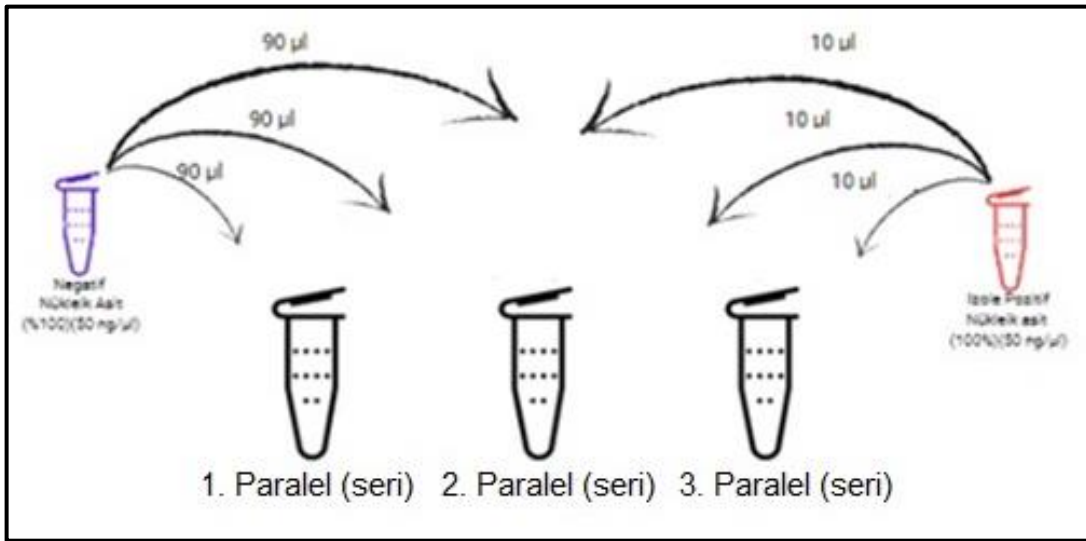


Şekil 1. LOD Çalışma Grupları

#### 7.1.1. Bitki LOD çalışması

ISF, EPPO PM 7/146 ve EPPO PM 7/98 çalışmaları doğrultusunda ToBRFV tespitinde kullanılan CaTa28 ve CSP1325 primer-prob setleri ile yapılan çalışmalarda belirtilen Cq alt limitleri referans alınacaktır. Buna göre Şekil 1’de belirtilen bitki LOD çalışması örnek grupları oluşturularak her laboratuvarın alt limitlerinin belirlenebilmesi amaçlanmaktadır. Buna göre,

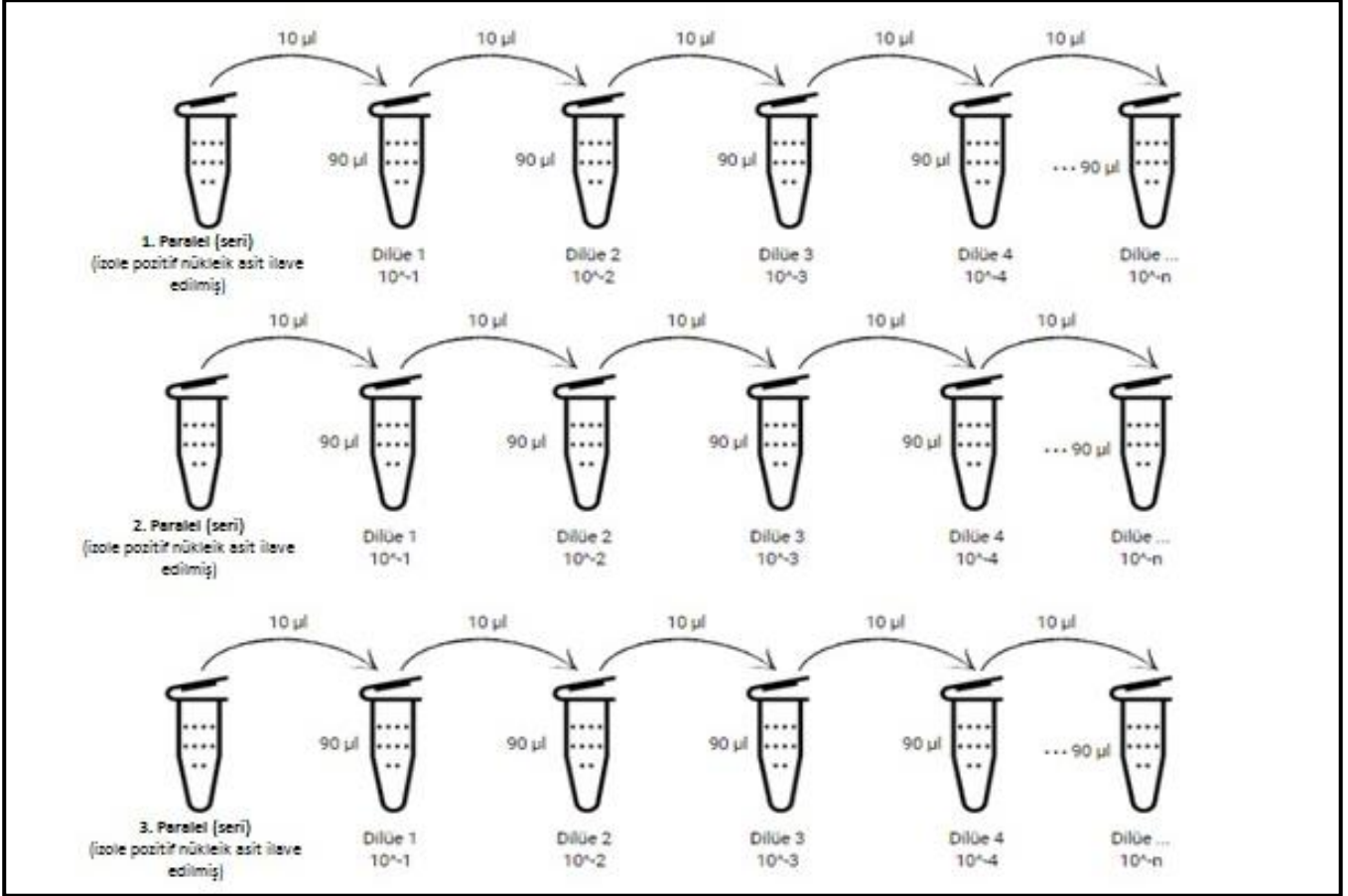
- a. Öncelikle çalışmada kullanılacak olan ToBRFV'den ari olduğu düşünülen bitkinin, ToBRFV içermediğini teyit etmek amacı ile öncelikle bitkiden alınan örnek ile total RNA izolasyonundan başlayarak CaTa28 ve CSP1325 primer-prob setleri ile -RT-qPCR analizi gerçekleştirilmelidir. ToBRFV'den ari olduğundan emin olunan bitki RNA'sı LOD seyreltme serilerinde Şekil 2'de belirtilen negatif nükleik asit olarak kullanılabilir.
- b. Daha sonra ToBRFV pozitif olan 1 meyve, 1 bitki kısımları (yaprak/ bitki parçası) örneği olmak üzere toplam 2 örneğin ayrı ayrı RNA izolasyonları yapılarak bulaştırma yapmak için izole pozitif nükleik asit elde edilir.
- c. Bulaştırma yapmak için elde edilen izole pozitif nükleik asit, Şekil 2'de gösterildiği üzere, ToBRFV'den ari negatif RNA örneğine bulaştırılır. Bunun için öncelikle ToBRFV'den ari negatif RNA örneği, 3'er seri/paralel dilüsyon oluşturmak için, 3 ependorf tüpe 90µl olarak dağıtılır. Daha sonra her üç tüpe ayrı ayrı izole pozitif nükleik asit'ten, 10µl ilave edilerek her bir tüpün  $10^{-9}$ 'a kadar dilüsyonu yapılır (Şekil 3).



**Şekil 2.** ToBRFV'den Ari Negatif RNA Örneğinin Ependorf Tüplere Dağıtılması ve Bulaştırılması

- d. Standart bir eğri oluşturmak için her seyreltmenin üç kopyası kullanılmalıdır. Buna göre, çalışmadaki 2 ToBRFV pozitif örnek ile her bir örnek için, 3'er seri/paralel dilüsyon oluşturulmalıdır.

- e. Oluşturulan dilüsyon çalışmasında her 10 µl karışım bir önceki tüpten olacak şekilde sonraki tüpe eklenir ve dilüsyon işlemi tamamlanır (Şekil 3).



Şekil 3. ToBRFV Pozitif RNA Örneği İle Başlatılan Seri Dilüsyon Çalışması

- f. Bu doğrultuda, ToBRFV LOD çalışmasında her bir örnekteki bir seri/paralel dilüsyon için,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  seviyelerinde, 7 alt dilüsyon serisi çalışılacak şekilde kurgu yapılır (EPPO PM7/146).
- g. 7 dilüsyon serisinin ( $10^{-3}$  -  $10^{-9}$ ) tamamının primer grubu için (CaTa28 ve CSP1325) 3 tekrerrür olarak (2 bitki örneği x 3 dilüsyon paraleli x 7 alt dilüsyon) toplam 42 örnek şeklinde RT-qPCR analizi gerçekleştirilir (Çizelge 2).

**Çizelge 2.** Bitki LOD Çalışması için RT-qPCR Örnek Analiz Şablonu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	ÖR1 (10 <sup>-3</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-3</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-3</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-4</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-4</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-4</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-5</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-5</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-5</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-6</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-6</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-6</sup> )
<b>B</b>	ÖR1 (10 <sup>-7</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-7</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-7</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-8</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-8</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-8</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-9</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-9</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-9</sup> )			
<b>C</b>												
<b>D</b>	ÖR2 (10 <sup>-3</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-3</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-3</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-4</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-4</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-4</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-5</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-5</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-5</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-6</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-6</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-6</sup> )
<b>E</b>	ÖR2 (10 <sup>-7</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-7</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-7</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-8</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-8</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-8</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-9</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-9</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-9</sup> )			
<b>F</b>												
<b>G</b>												
<b>H</b>	<b>PAC</b>	<b>PAC</b>	<b>PIC</b>	<b>PIC</b>				<b>NIC</b>	<b>NIC</b>		<b>NTC</b>	<b>NTC</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>PAC / Pozitif Amplifikasyon Kontrol</b> RT-qPCR amplifikasyon esnasında kullanılan ToBRFV pozitif olan sertifikalı izolat RNA'sı/fragmenti</li><li>• <b>PIC / Pozitif İzolasyon Kontrol</b> Domates ve biber bitki kısımları, meyve parçaları ve yaprak içeren ToBRFV çalışması için yapılan her RNA izolasyonu esnasında, numunelere ek olarak izolasyon aşamasında çalışmaya dahil edilen ToBRFV enfekteli bitki parçası.</li><li>• <b>NIC / Negatif İzolasyon Kontrol</b> RNA izolasyonu esnasında ayrı bir örnek olarak izolasyona dahil edilen, ToBRFV'den arı olan bitki materyalidir. Arı materyalin bulunmadığı durumda ekstraksiyon buffer da kullanılabilir.</li><li>• <b>NTC / Negatif Template Kontrol</b> Tüm PCR reaktiflerini içeren ancak hedef veya spayk DNA, RNA veya PEC nükleik asitleri içermeyen ve RT-qPCR amplifikasyon esnasında kullanılan PCR grade su içeren örnek.</li></ul>												

#### 7.1.1.1. Bitki LOD Sonuç Eldesi ve Değerlendirilmesi

- a. Çizelge 2'den elde edilen reaksiyon kuyularına ait C<sub>q</sub> değerleri Çizelge 3 "Bitki LOD RT-qPCR Örnek Analiz Sonuç Şablonu" ve Çizelge 4 "Bitki LOD RT-qPCR Örnek Analizi Kontrol Parametresi Sonuç Şablonu" üzerinde belirtilir.



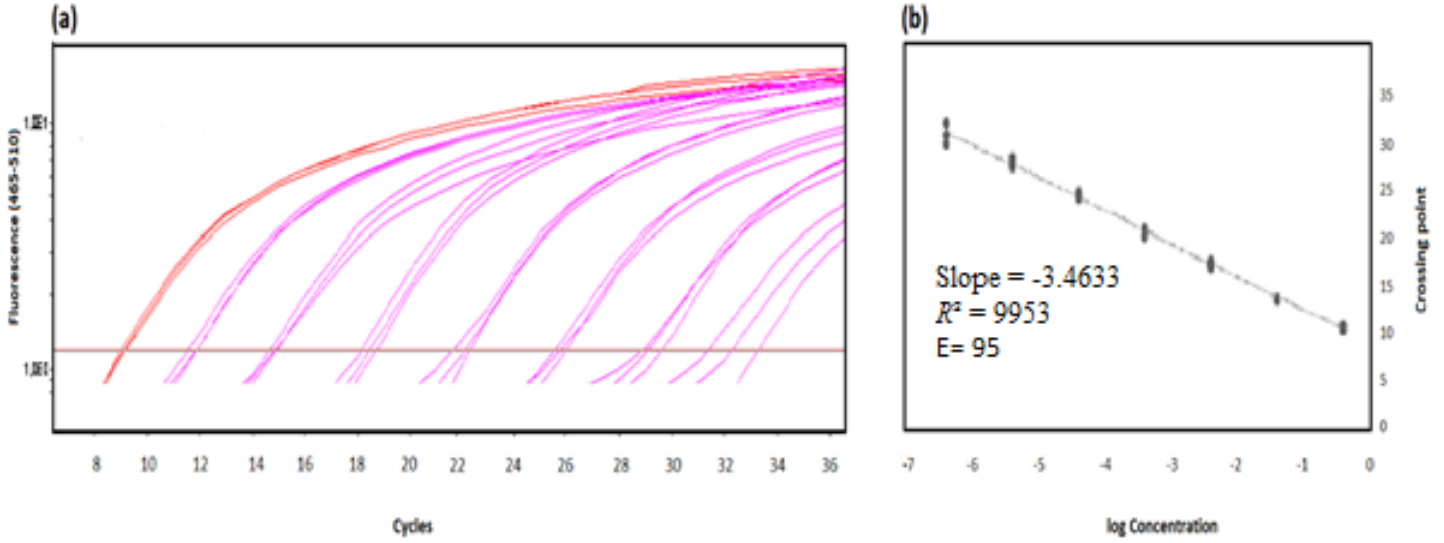
**Çizelge 3.** Bitki LOD RT-qPCR Örnek Analiz Sonuç Şablonu

Çalışma Tarihi	...../...../.....											
Çalışmayı Yapan Personel Adı	.....						.....					
Dilüsyon Serileri	1. ÖRNEK ADI						2. ÖRNEK ADI					
	CaTa28 Cq Değerleri			CSP1325 Cq Değerleri			CaTa28 Cq Değerleri			CSP1325 Cq Değerleri		
	1.seri	2.seri	3.seri	1.seri	2.seri	3.seri	1.seri	2.seri	3.seri	1.seri	2.seri	3.seri
10 <sup>-3</sup>												
10 <sup>-4</sup>												
10 <sup>-5</sup>												
10 <sup>-6</sup>												
10 <sup>-7</sup>												
10 <sup>-8</sup>												
10 <sup>-9</sup>												

**Çizelge 4.** Bitki LOD RT-qPCR Örnek Analizi Kontrol Parametresi Sonuç Şablonu

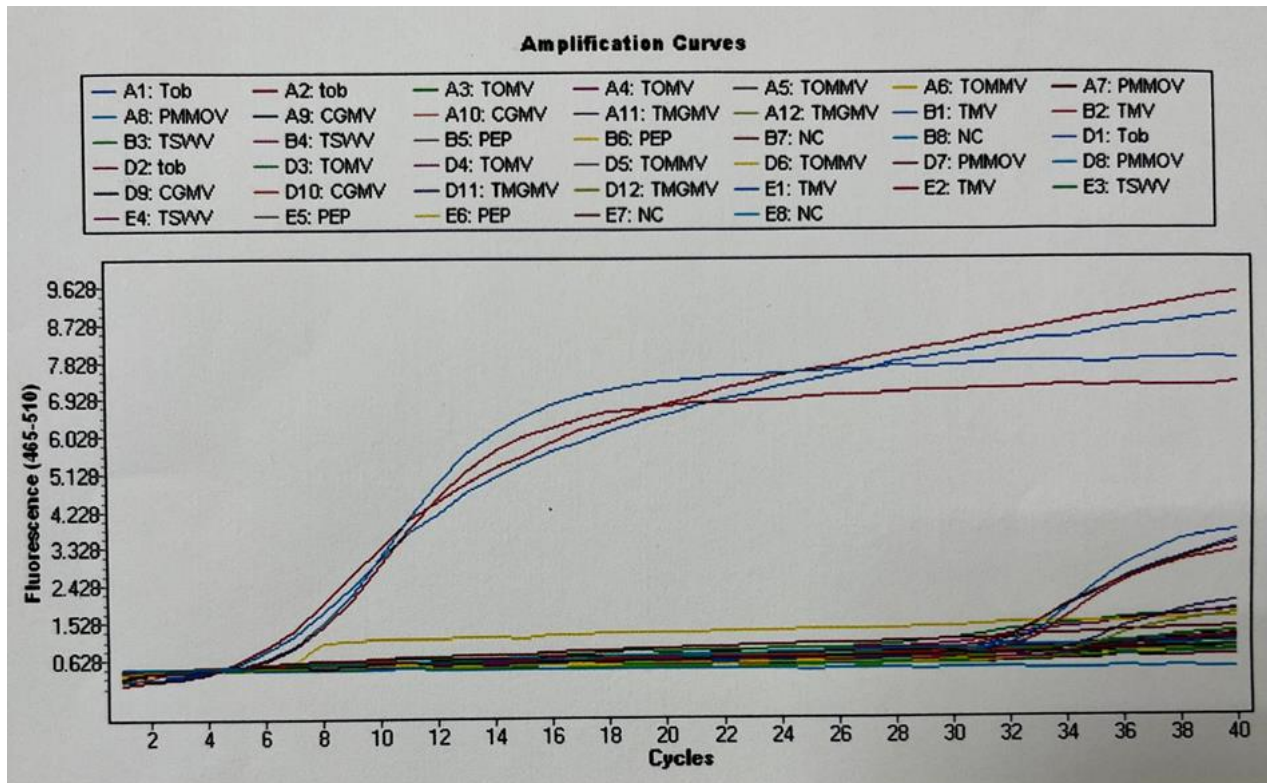
Tekrar Sayısı	CaTa28 Cq Değerleri				CSP1325 Cq Değerleri			
	PAC	PIC	NIC	NTC	PAC	PIC	NIC	NTC
1.Tekrar								
2.Tekrar								

- b. Bu çalışma kullanılan dilüsyonlardan RT-qPCR analiz sonuçlarından her bitki için düşük dilüsyonlarda üç paralelin de aynı sonuç verdiği (ISF önerisi 28/32 Cq aralığında çıkan) en son sulandırma serisi tespit limiti olarak belirlenmelidir. **Bu tespit limitine göre her laboratuvar kendi cut/off değerini belirler.**
- c. 3 paralel hazırlanan 7 seri dilüsyonun RT-qPCR sonuçları ve seyreltmelerin logaritmaları üzerinden bir kalibrasyon eğrisi oluşturulur. Amplifikasyon verimliliğini hesaplamak için standart eğrinin eğimi kullanılır. Cihaz tarafından otomatik olarak verilen standart eğrinin eğimine ait değer ve cihaz görüntüsü (RT-qPCR Standart curve) raporda çizelge 3 ve 4 ün altında şekil numarası verilerek gösterilmelidir (Şekil 4).



Şekil 4. Örnek RT-qPCR Standart eğrisi (standart curve)

d. Çizelge 3 ve Çizelge 4 de analiz parametreleri işlenen cq değerlerinin amplifikasyon eğrilerinin cihaz görüntüleri, şekil numarası verilerek raporda çizelge 3 ve 4 ün altında gösterilmelidir (Şekil 5).



Şekil 5. Örnek RT-qPCR Amplifikasyon eğrisi (amplifikasyon curve)



- e. RT-qPCR analizlerinde Çizelge 2’de belirtilen kontrol parametreleri için aşağıdaki sonuçlar beklenmelidir.
- ✓ Sonuçlar sadece pozitif amplifikasyon kontrolü (PAC) Cq 32 altında üstel bir amplifikasyon eğrisi verirse geçerlidir.
  - ✓ NIC ve NTC negatif olmalıdır.
  - ✓ PIC ve PAC pozitif olmalıdır.
- f. Kontrol parametrelerinin de uygun olması durumunda, LOD çalışması çizelgelerinin altına, tespit sınırı ve diğer veriler yazılarak raporda açıkça belirtilmelidir.
- Örn., “..... örneğinin LOD çalışmasında, Tespit sınırı,  $32.650 \pm 0.075$  ortalama Cq değeri ile  $10^{-6}$  dilüsyonlarda kaydedildi. PCR testinin etkinliği  $E= 95$ , Eğim =  $-3.46$  ( $-3,1$  ile  $-3,6$  arasında olmalı) ve  $R^2=0,99$  ( $R^2 > 0.98$  olmalı) olarak belirlenmiştir.”**
- g. Kontrol parametrelerinde beklenmedik sonuçların elde edildiğinde çalışmalar tekrar edilmelidir.

### 7.1.2. Tohum LOD Çalışması

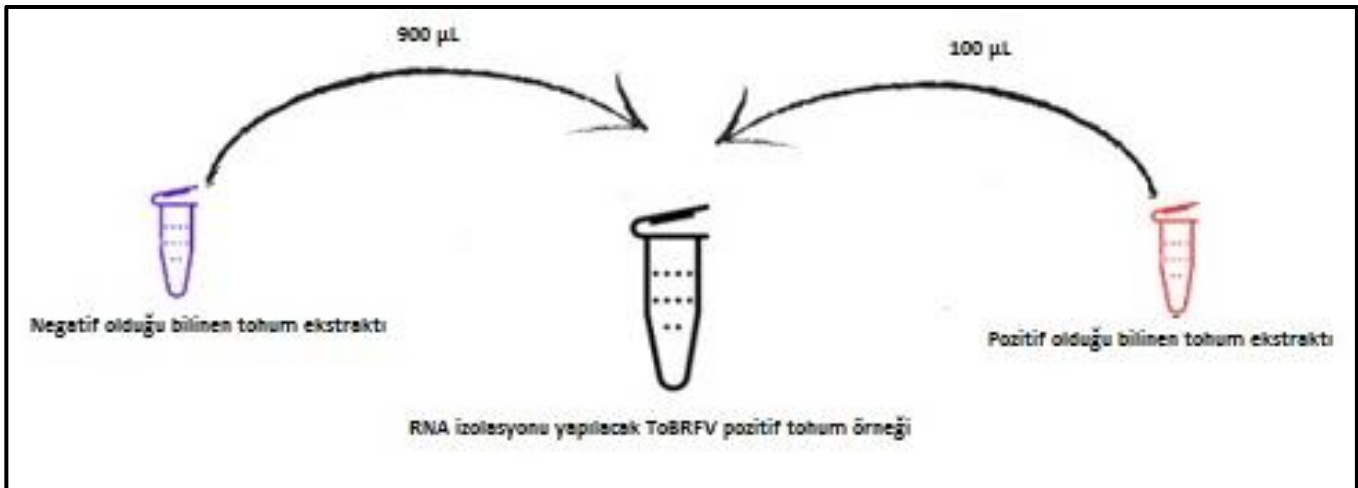
ISF, EPPO PM 7/146 ve EPPO PM 7/98 çalışmaları doğrultusunda ToBRFV tespitinde CaTa28 ve CSP1325 primerleri kullanılması önerilmektedir. Ayrıca EPPO PM7/146’ya göre tohum analizlerinde ToBRFV pozitif olması halinde ikinci bir real time yöntemi ile analizlerin doğrulanması gerekmektedir. Buna göre öncelikle Şekil 1’de belirtilen tohum LOD çalışması örnek grupları oluşturularak her laboratuvarın alt limitleri belirlenecektir. Daha sonra Menzel&Winter 2021 primer-prob seti ile doğrulama için LOD çalışması gerçekleştirilecektir.

#### 7.1.2.1. CaTa28, CSP1325 ve BaCV Primerleri ile Kurulan Tohum LOD Çalışması

Çalışmada ToBRFV negatif olduğu bilinen 1 adet biber ve 1 adet domates tohumu olmak üzere toplam 2 örnek ile, ToBRFV spayklanmış tohum ekstraktının her biri için  $10^{-1}$  -  $10^{-9}$  arasında on kat seyreltme ile dilüsyon serisi hazırlanması hedeflenmektedir.

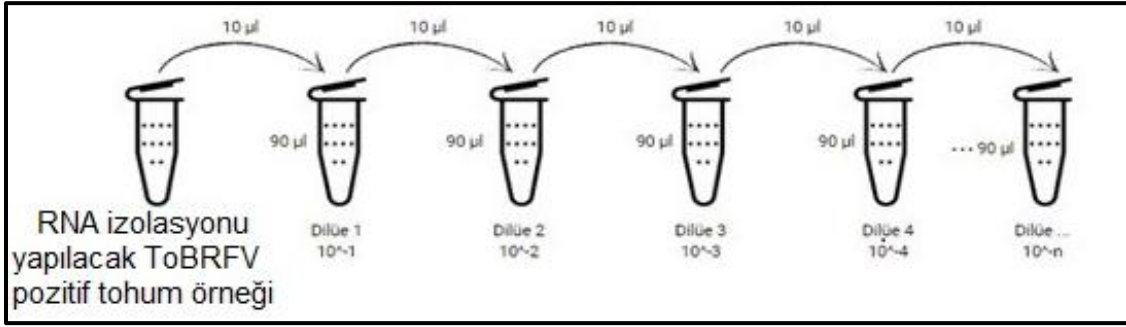
- a. Buna göre öncelikle kullanılan örneklerin ToBRFV’den ari olduğunu göstermek için çalışma yapılır. Her bir tohumdan alınan örnek ile total RNA izolasyonundan başlayarak, CaTa28 ve CSP1325 primerleri ile RT-qPCR analizi gerçekleştirilmelidir. ToBRFV’den ari olduğu teyit edilen tohum örnekleri çalışmaya dahil edilmelidir.

- b. Bulaştırma yapılacak ToBRFV pozitif izolasyonun hazırlanması:** 6 adet ToBRFV enfekteli tohum veya 12 mg ToBRFV enfekteli bitki “ToBRFV tespiti için Real Time RT-PCR Metot Talimatı”nda belirtildiği gibi ezme tamponu ile işleme alınır.
- c. ToBRFV negatif izolasyonun hazırlanması:** 999 adet ToBRFV’den ari tohum “ToBRFV tespiti için Real Time RT-PCR Metot Talimatında belirtildiği gibi ezme tamponu ile ekstrat haline getirilir. Bununla birlikte, yalnızca tohum içeren ToBRFV çalışması için, numuneye spayk solüsyon olarak eklenen PEC [pozitif olduğu bilinen bitki ekstraktı / (Bacopa chlorosis virus (**BaCV**), Dahlia latent viroid (**DLVd**) veya Squash mosaic virus (**SqMV**)] takibi için de tohum ekstraksiyonu aşamasında tohumlara bulaştırma yapılması gerekmektedir. Her bir numune için aynı zamanda “Internal Amplifikasyon Kontrol” olan PEC, madde 6.3.4’ de açıklandığı şekilde kullanılmalıdır.
- d.** Ekstraktlar elde edildikten sonra 900 µl ToBRFV’den ari ekstrakt içine, 100 µl ToBRFV enfekteli ekstrakt eklenerek dilüsyon çalışması başlatılır (Şekil 6).



**Şekil 6.** ToBRFV’den Ari Negatif RNA Örneğinin Ependorf Tüplere Dağıtılması ve Bulaştırılması

- e.** Buna göre, her bir tohum örneği için (Domates ve Biber) 1 dilüsyon serisi olmak üzere toplamda 2 dilüsyon serisi için laboratuvar RNA izolasyonu prosedürüne göre, tohumda RNA izolasyonunu gerçekleştirir.



Şekil 7. ToBRFV Pozitif RNA Örneği ile Başlatılan Seri Dilüsyon Çalışması

- f. Her tohum örneğine ait 9 dilüsyon serisinden elde edilen RNA'lar 3 tekerrür olacak şekilde toplam 54 örnek şeklinde Çizelge 5'deki kontrol parametreleri ile CaTa28, CSP1325 ve BaCV primer gruplar birlikte kullanılarak tripleks RT-qPCR analizi gerçekleştirilir.

Çizelge 5. Tohum LOD RT-qPCR Örnek Analiz Şablonu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	ÖR1 (10 <sup>-1</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-1</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-1</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-2</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-2</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-2</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-3</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-3</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-3</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-4</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-4</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-4</sup> )
<b>B</b>	ÖR1 (10 <sup>-5</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-5</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-5</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-6</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-6</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-6</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-7</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-7</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-7</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-8</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-8</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-8</sup> )
<b>C</b>	ÖR1 (10 <sup>-9</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-9</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-9</sup> )									
<b>D</b>	ÖR2 (10 <sup>-1</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-1</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-1</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-2</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-2</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-2</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-3</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-3</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-3</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-4</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-4</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-4</sup> )
<b>E</b>	ÖR2 (10 <sup>-5</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-5</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-5</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-6</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-6</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-6</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-7</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-7</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-7</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-8</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-8</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-8</sup> )
<b>F</b>	ÖR1 (10 <sup>-9</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-9</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-9</sup> )									
<b>G</b>						IC						
<b>H</b>	PAC	PAC	PIC	PIC		IC		NIC	NIC		NTC	NTC

- **IC / İnhibisyon Kontrol**  
Enfekte olmamış tohumdan elde edilen ekstrakt içindeki PEC dilüsyonudur (madde 6.3.4).
- **PAC / Pozitif Amplifikasyon Kontrol**  
RT-qPCR amplifikasyon esnasında kullanılan ToBRFV pozitif olan sertifikalı izolat RNA'sı/fragmenti.
- **PIC / Pozitif İzolasyon Kontrol**  
Domates ve biber bitki kısımları, meyve parçaları ve yaprak içeren ToBRFV çalışması için yapılan her RNA izolasyonu esnasında, numunelere ek olarak izolasyon aşamasında çalışmaya dahil edilen ToBRFV enfekteli bitki parçası).
- **NIC / Negatif İzolasyon Kontrol**  
RNA izolasyonu esnasında ayrı bir örnek olarak izolasyona dahil edilen, ToBRFV'den ari olan bitki materyalidir. Ari materyalin bulunmadığı durumda ekstraksiyon buffer da kullanılabilir).
- **NTC / Negatif Template Kontrol** (tüm PCR reaktiflerini içeren ancak hedef veya spayk DNA, RNA veya PEC nükleik asitleri içermeyen ve RT-qPCR amplifikasyon esnasında kullanılan PCR grade su içeren örnek).



### 7.1.2.1.1. Tohum LOD CaTa28, CSP1325 ve BaCV Primerleri ile Yapılan LOD Sonuç Eldesi ve Değerlendirilmesi

- a. Çizelge 5'den elde edilen reaksiyon kuyularına ait Cq değerleri Çizelge 6, 7 ve 8 üzerinde belirtilir.

**Çizelge 6.** Tohum LOD RT-qPCR 1. Örnek Analiz Sonuç Şablonu

Çalışma Tarihi	...../...../.....								
Çalışmayı Yapan Personel Adı	.....								
Dilüsyon Serileri	1. ÖRNEK ADI								
	CaTa28 Cq Değerleri			CSP1325 Cq Değerleri			BaCV Cq Değerleri		
	1.seri	2.seri	3.seri	1.seri	2.seri	3.seri	1.seri	2.seri	3.seri
10 <sup>-1</sup>									
10 <sup>-2</sup>									
10 <sup>-3</sup>									
10 <sup>-4</sup>									
10 <sup>-5</sup>									
10 <sup>-6</sup>									
10 <sup>-7</sup>									
10 <sup>-8</sup>									
10 <sup>-9</sup>									

**Çizelge 7.** Tohum LOD RT-qPCR 2. Örnek Analiz Sonuç Şablonu

Çalışma Tarihi	...../...../.....								
Çalışmayı Yapan Personel Adı	.....								
Dilüsyon Serileri	2. ÖRNEK ADI								
	CaTa28 Cq Değerleri			CSP1325 Cq Değerleri			BaCV Cq Değerleri		
	1.seri	2.seri	3.seri	1.seri	2.seri	3.seri	1.seri	2.seri	3.seri
10 <sup>-1</sup>									
10 <sup>-2</sup>									
10 <sup>-3</sup>									
10 <sup>-4</sup>									
10 <sup>-5</sup>									
10 <sup>-6</sup>									
10 <sup>-7</sup>									
10 <sup>-8</sup>									
10 <sup>-9</sup>									

**Çizelge 8.** Tohum LOD RT-qPCR Örnek Analizi Kontrol Parametresi Sonuç Şablonu

Tekrar sayısı	CaTa28 Cq Değerleri					
	PAC	PIC	NIC	NTC	IC	IC
1.Tekrar						
2.Tekrar						
	CSP1325 Cq Değerleri					
	PAC	PIC	NIC	NTC	IC	IC
1.Tekrar						
2.Tekrar						
	BaCV Cq Değerleri					
	PAC	PIC	NIC	NTC	IC	IC
1.Tekrar						
2.Tekrar						

- b. Bu çalışma kullanılan dilüsyonlardan RT-qPCR analiz sonuçlarından her bir tohum örneği için düşük dilüsyonlarda üç paralelin de aynı sonuç verdiği (ISF önerisi 28/32 Cq aralığında çıkan) en son sulandırma serisi tespit limiti olarak belirlenmelidir. **Bu tespit limitine göre her laboratuvar kendi cut/off değerini belirler.**
- c. Sonuçlar sadece pozitif amplifikasyon kontrolü (PAC) laboratuvar cut/off değeri altında sinyal verirse geçerlidir.
- ✓ NIC ve NTC negatif olmalıdır.
  - ✓ PIC ve PAC CaTa28 ve CSP1325 primerlerinde ToBRFV pozitif; IC BaCV pozitif olmalıdır.
- d. Kontrol parametrelerinde beklenmedik sonuçların elde edildiğinde çalışmalar tekrar edilmelidir.

#### 7.1.2.2. Tohum Analizlerinin Doğrulamasında Kullanılan RT-qPCR Primerlerinin (Menzel&Winter 2021) LOD Çalışması

- a. Tohum LOD çalışmasında (CaTa28, CSP1325 ve BaCV Primerleri kullanılarak yapılan) kullanılan dilüsyon serileri ( $10^{-1}$ .... $10^{-9}$ ) bu çalışmada kullanılacaktır. Rutin çalışmalarda pozitifliğin doğrulanma çalışması olan Menzel& Winter 2021 primeri ile yapılan LOD çalışmasında bu sebeple inhibisyon kontrol uygulanmasına gerek yoktur.





- b. Her tohum örneğine ait 9 dilüsyon serisinden elde edilen RNA'lar 3 tekerrür 9 olacak şekilde toplam 54 örnek şeklinde Çizelge 9'daki kontrol parametreleri ile RT-qPCR analizi Menzel&Winter 2021 primerleri ile gerçekleştirilir.

**Çizelge 9.** Menzel&Winter 2021 Primerlerin LOD RT-qPCR Örnek Analiz Şablonu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	ÖR1 (10 <sup>-1</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-1</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-1</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-2</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-2</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-2</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-3</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-3</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-3</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-4</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-4</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-4</sup> )
<b>B</b>	ÖR1 (10 <sup>-5</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-5</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-5</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-6</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-6</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-6</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-7</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-7</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-7</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-8</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-8</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-8</sup> )
<b>C</b>	ÖR1 (10 <sup>-9</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-9</sup> )	ÖR1 (10 <sup>-9</sup> )									
<b>D</b>	ÖR2 (10 <sup>-1</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-1</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-1</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-2</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-2</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-2</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-3</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-3</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-3</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-4</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-4</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-4</sup> )
<b>E</b>	ÖR2 (10 <sup>-5</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-5</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-5</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-6</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-6</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-6</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-7</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-7</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-7</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-8</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-8</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-8</sup> )
<b>F</b>	ÖR2 (10 <sup>-9</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-9</sup> )	ÖR2 (10 <sup>-9</sup> )									
<b>G</b>												
<b>H</b>	<b>PAC</b>	<b>PAC</b>	<b>PIC</b>	<b>PIC</b>				<b>NIC</b>	<b>NIC</b>		<b>NTC</b>	<b>NTC</b>

• **PAC: Pozitif Amplifikasyon Kontrol**  
RT-qPCR amplifikasyon esnasında kullanılan ToBRFV pozitif olan sertifikalı izolat RNA'sı/fragmenti.

**PIC: Pozitif İzolasyon Kontrol**  
Domates ve biber bitki kısımları, meyve parçaları ve yaprak içeren ToBRFV çalışması için yapılan her RNA izolasyonu esnasında, numunelere ek olarak izolasyon aşamasında çalışmaya dahil edilen ToBRFV enfekteli bitki parçası.

• **NIC: Negatif İzolasyon Kontrol**  
RNA izolasyonu esnasında ayrı bir örnek olarak izolasyona dahil edilen, ToBRFV'den arı olan bitki materyalidir. Arı materyalin bulunmadığı durumda ekstraksiyon buffer da kullanılabilir.

• **NTC: Negatif Template Kontrol**  
Tüm PCR reaktiflerini içeren ancak hedef veya spayk DNA, RNA veya PEC nükleik asitleri içermeyen ve RT-qPCR amplifikasyon esnasında kullanılan PCR grade su içeren örnek.

#### 7.1.2.2.1. Tohum Analizlerinin Doğrulamasında Kullanılan RT-qPCR primerlerinin (Menzel & Winter 2021) LOD Sonuç Eldesi ve Değerlendirilmesi

- a. Çizelge 9'dan elde edilen reaksiyon kuyularına ait Cq değerleri Çizelge 10 üzerinde belirtilir.



**Çizelge 10.** Menzel&Winter 2021 Primerlerin LOD RT-qPCR Örnek Analiz Sonuç Şablonu

Çalışma Tarihi	...../...../.....	...../...../.....				
Çalışmayı Yapan Personel Adı	.....	.....				
Dilüsyon Serileri	1. ÖRNEK ADI			2. ÖRNEK ADI		
	Menzel&Winter 2021 Cq Değerleri			Menzel&Winter 2021 Cq Değerleri		
	1.seri	2.seri	3.seri	1.seri	2.seri	3.seri
10 <sup>-1</sup>						
10 <sup>-2</sup>						
10 <sup>-3</sup>						
10 <sup>-4</sup>						
10 <sup>-5</sup>						
10 <sup>-6</sup>						
10 <sup>-7</sup>						
10 <sup>-8</sup>						
10 <sup>-9</sup>						

**Çizelge 11.** Menzel& Winter 2021 Primerlerin RT-qPCR Örnek Analizi Kontrol Parametresi Sonuç Şablonu

Tekrar sayısı	Menzel&Winter 2021 Cq Değerleri			
	PAC	PIC	NIC	NTC
1.Tekrar				
2.Tekrar				

- b. Bu çalışma, kullanılan dilüsyonların RT-qPCR analiz sonuçlarından her bir tohum örneği için düşük dilüsyonlarda üç paralelin de aynı sonuç verdiği en son sulandırma serisi tespit limiti olarak belirlenmelidir. Menzel&Winter'in cut/off değerini 35 Cq olarak belirttiği (EPPO, 2022) tespit limiti referans alınmakla birlikte, her laboratuvar kendi cut/off değerini belirlemelidir.
- c. Sonuçlar, sadece pozitif amplifikasyon kontrolü (PAC) laboratuvar cut/off değeri altında sinyal verirse geçerlidir.
- ✓ NIC ve NTC negatif olmalıdır.
  - ✓ PIC ve PAC ToBRFV pozitif olmalıdır.
- d. Kontrol parametrelerine ait sonuçlar Çizelge 11 üzerinde belirtilir.



- e. Kontrol parametrelerinde beklenmedik sonuçların elde edildiğinde çalışmalar tekrar edilmelidir.

### 7.2. Analitik Özgüllük (Kapsayıcılık ve Münhasırlık)

Bu aşamada analizin hedef(ler)deki patojenleri tespit etme (kapsayıcılık) ve hedef olmayanları hariç tutma (dışlayıcılık) yeteneğini ortaya koyması amaçlanmıştır.

Bu aşamanın spesifiklik gereksinimleri için, CaTa28 ve CSP1325 primer-prob setlerinin mevcut tüm ToBRFV dizileriyle %100 benzerliğe sahip olması ve yakın akraba olup hedef olmayan organizmaların (Çizelge 13) dizileriyle %90'dan az benzerliğe sahip olması gereklidir.

**Not:** Çizelge 12'de belirtilen etmenlere ait izolat numaraları çalışılan laboratuvarlara göre değişkenlik gösterebilir.

**Çizelge 12.** ToBRFV Yakın Akraba Olduğu Bilinen İzolatlar ve Bu İzolatların Kaynak Kodları

Etmen Adı	İzolat No
<i>Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV)</i>	DSMZ/ PV/1236
<i>Tomato mosaic virus (ToMV)</i>	DSMZ/ PV/0141
<i>Tomato mottle mosaic virus (ToMMV)</i>	DSMZ/ PV/1267
<i>Pepper mild mottle virus (PMMoV)</i>	DSMZ/ PV/0165
<i>Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)</i>	DSMZ/ PV/0375
<i>Tobacco mild green mosaic virus (TMGMV)</i>	DSMZ/ PV/0112
<i>Tobacco mosaic virus (TMV)</i>	DSMZ/ PV/1252

#### 7.2.1. Analitik Özgüllük Analizi

- a. Buna göre her iki CaTa28 ve CSP1325 primer-prob setlerinin Çizelge 12'de belirtilen etmenlerin RNA örnekleri ile 3'er tekerrürlü olarak RT-qPCR analizi gerçekleştirilir.
- b. Çalışma her iki primer setinin multipleks kullanımı ile Çizelge 13'deki düzenle gerçekleştirilir.

**Çizelge 13. Analitik Özgüllük RT-qPCR Örnek Analiz Şablonu**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ToMV	ToMV	ToMV							ToBRFV	ToBRFV	ToBRFV
B	ToMMV	ToMMV	ToMMV									
C	PMMoV	PMMoV	PMMoV									
D	CGMMV	CGMMV	CGMMV									
E	TMGMV	TMGMV	TMGMV									
F	TMV	TMV	TMV								PAC	PAC
G												
H	NIC	NIC		NTC	NTC						PIC	PIC

- **PAC: Pozitif Amplifikasyon Kontrol**  
RT-qPCR amplifikasyon esnasında kullanılan ToBRFV pozitif olan sertifikalı izolat RNA'sı/fragmenti.
- **PIC: Pozitif İzolasyon Kontrol**  
Domates ve biber bitki kısımları, meyve parçaları ve yaprak içeren ToBRFV çalışması için yapılan her RNA izolasyonu esnasında, numunelere ek olarak izolasyon aşamasında çalışmaya dahil edilen ToBRFV enfekteli bitki parçası.
- **NIC: Negatif İzolasyon Kontrol**  
RNA izolasyonu esnasında ayrı bir örnek olarak izolasyona dahil edilen, ToBRFV'den arı olan bitki materyalidir. Arı materyalin bulunmadığı durumda ekstraksiyon buffer da kullanılabilir.
- **NTC: Negatif Template Kontrol**  
Tüm PCR reaktiflerini içeren ancak hedef veya spayk DNA, RNA veya PEC nükleik asitleri içermeyen ve RT-qPCR amplifikasyon esnasında kullanılan PCR grade su içeren örnek.

### 7.2.2. Analitik özgüllük analizinin değerlendirilmesi

Çizelge 13'den elde edilen reaksiyon kuyularına ait Cq değerleri Çizelge 14 üzerinde belirtilir.

**Çizelge 14. Analitik Özgüllük RT-qPCR Örnek Analiz Sonuç Şablonu**

Çalışma Tarihi	...../...../.....					
Çalışmayı Yapan Personel Adı	.....					
İzolat İsimleri	CaTa28 Cq Değerleri			CSP1325 Cq Değerleri		
	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
ToBRFV						
ToMV						
ToMMV						
PMMoV						
CGMMV						
TMGMV						
TMV						



- a. Gerçekleştirilen RT-qPCR analizinde, ToBRFV izolatlarının (Çizelge 12) RT-qPCR testinde her iki primer/prob seti tarafından tespit edilmesi ( $Cq < 32$ ) beklenir. Analize tabi tutulan tüm hedef dışı etkenlerin de her laboratuvar tarafından belirlenmiş cut/off değerinin üzerinde negatif sonuç vermesi beklenir.
- b. Kontrol parametrelerine ait sonuçlar Çizelge 15 üzerinde belirtilir.

**Çizelge 15.** Analitik Özgüllük RT-qPCR Örnek Analizi Kontrol Parametresi Sonuç Şablonu

Tekrar sayısı	CaTa28 Cq Değerleri				CSP1325 Cq Değerleri			
	PAC	PIC	NIC	NTC	PAC	PIC	NIC	NTC
1.Tekrar								
2.Tekrar								

- c. Sonuçlar sadece pozitif amplifikasyon kontrolü (PAC) laboratuvar cut/off değeri altında sinyal verirse geçerlidir.
- ✓ NIC ve NTC negatif olmalıdır.
  - ✓ PIC ve PAC ve ToBRFV pozitif olmalıdır.
- d. Kontrol parametrelerinde beklenmedik sonuçların elde edildiğinde çalışmalar tekrar edilmelidir.

### 7.3. Tekrarlanabilirlik

RT-qPCR için tekrarlanabilirlik, kullanılan metodun aynı laboratuvarında, aynı cihazla/metotla, aynı uygulama koşulları altında, aynı kişi tarafından kısa zaman (analizin süresi ve analizin yapısına göre değişir) aralığında, aynı veya benzer matrislerde elde edilen ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Bu amaçla LOD'nin hemen üzerindeki üç bağımsız seyreltme serisinin ToBRFV RT-qPCR kalitatif sonuçlarının aynı olması gereklidir (pozitif/negatif sonuç). Tekrar edilebilirlik performans kriteri için, LOD çalışmalarında üretilen veriler dikkate alınarak çalışmanın planlanması yapılır. (ISF 2020 Validation Report, Eppo PM 7/98 (5)).

Buna göre raporda ;

- ✓ “7.1.1.1. LOD Bitki LOD Sonuç Eldesi ve Değerlendirilmesi”,
- ✓ “7.1.2.1.1. Tohum LOD çalışmaları CaTa28 ve CSP1325 Primerleri ile Yapılan LOD Sonuç Eldesi ve Değerlendirilmesi”
- ✓ “7.1.2.2.1.Tohum Analizlerinin Doğrulamasında Kullanılan RT-qPCR Primerlerinin (Menzel&Winter 2021) LOD Sonuç Eldesi ve Değerlendirilmesi”



başlıkları altında tespit edilen LOD değerinin hemen üzerindeki dilüsyondan üç kopya halinde gerçekleştirilen (Şekil 2, 3) üç bağımsız seyreltme serisinin her birinden 3 paralel çalışma yapılır. Buna göre çalışmanın planlanması için öncelikle Şekil 1 doğrultusunda çalışılan örnekler için LOD verileri, Çizelge 16’da gösterilir.

**Çizelge 16.** LOD Çalışmalarından Elde Edilen Tekrarlanabilirlik verileri RT-qPCR Örnek Analiz Sonuç Şablonu  
(NOT: Sütun 1 ve 2’deki dilüsyon değerleri örnek olarak verilmiştir. Bu sütunlara çalışmalarda elde edilen değerler yazılacaktır.)

Örnekler ve paralelleri	LOD Dilüsyonu	LOD Dilüsyonunun Hemen Üzerinde Yer Alan Dilüsyon Serisi	CaTa28 Cq Değerleri			CSP1325 Cq Değerleri			BaCV Cq Değerleri			Menzel&Winter 2021 Cq Değerleri			
			1.seri	2.seri	3.seri	1.seri	2.seri	3.seri	1.seri	2.seri	3.seri	1.seri	2.seri	3.seri	
Örnek 1	1	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>							-	-	-	-	-	-
	2	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>							-	-	-	-	-	-
	3	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>							-	-	-	-	-	-
Örnek 2	1	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>							-	-	-	-	-	-
	2	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>							-	-	-	-	-	-
	3	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>							-	-	-	-	-	-
Örnek 3	1	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>										-	-	-
													-	-	-
													-	-	-
Örnek 4	1	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-7</sup>										-	-	-
													-	-	-
													-	-	-
Örnek 5	1	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-7</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
				-	-	-	-	-	-	-	-	-			
				-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Örnek 6	1	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-8</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
				-	-	-	-	-	-	-	-	-			
				-	-	-	-	-	-	-	-	-			

- Örnek:1 BİTKİ KISIMLARI (Bitki parçaları /Yaprak) - (Domates / Biber)
- Örnek:2 MEYVE (Domates / Biber)
- Örnek:3 TOHUM (Domates)
- Örnek:4 TOHUM (Biber)
- Örnek:5 TOHUM DOĞRULAMA (Domates)
- Örnek:6 TOHUM DOĞRULAMA (Biber)



### 7.3.1. Tekrarlanabilirlik Çalışması Pleyt Dizayını

Çizelge 16 doğrultusunda, Çizelge 17’de belirtilen RT-qPCR Örnek Analiz Şablonu hazırlanarak, tekrarlanabilirlik çalışması yapılır.

**Çizelge 17.** Tekrarlanabilirlik Çalışması için RT-qPCR Örnek Analiz Şablonu 1

**Not:** (Reaksiyon kuyularında kullanılacak olan dilüsyonlar, Çizelge 16’daki tabloya göre örnek olarak verilmiştir. Reaksiyon kuyularında çalışmada elde edilen değerlere göre uygun dilüsyonlar kullanılacaktır).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ÖR1.1S/1P (10 <sup>-4</sup> )	ÖR1.1S/2P (10 <sup>-4</sup> )	ÖR1.1S/3P (10 <sup>-4</sup> )		ÖR3.1S/1P (10 <sup>-6</sup> )	ÖR3.1S/2P (10 <sup>-6</sup> )	ÖR3.1S/3P (10 <sup>-6</sup> )					IC
B	ÖR1.2S/1P (10 <sup>-4</sup> )	ÖR1.2S/2P (10 <sup>-4</sup> )	ÖR1.2S/3P (10 <sup>-4</sup> )		ÖR3.1S/4P (10 <sup>-6</sup> )	ÖR3.1S/5P (10 <sup>-6</sup> )	ÖR3.1S/6P (10 <sup>-6</sup> )					IC
C	ÖR1.3S/1P (10 <sup>-4</sup> )	ÖR1.3S/2P (10 <sup>-4</sup> )	ÖR1.3S/3P (10 <sup>-4</sup> )		ÖR3.1S/7P (10 <sup>-6</sup> )	ÖR3.1S/8P (10 <sup>-6</sup> )	ÖR3.1S/9P (10 <sup>-6</sup> )					
D	ÖR2.1S/1P (10 <sup>-5</sup> )	ÖR2.1S/2P (10 <sup>-5</sup> )	ÖR2.1S/3P (10 <sup>-5</sup> )		ÖR4.1S/1P (10 <sup>-7</sup> )	ÖR4.1S/2P (10 <sup>-7</sup> )	ÖR4.1S/3P (10 <sup>-7</sup> )					
E	ÖR2.2S/1P (10 <sup>-5</sup> )	ÖR2.2S/2P (10 <sup>-5</sup> )	ÖR2.2S/3P (10 <sup>-5</sup> )		ÖR4.1S/4P (10 <sup>-7</sup> )	ÖR4.1S/5P (10 <sup>-7</sup> )	ÖR4.1S/6P (10 <sup>-7</sup> )					
F	ÖR2.3S/1P (10 <sup>-5</sup> )	ÖR2.3S/2P (10 <sup>-5</sup> )	ÖR2.3S/3P (10 <sup>-5</sup> )		ÖR4.1S/7P (10 <sup>-7</sup> )	ÖR4.1S/8P (10 <sup>-7</sup> )	ÖR4.1S/9P (10 <sup>-7</sup> )					
G												
H	PAC	PAC	PIC	PIC				NIC	NIC		NTC	NTC

- **KODLAMA:** **ÖR**; Örnek Adı ve Numarası / **S**; LOD dilüsyonunun hemen üzerindeki dilüsyondan oluşan 3 adet ya da tohum için 1 adet seri dilüsyonun numarası / **P**; Her seri dilüsyondan reaksiyon pleytine aktarılan paralel çalışmanın numarası.
- **IC / İnhibisyon Kontrol**  
Enfekte olmamış tohumdan elde edilen ekstrakt içindeki PEC dilüsyonudur (madde 6.3.4).
- **PAC / Pozitif Amplifikasyon Kontrol**  
RT-qPCR amplifikasyon esnasında kullanılan ToBRFV pozitif olan sertifikalı izolat RNA’sı/fragmenti.
- **PIC / Pozitif İzolasyon Kontrol**  
Domates ve biber bitki kısımları, meyve parçaları ve yaprak içeren ToBRFV çalışması için yapılan her RNA izolasyonu esnasında, numunelere ek olarak izolasyon aşamasında çalışmaya dahil edilen ToBRFV enfekteli bitki parçası).
- **NIC / Negatif İzolasyon Kontrol**  
RNA izolasyonu esnasında ayrı bir örnek olarak izolasyona dahil edilen, ToBRFV’den arı olan bitki materyalidir. Ari materyalin bulunmadığı durumda ekstraksiyon buffer da kullanılabilir).
- **NTC / Negatif Template Kontrol** (tüm PCR reaktiflerini içeren ancak hedef veya spayk DNA, RNA veya PEC nükleik asitleri içermeyen ve RT-qPCR amplifikasyon esnasında kullanılan PCR grade su içeren örnek).



**Çizelge 18.** Tekrarlanabilirlik Çalışması için RT-qPCR Örnek Analiz Şablonu 2 (Menzel&Winter 2021 Primerleri)

**Not:** (Reaksiyon kuyularında kullanılacak olan dilüsyonlar, Çizelge 16 daki tabloya göre örnek olarak verilmiştir. Reaksiyon kuyularında çalışmada elde edilen değerlere göre uygun dilüsyonlar kullanılacaktır).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ÖR5.1S/1P (10 <sup>-7</sup> )	ÖR5.1S/2P (10 <sup>-7</sup> )	ÖR5.1S/3P (10 <sup>-7</sup> )									
B	ÖR5.1S/4P (10 <sup>-7</sup> )	ÖR5.1S/5P (10 <sup>-7</sup> )	ÖR5.1S/6P (10 <sup>-7</sup> )									
C	ÖR5.1S/7P (10 <sup>-7</sup> )	ÖR5.1S/8P (10 <sup>-7</sup> )	ÖR5.1S/9P (10 <sup>-7</sup> )									
D	ÖR6.1S/1P (10 <sup>-8</sup> )	ÖR6.1S/2P (10 <sup>-8</sup> )	ÖR6.1S/3P (10 <sup>-8</sup> )									
E	ÖR6.1S/4P (10 <sup>-8</sup> )	ÖR6.1S/5P (10 <sup>-8</sup> )	ÖR6.1S/6P (10 <sup>-8</sup> )									
F	ÖR6.1S/7P (10 <sup>-8</sup> )	ÖR6.1S/8P (10 <sup>-8</sup> )	ÖR6.1S/9P (10 <sup>-8</sup> )									
G												
H	PAC	PAC	PIC	PIC				NIC	NIC		NTC	NTC

- **KODLAMA: ÖR;** Örnek Adı ve Numarası (örnek isimleri ve numaraları çizelge 17 ye göre tanımlanıp tablo altına yazılacaktır) / **S;** LOD dilüsyonunun hemen üzerindeki dilüsyondan oluşan 3 adet ya da tohum için 1 adet seri dilüsyonun numarası / **P;** Her seri dilüsyondan reaksiyon pleytine aktarılan paralel çalışmanın numarası.
- **PAC / Pozitif Amplifikasyon Kontrol**  
RT-qPCR amplifikasyon esnasında kullanılan ToBRFV pozitif olan sertifikalı izolat RNA'sı/fragmenti..
- **PIC / Pozitif İzolasyon Kontrol**  
Domates ve biber bitki kısımları, meyve parçaları ve yaprak içeren ToBRFV çalışması için yapılan her RNA izolasyonu esnasında, numunelere ek olarak izolasyon aşamasında çalışmaya dahil edilen ToBRFV enfekteli bitki parçası.
- **NIC / Negatif İzolasyon Kontrol**  
RNA izolasyonu esnasında ayrı bir örnek olarak izolasyona dahil edilen, ToBRFV'den ari olan bitki materyalidir. Ari materyalin bulunmadığı durumda ekstraksiyon buffer da kullanılabilir.
- **NTC / Negatif Template Kontrol**  
Tüm PCR reaktiflerini içeren ancak hedef veya spayk DNA, RNA veya PEC nükleik asitleri içermeyen ve RT-qPCR amplifikasyon esnasında kullanılan PCR grade su içeren örnek.

### 7.3.2. Tekrarlanabilirlik Sonuçlarının Değerlendirilmesi

LOD'nin hemen üzerindeki üç bağımsız seyreltme serisi ve onlara ait 3 paralel çalışmanın ToBRFV RT-qPCR kalitatif sonuçlarının aynı olması gereklidir.



Çizelge 17'den elde edilen reaksiyon kuyularına ait Cq değerleri Çizelge 19 üzerinde belirtilir.

**Çizelge 19.** Tekrarlanabilirlik Çalışması için RT-qPCR Sonuçları (1)

Çalışma Tarihi	...../...../.....								
Çalışmayı Yapan Personel Adı	.....								
ÖRNEK NO	1. <b>ÖRNEK ADI:</b> BİTKİ KISIMLARI (Bitki parçaları /Yaprak) - (Domates / Biber) 2. <b>ÖRNEK ADI:</b> MEYVE (Domates / Biber) 3. <b>ÖRNEK ADI:</b> TOHUM (Domates) 4. <b>ÖRNEK ADI:</b> TOHUM (Biber)								
	CaTa28 Cq Değerleri			CSP1325 Cq Değerleri			BaCV Cq Değerleri		
	1.seri	2.seri	3.seri	1.seri	2.seri	3.seri	1.seri	2.seri	3.seri
ÖR1.1							-	-	-
ÖR1.2							-	-	-
ÖR1.3							-	-	-
ÖR2.1							-	-	-
ÖR2.2							-	-	-
ÖR2.3							-	-	-
ÖR3.1		-	-		-	-			
		-	-		-	-			
		-	-		-	-			
		-	-		-	-			
		-	-		-	-			
		-	-		-	-			
		-	-		-	-			
		-	-		-	-			
ÖR4.1		-	-		-	-			
		-	-		-	-			
		-	-		-	-			
		-	-		-	-			
		-	-		-	-			
		-	-		-	-			
		-	-		-	-			
		-	-		-	-			





**Çizelge 20.** Çizelge 17 için Bildirilen, Tekrarlanabilirlik Çalışması RT-qPCR Örnek Analizi, Kontrol Parametresi Sonuç Şablonu

Çalışma Tarihi	...../...../.....					
Çalışmayı Yapan Personel Adı	.....					
Tekrar sayısı	CaTa28 Cq Değerleri					
	PAC	PIC	NIC	NTC	IC	IC
1.Tekrar						
2.Tekrar						
	CSP1325 Cq Değerleri					
	PAC	PIC	NIC	NTC	IC	IC
1.Tekrar						
2.Tekrar						
	BaCV Cq Değerleri					
	PAC	PIC	NIC	NTC	IC	IC
1.Tekrar						
2.Tekrar						



Çizelge 18'den elde edilen reaksiyon kuyularına ait Cq değerleri, Çizelge 21 üzerinde belirtilir.

**Çizelge 21.** Tekrarlanabilirlik Çalışması için RT-qPCR Sonuçları (2), (Menzel&Winter 2021 Primerleri)

Çalışma Tarihi	...../...../.....		
Çalışmayı Yapan Personel Adı	.....		
ÖRNEK NO	5. ÖRNEK ADI: TOHUM DOĞRULAMA (Domates) 6. ÖRNEK ADI: TOHUM DOĞRULAMA (Biber)		
	Menzel&Winter 2021 Cq Değerleri		
	1.seri	2.seri	3.seri
ÖR5.1		-	-
		-	-
		-	-
		-	-
		-	-
		-	-
		-	-
		-	-
ÖR6.1		-	-
		-	-
		-	-
		-	-
		-	-
		-	-
		-	-
		-	-



**Çizelge 22.** Çizelge 18’de bildirilen Tekrarlanabilirlik Çalışması İçin Menzel&Winter 2021 Primerlerin RT-qPCR Örnek Analizi, Kontrol Parametresi Sonuç Şablonu

Çalışma Tarihi	...../...../.....			
Çalışmayı Yapan Personel Adı	.....			
Tekrar sayısı	Menzel&Winter 2021 Cq Değerleri			
	PAC	PIC	NIC	NTC
1.Tekrar				
2.Tekrar				

#### 7.4. Tekrar Üretilirlik

Laboratuvar içi tekrar üretilebilirlik, bir metodun aynı laboratuvarında, farklı kişiler tarafından, farklı cihaz ve ekipmanlarla, mümkünse farklı zamanlarda aynı örneklerde yaptığı ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Laboratuvar içi ToBRFV analizi tekrar üretilebilirlik çalışması için, kalitatif sonuçlarının aynı olması gereklidir.

Bu doğrultuda laboratuvar, tekrar üretilebilirlik verifikasyon çalışması için, enfekte örnekleri ekstraksiyonlarından itibaren (örneğe rutin numune analizi gibi davranarak) farklı analistler ile mümkünse farklı zamanlarda, farklı cihaz ve ekipmanlarla çalışmalıdır. tekrar üretilebilirlik çalışması için kullanılacak örnekler Şekil 1’de oluşturulan numune grupları doğrultusunda seçilir. Buna göre;

- ✓ bir örnek, bitki kısımları (Bitki parçaları /Yaprak) - (Domates / Biber)
- ✓ bir örnek, meyve (Domates / Biber),
- ✓ bir örnek tohum (Domates)
- ✓ bir örnek tohum (Biber)
- ✓ bir örnek tohum Doğrulama (Domates) (Menzel&Winter 2021)
- ✓ bir örnek tohum Doğrulama (Biber) (Menzel&Winter 2021)

olmak üzere toplamda en az 6 örnek ile, tohum için ekstraksiyon, diğer örnekler için RNA izolasyon aşamasından itibaren, yukarıda anlatılan koşullar doğrultusunda gerçekleştirilir.



### 7.4.1. Tekrar Üretilirlik Çalışması Pleyt Dizaynı

**Çizelge 23.** A kişisine ait Tekrar Üretilirlik Çalışması için RT-qPCR Örnek Analiz Şablonu-1

Çalışma Tarihi	...../...../.....											
Çalışmayı Yapan Personel Adı	.....											
Çalışmada Kullanılan Örnekler	1. <b>ÖRNEK ADI:</b> BİTKİ KISIMLARI (Bitki parçaları /Yaprak) - (Domates / Biber) 2. <b>ÖRNEK ADI:</b> MEYVE (Domates / Biber) 3. <b>ÖRNEK ADI:</b> TOHUM (Domates) 4. <b>ÖRNEK ADI:</b> TOHUM (Biber)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A Kişişi ÖR1/1	A Kişişi ÖR1/2	A Kişişi ÖR1/3									IC
B	A Kişişi ÖR2/1	A Kişişi ÖR2/2	A Kişişi ÖR2/3									IC
C	A Kişişi ÖR3/1	A Kişişi ÖR3/2	A Kişişi ÖR3/3									
D	A Kişişi ÖR4/1	A Kişişi ÖR4/2	A Kişişi ÖR4/3									
E												
F												
G												
H	PAC	PAC	PIC	PIC				NIC	NIC		NTC	NTC

- **IC / İnhibisyon Kontrol**  
Enfekte olmamış tohumdan elde edilen ekstrakt içindeki PEC dilüsyonudur (madde 6.3.4).
- **PAC / Pozitif Amplifikasyon Kontrol**  
RT-qPCR amplifikasyon esnasında kullanılan ToBRFV pozitif olan sertifikalı izolat RNA'sı/fragmenti.
- **PIC / Pozitif İzolasyon Kontrol**  
Domates ve biber bitki kısımları, meyve parçaları ve yaprak içeren ToBRFV çalışması için yapılan her RNA izolasyonu esnasında, numunelere ek olarak izolasyon aşamasında çalışmaya dahil edilen ToBRFV enfekteli bitki parçası).
- **NIC / Negatif İzolasyon Kontrol**  
RNA izolasyonu esnasında ayrı bir örnek olarak izolasyona dahil edilen, ToBRFV'den ari olan bitki materyalidir. Ari materyalin bulunmadığı durumda ekstraksiyon buffer da kullanılabilir).
- **NTC / Negatif Template Kontrol** (tüm PCR reaktiflerini içeren ancak hedef veya spayk DNA, RNA veya PEC nükleik asitleri içermeyen ve RT-qPCR amplifikasyon esnasında kullanılan PCR grade su içeren örnek.

**Çizelge 24. B kişisine ait Tekrar Üretilbilirlik Çalışması için RT-qPCR Örnek Analiz Şablonu-1**

Çalışma Tarihi	...../...../.....											
Çalışmayı Yapan Personel Adı	.....											
Çalışmada Kullanılan Örnekler	1. <b>ÖRNEK ADI: BİTKİ KISIMLARI</b> (Bitki parçaları /Yaprak) - (Domates / Biber) 2. <b>ÖRNEK ADI: MEYVE</b> (Domates / Biber) 3. <b>ÖRNEK ADI: TOHUM</b> (Domates) 4. <b>ÖRNEK ADI: TOHUM</b> (Biber)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B Kişisi ÖR1/1	B Kişisi ÖR1/2	B Kişisi ÖR1/3									IC
B	B Kişisi ÖR2/1	B Kişisi ÖR2/2	B Kişisi ÖR2/3									IC
C	B Kişisi ÖR3/1	B Kişisi ÖR3/2	B Kişisi ÖR3/3									
D	B Kişisi ÖR4/1	B Kişisi ÖR4/2	B Kişisi ÖR4/3									
E												
F												
G												
H	PAC	PAC	PIC	PIC				NIC	NIC		NTC	NTC

- **IC / İnhibisyon Kontrol**  
Enfekte olmamış tohumdan elde edilen ekstrakt içindeki PEC dilüsyonudur (madde 6.3.4).
- **PAC / Pozitif Amplifikasyon Kontrol**  
RT-qPCR amplifikasyon esnasında kullanılan ToBRFV pozitif olan sertifikalı izolat RNA'sı/fragmenti.
- **PIC / Pozitif İzolasyon Kontrol**  
Domates ve biber bitki kısımları, meyve parçaları ve yaprak içeren ToBRFV çalışması için yapılan her RNA izolasyonu esnasında, numunelere ek olarak izolasyon aşamasında çalışmaya dahil edilen ToBRFV enfekteli bitki parçası).
- **NIC / Negatif İzolasyon Kontrol**  
RNA izolasyonu esnasında ayrı bir örnek olarak izolasyona dahil edilen, ToBRFV'den ari olan bitki materyalidir. Ari materyalin bulunmadığı durumda ekstraksiyon buffer da kullanılabilir).
- **NTC / Negatif Template Kontrol** (tüm PCR reaktiflerini içeren ancak hedef veya spayk DNA, RNA veya PEC nükleik asitleri içermeyen ve RT-qPCR amplifikasyon esnasında kullanılan PCR grade su içeren örnek.



**Çizelge 25.** A kişisine ait Tekrar Üretilirlik Çalışması için RT-qPCR Örnek Analiz Şablonu-2  
(Menzel&Winter 2021 Primerleri)

Çalışma Tarihi	...../...../.....											
Çalışmayı Yapan Personel Adı	.....											
Çalışmada Kullanılan Örnekler	5. ÖRNEK ADI: TOHUM DOĞRULAMA (Domates) 6. ÖRNEK ADI: TOHUM DOĞRULAMA (Biber)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A Kişişi ÖR5/1	A Kişişi ÖR5/2	A Kişişi ÖR5/3									
B	A Kişişi ÖR6/1	A Kişişi ÖR6/2	A Kişişi ÖR6/3									
C												
D												
E												
F												
G												
H	PAC	PAC	PIC	PIC				NIC	NIC		NTC	NTC

• **PAC: Pozitif Amplifikasyon Kontrol**  
RT-qPCR amplifikasyon esnasında kullanılan ToBRFV pozitif olan sertifikalı izolat RNA'sı/fragmenti.

• **PIC: Pozitif İzolasyon Kontrol**  
Domates ve biber bitki kısımları, meyve parçaları ve yaprak içeren ToBRFV çalışması için yapılan her RNA izolasyonu esnasında, numunelere ek olarak izolasyon aşamasında çalışmaya dahil edilen ToBRFV enfekteli bitki parçası.

• **NIC: Negatif İzolasyon Kontrol**  
RNA izolasyonu esnasında ayrı bir örnek olarak izolasyona dahil edilen, ToBRFV'den ari olan bitki materyalidir. Ari materyalin bulunmadığı durumda ekstraksiyon buffer da kullanılabilir.

• **NTC: Negatif Template Kontrol**  
Tüm PCR reaktiflerini içeren ancak hedef veya spayk DNA, RNA veya PEC nükleik asitleri içermeyen ve RT-qPCR amplifikasyon esnasında kullanılan PCR grade su içeren örnek.



**Çizelge 26. B kişisine ait Tekrar Üretilbilirlik Çalışması için RT-qPCR Örnek Analiz Şablonu-2**  
(Menzel&Winter 2021 Primerleri)

Çalışma Tarihi												
Çalışmayı Yapan Personel Adı												
Çalışmada Kullanılan Örnekler		5. ÖRNEK ADI: TOHUM DOĞRULAMA (Domates) 6. ÖRNEK ADI: TOHUM DOĞRULAMA (Biber)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B Kişisi ÖR5/1	B Kişisi ÖR5/2	B Kişisi ÖR5/3									
B	B Kişisi ÖR6/1	B Kişisi ÖR6/2	B Kişisi ÖR6/3									
C												
D												
E												
F												
G												
H	PAC	PAC	PIC	PIC				NIC	NIC		NTC	NTC

- **PAC: Pozitif Amplifikasyon Kontrol**  
RT-qPCR amplifikasyon esnasında kullanılan ToBRFV pozitif olan sertifikalı izolat RNA'sı/fragmenti.
- **PIC: Pozitif İzolasyon Kontrol**  
Domates ve biber bitki kısımları, meyve parçaları ve yaprak içeren ToBRFV çalışması için yapılan her RNA izolasyonu esnasında, numunelere ek olarak izolasyon aşamasında çalışmaya dahil edilen ToBRFV enfekteli bitki parçası.
- **NIC: Negatif İzolasyon Kontrol**  
RNA izolasyonu esnasında ayrı bir örnek olarak izolasyona dahil edilen, ToBRFV'den ari olan bitki materyalidir. Ari materyalin bulunmadığı durumda ekstraksiyon buffer da kullanılabilir.
- **NTC: Negatif Template Kontrol**  
Tüm PCR reaktiflerini içeren ancak hedef veya spayk DNA, RNA veya PEC nükleik asitleri içermeyen ve RT-qPCR amplifikasyon esnasında kullanılan PCR grade su içeren örnek.



### 7.4.2 Tekrar Üretilirlik Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Mümkünse farklı zamanlarda farklı cihazlarla farklı personelin (A ve B kişileri) yapmış olduğu ToBRFV RT-qPCR kalitatif analiz sonuçları aynı olmalıdır.

Çizelge 23 ve 24'den (A ve B kişisi) elde edilen reaksiyon kuyularına ait Cq değerleri Çizelge 27 üzerinde belirtilir.

**Çizelge 27.** Tekrar Üretilirlik Çalışması için A ve B kişilerine ait RT-qPCR Sonuçları (1)

Çalışma Tarihi	A: ...../...../..... ; B: ...../...../.....																	
Çalışmayı Yapan Personel Adları	A: ..... ; B: .....																	
ÖRNEK NO	1. ÖRNEK ADI: BİTKİ KISIMLARI (Bitki parçaları /Yaprak) - (Domates / Biber) 2. ÖRNEK ADI: MEYVE (Domates / Biber) 3. ÖRNEK ADI: TOHUM (Domates) 4. ÖRNEK ADI: TOHUM (Biber)																	
	CaTa28 Cq Değerleri						CSP1325 Cq Değerleri						BaCV Cq Değerleri					
	1.seri		2.seri		3.seri		1.seri		2.seri		3.seri		1.seri		2.seri		3.seri	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
ÖR1																		
ÖR1																		
ÖR1																		
ÖR2																		
ÖR2																		
ÖR2																		
ÖR3																		
ÖR3																		
ÖR3																		
ÖR4																		
ÖR4																		
ÖR4																		





**Çizelge 28.** Çizelge 23 ve 24’de Bildirilen Tekrar Üretilbilirlik Çalışması için, A ve B Kişilerine ait RT-qPCR Örnek Analizi, Kontrol Parametresi Sonuç Şablonu

Çalışma Tarihi	A: ...../...../..... ; B: ...../...../.....						
Çalışan Personel	Tekrar sayısı	CaTa28 Cq Değerleri					
		PAC	PIC	NIC	NTC	IC	IC
A Kişisi	1.Tekrar						
A Kişisi	2.Tekrar						
B Kişisi	1.Tekrar						
B Kişisi	2.Tekrar						
		CSP1325 Cq Değerleri					
		PAC	PIC	NIC	NTC	IC	IC
A Kişisi	1.Tekrar						
A Kişisi	2.Tekrar						
B Kişisi	1.Tekrar						
B Kişisi	2.Tekrar						
		BaCV Cq Değerleri					
		PAC	PIC	NIC	NTC	IC	IC
A Kişisi	1.Tekrar						
A Kişisi	2.Tekrar						
B Kişisi	1.Tekrar						
B Kişisi	2.Tekrar						



Çizelge 25 ve 26'dan (A ve B kişisi) elde edilen reaksiyon kuyularına ait Cq değerleri Çizelge 29 üzerinde belirtilir.

**Çizelge 29.** Tekrar Üretilbilirlik Çalışması için A ve B Kişilerine ait RT-qPCR Sonuçları (2), (Menzel&Winter 2021 Primerleri)

Çalışma Tarihi	A: ...../...../..... ; B: ...../...../.....					
Çalışmayı Yapan Personel Adları	A: ..... ; B: .....					
ÖRNEK NO	5. ÖRNEK ADI: TOHUM DOĞRULAMA (Domates) 6. ÖRNEK ADI: TOHUM DOĞRULAMA (Biber)					
	Menzel&Winter 2021 Cq Değerleri					
	1.seri		2.seri		3.seri	
	A	B	A	B	A	B
ÖR5						
ÖR5						
ÖR5						
ÖR6						
ÖR6						
ÖR6						

**Çizelge 30.** Çizelge 25 ve 26'da Bildirilen Tekrar Üretilbilirlik Çalışması için, A ve B Kişilerine ait RT-qPCR (Menzel& Winter 2021) Örnek Analizi Kontrol Parametresi Sonuç Şablonu

Çalışma Tarihi	A: ...../...../..... ; B: ...../...../.....				
Çalışan Personel	Tekrar sayısı	Menzel&Winter 2021 Cq Değerleri			
		PAC	PIC	NIC	NTC
A Kişisi	1.Tekrar				
A Kişisi	2.Tekrar				
B Kişisi	1.Tekrar				
B Kişisi	2.Tekrar				



## 8. KAYNAKLAR

1. ISF, 2019. Detection of infectious Tomato brown rugose fruit virüs (ToBRFV) in tomato and pepper seed. Version 2019.
2. ISF, 2020. Detection of Tomato brown rugose fruit virüs (ToBRFV) in tomato and pepper seed by SE-qPCR.
3. EPPO, 2022. PM 7/146 (2) Tomato brown rugose fruit virus; ToBRFV. EPPO Bulletin, 52; 665/692.
4. EPPO, 2021. STANDARD- DIAGNOSTICS PM 7/98 (5). Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. EPPO Bulletin, 51; 468-498.
5. Eupresco Project, 2021. Validation of molecular tests for the detection of tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in seed of tomato and pepper.

**1. AMAÇ:**

Uluslararası Tohum Federasyonu'nun (International Seed Federation; ISF) "Domates ve Biber Tohumlarında Bulaşıcı Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) Tespiti (2020)" ve Avrupa ve Akdeniz Bitki Koruma Organizasyonu'nun (European and Mediterranean Plant Protection Organization; EPPO) "PM 7/146 (2) Tomato brown rugose fruit virus; ToBRFV (2022)" teşhis standartlarına göre domates ve biber bitkilerinde tohum, bitki kısımları (yaprak, çanak yaprak) ve meyve materyalinde ToBRFV'nin tespitine yönelik: RNA izolasyonu aşaması öncesi örnekleme miktarı ve hazırlama şekli, RNA izolasyonu, elde edilen total RNA'nın kullanılarak yapılan Real-time RT-PCR metodu, kullanılan kimyasallar, Real Time RT-PCR bileşimi ve metot protokolünün açıklanması amaçlanmaktadır.

**2. KAPSAM:**

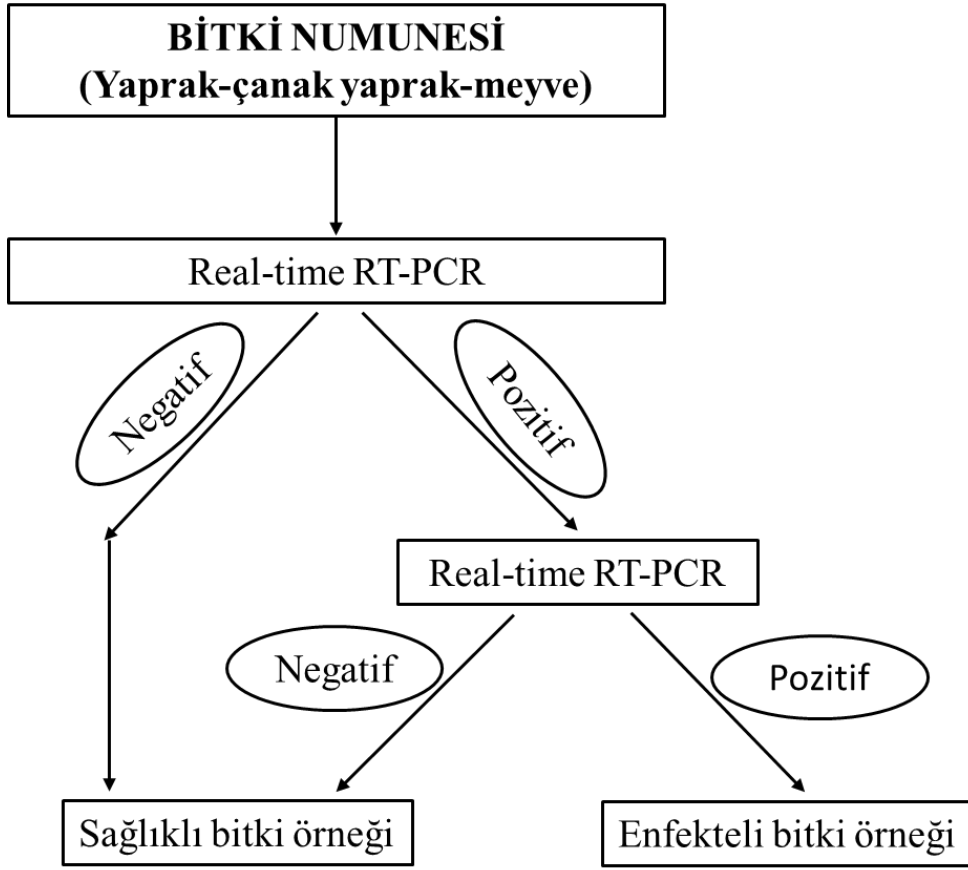
Bu metot talimatı Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne gelen domates ve biber bitkilerinin bitki kısımları (yaprak, çanak yaprak ve meyve) ile tohum numunelerinden, Tomato brown rugose fruit virus (*Tobamovirus fructirugosum*; ToBRFV) etmeninin tespitine yönelik numune kabul birimine teslim edilen örneklerin: Analiz süreci, örnekleme miktarı/şekilleri, izolasyon öncesi aşamaları, total RNA izolasyonu, Real-time RT-PCR aşamasında kullanılacak kimyasallar, Real-time RT-PCR bileşimi ve metot protokolleri dahil olmak üzere tüm aşamaları kapsamaktadır.

**3. ANALİZ PRENSİBİ VE YÖNTEM SÜRECİ:**

ToBRFV etmeninin tespitinde, tekrarlanabilirliğin ve seçiciliğin, serolojik yöntemler ve konvansiyonel RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) yöntemine göre yüksek olması ve daha kısa bir zamanda sonuç alınabilmesi nedeniyle Real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (Real-Time RT-PCR) metodu kullanılmaktadır (Euphresco Project, 2021).

Yapılan Real-Time RT-PCR analizleri ile domates ve biber tohumları, bitki kısımları (yaprak, çanak yaprak) ve meyve materyalinde ToBRFV etmeninin tespiti amaçlanmaktadır. Real-Time RT-PCR analizi sonucunda virüs tespit edilemediğinde numune serisinde ToBRFV bulunmadığı kabul edilmektedir.

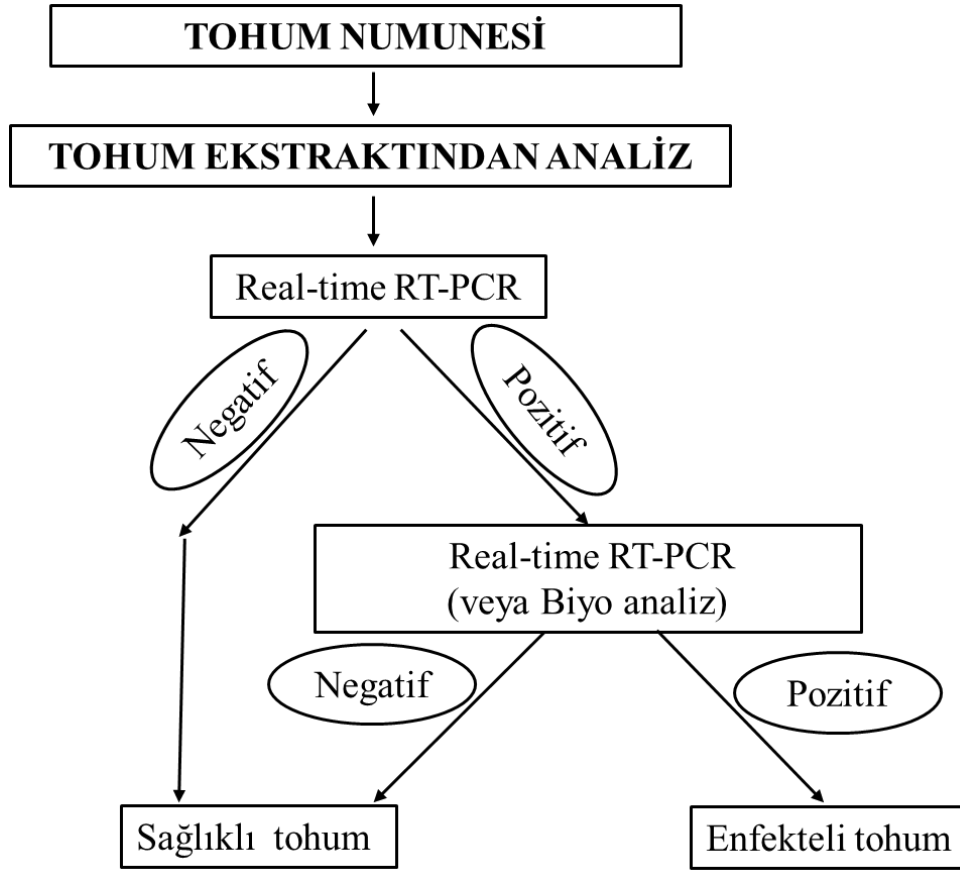
Domates ve biber bitki (yaprak, çanak yaprak ve meyve) numunelerinden ToBRFV teşhisinde kullanılan Real-Time RT-PCR analizinin işlem aşaması aşağıda verilmiştir (Şekil 1).



**Şekil 1.** Domates ve biber bitki kısımlarından (yaprak, çanak yaprak ve meyve) oluşan numunelerde ToBRFV tespiti için analiz sürecini açıklayan akış şeması.

**EPPO 2022'ye göre domates ve biber tohumlarında ToBRFV'nin tespitinde Real Time RT-PCR yönteminin kullanılması ve analiz sonucunda ToBRFV ile enfekteli olduğu belirlenen tohum numunelerinin, farklı bir tanılama testi kullanılarak doğrulanması önerilmektedir (EPPO 2022 Ekler: 4, 5 ve 7). Bu amaçla EPPO 2022 PM 7/146 (2)'de önerilen farklı primer/problar seçilerek Real-Time RT-PCR testi uygulanmalıdır.**

Domates ve biber tohum numunelerinden ToBRFV teşhisinde kullanılan Real-Time RT-PCR analizinin işlem aşaması aşağıda verilmiştir (Şekil 2).



**Şekil 2.** Domates ve biber tohum numunelerinden (tohum ekstraktlarından) ToBRFV tespiti için analiz sürecini açıklayan akış şeması.

#### 4. TANIMLAR ve KISALTMALAR

bç: Baz çifti

EPPO: European and Mediterranean Plant Protection Organization

DTT: Dithiothreitol

Fw: Forward primer

IC: İnhibisyon Kontrol

IPC: Internal Pozitif Kontrol

ISHI: International Seed Health Initiative

ISHI-Veg: ISHI for Vegetable crops

ISF: International Seed Federation

$\mu$ L: mikrolitre

$\mu$ M: mikromolar

mL: mililitre

NaOCl: Sodyum Hipoklorit

NIC: Negatif İzolasyon Kontrol

NTC: Negatif Template Kontrol

ng: nanogram

PAC: Pozitif Amplifikasyon Kontrolü

PBS: Phosphate Buffer Salin

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

PEC: Pozitif Ekstraksiyon Kontrol

PIC: Pozitif İzolasyon Kontrolü

Pr: Prob

qPCR: Real-Time PCR

rpm: revolutions per minute (devir sayısı)

RNA: Ribonükleik asit

Rv: Reverse primer

RT-PCR: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Real-time RT-PCR: Real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

SDS: Sodium dodecyl sulfate

SE-qPCR: Tohum ekstaktı ile yapılan qPCR

ToBRFV: *Tomato brown rugose fruit virus*

w/v: ağırlık/hacim (hacimdeki ağırlık)

## 5. GÜVENLİK ve SAĞLIK UYARILARI

- a. Laboratuvarda yapılan tüm çalışmalar sırasında mutlaka eldiven kullanılmalıdır. Özellikle numunelere direkt temas durumunda, her numune geçişinde eldiven değiştirilmesi önemlidir.
- b. Çalışmada insan sağlığına zararlı olabilecek kimyasal maddelerin ( $\beta$ -mercaptoethanol vb.) çeker ocak gibi güvenlik ekipmanları ile kullanılmalıdır.
- c. Çalışmalarda iş güvenliğini etkileyebilecek kimyasal ya da farklı malzemeler (sıvı azot) kullanılacak ise koruyucu ekipmanlar kullanılmalıdır.
- d. Laboratuvarda kullanılacak tüm sarf malzemeler steril olmalıdır.
- e. Çapraz kontaminasyon ve analizlerin doğruluğu açısından tüm çalışmalarda filtreli pipet uçları kullanılmalıdır. İzolasyon, PCR karışımı ve nükleik asit ilavelerinin yapıldığı bölümlerin tamamında farklı pipet setleri yer almalıdır.
- f. Mümkünse numune inceleme, izolasyon, PCR karışımı, nükleik asit ilavesi ve PCR analizlerinin yapıldığı bölümlerin her birinin bağımsız olması ve negatif basınç içermesi tercih edilmelidir.

## 6. ALET-EKİPMAN ve AKSESUARLAR

1. Biyogüvenlik kabini
2. Çeker ocak

3. Çözelti pH ölçümü için pH metre
4. Elektroforez tankı ve güç kaynağı
5. Etüv
6. Ezme poşeti
7. Güvenlik ekipmanları (Koruyucu tulum, ısı geçirmez eldiven, gözlük vb.)
8. Hassas terazi
9. Isıtıcı manyetik karıştırıcı
10. İklimlendirme kabini
11. Jel görüntüleme sistemi
12. Kuru blok ısıtıcı
13. Laboratuvar temel sarf malzemeleri (erlenmayer, mezür, beher, tartım kabı, pipet, şişe vb.)
14. Makro-Mikro pipetler (0.1-1000 µL, 1-10 mL)
15. Masa üstü santrifüj
16. Mikrodalga fırın
17. Mikrosantrifüj tüpleri (0.2-1.5-2.0-15-50 mL)
18. Mini santrifüj
19. Otoklav
20. Otomatik homojenizatör
21. Otomatik mikropipet setleri
22. PCR çalışma kabini (Laminar-flow)
23. Real-Time PCR cihazı
24. Soğutucu ve dondurucu dolaplar (+4 °C, -20 °C ve -80 °C)
25. Tek kullanımlık, filtreli, nükleaz içermeyen pipet uçları.
26. Thermalcycler
27. Vorteks

## **7. MOLEKÜLER YÖNTEMLER İÇİN NUMUNE HAZIRLAMA (RNA İzolasyonu Öncesi İşlem Prosedürü)**

### **7.1. Numune Hazırlama Öncesi Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar**

- Domates ve biber bitki kısımları (yaprak, çanak yaprak ve meyve) ile tohumlardan RNA izolasyonu işlemlerine başlamadan önce, çalışma yapılacak tezgâh %70 etanol veya sodyum hipoklorit (NaOCl) kullanılarak dezenfekte edilmelidir.
- Numunelerde yüksek konsantrasyonda virüs bulunabileceğinden numuneler işlenirken dikkatli olunmalıdır. Numunelere hiçbir zaman çıplak el ile dokunulmamalı ve her bir numunede mutlaka eldiven değiştirilmelidir.



- Ekstrakte edilen RNA, kısa süreli saklama (<8 saat) için buzdolabında +4 C'de, -20 °C'de (<1 ay) veya daha uzun süreler için -80 °C'de saklanmalıdır.

## 7.2. Numune Hazırlama İçin Alet-Ekipman ve Aksesuarlar

1. Ezme poşeti
2. Öğütme cihazı/ el homojenizatörü
3. Standart masa üstü mikrosantrifüj
4. Mikropipetler
5. Steril, tek kullanımlık, filtrelili, nükleaz içermeyen, aerosole dayanıklı pipet uçları
6. Süpernatant ve kimyasal hazırlıklar için steril reaksiyon (mikrosantrifüj) tüpleri
7. Tampon çözelti hazırlıklarında kimyasal tartımları için hassas terazi
8. Tampon çözelti hazırlıkları için tartım kabı ve ölçü silindirleri
9. Tampon çözelti hazırlıkları için steril şişeler
10. Çözelti pH ölçümü için pH metre

## 7.3. Numune Hazırlama İçin Kullanılan Kimyasal Maddeler

Domates ve biber tohumlarının homojenizasyonu aşamasında Çizelge 1 ve Çizelge 2'de belirtilen homojenizasyon tamponları kullanılmaktadır.

**Çizelge 1.** Fosfat Tamponlu Salin (PBS) çözeltisi içeriği  
(Fosfat Tamponlu Salin (PBS) - litre başına pH 7,2 - 7,4)

Kimyasal Adı	Hacim
Sodyum klorür (NaCl)	8.0 g
Disodyum hidrojen fosfat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.15 g
Potasyum dihidrojen fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.2 g

1 litreye kadar distile su eklenir, pH ayarlanır ve tampon çözelti 121 °C, 15 psi'de 15 dakika boyunca otoklavlanır.

**Çizelge 2.** GH+ tampon çözeltisi içeriği

Kimyasal Adı	Hacim	Son konsantrasyon
Guanidin hidroklorür	573.18 g	6 M
Sodyum asetat (4 M, pH 5.2)	50 mL	0.2 M
EDTA Na <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	9.3 g	25 mM
PVP-10	25.0 g	2.5% w/v
Distile su	1.0 L	

## 7.4. Domates ve Biber Tohum Numunelerinin Hazırlanması

### 7.4.1. Örnek Hazırlanması

Öğütme ve tohumlardan RNA ekstraksiyonu dahil olmak üzere örnek hazırlama zor olabilir. Tutarlı sonuçlar elde etmek ve istenirse enfeksiyon seviyesini yani alt örneklerin sonuçlarını belirlemek

amacıyla alt örnekleme yapılır (ISTA, 2021). Yanlış negatif sonuç alma olasılığının daha yüksek olduğu seviyelerde, daha fazla alt örnek test edilmesi önerilmektedir (ISTA, 2021).

#### 7.4.2. Örneklerin Homojenizasyonu

Domates ve biber tohumlarının homojenizasyonu aşamasında farklı homojenizasyon tamponları kullanılarak gerçekleştirilen iki prosedür tanımlanmıştır (EPPO,2022). Farklı alternatif yöntemler mevcut olup, analizi yapan laboratuvar bu yöntemlerden birini kullanabilir.

##### a. PBS Tampon Çözeltisi ile Homojenizasyon

- Domates ve biber için 250 adet tohumdan oluşan 12 alt örnek hazırlanır.
- Alt numunelere 10 mL (domates için) ve 20 mL (biber için) 0,1 M fosfat tamponu ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,2) (Çizelge 1) eklenerek gece boyunca yaklaşık 4°C'de inkübe edilir.
- İnkübasyon sonrasında örnekler bir homojenizatör ile öğütülür.
- Örnekler, 4 °C'de 10.000 g 'de 10 dakika santrifüj edilir ve süpernatant (üstte kalan sıvı kısım) RNA izolasyonu için kullanılabilir.
- Kullanılacak RNA izolasyon yönteminin prosedürü doğrultusunda RNA izolasyon işlemi için her örnekten süpernatant alınır (İzolasyon yöntemleri bölümünde her izolasyon yöntemi için alınması gerekli olan miktar net olarak ilgili bölümde açıklanmıştır).

##### b. GH+ Tampon Çözeltisi ile Homojenizasyon

- Domates ve biber için 1000 adet tohumdan oluşan 3 alt örnek hazırlanır.
- Örnekler üzerine domates tohum örnekleri için 20 mL GH+ tamponu ve biber tohum örnekleri için 40 mL GH+ tamponu (Çizelge 2) eklenir ve 30-60 dakika oda sıcaklığında bekletilir.
- Oda sıcaklığında bekletildikten sonra domates örnekleri 90 saniye biber örnekleri 4 dakika homojenizasyona tabi tutulur.
- Alternatif olarak, kuru tohumlar otomatik homojenizatör ile öğütülür.

##### c. Kuru Tohumların GH+ Tamponu İle Homojenizasyonu

- Kuru tohumlar otomatik homojenizatör ile öğütülür.
- Üç alt örnek 1000 adet domates veya altı alt örnek 500 adet biber tohumu 50 mL'lik bir tüpe aktarılır ve bir çelik bıçak (14 mm) eklenir.
- Tohumlar tüpler yukarı bakacak şekilde 1.700 rpm'de domates tohumları için 4 dakika ve biber tohumları için 7 dakika öğütülür.
- Öğütme işleminden sonra domates tohum örnekleri için 20 mL GH+ tamponu ve biber tohum örnekleri için 40 mL GH+ tamponu (Çizelge 2) eklenir. Homojen çözeltiler elde etmek için tüpler elle çalkalanır.
- Biber için, ileri işlemlerden önce, aynı numunedan üç alt numune yapmak için, üç kez iki homojenat birleştirilir.

- Her bir alt numune için 1 mL tohum homojenatı 1.5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılır ve 30 µL dithiothreitol-DTT (5 M) eklenir.
- Ardından 15 dakika boyunca 850 rpm ve 65 °C'de bir çalkalayıcıda inkübe edilir. 16.000 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra kullanılacak olan RNA izolasyon yönteminin prosedürüne göre süpernatant alınır ve RNA izolasyon işlemi başlatılır.

## 7.5. Domates ve Biber Bitki Materyalinden (bitki kısımları ve meyveler) Numune Hazırlanması

### 7.5.1. Örneklem Hazırlanması

- Domates yaprakçıkları veya çanak yaprakları, biber yaprakları veya meyvelerden oluşan numuneler için örneklem her bitkiden eşit miktarda içermelidir. Bunun için;
- Yaprak materyalinde; yaprakları istifleyerek ve tek kullanımlık 4 mm yaprak zımbası kullanarak yaprak diskleri hazırlayarak veya üst kısımları keserek veya yırtarak örneklem gerçekleştirilebilir.
- Domates ve biber meyve örneklerinde; her meyvenin en az üç farklı yerinden küçük bir kabuk parçası ve bitişik doku örneklenmelidir.

### 7.5.2. Örneklerin Homojenizasyonu

- Birleştirilmiş örnekler için genellikle daha büyük miktarlarda bitki materyali söz konusudur. Bu gibi durumlarda homojenizasyon için PBS tamponu (Çizelge 1), GH+ tamponu (Çizelge 2) ve ELISA tamponu gibi tamponlar kullanılabilir.
- Bitki dokusu PBS (Çizelge 1) ile yapraklar için 1:10 w/v ve meyveler için 1:20 w/v aralığında öğütülür. GH+tamponu kullanılacaksa bitki dokusu bir ekstraksiyon torbasına konur ve GH+ tamponu (aralık 1:2-1:5 [w/v]) içinde homojenize edilir.
- Kullanılacak RNA izolasyon yönteminin prosedürü doğrultusunda RNA izolasyon işlemi için her örnekten süpernatant alınır (İzolasyon yöntemleri bölümünde her izolasyon yöntemi için alınması gerekli olan miktar net olarak ilgili bölümde açıklanmıştır).

## 8. RNA İZOLASYONU

RNA izolasyonu için aşağıda belirtilen yöntem ve/veya ticari RNA ekstraksiyon kitleri, firmanın önerdiği protokol doğrultusunda kullanılabilir.

### 1. Silika Jel Metodu (Foissac ve ark., 2001)

Metot için kullanılan tampon solüsyonların tamamı **EK-1**'de verilmiştir.

- a. Mikrosantrifüj tüp içerisine 1mL bitki özütü ve 1mL ekstraksiyon tamponu (Grinding Buffer) ilave edilerek karıştırılır.

- b. Bir önceki aşamada elde edilen karışımdan 0.5 mL önceden hazırlanmış steril mikrosantrifüj tüp içine aktarılır ve üzerine 5 µL 2-Mercaptoethanol ve 100 µL %10 SDS ilave edilir. Daha sonra tüpler vorteks ile iyice karıştırılır.
- c. Tüpler zaman zaman sallanmak kaydı ile 10 dakika 70 °C'de inkübasyona bırakılır ve ardından 5 dakika buz içerisinde bekletilir.
- d. Buz içerisinden çıkarılan tüpler, 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Tüpün üstünde kalan 300 µL lik sıvı (süpernatant) yeni bir tüpe alınarak üzerine 150 µL etanol (% 99.9), 35 µL silika jel ve 300 µL sodyum iodin ilave edilir.
- e. Bir önceki aşamada elde edilen karışım, çalkalayıcı platform (shaker) üzerinde 10 dakika oda ısısında inkübasyona bırakılır.
- f. Çalkalayıcı platformdan alınan tüpler 6.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılır ve 500 µL yıkama tamponu ilave edilir. Tüpler iyice vorteksenerek karıştırıldıktan sonra 6.000 rpm' de santrifüj edilir. Yıkama işlemi 1 kez daha tekrarlanır.
- g. Üst sıvı atıldıktan sonra tüplerin içinde alkol kalmayacak şekilde iyice kurumaya bırakılır (yaklaşık 30 dakika) ve daha sonrasında 75 µL nükleaz içermeyen su ilave edilip vorteksenerek pelet iyice çözdürülür. Tüpler daha sonra 70 °C 'de 4 dakika inkübe edilir.
- h. İnkübasyon işleminin ardından tüpler 3 dakika 14.000 rpm'de santrifüj edilir ve sonunda oluşan üst sıvı yeni bir tüpe aktarılarak total RNA elde edilmiş olur.
- i. Elde edilen total RNA'lar kullanılıncaya kadar kısa süreli -20°C'de muhafaza edilecektir.

2. "MN NucleoSpin RNA Plant" Kiti (Machery-Nagel, Catalog number: 740949.50)
3. GNM™ Total RNA Mini Kit (Plant) (Catalog number: R10-202 050)
4. THERMO SCIENTIFIC GeneJET Plant RNA Pürifikasyon Kiti (Catalog number: K0801)
5. NORGEN Plant/Fungi Total RNA Pürifikasyon Kiti (Catalog number: K0801:25850)
6. MagNa Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit ( Catalog number: 07 290 519 001)
7. High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Catalog number: 11858874001)

## 9. REAL-TIME RT-PCR METODU

### 9.1. Real-Time RT-PCR Tanımı

ISF-ISHI-Veg (ISF, 2020) temelli bu tek aşamalı dubleks/tripleks Real-time RT-PCR protokolü domates ve biber bitkisinin tohum, yaprak, çanak yaprak ve meyve materyalinde ToBRFV'nin tespiti ve tanımlanması için kullanılmıştır. Primer ve prob konsantrasyonları orijinal protokole kıyasla değiştirilmiştir. Test, CSP Labs (ABD) tarafından geliştirilen CSP1325 primerleri ve probu birlikte Enza Zaden BV (NL) tarafından geliştirilen CaTa28 primerleri ve probuna dayanmaktadır.

CaTa28 primerlerinin hedef dizisi hareket proteini geni içinde yer almaktadır; NC\_028478.1 numaralı GenBank erişiminin nükleotid dizisi kullanılarak, ileri ve geri primerler sırasıyla 5163 ve 5283 pozisyonlarında başlar ve prob 5191-5211 pozisyonlarını kapsar. CSP1325 primerlerinin hedef dizisi, kaplama proteini geninin sonunda bulunur; GenBank erişim no NC\_028478.1'in nükleotid dizisi kullanılarak, ileri ve geri primerler sırasıyla 6144 ve 6223 pozisyonlarında başlar ve prob 6169-6195 pozisyonlarını kapsamaktadır.

## 9.2. Real-Time RT-PCR Primerleri, Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışı

Tek aşamalı dubleks/tripleks Real-time RT-PCR protokolü, domates ve biber tohumlarında ToBRFV'nin tespiti ve tanınması için geliştirilmiş olup aynı zamanda yaprak/meyve materyali için de kullanılabilir. Analiz, Enza Zaden BV (The Netherlands) tarafından geliştirilen CaTa28 primer-probu ile CSP Labs (ABD) tarafından geliştirilen CSP1325 primer-prob kombinasyonuna dayanmaktadır. Bu analiz, dahili pozitif kontrol olarak Naktuinbouw (NL) tarafından geliştirilen Bacopa chlorosis virus (BaCV) primer ve probunu da içermektedir (Çizelge 3).

**Çizelge 3.** Domates ve biber bitkisinin yaprak, çanak yaprak, meyve ve tohumlarında ToBRFV'nin teşhisi için yapılan Real-time RT-PCR yönteminde kullanılan primer-prob dizileri

Primer adı	Sekans Dizisi (5' → 3')	Kaynak
<b>CaTa 28 Fw</b>	GGT GGT GTC AGT GTC TGT TT	
<b>CaTa 28 Rv</b>	GCG TCC TTG GTA GTG ATG TT	Enza Zaden B.V. Netherlands
<b>CaTa28 Pr</b>	6FAM-AGA GAA TGG AGA GAG CGG ACG AGG-BHQ1	
<b>CSP1325 Fw</b>	CAT TTG AAA GTG CAT CCG GTT T	
<b>CSP1325 Rv</b>	GTA CCA CGT GTG TTT GCA GAC A	CSP Labs USA
<b>CSP1325 Pr</b>	VIC – ATG GTC CTC TGC ACC TGC ATC TTG AGA -BHQ1	
<b>BaCV-Fw</b>	CGA TGG GAA TTC ACT TTC GT	
<b>BaCV-Rv</b>	AAT CCA CAT CGC ACA CAA GA	Naktuinbouw Netherlands
<b>BaCV-Pr</b>	TxR- CAA TCC TCA CAT GAT GAG ATG CCG - BHQ2	

BaCV'in reaksiyonda harici pozitif kontrollere (PIC ve PAC) alternatif veya ek olarak kullanılan bir IPC olduğu unutulmamalıdır. Bu nedenle 2 farklı Real-time RT-PCR karışımı alternatifli olarak kullanılabilir. İlk reaksiyon karışımı sadece CaTa28 ve CSP1325 primerleri ile domates ve biber bitkisinin yaprak, çanak yaprak ve meyvesinden ToBRFV'nin tespitinde kullanılan Real-time RT-PCR bileşenlerini içermektedir (Çizelge 4). İkinci reaksiyon karışımı CaTa28, CSP1325 ve BaCV primerleri ile domates ve biber bitkisinin tohum ekstraktından ToBRFV'nin tespitinde kullanılan Real-

time RT-PCR bileşenlerini içermektedir (Çizelge 5). Reaksiyon karışımında LightCycler® Multiplex RNA Virus Master (Roche, 7083173001) kullanılmıştır.

### 9.3. Real-Time RT-PCR Analizinde Kullanılan Kontroller

Güvenilir bir test sonucu elde edilebilmesi için hedef organizmanın ve hedef nükleik asidin, her bir nükleik asit ekstraksiyonu ve amplifikasyon serisi için sırasıyla aşağıdaki kontroller analizlere dahil edilmelidir.

#### **Kontroller**

##### **Negatif İzolasyon Kontrolü (NIC):**

RNA izolasyonu esnasında ayrı bir örnek olarak izolasyona dahil edilen, ToBRFV'den ari olan bitki materyalidir. Ari materyalin bulunmadığı durumda ekstraksiyon buffer da kullanılabilir.

##### **Pozitif İzolasyon Kontrol (PIC):**

Domates ve biber bitki kısımları, meyve parçaları ve yaprak içeren numunelerde, ToBRFV çalışması için yapılan her RNA izolasyonu esnasında, numunelere ek olarak izolasyon aşamasında çalışmaya dahil edilen ToBRFV enfekteli bitki parçasıdır.

##### **Negatif Template Kontrol (NTC):**

Reaksiyon karışımının hazırlanması sırasında kontaminasyondan kaynaklanan yanlış pozitifleri ortadan kaldırmak için kullanılır. Tüm PCR reaktiflerini içeren ancak hedef veya spayk DNA, RNA veya Pozitif Ekstraksiyon Kontrol (PEC) nükleik asitleri içermeyen ve Real-time RT-PCR amplifikasyon esnasında kullanılan PCR grade su içeren örnektir.

##### **Pozitif Amplifikasyon Kontrol (PAC):**

Real-time RT-PCR amplifikasyon esnasında kullanılan ToBRFV pozitif olan sertifikalı izolat RNA'sı/fragmentidir.

##### **İnhibisyon Kontrol (IC):**

Tohum analizlerinde kullanılması gereken kontrollerden biridir. Enfekte olmamış tohumdan elde edilen ekstrakt içine, 28-32 Cq aralığına denk gelen, PEC bitki ekstraktının bulaştırılması ile elde edilir. Diğer tüm kontrol ve örneklerle birlikte RNA izolasyonu yapılır. Real-time RT-PCR aşamasında diğer örnekler ve analiz kontrolleri ile birlikte ayrı bir kuyucukta kontrol parametresi olarak yüklenir.

**Not:** PEC'in Cq değeri, tüm örneklerde IC'nin Cq değerinin 3 döngü aralığında olmalıdır. Bu olmaz ise ToBRFV kaybı yaşanmış veya amplifikasyon aşamasında inhibisyon olmuş olabilir. IC'nin Cq değeri 28-32 aralığında olmalıdır.

##### **Pozitif Ekstraksiyon Kontrol (PEC) (Internal amplifikasyon kontrol):**

Yalnızca tohum içeren ToBRFV çalışması için yapılan her RNA izolasyonu esnasında numuneye spayk solüsyon olarak eklenen *Bacopa chlorosis virus* (BaCV), *Dahlia latent viroid* (DLVd) veya *Squash mosaic virus* (SqMV) pozitif olduğu bilinen bitki ekstraktı. PEC, her bir numune için aynı zamanda İnternal Amplifikasyon Kontrol'dür.

### **PEC Hazırlanışı:**

Spayk solüsyonu, BaCV, DLVd veya SqMV ile enfekteli bir bitkiden alınan örneğin tohumlara uygun buffer içerisinde ezilmesi ile hazırlanır. Her laboratuvar spayk solüsyonunu 28-32 Cq aralığında sonuç verecek konsantrasyonda dilüe etmelidir. Solüsyon, kullanılabildiği kadar tüplere bölünür ve -80 °C'de saklanır.

## **9.4. Plate Yerleşim Düzeni**

### **9.4.1. Tohum Numunelerinde ToBRFV Tespiti için Örnek Plate Yerleşim Düzeni**

**Tohum numunelerinde ToBRFV tespiti için,** Real-time RT-PCR analizine alınacak 1 tohum numunesi örneği (3000 adet tohum) 3 alt paralellerinin 2 tekrarlı plate yerleşim planı örneği Şekil 3'de verilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T1.1	T1.2	T1.3									NIC
B	T1.1	T1.2	T1.3									NIC
C												
D												NTC
E												NTC
F												
G						IC*						
H	PAC	PAC	PIC	PIC		IC*						

**Şekil 3.** Tohum numunelerinde Real-time RT-PCR yöntemi ile ToBRFV analizi için, 1 tohum numunesinin (3000 adet tohum) 3 adet alt paralellerinin 2 tekrarlı örnek plate yerleşim planı.

**PAC:** Pozitif Amplifikasyon Kontrol (Real-time RT-PCR amplifikasyon esnasında kullanılan ToBRFV pozitif sertifikalı materyal örneği).

**PIC:** Pozitif İzolasyon Kontrol (Domates ve biber tohumları, bitki kısımları, meyve parçaları ve yaprak içeren, ToBRFV çalışması için yapılan her RNA izolasyonu esnasında, numunelere ek olarak izolasyon aşamasında çalışmaya dahil edilen ToBRFV enfekteli bitki parçası).

**NIC:** Negatif İzolasyon Kontrol (RNA izolasyonu esnasında ayrı bir örnek olarak izolasyona dahil edilen, ToBRFV'den ari olan bitki materyalidir. Ari materyalin bulunmadığı durumda ekstraksiyon buffer da kullanılabilir).

**NTC:** Negatif Template Kontrol (Tüm PCR reaktiflerini içeren ancak hedef veya spayk DNA, RNA veya PEC nükleik asitleri içermeyen ve Real-time RT-PCR amplifikasyon esnasında kullanılan PCR grade su içeren örnek).

**T1.1 T1.2 T1.3:** Analize alınacak 1 tohum numunesine ait (3000 adet tohum) 3 adet alt paralelleri ve tekrarı.

**IC\*:** Tohum analizlerinde harici pozitif kontrollere (PIC ve PAC) ek olarak olarak, her bir numuneyi ayrı ayrı izlemek için plate düzenine **Internal Kontrol (IC)** eklenir. IC, enfekte olmamış tohumdan elde edilen ekstrakt içindeki PEC dilüsyonudur.

#### 9.4.2. Bitki Kısımlarından (yaprak, çanak yaprak ve meyve) ToBRFV Tespiti için Örnek Plate Yerleşim Düzeni

**Bitki kısımlarından (yaprak, çanak yaprak ve meyve) ToBRFV tespiti için** Real-time RT-PCR analizine alınacak bitki kısımlarına (yaprak, çanak yaprak ve meyve) ait her bir numunenin 2 tekrarlı örnek plate yerleşim planı Şekil 4'te verilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BK.1	BK.2	BK.3									NIC
B	BK.1	BK.2	BK.3									NIC
C												
D												NTC
E												NTC
F												
G												
H	PAC	PAC	PIC	PIC								

**Şekil 4.** Bitki kısımlarından (yaprak, çanak yaprak ve meyve) Real-time RT-PCR yöntemi ile ToBRFV analizi için, her bir numunenin 2 tekrarlı örnek plate yerleşim planı.

**PAC:** Pozitif Amplifikasyon Kontrol (Real-time RT-PCR amplifikasyon esnasında kullanılan ToBRFV pozitif sertifikalı materyal örneği).

**PIC:** Pozitif İzolasyon Kontrol (domates ve biber bitki kısımları, meyve parçaları ve yaprak içeren, ToBRFV çalışması için yapılan her RNA izolasyonu esnasında, numunelere ek olarak izolasyon aşamasında çalışmaya dahil edilen ToBRFV enfekteli bitki parçası).

**NIC:** Negatif İzolasyon Kontrol (RNA izolasyonu esnasında ayrı bir örnek olarak izolasyona dahil edilen, ToBRFV'den arı olan bitki materyalidir. Arı materyalin bulunmadığı durumda ekstraksiyon buffer da kullanılabilir).

**NTC:** Negatif Template Kontrol (tüm PCR reaktiflerini içeren ancak hedef veya spayk DNA, RNA veya PEC nükleik asitleri içermeyen ve Real-time RT-PCR amplifikasyon esnasında kullanılan PCR grade su içeren örnek).



**Bitki kısımları 1 (BK.1):** Analize alınacak bitki kısımlarından (yaprak, çanak yaprak ve meyve) oluşan 1 adet numune (1 numaralı numune) ve tekerrürü.

**Bitki kısımları 2 (BK.2):** Analize alınacak bitki kısımlarından (yaprak, çanak yaprak ve meyve) oluşan 1 adet numune (2 numaralı numune) ve tekerrürü.

**Bitki kısımları 3 (BK.3):** Analize alınacak bitki kısımlarından (yaprak, çanak yaprak ve meyve) oluşan 1 adet numune (3 numaralı numune) ve tekerrürü.

## 9.5. Metodun Uygulanışı

### 9.5.1. Domates ve Biber Bitkilerinin Yaprak, Çanak Yaprak ve Meyvesinden ToBRFV'nin Tespiti:

Domates ve biber bitkilerinin yaprak, çanak yaprak ve meyvesinden ToBRFV'nin tespiti için tek aşamalı dubleks Real-time RT-PCR metodu kullanılmaktadır. Analizde RealTime ready RNA Virus Master Mix kullanılmakta ve LightCycler 480 termal cyler cihazı ile test yapılmaktadır. Real-time RT-PCR Master mix protokolüne göre her bir reaksiyon için kullanılan PCR bileşenleri Çizelge 4'te verilmiştir.

**Çizelge 4.** Domates ve biber bitkisinin yaprak, çanak yaprak ve meyvesinden ToBRFV'nin tespitinde kullanılan Real-time RT-PCR bileşenleri

PCR reaksiyon bileşenleri	Çalışma konsantrasyonu	Reaksiyon başına hacim (µL)	Son konsantrasyon
Su (PCR grade water)		9	
RealTime ready RNA Virus Master Mix (Roche Life Science)	5×	4	1×
CaTa28 Fw	10 µM	0.30	0.15 µM
CaTa28 Rv	10 µM	0.30	0.15 µM
CaTa28 Pr	10 µM	0.20	0.10 µM
CSP1325 Fw	10 µM	0.30	0.15 µM
CSP1325 Rv	10 µM	0.30	0.15 µM
CSP1325 Pr	10 µM	0.20	0.10 µM
Enzyme blend	50x	0,4	1×
<b>Ara toplam</b>		<b>15.00</b>	
<b>RNA</b>		<b>5.00</b>	
<b>Toplam</b>		<b>20.00</b>	

### 9.5.2. Domates ve Biber Bitkilerinin Tohumlarından ToBRFV'nin Tespiti:

Domates ve biber bitkilerinin tohumlarından (tohum ekstraktı) ToBRFV'nin tespiti için tek aşamalı tripleks (CaTa28, CSP1325 ve BaCV primer prob setleri kullanılmaktadır) Real-time RT-PCR metodu kullanılmaktadır. Analizde RealTime ready RNA Virus Master Mix kullanılmakta ve LightCycler 480

termal cycler cihazı ile test yapılmaktadır. Real-time RT-PCR Master mix protokolüne göre her bir reaksiyon için kullanılan PCR bileşenleri Çizelge 5'te verilmiştir.

Söz konusu tek aşamalı dubleks (veya BaCV kullanıldığında tripleks) Real-time RT-PCR protokolü, domates ve biber tohumlarında ToBRFV'nin tespiti ve tanınması için kullanılmaktadır, ayrıca yapraklar veya çanak yapraklar için de kullanılabilir.

**Çizelge 5.** Domates ve biber bitkisinin tohum ekstraktından ToBRFV'nin tespitinde kullanılan Real-time RT-PCR bileşenleri

PCR reaksiyon bileşenleri	Çalışma konsantrasyonu	Reaksiyon başına hacim (µL)	Son konsantrasyon
Su (PCR grade water)		4,6	
RealTime ready RNA Virus Master Mix (Roche Life Science)	5×	4	1×
CaTa28 Fw	10 µM	0.75 µM	0.375
CaTa28 Rv	10 µM	0.75 µM	0.375
CaTa28 Pr	10 µM	0.50 µM	0.25
CSP1325 Fw	10 µM	0.75 µM	0.375
CSP1325 Rv	10 µM	0.75 µM	0.375
CSP1325 Pr	10 µM	0.50 µM	0.25
BaCV-F	10 µM	0.75 µM	0.375
BaCV-R	10 µM	0.75 µM	0.375
BaCV-P	10 µM	0.50 µM	0.25
Enzyme blend	50x	0,4	1×
<b>Ara toplam</b>		<b>15.00</b>	
<b>RNA</b>		<b>5.00</b>	
<b>Toplam</b>		<b>20.00</b>	

Tek aşamalı dubleks/tripleks Real-time RT-PCR protokolü Çizelge 6'da verilmiştir. Real-time RT-PCR analizi bir qPCR cihazında (ROCHE-LightCycler® 480) gerçekleştirilmiştir.

**Not:** Real-time RT-PCR parametreleri (Çizelge 4 ve 5) başka ticari TaqMan Real-time RT-PCR kiti kullanılırken ayarlanması gerekebilir. TaqMan Real-time RT-PCR uygulamalarına uygun herhangi bir PCR karışımı uygunluğu ve performansı laboratuvar içi validasyon çalışması ile gösterildiğinde kullanılabilir.

**Çizelge 6.** Real-time RT-PCR protokolü

Program	Cycle	Temperature °C	Time	Acquisition mode	Ramp rate (°C/s)
Reverse Transcription	1	50	8 dk	NONE	4.4
Initial Denaturation	1	95	30 sn	NONE	4.4
Amplification	40	95	1 sn	NONE	4.4
		60	20 sn	Single	2.2
		72	1 sn	NONE	4.4
Cooling	1	40	30 sn	-	1.0

**Not:** Dupleks ve tripleks analizlerde CaTa28 primer amplifikasyonunun değerlendirilmesi FAM kanalında; CSP1325 primer amplifikasyonunun değerlendirilmesi VIC/HEX kanalında; BaCV primer amplifikasyonunun değerlendirilmesi Cyc5 kanalında gerçekleştirilir.

### 9.5.3. Real-Time RT-PCR Aşamaları

1. Derin dondurucudan master miks içeriği (enzim hariç) primer ve probler çıkartılır, erimeye bırakılır. Erime tamamlandıktan sonra tüpler kısa süreyle santrifüj edilir.
2. Real Time RT-PCR reaksiyon karışımı, bir mikrosantrifüj tüp (ependorf tüp vb.) içerisinde, bitki kısımlarından oluşan numune için Çizelge 4, tohum numunesi ise Çizelge 5'teki sırayla, numune sayısından bir fazla olacak şekilde, pipetleme hatası dikkate alınarak biyogüvenlik kabini içinde hazırlanır.

**Not:** Real Time RT-PCR reaksiyon karışımı hazırlanırken, her bir numunenin 2 tekrarlı çalışılacağı, negatif (NIC ve NTC) ve pozitif kontroller (PAC ve PIC) ile tohum numunesi için internal kontrol (IC) kullanılacağı dikkate alınmalıdır.

3. Karışım, plaka (plate) üzerindeki kuyucuklara veya strip kuyucuklarına 1X reaksiyon toplamı (15 µl) kadar her bir numune için 2 tekrarlı dağıtılır.
4. Her örnek RNA'sından 5 µl olacak şekilde kuyucuklara eklenir (**Örnek RNA'ları, reaksiyon karışımı hazırlanan biyogüvenlik kabininden farklı bir biyogüvenlik kabini içerisinde eklenmelidir.**). Kuyucuklara negatif (NIC ve NTC) ve pozitif kontroller (PAC ve PIC) eklenir. Tohum numunesinde negatif ve pozitif kontrollere ek olarak IC de eklenir.
5. **Negatif kontroller (NIC ve NTC) kuyucuklara, pozitif kontrol (PAC ve PIC) eklenen kabinden farklı steril bir kabinde eklenir.**
6. RNA'lar eklendikten sonra plate'in üzeri 'seal' adı verilen özel şeffaf kaplayıcı ile strip tüpler ise strip kapağı ile kapatılır.
7. Plate ve/veya strip tüpler, 2 dakika süreyle 1000 rpm'de santrifüj edilir ve karışımın kuyucukların dibinde birikmesi sağlanır
8. Plate, real time cihazına yüklenir.
9. Çizelge 6'daki cihaz protokolü doğrultusunda Real-time RT-PCR analizi gerçekleştirilir.
10. Real time RT-PCR sonuçları, cihazın yazılımına göre değerlendirilir.

## 9.6. Real-Time RT-PCR Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Her bir fluorophore için arka plan floresansının hemen üstünde bir Cq (quantification cycle) eşik değeri belirlemek kullanıcının sorumluluğundadır. Sabit bir eşik değeri kontrol edilmeli ve gerekirse her testte arka plan floresansının hemen üzerinde kalacak şekilde değiştirilmelidir.

ToBRFV pozitif örnekler için, S şeklinde amplifikasyon eğrisi ile gösterilen eksponansiyel (üstel) amplifikasyon kontrol edilir.

Real-time RT-PCR analizi için negatif sonuç, örneğin ToBRFV içermediği anlamına gelir.

### 9.6.1. Real-Time RT-PCR Analiz Sonuçlarının Doğrulanması

Sonuçlar sadece;

- Pozitif amplifikasyon kontrolü (PAC) Cq 32 altında ( $Cq < 32$ ) eksponansiyel (üstel) bir amplifikasyon eğrisi verirse ve
- Negatif kontrol örneklerindeki Cq değerinin validasyon sırasında laboratuvar tarafından belirlenen bir kesme değerinin (cut off) üstünde olması durumunda geçerlidir.

IPC Cq değeri tüm örnekler için Cq değerinin 3 döngülük sınırında olmalıdır. Bu olmazsa, ToBRFV kaybı veya amplifikasyon sırasında inhibisyon olmuş olabilir. IC Cq değeri 28 ile 32 Cq arasında olmalıdır.

**Not:** ToBRFV için DNA bir PAC olarak kullanıldıysa, BaCV Cq değeri uygun reverse (ters) transkripsiyonun da bir kontrolüdür. Real-time RT-PCR hatası (karışım/program) ile inhibisyon arasında ayırım yapmak için BaCV PAC önerilmektedir.

### 9.6.2. Real-Time RT-PCR Analizinde Kontrollerin Doğrulanması

- NIC ve NTC negatif olmalıdır.
- PIC ve PAC (ve varsa IC) pozitif olmalıdır.

Bu koşullar karşılandığında:

- Bir test, eksponansiyel (üstel) bir amplifikasyon eğrisi üretiyorsa pozitif olarak kabul edilecektir.
- Bir amplifikasyon eğrisi üretmeyen veya üstel olmayan bir eğri üreten bir test negatif olarak kabul edilecektir.
- Çelişkili veya net olmayan sonuçlar elde edilirse testler tekrarlanmalıdır.

ISF-ISHI-Veg'de (2020) Ct/Cq 32'lik bir ön kesme (cut-off) değerinin belirtildiği unutulmamalıdır. Ct kesme değeri ekipman, malzeme ve kimyasala bağlı olduğundan, testi uygularken her laboratuvarında doğrulanması gerekmektedir.

ISF-ISHI-Veg zayıf çapraz reaksiyonlar (örn. bazı hedef dışı tobamovirüsler) için analizlerde Ct/Cq 32 olarak bir cut-off (pozitif veya negatif için belirlenen sınır değeri) değeri belirlemişlerdir. Bu değer ve üzerinde oluşan Ct/Cq değerlerini negatif olarak değerlendirmeye almışlardır. Bununla beraber çelişkili veya net olmayan sonuçlar elde edilirse testlerin tekrarlanmasını önermektedir. Standart bir

numunenin ISF-ISHI-Veg (2020)'ye göre LOD (Limit of Detection-Tespit Sınırı) için dilisyon serileri ile yapılan çalışmaları sonucunda yaklaşık  $10^{-7}$  değerine ulaşmışlardır.

### 9.6.3. Metodun Kullanım Kısıtlamaları

Bu metot muamele görmemiş tohumlar için uygundur. Aynı zamanda, mevcut herhangi bir kalıntının tahlili etkilememesi koşuluyla, dezenfeksiyon amacıyla fiziksel veya kimyasal işlemler kullanılarak işlenmiş tohumların test edilmesi için de uygundur. Herhangi bir antagonizm ve/veya inhibisyon olup olmadığının kontrolünün sağlanması analiz, örnek spayklama (yapay kirletme/kontaminasyon) veya deneysel karşılaştırma yapmak yoluyla kullanıcının sorumluluğundadır.

Metot, koruyucu kimyasallar veya biyolojik maddelerle muamele görmüş tohumlar için valide değildir. İşlenmiş tohum test edilirse, koruyucu kimyasalların veya biyolojik maddelerin yöntem sonuçlarına etkisinin olup olmadığının deneysel olarak (analiz, örnek spayklama veya deneysel karşılaştırma) belirlenmesinden kullanıcı sorumludur.

### 9.6.4. Cihaz Kontrolü

Real-time RT-PCR testinde kullanılan LightCyCler 480 cihazının yıllık bakımları/test performans çalışması yetkili kurumlar tarafından yapılmalıdır.

## 10. REAL-TIME RT-PCR METODU (ISF, 2020'den CaTa28, CSP1325 ve BaCV Primer-Prob Setleri Kullanılarak) SONUCUNDA ToBRFV İLE ENFEKTELİ BULUNAN TOHUM NUMUNELERİNDE DOĞRULAMA METODU (Real-Time RT-PCR Testi, Menzel & Winter, 2021; EPPO 2022)

ISF 2020'nin önerdiği CaTa28 ve CSP1325 primerleri ile yapılan dubleks/tripleks Real-time RT-PCR analizleri sonucunda ToBRFV ile enfekteli olduğu belirlenen domates ve biber tohum numunelerinde, ToBRFV'nin enfektif olup olmadığını doğrulamak için "Lokal Lezyon Analizi" istenmektedir. **Lokal lezyon analizini uygulama ve sonuç alma aşamaları çok uzun (45-60 gün) sürmektedir. Bu nedenle EPPO 2022 PM 7/146 (2)'de önerildiği gibi ToBRFV ile enfekteli bulunan domates ve biber tohum numunelerinin doğrulama analizi farklı primer prob setleri (EPPO 2022 Ekler:4, 5**

ve 7; Menzel, W. ve Winter, S. 2021) kullanılarak yapılmaktadır. Ayrıca ToBRFV için “Lokal Lezyon Analizi” metodu da bulunmaktadır.

EPPO 2022 PM 7/146 (2)’de yer alan Menzel, W. ve Winter, S. (2021)’ın önerdiği Real-time RT-PCR metodu aşağıda yer almaktadır.

### 10.1. Real-Time RT-PCR Tanımı

Tek aşamalı Real-time RT-PCR protokolü, domates ve biber yapraklarında, çanak yapraklarında, meyvelerinde ve tohumlarında ToBRFV'nin tespiti ve tanınması için uygundur. Test, Menzel ve Winter (2021) tarafından yayınlanan primerler ile proba dayanmaktadır. Primerler ve prob, kılıf protein geninin sonundan 3- NTR'nin ortasına (Genbank erişim no. NC\_028478 için pozisyon 6133-6228) kadar olan bir parçayı hedeflemektedir.

EPPO 2022’de domates ve biber tohumlarında ToBRFV’nin tespitinde Real-time RT-PCR yönteminin kullanılması (EPPO 2022 Ekler: 4, 5 ve 7) ve analiz sonucunda ToBRFV ile enfekteli olduğu belirlenen tohum numunelerinin, farklı bir tanılama testi (EPPO 2022 Ekler: 4, 5 ve 7) kullanılarak doğrulanması önerilmektedir.

Bu amaçla domates ve biber tohumlarında, CaTa28, CSP1325 ve BaCV primer problemleri kullanılarak yapılan tripleks Real-time RT-PCR analizi sonucunda ToBRFV ile enfekteli olduğu belirlenen numunelerin doğrulanması amacıyla Menzel ve Winter, 2021’de belirtilen ToBRFV qs1 ve ToBRFV qas2 primerleri ile ToBRFVp1 probu (Çizelge 7) kullanılmaktadır (EPPO 2022).

### 10.2. Real-Time RT-PCR Primerleri, Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışı

Domates ve biber tohumlarında ToBRFV’nin varlığının doğrulanması amacıyla RealTime ready RNA Virus Master Mix kullanılarak LightCycler 480 termal cycluser cihazı ile test yapılmaktadır.

Kullanılan ToBRFV qs1 ve ToBRFV qas2 primerleri ile ToBRFVp1 probu Çizelge 7’de verilmiştir (EPPO 2022).

**Çizelge 7.** ToBRFV ile enfekteli bulunan tohum numunelerinde doğrulama analizi için yapılan Real-time RT-PCR yönteminde kullanılan primer-prob dizileri

Primer adı	Sekans Dizisi (5' → 3')	Kaynak
ToBRFV qs1 Fw	CAA TCA GAG CAC ATT TGA AAG TGC A	(EPPO 2022; MENZEL ve WINTER, 2021)
ToBRFV qas2 Rv	CAG ACA CAA TCT GTT ATT TAA GCA TC	
ToBRFVp1 Prob	6FAM-ACA ATG GTC CTC TGC ACC TG-BHQ1	

### 10.3. Real-Time RT-PCR Analizinde Kullanılan Kontroller

Güvenilir bir test sonucu elde edilebilmesi için hedef organizmanın ve hedef nükleik asidin, her bir nükleik asit ekstraksiyonu ve amplifikasyon serisi için sırasıyla aşağıdaki kontroller analizlere dahil edilmelidir.

### **Kontroller**

#### **Negatif İzolasyon Kontrolü (NIC):**

RNA izolasyonu esnasında ayrı bir örnek olarak izolasyona dahil edilen, ToBRFV'den ari olan bitki materyalidir. Ari materyalin bulunmadığı durumda ekstraksiyon buffer da kullanılabilir.

#### **Pozitif İzolasyon Kontrol (PIC):**

Domates ve biber tohumları, bitki kısımları, meyve parçaları ve yaprak içeren numunelerde, ToBRFV çalışması için yapılan her RNA izolasyonu esnasında, numunelere ek olarak izolasyon aşamasında çalışmaya dahil edilen ToBRFV enfekteli bitki parçasıdır.

#### **Negatif Template Kontrol (NTC):**

Reaksiyon karışımının hazırlanması sırasında kontaminasyondan kaynaklanan yanlış pozitifleri ortadan kaldırmak için kullanılır. Tüm PCR reaktiflerini içeren ancak hedef veya spayk DNA, RNA veya PEC nükleik asitleri içermeyen ve Real-time RT-PCR amplifikasyon esnasında kullanılan PCR grade su içeren örnektir.

#### **Pozitif Amplifikasyon Kontrol (PAC):**

Real-time RT-PCR amplifikasyon esnasında kullanılan ToBRFV pozitif olan sertifikalı izolat RNA'sı/fragmentidir.

**Not: PIC'e alternatif veya ek olarak,** her bir bireysel örneği ayrı ayrı izlemek için dahili pozitif kontroller (Internal Control-IC) kullanılabilir. IC, tercihen nad5 (Botermans ve ark., 2013) gibi RNA hedeflerini çoğaltan korunan primerler kullanılarak matrisin endojen nükleik asidini içerebilir. Ancak, tohum örnekleri için nad5 tutarlı bir şekilde performans göstermeyebilir. Bu durumda, COX (örn. Weller ve ark., 2000 veya Papayiannis ve ark., 2011) IC olarak kullanılabilir. Alternatif olarak, Bacopa chlorosis virus (BaCV) ile enfekte olmuş bir bitkiden hazırlanan bir BaCV spaykı, RNA ekstraksiyonu sırasında eklenebilir (EPPO 2022, Ek 1). BaCV'ye özgü primerler ve proplar kullanılmalıdır. Bu metot talimatının 9. ve 9.5. başlıklarında ayrıntılı olarak yer almaktadır (EPPO 2022; ISF, 2020).

#### **İnhibisyon Kontrol (IC):**

Tohum analizlerinde kullanılması gereken kontrollerden biridir. Enfekte olmamış tohumdan elde edilen ekstrakt içine, 28-32 Cq aralığına denk gelen, PEC bitki ekstraktının bulaştırılması ile elde

edilir. Diğer tüm kontrol ve örneklerle birlikte RNA izolasyonu yapılır. Real-time RT-PCR aşamasında diğer örnekler ve analiz kontrolleri ile birlikte ayrı bir kuyucukta kontrol parametresi olarak yüklenir.

**Not:** PEC'in Cq değeri, tüm örneklerde IC'nin Cq değerinin 3 döngü aralığında olmalıdır. Bu olmaz ise ToBRFV kaybı yaşanmış veya amplifikasyon aşamasında inhibisyon olmuş olabilir. IC'nin Cq değeri 28-32 aralığında olmalıdır.

#### **Pozitif Ekstraksiyon Kontrol (PEC) (Internal amplifikasyon kontrol):**

Yalnızca tohum içeren ToBRFV çalışması için yapılan her RNA izolasyonu esnasında numuneye spayk solüsyon olarak eklenen *Bacopa chlorosis virus* (BaCV), *Dahlia latent viroid* (DLVd) veya *Squash mosaic virus* (SqMV) pozitif olduğu bilinen bitki ekstraktı. PEC, her bir numune için aynı zamanda Internal Amplifikasyon Kontrol'dür.

#### **PEC Hazırlanışı:**

Spayk solüsyonu, BaCV ile enfekteli bir bitkiden alınan örneğin tohumlara uygun buffer içerisinde ezilmesi ile hazırlanır. Her laboratuvar spayk solüsyonunu 28-32 Cq aralığında sonuç verecek konsantrasyonda dilüe etmelidir. Solüsyon, kullanılabildiği kadar tüplere bölünür ve /80 °C'de saklanır.

### **10.4. Plate Yerleşim Düzeni**

#### **10.4.1. Tohum Numunelerinde ToBRFV Tespiti için Örnek Plate Yerleşim Düzeni**

**Tohum numunelerinde ToBRFV tespiti için,** Real-time RT-PCR analizine alınacak 1 tohum numunesi örneği (3000 adet tohum) 3 alt paralelleri ile 2 tekrarlı plate yerleşim planı örneği Şekil 5'te verilmiştir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T1.1	T1.2	T1.3									NIC
B	T1.1	T1.2	T1.3									NIC
C												
D												NTC
E												NTC
F												
G						IC*						
H	PAC	PAC	PIC	PIC		IC*						

**Şekil 5.** Tohum numunelerinde Real-time RT-PCR yöntemi ile ToBRFV analizi için, 1 tohum numunesinin (3000 adet tohum) 3 adet alt paralellerinin 2 tekrarlı örnek plate yerleşim planı.



**PAC:** Pozitif Amplifikasyon Kontrol (Real-time RT-PCR amplifikasyon esnasında kullanılan ToBRFV pozitif sertifikalı materyal örneği).

**PIC:** Pozitif İzolasyon Kontrol (domates ve biber tohumları, bitki kısımları, meyve parçaları ve yaprak içeren ToBRFV çalışması için yapılan her RNA izolasyonu esnasında, numunelere ek olarak izolasyon aşamasında çalışmaya dahil edilen ToBRFV enfekteli bitki parçası).

**NIC:** Negatif İzolasyon Kontrol (RNA izolasyonu esnasında ayrı bir örnek olarak izolasyona dahil edilen, ToBRFV'den ari olan bitki materyalidir. Ari materyalin bulunmadığı durumda ekstraksiyon buffer da kullanılabilir).

**NTC:** Negatif Template Kontrol (tüm PCR reaktiflerini içeren ancak hedef veya spayk DNA, RNA veya PEC nükleik asitleri içermeyen ve Real-time RT-PCR amplifikasyon esnasında kullanılan PCR grade su içeren örnek).

**T1.1 T1.2 T1.3:** Analize alınacak 1 tohum numunesine ait (3000 adet tohum) 3 adet alt paralelleri ve tekrarı.

**Not\*:** Tohum analizlerinde PIC alternatif veya ek olarak, her bir numuneyi ayrı ayrı izlemek için plate düzenine **Internal Kontrol (IC)** eklenebilir. IC, enfekte olmamış tohumdan elde edilen ekstrakt içindeki PEC dilüsyonudur.

### 10.5. Metodun Uygulanışı

Domates ve biber bitkilerinin tohumlarından ToBRFV'nin varlığının doğrulanması için RealTime ready RNA Virus Master Mix kullanılarak LightCycler 480 termal cyclus cihazı ile test yapılmaktadır. Real-time RT-PCR Master mix protokolüne göre her bir reaksiyon için kullanılan PCR bileşenleri Çizelge 6'da verilmiştir.

Söz konusu tek aşamalı Real-time RT-PCR protokolü, domates ve biber tohumlarında ToBRFV'nin varlığının doğrulanması için kullanılmaktadır, ayrıca yapraklar veya çanak yapraklar için de kullanılabilir.

**Çizelge 8.** Domates ve biber bitkisinin tohumlarında ToBRFV'nin varlığının doğrulanmasında kullanılan Real-time RT-PCR bileşenleri

PCR reaksiyon bileşenleri	Çalışma konsantrasyonu	Reaksiyon başına hacim (µL)	Son konsantrasyon
Su (PCR grade water)		8,9	
RealTime ready RNA Virus Master Mix (Roche Life Science)	5×	4	1×
ToBRFV qs1	10 µM	0.6	0.03 µM
ToBRFV qas2	10 µM	0.6	0.03 µM
ToBRFV p1	10 µM	0.5	0.25 µM
Enzyme blend	50x	0,4	1×
<b>Ara toplam</b>		<b>15.00</b>	

<b>RNA</b>	5.00
<b>Toplam</b>	<b>20.00</b>

**Not:** Real-time RT-PCR parametreleri (Çizelge 8 ve 9) başka ticari TaqMan Real-time RT-PCR kiti kullanılırken ayarlanması gerekebilir. TaqMan Real-time RT-PCR uygulamalarına uygun herhangi bir PCR karışımı uygunluğu ve performansı laboratuvar içi validasyon çalışması ile gösterildiğinde kullanılabilir.

Tek aşamalı Real-time RT-PCR reaksiyon protokolü Çizelge 9’da verilmiştir. Real-time RT-PCR reaksiyonları qPCR cihazında (ROCHE-LightCycler® 480) gerçekleştirilmektedir.

**Çizelge 9.** Real-time RT-PCR protokolü

Program	Cycle	Temperature °C	Time	Acquisition mode	Ramp rate (°C/s)
<b>Reverse Transcription</b>	1	50	8 dk	NONE	4.4
<b>Initial Denaturation</b>	1	95	30 sn	NONE	4.4
		95	1 sn	NONE	4.4
<b>Amplification</b>	40	60	20 sn	Single	2.2
		72	1 sn	NONE	4.4
<b>Cooling</b>	1	40	30 sn	-	1.0

**Not:** Tek aşamalı Real-time RT-PCR analizlerde **ToBRFV qs1** ve **ToBRFV qas2** primer amplifikasyonunun değerlendirilmesi **FAM kanalında** gerçekleştirilir.

#### 10.5.1. Real-Time RT-PCR Aşamaları

1. Derin dondurucudan master miks içeriği (enzim hariç) primer ve probler çıkartılır, erimeye bırakılır. Erime tamamlandıktan sonra tüpler kısa süreyle santrifüj edilir.
2. Real-time RT-PCR reaksiyon karışımı, bir mikrosantrifüj tüp (eppendorf tüp vb.) içerisinde Çizelge 8’deki sırayla örnek sayısından bir fazla olacak şekilde, pipetleme hatası dikkate alınarak, biyogüvenlik kabini içinde hazırlanır.

**Not:** Real Time RT-PCR reaksiyon karışımı hazırlanırken, her bir numunenin 2 tekrarlı çalışılacağı, negatif (NIC ve NTC) ve pozitif kontroller (PAC ve PIC) kullanılacağı dikkate alınmalıdır.

3. Karışım, plaka (plate) üzerindeki kuyucuklara veya strip kuyucuklarına 1X reaksiyon toplamı (15 µl) kadar dağıtılır.

4. Her örnek RNA'dan 5 µl olacak şekilde kuyucuklara eklenir. Kuyucuklara negatif ve pozitif kontroller ile gerekirse IC eklenir (Örnek RNA'ları, reaksiyon karışımı hazırlanan biyogüvenlik kabininden farklı bir biyogüvenlik kabini içerisinde eklenmelidir).
5. RNA'lar eklendikten sonra plate'in üzeri 'seal' adı verilen özel şeffaf kaplayıcı ile strip tüpler ise strip kapağı ile kapatılır.
6. Plate ve/veya strip tüpler, plate santrifüjünde 2 dakika süreyle 1000 rpm'de santrifuj edilir ve karışımın kuyucukların dibinde birikmesi sağlanır.
7. Plate, real time cihazına yüklenir.
8. Çizelge 9'daki cihaz protokolü doğrultusunda Real-time RT-PCR analizi gerçekleştirilir.
9. Real-time RT-PCR sonuçları, cihazın yazılımına göre değerlendirilir.

#### 10.6. Real-Time RT-PCR Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

- NIC ve NTC negatif olmalıdır.
- PIC ve PAC (ve varsa IC) pozitif olmalıdır.
- Bu koşullar karşılandığında
  - Bir test, eksponansiyel (üstel) bir amplifikasyon eğrisi üretirse pozitif olarak kabul edilecektir.
  - Bir amplifikasyon eğrisi üretmeyen veya üstel olmayan bir eğri üreten bir test negatif olarak kabul edilecektir.
- Çelişkili veya net olmayan sonuçlar elde edilirse testler tekrarlanmalıdır.
- Zayıf çapraz reaksiyonların örneğin bazı hedef olmayan tobamovirüslerle ortaya çıkabileceği ve bu nedenle bir kesme değerinin gerekli olduğu unutulmamalıdır (N. Mehle, yayınlanmamış). VALITEST test performans çalışması için oluşturulan test açıklamasında Cq 35'lik bir ön kesme değeri belirtilmiştir. Cq kesme değeri ekipman, malzeme ve kimyasala bağlı olduğundan, test uygulanırken her laboratuvarında doğrulanması gerekir.

##### 10.6.1. Metodun Kullanım Kısıtlamaları

Bu metot muamele görmemiş tohumlar için uygundur. Aynı zamanda, mevcut herhangi bir kalıntının tahlili etkilememesi koşuluyla, dezenfeksiyon amacıyla fiziksel veya kimyasal işlemler kullanılarak işlenmiş tohumların test edilmesi için de uygundur. Herhangi bir antagonizm ve/veya inhibisyon olup olmadığının kontrolünün sağlanması analiz, örnek spayklama (yapay kirletme/kontaminasyon) veya deneysel karşılaştırma yapmak yoluyla kullanıcının sorumluluğundadır.

Metot koruyucu kimyasallar veya biyolojik maddelerle muamele görmüş tohumlar için valide değildir. İşlenmiş tohum test edilirse, koruyucu kimyasalların veya biyolojik maddelerin yöntem sonuçlarına etkisinin olup olmadığının deneysel olarak (analiz, örnek spayklama veya deneysel karşılaştırma) belirlenmesinden kullanıcı sorumludur.

### 10.6.2. Cihaz Kontrolü

Real-time RT-PCR testinde kullanılan LightCyCler 480 cihazının yıllık bakımları/test performans çalışması yetkili kurumlar tarafından yapılmalıdır.

## 11. KAYNAKLAR

- EPPO 2022. PM 7/146 (2) *Tomato brown rugose fruit virus*; ToBRFV. EPPO Bulletin, 52; 665-692. DOI: 10.1111/epp.12891
- Eupresco Project, 2021. Validation of molecular tests for the detection of tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in seed of tomato and pepper.
- Foissac X, Svanella-Dumas L, Dulucq MJ, Candresse T, Gentit P & Clark MF, (2001). Polyvalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing.
- ISF, 2020. Detection of infectious *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) in tomato and pepper seed. Version November 2020.
- ISTA, 2021. Validation of seed health methods and organisation and analysis of interlaboratory comparative tests (CT), p 8-10.
- Menzel, W. and Winter, S. (2021). Identification of novel and known tobamoviruses in tomato and other solanaceous crops using a new pair of generic primers and development of a specific RT-qPCR for ToBRFV. *Acta Horticulturae* 1316, 143-148
- Papayiannis LC, Harkou IS, Markou YM, Demetriou CN & Katis NI (2011) Rapid discrimination of Tomato chlorosis virus, Tomato infectious chlorosis virus and co-amplification of plant internal control using real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 176, 53–59.
- Weller SA, Elphinstone JG, Smith NC, Boonham N & Stead DE (2000) Detection of *Ralstonia solanacearum* Strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan), Assay. *Applied and Environmental Microbiology* 66(7), 2853–2858. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.7.2853-2858.2000>.

**EK-1****Silika jel total RNA izolasyon protokolünde kullanılan tampon çözeltiler ve miktarları**

<b>Tamponlar</b>	<b>Kimyasal</b>	<b>Miktar</b>	<b>Açıklamalar</b>
<b>1</b> Grinding Buffer (100 mL)	0.2 M Sodium Acetate (pH:5.2) 25 mM EDTA 1 M Potasium Acetate 4 M Guanidine Thiocyanate veya 6 M Guanidine Hydrochloride %2.5 PVP	1.6406 gr 0.930 gr 9.814 gr 47.264 gr veya 57.318 gr 2.5 gr	Sodium acetate 100 mL hacimli bir beher içinde belirtilen miktarda 20-25 mL distile su içinde eritilir ve pH 5.2 ayarlanır. pH ayarlandıktan sonra diğer kimyasallar sırası ile belirtilen miktarlarda PVP hariç behere ilave edilir. Çözelti içine konulan kimyasallar eğer erimez ise bir miktar manyetik karıştırıcıda ısıtılabilir. Hazırlanan çözelti son olarak 100 mL'ye tamamlanır, otoklav şişesine aktarılır ve otoklav edilir (121 °C- 1.2 atm basınç- 25 dakika). Otoklav işlemi bittikten sonra şişe içerisine PVP ilave edilir. Çözelti +4°C de saklanır.
<b>2</b> %10'luk SDS (100 mL)	Sodium Dodecyl Sulfate	10 gr	Sodium Dodecyl Sulfate bir beher içinde yaklaşık 40-50 mL distile su içinde eritilir. Daha sonra 100 mL tamamlanır. Çözelti daha sonra 0.22 µL filtreden geçirilir ve oda ısısında saklanır.
<b>3</b> Washing Buffer (500 mL)	10 mM TRİS-HCl (pH: 7.5) 0,05 M EDTA 50 mM Sodium Chloride	0.605 gr 0.0093 gr 1.461 gr	Tris bir beher içerisinde yaklaşık 200 mL distile su içinde eritilir ve pH: 7.5 HCl ile ayarlanır. Daha sonra diğer kimyasallar sırası ile ilave edilir ve 250 mL distile su ile tamamlanır. Çözelti 500 mL'lik otoklav şişesine aktarılır ve otoklav edilir (121 °C- 1.2 atm basınç- 25 dakika). Otoklavdan çıkan çözeltinin üzerine 250 mL saf alkol ilave edilir ve çözelti +4°C de saklanır.
<b>4</b> Sodium İodid (10 mL)	6 M Sodium İodide 0.15 M Sodium Sulfate	8.993 gr 0.189 gr	2-3 mL distile su içerisinde sodium iodide belirtilen miktarlarda eritilir. Daha sonra sodium sulfate ilave edilir ve

---

				çözelti 10 mL tamamlanır. Hazırlanan çözelti koyu renkli bir şişede +4°C de saklanır.
5	Silika Jel (5 mL)	Silicon Dioxide (pH: 2)	5 gr	5 mL distile su içerisine belirtilen miktarlarda silicon dioxide ilave edilir. Hazırlanan karışımın pH kâğıdı yardımı ile pH:2'ye ayarlanır.

---

**1. AMAÇ:**

Uluslararası Tohum Federasyonu'nun (ISF, 2020) "Domates ve Biber Tohumlarında Bulaşıcı Tomato brown rugose fruit virus; ToBRFV Tespiti" teşhis standartlarına göre, öğütülerek RNA'sı elde edilen domates ve biber tohum numunelerinin, Real-time RT-PCR analizi sonucunda ToBRFV ile enfekteli bulunması durumunda, ToBRFV'nin bulaşıcı (enfektif) olup olmadığının doğrulanması amacıyla yapılan lokal lezyon analizinin metot protokolünün açıklanması amaçlanmaktadır.

**2. KAPSAM:**

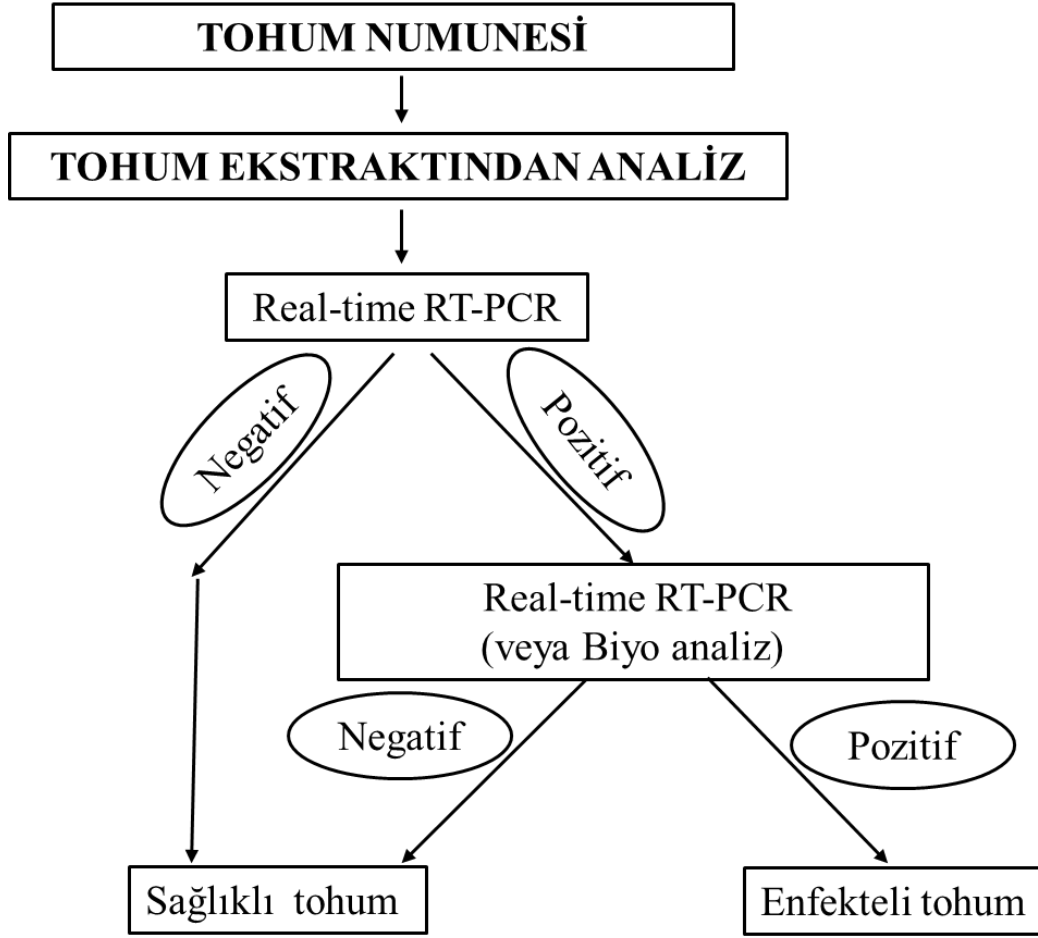
Bu metot talimatı, Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne gelen domates ve biber tohum numunelerinin öğütülerek ekstrakte edilen RNA örneklerinde, Real-time RT-PCR analizi sonucunda ToBRFV ile enfekteli bulunması durumunda, ToBRFV etmeninin bulaşıcı (enfektif) olup olmadığının tespitine yönelik lokal lezyon analizinin malzemelerini ve tüm analiz aşamalarını kapsamaktadır.

**3. ANALİZ PRENSİBİ VE YÖNTEM SÜRECİ:**

ToBRFV etmeninin tespitinde, tekrarlanabilirliğin ve seçiciliğin, serolojik yöntemler ve konvansiyonel RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) yöntemine göre yüksek olması ve daha kısa bir zamanda sonuç alınabilmesi nedeniyle Real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (Real-time RT-PCR) metodu kullanılmaktadır (ISF, 2020; Euphresco Project, 2021). Real-time RT-PCR analizi sonucunda virüs tespit edilemediğinde tohum numune serisinde ToBRFV bulunmadığı kabul edilmektedir.

Real-time RT-PCR analizi sonucunda ToBRFV ile enfekteli bulunan tohum numunelerinde, ToBRFV'nin tespitinde Real-time RT-PCR yönteminin kullanılması ve analiz sonucunda ToBRFV ile enfekteli olduğu belirlenen tohum numunelerinin, farklı bir tanılama testi kullanılarak doğrulanması önerilmektedir (EPPO 2022 Ekler: 4, 5 ve 7).

Alternatif olarak bu metotta açıklanan lokal lezyon analizi ile de doğrulama yapılabilmektedir (ISF, 2020). Domates ve biber tohum numunelerinden ToBRFV teşhisi ve doğrulanması için kullanılan Real-time RT-PCR analizi ile lokal lezyon analizinin işlem aşaması Şekil 1'de verilmiştir.



**Şekil 1.** Tohum numunelerinden (tohum ekstraktlarından) ToBRFV tespiti için analiz sürecini açıklayan akış şeması.

#### 4. LOKAL LEZYON ANALİZİ

ToBRFV, *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi NN ve *Nicotiana glutinosa* yapraklarında tobamovirüsler için tipik olan hipersensitif reaksiyona neden olmaktadır (Luria ve ark., 2017). Analizde kullanılan test bitkilerinde tipik olan hipersensitif reaksiyonlar takip edilmelidir.

##### 4.1. Malzemeler

- Analiz bitkileri (*Nicotiana glutinosa* veya *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi NN)
- Carborundum (320 mesh grit powder, Fisher Scientific veya muadili)
- Kontroller:



- **Positive Process Control (PPC):** İyi karakterize edilmiş pozitif tohum serisi/lotu veya PBS tohum ekstraksiyon tamponu içinde yeterince seyreltilmiş, Solanaceous konukçularının (domates, biber) ToBRFV ile enfekte yapraklarının sıvı ekstraktı.
- **Negative Process Control (NPC):** Tohum ekstraksiyon tamponu veya ToBRFV bulandırmayan domates/biber tohumu ekstraktı.

**d.** Tohum ekstraksiyon tamponu (Fosfat Tamponlu Salin – PBS, Çizelge 1):

**Çizelge 1.** Fosfat Tamponlu Salin (PBS) çözeltisi içeriği  
(Fosfat Tamponlu Salin (PBS) - litre başına pH 7,2 - 7,4)

Kimyasal Adı	Hacim
Sodyum klorür (NaCl)	8.0 g
Disodyum hidrojen fosfat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.15 g
Potasyum dihidrojen fosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.2 g

1 litreye kadar distile su eklenir, pH ayarlanır ve tampon çözelti 121 °C, 15 psi'de 15 dakika boyunca otoklavlanır.

**e.** Eldiven veya alkali sabun ve su

**f.** Koruyucu maske

#### 4.2. *Nicotiana* analiz bitkilerinin inokulasyonu ve inkübasyonu

- Tohum ekstaktı ile yapılan Real-time RT-PCR analizindeki orijinal 12 tohum ekstraksiyon alt numunesi kullanılır.
- Tohum ekstraksiyonları için muhafaza koşulları karşılanmadığında ve Real-time RT-PCR 1000 tohumluk alt numunelerde yapıldığında, yeni bir tohum örneği alınır ve 250 tohumluk 12 alt numune PBS tampon çözeltisi ile öğütülür.

##### **PBS Tampon Çözeltisi ile Homojenizasyon**

- Domates ve biber için 250 tohumdan oluşan 12 alt örnek hazırlanır.
- Alt numunelere domates için 10 mL ve biber için 20 mL 0,1 M fosfat tamponu (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2) (Çizelge 1) eklenerek gece boyunca yaklaşık 4°C'de inkübe edilir.
- İnkübasyon sonrasında örnekler bir homojenizatör ile öğütülür.
- Örnekler, 4 °C'de 10.000 g 'de 10 dakika santrifüj edilir ve süpernatant (üstte kalan sıvı kısım) RNA izolasyonu ve lokal lezyon analizi için kullanılabilir.
- Analiz bitkileri (*Nicotiana glutinosa* veya *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi NN) yeterli ışık yoğunluğunda ve 20-25° C'de büyütülür.

- Yüksek turgorlu 4 -5 gerçek yapraklı bitkiler seçilir. Yaşlı bitkiler veya çiçeklenmiş olanlar kullanılmaz.
- İlk gerçek yaprak (en yaşlı gerçek yaprak), farklı şekil/doku/kalınlık gibi özelliklerinden dolayı daha az duyarlı olacağı için kullanılmamalıdır.
- Mildiyö'den (Downy mildew) etkilenmiş tütün bitkilerinin yaprakları önemli ölçüde daha az duyarlıdır. İnokulasyon yapılmış bitkide görülebilir belirtiler olmamalıdır ve hastalık bulundurmamalıdır.
- Yaprak yüzeyinde çok ince bir tabaka oluşturacak şekilde yeterli miktarda carbondurum (320 mesh grit powder, Fisher Scientific veya muadili) yapraklara serpilir. Koruyucu maske kullanılmalıdır.
- Her bir alt numune için toplam 4 yaprak olmak üzere, 2 bitkinin (neredeyse, yaklaşık olarak) tamamen büyümüş iki yaprağının tüm yüzeyi her bir tohum ekstraktı ile inokule edilmelidir.
- Yaprak üzerine bir damla inokulum (100-200 mikrolitre) damlatılır. Eldiven giyildikten sonra parmaklar ile yaprağa zarar vermeden sabit ve hafif bir basınç uygulanarak damla yüzeye yayılır.

**Not:** Eldivenle çalışılırken örnekler arasında eldivenler değiştirilir veya alkali sabun ya da muadili kullanılarak eller temizlenir ve kalıntıları uzaklaştırmak için su ile durulanır.

- İnokulasyon sonrası bitkiler birkaç dakika çeşme suyu ile durulanır.
- Bitkiler PPC ve NPC ile tohum ekstraktı için kullanılanlara benzer şekilde inokule edilir.
- Bitkiler, kontrollü şartlarda, 20-25° C'de ve en az 12 saat ışık verilerek 5-7 gün süreyle inkube edilir.

**Not:** Tütün bitkilerinin aşırı duyarlılık reaksiyonları, lokal lezyon gelişimi, 28° C'nin üzerindeki sıcaklıklarda görülmeyebilir ve farklı tobamovirüsler için değişkenlik gösterebilir.

#### 4.3. İnokule edilmiş bitkilerin değerlendirilmesi

- İnokule edilmiş yapraklar lokal lezyonlar açısından incelenir.
- Çok sayıda lokal lezyon varsa, PPC ve NPC ile yapılan bir karşılaştırma, gözlemlenen lezyonların çoğunun veya tamamının gerçek virüs lezyonları olup olmadığını, örneğin sürtünme hasarından kaynaklanmış olup olmadığını, kolayca ortaya çıkaracaktır.
- İnokule edilmiş bitkilerde ToBRFV için Real-time RT-PCR testi ile doğrulama yapılır.
- **İsteğe bağlı:** Lezyonlar az sayıdaysa, mekanik hasar (inokulasyon sırasında verilen hasar ya da pestisit kullanımı gibi) ya da gerçek virüs enfeksiyonu olup olmadığı doğrulanır.

Şüpheli lezyon kesilerek çıkartılır ve az miktarda tohum ekstraksiyon tamponu içine ufalanarak 2 analiz bitkisinin iki yaprağına tekrar inokule edilir. Virüslerden kaynaklanan lezyonlar bu doğrulama testinde çok sayıda lezyon oluşturacak kadar yeterli miktarda enfektif virüs içermektedir. İnokule edilen bitkilerde ToBRFV için Real-time RT-PCR testi ile doğrulama yapılır.

**KAYNAKLAR**

- EPPO 2022. PM 7/146 (2) *Tomato brown rugose fruit virus*; ToBRFV. EPPO Bulletin, 52; 665-692. DOI: 10.1111/epp.12891
- Eupresco Project, 2021. Validation of molecular tests for the detection of tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in seed of tomato and pepper.
- ISF, 2020. Detection of infectious *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) in tomato and pepper seed. Version November 2020.
- Luria N, Smith E, Reingold V, Bekelman I, Lapidot M, Levin I, ... & Dombrovsky A. (2017). A new Israeli Tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm-22 resistance genes. PloS one, 12(1), e0170429.