

BİTKİ VİRÜSLERİNİN TANILANMASINDA dsRNA ANALİZ YÖNTEMİNİN KULLANILMASI

Nejla YARDIMCI¹

Handan ERYİĞİT¹

¹Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü- ISPARTA

ÖZET

Bitki virüslerinin tanı ve teşhisi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler virüs teşhisinde elverişli olmalarına rağmen, bir kısmı zaman alıcı olmakta ve özellikle serolojik testlerde antiserumun varlığına bağımlı kalmaktadır. Son yıllarda moleküler tekniklerde meydana gelen gelişmelerle virüslerin tanısı daha da kolaylaştığı gibi, daha kesin ve güvenilir sonuçlara ulaşmakta mümkün olabilmektedir. Bu moleküler tekniklerin en önemlilerinden biri de; virüsle infekteli bitkilerden replikatif double-stranded RNA (dsRNA)'nın izolasyonu ve analizidir. Bu yöntemle göre bir bitkideki dsRNA'nın varlığı, sayısı, büyüklüğü, bir virüsün tanısı için potansiyel tanılama değerleridir. Viral dsRNA, selüloz kolon kromatografi ile izole edilir ve dsRNA'nın varlığı agarose jel elektroforez ile gösterilir.

Anahtar Kelimeler: dsRNA, Agarose Jel

USE OF dsRNA ANALYSIS METHOD FOR IDENTIFICATION OF PLANT VIRUSES

ABSTRACT

Several approaches for detection and diagnosis of plant viruses can be used. Despite to their usefulness, some of them have been time consuming and particularly serological tests have been depend upon providing antisera. In recent years obtaining easy, fast and accurate results in detection and determination of viruses has been possible by the development and improvements of molecular techniques. One of the most important methods is the isolation and analysis of replicative double- stranded RNA (dsRNA) from virus-infected plants. The presence number, size, and abundance dsRNAs in infected plant tissue are of potential value for diagnosis. Cellulose-column chromatography are used for purification of viral dsRNA and the presence of dsRNA are represented by agarose gel electrophoresis.

Key Words: dsRNA, Agarose Gel

1.GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızlı artışı ile beslenme de önemli bir sorun haline gelmiştir. Tarım alanlarını genişletmenin zor olduğu günümüz koşullarında birim alandan daha fazla ürün almak, kaliteyi ve verimi yükseltmek beslenme açısından önem taşımaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalar, çevresel koşulların düzenlenmesi, kültürel faaliyetlerin uygun bir biçimde yapılması, bitkilerin ve ürünlerin hastalık ve zararlılardan korunmasıdır (Baykal,1992).

Bitki virüslerinin neden olduğu hastalıklar tarla ve bahçe ürünlerinde her yıl yaklaşık 15 milyar dolar kayıplara neden olmaktadır. Özellikle bu kayıplar

tropikal ve subtropikal bölgelerde önemli olmaktadır (Ulubaş, 2002). Bu hastalıkların kontrol çalışmalarında ilk önemli adım hastalığa neden olan virüsün kimliğini belirlemek ve özelliklerini ortaya koymaktır. Son yıllarda teşhis metodlarındaki gelişmelerle bu işlem daha kolay olarak gerçekleştirilmektedir (Ulubaş, 2001).

Birçok bitki virologu; bitkilerdeki virüsün teşhis ve tanısı için çeşitli yöntemler kullanmıştır. Bu yöntemler, biyolojik indeksleme, hücresel yapıcıklar (inclusion body), böceklerle taşınan virüslerde taşıma özelliği ya da kapasitesi, seroloji, elektron mikroskopik yöntemler, nükleik asit hibridizasyonu, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), dsRNA (Double Strand RNA) analizidir(Mathews,1993).

Virüs hastalıklarının tanısında genel olarak birçok yöntem kullanılmakla birlikte başarı şansı virüse ve konukçuya bağlıdır. Morris ve Dodds (1979), virüs ve funguslarla infekteli bitkilerden dsRNA analizi ve izolasyonu yolu ile bir metod geliştirmişlerdir.

Birçok bitki virüsü bir veya birkaç parça halinde olan tek iplikçikli ssRNA genomuna sahiptir. Viral replikasyonu olayı sırasında, her bir genom parçasına karşılık gelen çift iplikçikli dsRNA türleri infekteli dokuda birikebilir. Ayrıca subgenomik mesajlı RNA'lara karşılık gelen dsRNA'larda bazen bulunabilir. Bu çeşitli dsRNA türleri kolayca izole edilebilir. Böylece virüslerin taksonomik kriteri olarak kullanılabilir (Krajacic ve Lorkovic, 1992).

2.DsRNA ANALİZ YÖNTEMİ

DsRNA (çift iplikçikli RNA) analizi bitki virüslerinin tanısında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem bir RNA virüsü ile enfekte olmamış bitkilerin ölçülebilir miktarda yüksek molekül ağırlıklı dsRNA ihtiva etmeyeceği esasına dayanmaktadır (Morris ve Dodds, 1979).

Bu yaklaşıma göre, eğer bir bitkide dsRNA varsa bu bize bitkinin bir RNA virüsü veya virüs benzeri bir etmenle enfekte olduğunu gösterir. Ortaya çıkarılan bu dsRNA da bir tek sarmal RNA virüsünün replikatif formuna ait genomu olabilir.

Bu dsRNA'ları tanılamada birinci koşul bunların enfekteli bitkisel dokulardan izole edilmesidir (Korkmaz ve Çınar, 1998).

2.1.Bitkisel Dokulardan Nükleik Asitin İzolasyonu

Bitkisel dokulardan nükleik asitin izole edilme çalışmalarına dokunun

parçalanması ile başlanır. Bu adım doku tipine ve farklı amaçlara göre geliştirilebilir. Bitkisel ve fungal dokulardan dsRNA'nın izole edilmesi sırasında nükleik asitlerin bir kısmı kaybolmaktadır. Bu sebeple kaybı önleyen şartlar altında toplam hücresele nükleik asitlerin izolasyonuna çalışılır. dsRNA, diğer hücresele nükleik asitlere göre oldukça kararlı olduğu için daha az itina ile izole edilebilir. Bu yöntemle ilk başlayan kişi için en iyi yol tütün mozaik virüsü ya da hıyar mozaik virüsü ile enfekteli olan bitkiler ile başlamaktır.

Güldür ve Yılmaz (1994), enfekteli domates bitkisi ekstraktlarından agarose jel elektroforez yöntemi ile domates mozaik virüsünü saptamıştır.

Yine, Bostan ve Açıkgöz (2000) Erzurum yöresinde yetiştirilen patateslerden izole edilen patates X ve S virüslerini % 2'lik agar jelde 100 V'da 3 saat süre ile elektroforetik ayırma tabi tutarak PVX'e ait tek banta sahip dsRNA profilini elde etmiştir.

Bitkinin genç, körpe ve sulu, yeni enfekte olmuş kısımları genellikle iyi kalitede ve yüksek nükleik asit konsantrasyonuna sahiptir. Bu dokular bol miktarda viral dsRNA içerir. Ancak Citrus tristeza gibi floemle sınırlı virüslerde yapraklardan ziyade bitkinin genç kabuk dokuları ya da yaprağın orta damarının kullanılması tercih edilir.

1998 yılında Korkmaz ve Çınar tarafından Morris ve Dodds (1979)'un önerdiği ve Valverde ve ark.(1990)'nın geliştirdiği dsRNA analizi ve izolasyonu metodu modifiye edilerek turunçgil tristeza virüsü, tütün mozaik virüsü (TMV), hıyar mozaik virüsü (CMV) ve turunçgil klorotik cüceleşme hastalığı etmenlerini nükleik asit analiz yöntemi ile tanılama çalışmalarını yürütülmüştür. Turunçgil klorotik cüceleşme hastalığı dışında diğer virüslerin molekül ağırlıkları belirlenmiştir.

çilek ve kiraz gibi Rosaceae familyasına ait bitkilerde farklı bir problem görülür. Bu bitkilerde sulu ekstraktlardan dsRNA'nın ayrımını zorlaştıran yüksek miktarda polisakkarit kontaminantları bulunur. Bu şekilde problemlili dokularda bir önlem olarak sulu ekstraktın su oranını artırmak önerilebilir (Zhang et.al.,1998). Kiraz bitkisi ile yapılan çalışmalara örnek verecek olursak;

İlhan ve ark. (2001) de yaptıkları bir çalışma da Hatay, Yalova ve Çanakkale illerindeki fidanlık gen kaynakları ve bahçelerden temin edilen erik ve kayısı örneklerini dsRNA analizine tabi tutmuş ve çalışma da Erik halkalı leke virüsü'nün dsRNA izolasyonu Sbanadzovic ve di Terlizzi (1994)'nin yöntemine göre yapılmıştır. Virüsün nükleik asit analizleri sonucunda 1 izolatta 3 RNA tesbit edilmiştir. (RNA1, 3.662kb; RNA2, 2.507kb; RNA3, 1.887kb) 1 izolatta ise RNA2 bulunmuş, negatif kontrolde ise herhangi bir bant oluşumu gözlenmemiştir.

Açıkgöz ve ark. (1998), tarafından Amasya Kiraz Hastalığına neden olan etmeni tanılamak amacıyla nükleik asit izolasyonu ve analizi çalışmaları yapılmış ve viral dsRNA'nın elektroforetik analizi sonucunda dsRNA profilinin çok sayıda bant içerdiği ifade edilmiştir.

Zhang ve ark. (1998)'nin yaptıkları çalışmada Stem pitting simptomu sergileyen kiraz ağaçlarından nükleik asitin replikatif formu izole edilebilmiş ve polyacrylamid jel elektroforezde fragmentlerine ayırarak jelde virusa özgü 5 bant elde edilmiştir.

Çilek bitkisi ile yapılan çalışmalarda ise;

Spiegel (1987), çilek sarı kenar (Strawberry mild yellow-edge) virüsü ile enfekteli çilek bitkisinden dsRNA izolasyonunu gerçekleştirmiş ve elde edilen profilde 3 bant gözlemlemiştir.

Bunların molekül ağırlığı; 3.8, 2.8 ve 1.3 x 10⁶ dalton olduğunu belirleyen araştırmacı, bu dsRNA profilinin daha önceden belirlenmiş pancar western sarılık virüsü ve arpa sarı cücelik virüsü (Barley yellow dwarf) profiline benzediğini ifade etmiştir.

Watkins ve ark. (1990), June sarılık virüsü (June yellow virus) ile enfekteli çilek bitkisinden dsRNA izolasyonunu gerçekleştirmiş ve en büyük fragmentin molekül ağırlığının 1x 10⁶ olduğunu, sağlıklı bitkilerde ve *Fragaria vesca* bitkisinde ise dsRNA profiline rastlamadıklarını bildirmişler-dir.

Dokular, proteinlerin doğal yapısını bozan bir buffer (tampon) ile homojenize edilerek, nükleik asitlerin serbest kalması sağlanır. Homojenattaki ribonükleaz enziminin aktivitesini azaltmak için tuz konsantrasyonunun 1-0.1 mol arasında ayarlanması gerekir. Yine nükleaz aktivitesini düşürmek için bentonit, diethylprocarbonat ve metal iyonları gibi katkı maddeleri kullanılabilir(Sbanadzovic ve diTerlizzi, 1994).

Proteinin denature edilip nükleik asitlerin serbest kalmasını sağlamak için Sodium dodecyl sulphate (SDS) veya P-aminosalicylic acid gibi deterjanlar kullanılır. Bitki dokularının oksidasyonunu ve kahverengileşmesini önlemek için ekstrakta sulfite, polivinylpyrrolidone, mercaptoethanol, sodium diethyldithiocarbamate gibi katkı maddeleri ilave edilir. Bazı prosedürlerde protein denaturasyonu için Phenol önerilmektedir. Phenol ve Chloroform-Pentanol kullanımı proteini uzaklaştırma da en iyi sonucu vermiştir (Valverde et.al. 1990).

Eğer bilinmeyen bir virüs ya da ırk ile çalışma yapılıyorsa mutlaka bitkinin değişik organlarından örnekler alınmalıdır. Arazi ya da sera koşullarında elde edilen bitkilerden toplanan örnekler analiz için -20 yada -80 derecede uzun süre

saklanabilir. (Jarupat ve ark., 1991; Karan ve ark., 1991).

2.2.Yöntem

Üzerinde çok çalışılmış bir nükleik asit olan dsRNA'yı saflaştırmak için pek çok prosedür geliştirilmiştir. Çoğu bitki virüsünün dsRNA izolasyonunda Morris ve Dodds (1979) tarafından önerilen yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemin esası; CF-11 selüloz kolon kromatografisine dayanır.

Nükleik asitlerin selüloz kolonda fraksiyonlarına ayrılması çeşitli ethanol konsantrasyonlarında tek ve çift sarmal RNA'nın ve DNA'nın selüloza bağlanması temeline dayanır. DNA ve ssRNA fraksiyonları %15-18 Ethanol içeren tampon solüsyonda akıp giderken, dsRNA gibi yüksek sekonder yapılı olan RNA selülozda bağlı kalır (Spiegel, 1987). Daha sonra Ethanol içermeyen tampon solüsyonu uygulanarak dsRNA'lar selülozdan elde edilir. Bu işlemlerden sonra bitkisel dokulardan viral etmene özgü dsRNA elde edilmiş olur.

Selüloz prosedürü ile bitkisel dokulardan elde edilmiş olan dsRNA'nın analizi için, akrilamid ya da agar jel içerisinde elektroforetik ayırma gidilir. Doğru elektrik akımı alanın da belirli bir süre ile yapılan ayrımlar nükleik asitlerin molekül ağırlığına bağlıdır. Molekül ağırlığı fazla olanlar yakına, az olanlar ise daha uzağa göç ederler (Jordan ve Dodds, 1983).

Akrilamid ya da agardan hazırlanan destekler üzerine örnekler uygulanır ve uygun pH'lı bir tampon ile ıslatılır. Çoğunlukla kullanılan tamponlar Tris-Borate (TBE) ya da Tris-Phosphate (TPE)'dir. Bunların pH'sı 7.5-8 arasında olmalıdır. dsRNA için uygulanan elektrik akımı genellikle 100 V, süre ise 2.5-4 saat arasındadır. Bu süre sonunda viral nükleik asit fragmentleri molekül ağırlıklarına

göre jelde yerini alır. Jel içerisindeki dsRNA'ları görünür hale getirebilmek için Ethidium Bromid'le (EtBr) boyanır. Nükleik asit molekülleri 260-280 nm de UV ışığı absorbe ederler. Bu kısımların EtBr ile boyalı olması profilin UV ışık altında görünmesini sağlar (Valverde et.al.1990).

Jel üzerinde oluşan dsRNA profili ile molekül ağırlık standardının oluşturduğu profillerin karşılaştırılması yapılarak elektroforeze tabi tutulan viral dsRNA'ların molekül ağırlıkları saptanır. Standart olarak önceden molekül ağırlığı bilinen bir makromolekül (örneğin Hind III, Çift sarmal DNA) kullanılır (Açıkgöz ve ark., 1998). Araştırmacılar tarafından farklı türlerin dsRNA'larının belirlenmesi virüs enfeksiyonu için ayrıntılı bir kanıt olarak yorumlanmıştır. Çünkü her virüsün, hatta her türün yada izolatanın dsRNA'sının molekül ağırlığı birbirinden farklıdır. Analiz edilen virüs gruplarının molekül ağırlık standartları ile bağıntısı incelenerek teşhisi yapılmaktadır.

Yardımcı ve Açıkgöz (1997), tarafından yoncalarda yürütülen çalışmada alfalfa mozaik virüsünün tanısında üç ayrı dsRNA izolasyon yöntemi kullanılarak elde edilen viral RNA ların elektroforetik ayırımı gerçekleştirilmiştir. Diaz-Ruiz ve Kaper, Morris ve Dodds ve Duran Vila ve ark.nın önerdiği yöntemleri uygulayan araştırmacılar etmene özgü en belirgin dsRNA profilini Morris ve Dodds'un yöntemiyle elde etmişlerdir.

Yine başka bir çalışma da Açıkgöz ve Döken (2001), incir mozaik hastalığının tanılanmasında diğer tanı yöntemlerinin kullanılamaması sebebiyle dsRNA analiz yönteminin kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Enfekteli bitkilerden elde edilen nükleik asit profilinin molekül ağırlığının 0.6 Kbp ile 6.6 Kbp arasında yer aldığını belirlemişlerdir.

3. SONUÇ

Virüs hastalıklarının tanısında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Ancak her metodun kullanımı ve başarılı olma şansı virüse ve konukçuya bağlıdır.

dsRNA analiz yönteminin diğer yöntemlere göre birçok avantajı vardır. Klasik tanı yöntemleri ile kıyaslandığında basit ve göreceli olarak daha ucuzdur.

Köklü ve Baloğlu (2001)'de, yaptıkları bir çalışma da; Trakya Bölgesinde yetiştirilen bağlarda Asma yaprak kıvrılması ile ilişkili virüslerle enfekteli bitkilerde dsRNA analizleri sonucunda 1. örnekte agarose jelde 4 bant, 2. örnekte 3 bant, 3. örnekte 2 bant gözlemlenmiştir. Araştırmacılar dsRNA analiz yönteminin, ELISA ile kıyaslandığında daha hassas ve güvenilir olduğunu ancak test edilen örnek sayısının sınırlı olması ve test için gereken zamanın uzun olması gibi dezavantajları olduğunu ifade etmişlerdir.

Karışık enfeksiyonların tanısında kullanılabilir. Ayrıca virüsün farklı ırklarının belirlenmesini sağlamaktadır.

Honda ve ark.,(1986) da, Kanagawa ve Hiroşima da AMV (Alfalfa mosaic virus) ve CMV (Cucumber mosaic virus) ile ilgili yaptıkları çalışma da bu iki virüsün elektroforetik bantlarının ve protein kılıflarının birbirine benzer olduğunu bulmuşlardır. Şekil 2'de K ve T harfleri ile gösterilen bantlar AMV'yi, S, Y ve P harfleri ile gösterilenler ise CMV'yi anlatmaktadır.

Rezaian ve ark. (1990), asma yaprak kıvrıcılığı virüsü ile ilişkili virüslerle enfekteli bitkilerden dsRNA profillerini tespit ederek farklı asma bitkilerindeki dsRNA'ların farklı büyüklükte olduğunu belirtmişlerdir. RNA'ları saf olarak elde etmek için CF-11

sellüloz kromatografisi kullanan araştırmacılar viral nükleik asiti jel elektroforezde analiz ederek viral bantları elde etmişlerdir. Sağlıklı bitkilerde ise dsRNA'ya rastlanmamıştır.

Protein kapsülü bulunmayan viroidlerin tanısında da kolaylıkla kullanılabilen bir yöntemdir.

Purifiye edilen dsRNA daha sonra RNA'dan cDNA (Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit) sentezinde kullanılır. Virüsün baz dizilerinin belirlenmesine kaynaktır. PCR, moleküler klonlama ve northern blot analizinde kullanılır.

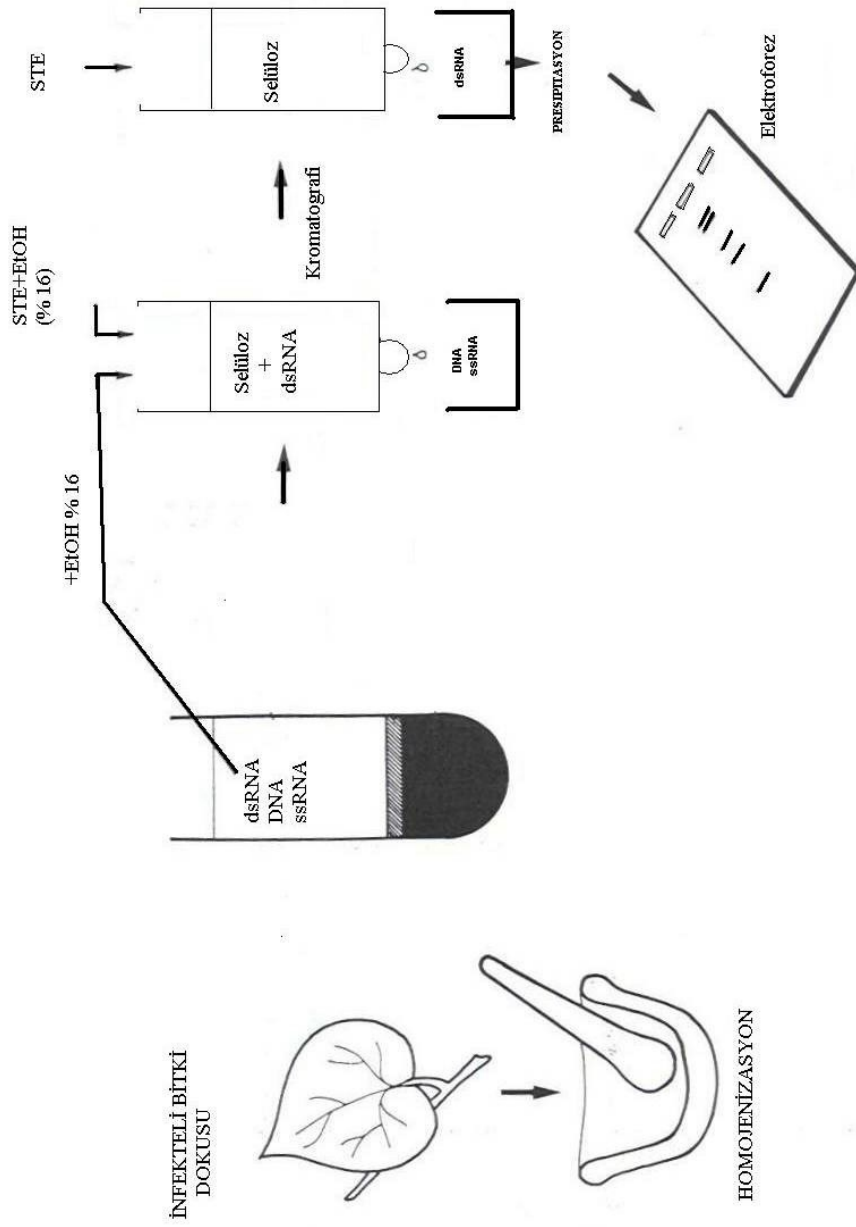
Bu yöntemle sadece RNA virüsleri tanılanabilmektedir. Luteovirüsler ve birçok Potyvirusler çok miktarda dsRNA üretemezler ve bu durum onların bu yöntemle tanısını imkansız kılar.

Bazı durumlarda arazi örnekleri düşük miktarda dsRNA'ya sahiptir ve bu gibi örneklerin seralarda duyarlı bitkiler üzerinde çoğaltılması gerekmektedir.

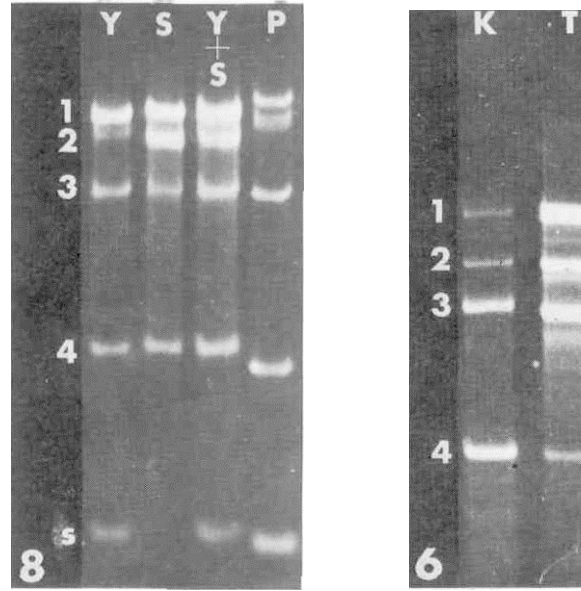
Serolojik testler; basit, pratik ve kısa zamanda sonuca ulaşılması sebebiyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte eğer bitki birden fazla virüsle enfekteli ise hedef alınmayan virüs tanımlanamayabilir (Clark ve Adams, 1977).

Sadece indikatör bitki kullanılarak yapılan tanı yöntemleri de güvenilir değildir. Çünkü bitkinin göstermiş olduğu reaksiyon ve belirtiler çevre koşulları, bitki çeşidi ve virüs ırkına göre değişiklik göstermektedir (Güldür ve Yılmaz, 1994).

Bütün bunlar göz önüne alındığında, bitkilerdeki virüs hastalıklarının tanısının doğru olarak yapılabilmesi için birden fazla yöntemin kullanılması önerilmektedir.



Şekil 1. Bitki dokusundan dsRNA'nın izolasyonu
(Krajacic ve Lorkovic, 1992)



Şekil 2. Alfalfa Mozayik Virüsü ve Cucumber Mozayik Virüsünün dsRNA' larının Elektroforetik Analizleri (Honda et. al,1986)

KAYNAKLAR

- Açıkgöz, S., Döken, M.T., Çıtır, A., Yardımcı, N., 1998. Amasya Kiraz Hastalığı Etmeninin dsRNA Analizi ile Tanılanması ve Ege Bölgesi'nin Bu Hastalık Yönünden İncelenmesi. Türkiye VIII. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, Ankara, 234-238
- Açıkgöz, S., Döken, M.T, 2001. İncir Mozayik Hastalığı Etmeninin Tanılanmasında dsRNA Analiz Yönteminin Kullanılması. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, 3-8 Eylül 2001, Tekirdağ.
- Baykal, N., 1992. Fitopatoloji. Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, BURSA.
- Bostan, H., Açıkgöz, S., 2000. Determination of PVX and PVS Symptoms on Some Test Plants and Identification of These Viruses Using dsRNA Analysis. The Journal of Turkish Phytopathology, Vol.29, No:1, 41-49p.
- Clark, M.F., Adams, A.N, 1977. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme Linked Immunosorbent assay for the Deduction Plant Viruses. J. Gen. Virology , 340, 475-483.
- Güldür, M.E., Yılmaz, M.A, 1994. Rapid Detection of Tomato Mosaic Virus by Agarose Gel Electrophoresis. J. Turk. Phytopath., Vol.23, No: 2, 87-90, 1994.
- Honda, Y., Hanada, K., Ushiyama, K., Zenbayashi, R., Tochiyama, H., 1986. Alfalfa Mosaic Virus and Cucumber Mosaic Virus İsolated from Pepino.
- İlhan, D., Ulubaş, Ç., Ertunç, F, 2001. Sert Çekirdekli Meyve Ağaçlarında Görülen Erik Nekrotik Halkalı Leke Virüsünün (PNRSV) dsRNA Analiz Yöntemi ile Tespiti. Türkiye IX. Fitopatoloji Kongresi, 3-8 Eylül 2001, Tekirdağ.
- Jarupat, T., Lee, J.G., Dodds, J.A., 1991. Additional Factors affecting dsRNA Analysis of Citrus Tristeza Virus. Proc 11. Conf. IOCU.IOCU Riverseid
- Jordan, R.L., Dodds, J.A, 1983. Hybridization of 5- end Labeled RNA to Plant Viral RNA in Agarose and Acrylamide gels. Plant Mol. Biol. Rep., 1: 33-37.
- Karan, M., Hicks, S., Harding, R.M., Teakle D.S., 1991. Stability and extractability of double-stranded RNA of Pangola Stunt and Sugarcane Fiji Disease Viruses in Dried Plant Tissues. J.Virol. Method. 33: 211-216.

- Korkmaz, S., Çınar, A., 1998. Bitki Virus Hastalıklarının Double-Stranded RNA Analizi Yöntemiyle Tanısının Yapılması. Türkiye VIII. Fitopatoloji Kongresi, 21-25 Eylül 1998, Ankara.
- Köklü, G., Baloğlu, S., 2001. Trakya Bölgesinde Yetiştirilen Bağlarda dsRNA Analiziyle Asma Yaprak Kıvrılması ile İlişkili Virüslerin Tesbit Edilmesi. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, Cilt 1, Sayı 1, 2001, Tekirdağ.
- Krajacic, M., Lorkovic, Z., 1992. Double-Stranded RNA from Plants Infected with Two Tymoviruses. Acta Biologica HAZU, 16/2, 11-19, Zagreb, 1992.
- Mathews, R.E.F., 1993. Diagnosis of Plant Virus Diseases. (Editör, R.E.F., Mathews), CRC Press, USA.
- Morris, T.J., Dodds, J.A., 1979. Isolation and Analysis of Double-Stranded RNA from Virus Infected Plant and Fungal Tissue. Phytopathology, 69:854-858.
- Rezaian, M.A., Krake, L.R., Cunying, Q., Hazzalin, C.A., 1990. Detection of Virus-Associated dsRNA from Leafroll Infected Grapevines. Journal of Virological Methods, 31, 325-334.
- Sbanadzovic, S., diTerlizzi, B., 1994. Isolation and Analysis of Double-Stranded RNA_s. Course on Plant Virus Diagnosis, Adana, 114-121.
- Spiegel, S., 1987. Double-Stranded RNA in Strawberry Plants Infected with Strawberry Mild Yellow-Edge Virus. Phytopathology 77: 1492-1494.
- Ulubaş, Ç., 2001. Sert Çekirdekli Meyve Ağaçlarında Enfeksiyon Yapan Virüslerin Moleküler Tanılanması. (Doktora Semineri). Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Ulubaş, Ç., 2002. Sert Çekirdekli Meyve Ağaçlarında Enfeksiyon Yapan Virüslerin Moleküler Yöntemlerle Tanılanması. Sert Çekirdekli Meyve Virüslerinin Moleküler Yöntemlerle Tanılanması Workshopu. 20-37, 30 Eylül- 4 Ekim 2002, Ankara.
- Valverde, R.A., Nameth, S.T., Jordan, R.L., 1990. Analysis of Double-Stranded RNA for Plant Virus Diagnosis. Plant Disease, 74: 255-258
- Watkins, C.A., Jones, A.T., Mayo, M.A., Mitchell, M.J., 1990. Double-Stranded RNA Analysis of Strawberry Plants Affected by June Yellows. Ann. Appl. Biol. 116, 73-83.
- Yardımcı, N., Açıkgöz, S., 1997. Studies on Alfalfa Mosaic Virus of Alfalfa Growing Areas in Erzurum. J. Turk. Phytopath. Vol.26, No:1, 23-30.
- Zhang, Y.P., Uyemoto, J.K., Kirkpatrick, B.C., 1998. Analysis of Double-Stranded RNA_s From Cherry Trees with Stem Pitting in California. Plant Disease, 82: 871-874.3