

Bitki Virüslerinin Tanılanmasında Serolojik Yöntemlerin Kullanılabilirlikleri Yönünden İncelenmesi¹

Üftade Güner², Ülkü Yorgancı³

Giriş

Bitki virüslerinin tespitinde değişik test yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlardan biri olan serolojik yöntemler, bitkilerde hastalık meydana getiren viral etmenlerin karakterize edilmesinde ve teşhisinde kullanılmaktadır. Biyolojik indeks testi ile moleküler yöntemlerde olduğu gibi, serolojik teşhis metotları da birçok avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Belli bir virüse spesifik olan serolojik reaksiyonlarda, sadece küçük miktarlarda viral materyal kullanılarak birkaç gün içerisinde sonuç almak mümkündür. Ayrıca geniş ölçekli rutin testlemelerde faydalı olabilen serolojik yöntemlerde uygun antiserumun önceden temini durumunda, testlerin uygulanabilirliği önem kazanmaktadır.

Serolojik yöntemler virüslerin tespit ve tanısında yaygın olarak kullanılmakla birlikte, hastalıkların fizyolojik özelliklerinin izlenmesinde de önemli bir role sahiptir. Özellikle patatest, bitki virüslerinin epidemiyolojik çalışmaları için uygulanan serolojik metotlar hızlı, basit ve duyarlı immüno yöntemlerin gelişimini gerektirmiştir (1, 2).

İslah programlarındaki rutin testlemelerde ve hastalıkların fizyolojik özelliklerini izlemede yararlı olan serolojik yöntemler, virüsleri gruplandırmak ve virüs ırklarını ayırmak amacıyla da kullanılmaktadır (3).

Sertifikasyon programlarına ait indeksleme stoklamasında, ıslah programlarında ve yumruları testlemek amacıyla da serolojik testler kullanılmaktadır (1, 4).

¹ Bu çalışma Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fitopatoloji Anabilim Dalında Prof. Dr. Ülkü Yorgancı danışmanlığı altında Uzm. Üftade Güner tarafından yapılan ve 2006 yılında sunulan "Bitki Virüslerinin Tanılanmasında Serolojik Yöntemlerin Kullanılabilirlikleri Yönünden İncelenmesi" isimli Doktora 1. Seminerinden alınmıştır.

² Uzm., Ziraat Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü, Yenimahalle-ANKARA. Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi : uftadep@yahoo.com

³ Prof. Dr., Ege Üniv. Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü (Emekli), Bornova-İZMİR

Serolojik Yöntemlerin Kullanılabilirlikleri Yönünden Değerlendirilmesi

Hastalık etmenlerinin tanılanmasında tek başına bir tekniğin kullanımı yeterli olmamaktadır. Viral etmenlerin teşhisinde kullanılacak yöntemin doğruluğu, tutarlılığı, duyarlılığı, kullanım kolaylığı ve maliyeti gibi faktörler testten etkili sonuçlar elde edilmesi açısından önem taşımaktadır (5).

Bu konuyla ilgili olarak çeşitli virüs hastalık etmenleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Özellikle *Citrus tristeza trichovirus* (CTV)'nün tespiti üzerinde daha fazla çalışılmıştır. Etmenin tanılanması için uygulanan serolojik tekniklerin karşılaştırılması amacıyla yapılan bir araştırmanın değerlendirmesi Çizelge 1'de verilmiştir (6).

Çizelge 1. CTV'nün tespiti için serolojik tekniklerin karşılaştırılması

Metot	Nispi duyarlılık	Avantajları	Dezavantajları
SDS-immüno difüzyon	düşük	*Basit ve hızlıdır *Ekipman ihtiyacı azdır *24-48 saatte sonuç alınır	*Duyarlılık düşüktür *Fazla miktarda antiserum gereklidir
SSEM	orta	*Partikül kalitesi saptanabilir	*TEM ve iyi eğitim gereklidir *Pahalıdır
SSEM-altın etiketli	yüksek	*In situ'da virüs lokalizasyonu ve virüs partiküllerinde epitop lokalizasyonu yapılabilir	*TEM ve iyi eğitim gereklidir *Pahalıdır
DAS-direkt	orta	*Nicel tespitler yapılabilir *Az miktarda antiserum gereklidir *24 saatte sonuç alınır	*Virüse spesifik IgG enzim konjugatlarının hazırlanması gerekmektedir *Sık background reaksiyonu
PTA	orta	*Nispi olarak basittir *Ticari olarak hazırlanan enzim konjugatlar kullanılabilir *Kısımlara ayrılmamış virüse spesifik antiserum kullanılabilir	*Duyarlılık düşüktür
DAS-indirekt	orta	*Ticari olarak hazırlanan enzim konjugatlar kullanılabilir *Arttırılmış duyarlılık ve azaltılmış background reaksiyonları vardır	*Farklı iki hayvandan alınan virüse spesifik IgG'ye ihtiyaç vardır *Teste bir inkübasyon aşaması ekler
DAS-indirekt ABC	yüksek	*Ticari olarak hazırlanan enzim konjugatlar kullanılabilir *Arttırılmış duyarlılık ve azaltılmış background reaksiyonları vardır *DAS-indirekt ELISA'dan 2-3 kat arttırılmış duyarlılık vardır	*Farklı iki hayvandan alınan virüse spesifik IgG'ye ihtiyaç vardır *Teste iki inkübasyon aşaması ekler
RISA	yüksek	*Nicel tespitler yapılabilir	*Işık titresi sayacına ve deneyimli personele ihtiyaç vardır *Radyoizotopların yarı ömrü 60 gündür ve atıkların özel olarak imha edilmelidir
ISIF	düşük	*Virüs antijeninin dağılımı in situ'da yapılabilir	*Nicel tespitler yapılamaz *Oransal olarak yavaştır *Bazen doku otofloresansı oluşabilir *Çok iyi sonuçlar için kristota

Metot	Nispi duyarlılık	Avantajları	Dezavantajları
			ihtiyaç vardır
Dot-immuno binding	orta	*Basit ve hızlıdır *İnkübasyon aşamaları azdır *Ekipman ihtiyacı azdır *24 saatte ya da daha kısa sürede sonuç alınabilir *Az miktarda IgG gereklidir	*Gelişme için reagentların ihtiyaç duyduğu oran tutarsızdır
Amplifiye enzim	çok yüksek	*Ticari olarak hazırlanan enzim konjugatlar kullanılabilir *Arttırılmış duyarlılık ve azaltılmış altyapı reaksiyonları vardır *Arttırılmış duyarlılık DAS-indirekt-ELISA'dan 25 kez daha fazladır	*Sonuçlar değişkendir *Nicel tespitler doğrusal değildir *Reagentlar pahalıdır
Western blot	yüksek	*Kılıf proteinlerin haritalanması polipeptid çalışmasını yararlı hale getirir *Strain farklılığı için farklı antiserum kullanımına imkan sağlar *Proteinlerin katı destekleyicilere bağlanma yeteneği, ticari ELISA testlerinden daha duyarlıdır *2-3 saatte sonuç alınabilir	*Elektroforez ekipmanına ihtiyaç vardır *Nicel tespitlerde eksiklik vardır
SDS : Sodyum dodesil sülfat, SSEM : Serolojik olarak spesifik elektron mikroskop, DAS :Double antibody sandwich, ABC : Abitin-biotin kompleks, RISA : Radio immunosorbent assay, ISIF : In situ immunofluoresans, TEM : Transmission electron microscopy, PTA : Plate-trapped antigen			

Çizelge 1 incelendiğinde, etmenin teşhisinde; SDS-immünodifüzyon, in situ immünofloresans, serolojik spesifik elektron mikroskop, altın immünoetiketli mikroskop ile tespit duyarlılığını arttırmak için enzim amplifiyeli sistem ya da biotin-avidin kompleks kullanımını içeren çeşitli serolojik yöntemler geliştirilmiştir. Farklı avantajlara ve duyarlılık seviyelerine sahip olan bu metotlar, değişik amaçlarda ve uygulamalarda kullanılabilir. Tüm teknikler arasından özellikle DAS-ELISA ve DAS-indirekt sistemlerinin, CTV tespitinde yaygın olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (7).

CTV'nün tespiti için geliştirilen DIBA (Dot immunobinding assay) yöntemi, DAS-ELISA ve DAS- indirekt ELISA yöntemleri ile karşılaştırılmış ve CTV teşhisinde DIBA yönteminin kullanımının ELISA yöntemi kadar kolay olduğu bildirilmiştir (7).

Kullanım Kolaylığı

Bitki virüslerinin tanısında önemli ve etkili olabilecek bir diğer kriter ise, yöntemin ve/veya yöntemlerin kullanılabilirliğidir. Özellikle bitki dokusunu manipüle etmek güç olmadıkça özel bir eğitim gerektirmeyen bazı yöntemler (DTBA, Direct tissue blotting assay) kolaylıkla kullanılabilir.

DAS-ELISA ve DAS-indirekt ELISA yöntemleri, yüksek duyarlılık sağlamakla birlikte, geniş ölçekli indekslemeler için zahmetli ve zaman alıcıdır. Ayrıca, her bir testte büyük hacimli buffer ve antikor kullanma zorunluluğu bulunmaktadır.

CTV'nün tespiti ile ilgili yapılan bir başka çalışmada, DIBA testinin DAS-ELISA kadar duyarlı olduğu fakat kullanılan antiserumların reaksiyona girmesinden dolayı, testte spesifik olmayan bazı etkileşimlerin meydana geldiği gözlenmiştir. Sonuç olarak, CTV tespitinde konvansiyonel DAS-ELISA ya da DAS-indirekt ELISA kullanmak yerine DIBA kullanmanın daha avantajlı olduğu bildirilmiştir. ELISA kadar da hassas olan DIBA basit ve kullanımı kolay bir testtir. Yeterli laboratuvar ekipmanı ve polyclonal antiserum kullanımı ile test 2-3 saatte tamamlanabilmektedir. ELISA ile karşılaştırıldığında, DIBA testinde nicel ölçümlerin eksik olması bir dezavantaj olmakla birlikte, rutin tanı çalışmaları için kullanımı güvenilirdir (7).

Bir başka araştırma, *Cucumber mosaic cucumovirus* (CMV)'nü tespit etmek için, RIPA (Rapid immunofilter paper assay) yöntemini kullanarak gerçekleştirilmiştir. Araştırmada viral belirti gösteren biber, hıyar, kabak, karpuz, kereviz ve tütün bitkisi olmak üzere toplam 64 örnek testlenmiştir. Testlenen örneklerin 37'sinde virüs saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar agar jel çift difüzyon testi ve indikatör bitkideki konukçu reaksiyonları ile de doğrulanmış ve CMV'nü tespit, RIPA testinin hızlı, basit ve spesifik bir teknik olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (8).

Maliyet ve Hızlılık

Virüslerin teşhisinde uygun ve etkili yöntemi seçmek kadar kullanılacak tekniğin maliyet açısından avantajları da önemlidir. Farklı testler kullanarak aynı sonuçların elde edilebileceği durumlarda, genellikle uygun maliyete sahip olanı seçmek daha doğru olmaktadır.

Çizelge 2'de yapılan bir çalışmaya ait değerlendirmede, Yine Çizelge 2'ye bakıldığında, DTBA yöntemi ile, 72 örneğin *Potato Y potyvirus* (PVY) açısından testlenmesinde, 67 dakikalık bir zamana gereksinim duyulurken, ELISA ile aynı işlemlerin 149 dakika sürdüğü gözlenmiştir. Gerekli olan ekipman (membranlar, petri tabakları vd.) maliyetinde ise, ELISA testinin DTBA'dan daha pahalı olduğu tespit edilmiştir (5).

Yine Çizelge 2'ye bakıldığında, DTBA testinin zaman ve emek açısından ELISA'dan pahalı olduğu bununla birlikte, konvansiyonel DAS-ELISA testinin 2-3 günde DTBA'nın ise 1 günde tamamlanabildiği görülmüştür (5).

Yapılan başka bir çalışmada, primer olarak kaplama antikorunun elemine edilmesine ve kullanılan konjugat antikor miktarının azaltılmasına bağlı olarak maliyette %50'lik bir azalma olduğu kaydedilmiştir (Çizelge 3) (5).

ELISA reaksiyonlarını okuyan spektrofotometreler pahalı olmasına rağmen test yaygın olarak kullanılmaktadır (9).

Çizelge 2. ELISA ve DTBA yöntemlerinin süre açısından karşılaştırılması

DAS-ELISA			DTBA		
Fonksiyon	Süre (dk)	İşlemler arasındaki süre (Saat)	Fonksiyon	Süre (dk)	İşlemler arasındaki süre (Saat)
Kırtasiye	10		Kırtasiye	10	
Kıyafet	8	12	Örnek hazırlama/yükleme	24	
Tabak yıkama	2	0.1	Bloklama	2	1
Örnek hazırlama/yükleme	89	12	Konjugat ilavesi	2	2
Tabak yıkama	2	0.1	Tabak yıkama	2	0.75
Konjugat ilavesi	4	1-4	Substrat ilavesi	4	0.5-1
Tabak yıkama	2	0.1	Okuma	8	
Substrat ilavesi	4	1	Final Kırtasiye/Temizlik	14/1	
Okuma	4				
Kırtasiye/Temizlik	14/10				
Toplam	149dk	2-3 gün		67dk	1 gün

Çizelge 3. ELISA ve DTBA yöntemlerinin maliyet açısından karşılaştırılması

Materyal maliyeti			
DAS-ELISA (\$)		DTBA(\$)	
ELISA tabakları	3.40	Membranlar	2.28
Antiserum	9.64	Petri tabağı	0.30
Konjugat	11.40	Konjugat	5.70
Bufferlar	0.30	Bufferlar	0.30
Enzim substrat	0.82	Enzim substrat	0.20
Toplam	25.56	Toplam	8.78

Antiserum seçimi, örneklerin toplanma zamanı ve uygun kit kullanımı gibi faktörler de, serolojik testlerden iyi sonuç alınmasına, ekonomik avantaj sağlanmasına ve işlem sürecinin ksalmasına yardımcı olmaktadır (10).

Bir diğer araştırmada, PAS-ELISA (İndirekt protein A-sandwich) ELISA testi ile, Tobamovirus grubundaki virüs ırkları ve 26 virüs antiserumu kullanılarak 8 virüs arasındaki serolojik etkileşim saptanmaya çalışılmıştır. Yöntemin, diğer ticari testlerden daha az antiseruma ihtiyaç duyması ve IgG ya da virüs pürifikasyonunu gerektirmemesi, serolojik etkileşimlerin tespitinde birtakım avantajlara sahip olduğunu göstermiştir. Fazla sayıda örnek testlenmesi ve çabuk sonuç alınması da testin bir diğer avantajı olarak görülmektedir (11).

Aynı zamanda, Plum pox potyvirus (PPV)'nün kontrolünde, latent taşıyıcılarda ya da belirtiler ayırt edilemediğinde, enfeksiyonun tespiti için ELISA yararlı olmaktadır (12).

Doku imprints kullanarak ELISA yöntemi ile *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWV)'ün tespiti için bir çalışma yapılmıştır. Yöntem, mekanik yolla ya da doğal

olarak TSWV'nün bulaştırıldığı krizantemde, biber ve domateste etmenin tespitine olanak sağladığı gözlenmiştir. DIBA ve biyolojik indeksleme yöntemlerine göre daha duyarlı, hızlı ve güvenilir olan immunoprinting yöntemi çok sayıda örneğin teşhisi için önerilmektedir (13).

Virülfifer böceklerde ve pirinç bitkisinde 10 bitki virüsü pratik olarak tespit etmek için uygulanan 4 serolojik yöntem (ELISA, simplified ELISA, LF, Latex flocculation ve PHA, Passive hemagglutination) karşılaştırılmıştır. Persistent olarak taşınan tüm virüsler bireysel böcek vektörlerinde ELISA ve simplified ELISA ile tespit edilmiştir. Testlerin kolaylığına göre LF, PHA, simplified ELISA ve ELISA şeklinde bir sıralama yapılabileceğine karar verilmiştir. Vektör böcekleri saptamak için kullanılan ezme yönteminde, böcek ELISA tabağındaki çukurda direkt ezilerek testlenir. Direkt ezme yöntemi de dikkate alındığında, simplified ELISA testinin, LF ve PHA yöntemlerine göre daha fazla avantaja sahip olduğu belirtilmiştir (2).

Daha az antikor kullanımı ile, spesifik olmayan reaksiyonları uzak tutarak enfekteli dokularda bitki virüslerinin (özellikle TMV) hızlı tesbiti için DIBA yöntemi modifiye edilmiştir. Bu metotla, *Tobacco mosaic tobamovirus* (TMV)'ün 1 ng'dan daha azı saptanabilmektedir. Yöntem hızlı ve duyarlı olmasıyla, bitki virüs hastalıkları açısından yararlı ve pratik bulunmuştur. Son zamanlarda tanımlanan immünoblotting tekniği ise, monoklonal antikorları testlemek için DIBA yöntemine doğru basitleştirilmiştir. Teknikler, DIBA ile aynı olup dot-ELISA (Nitroselüloz membran üzerinde ELISA) ve NC-ELISA (Nitroselüloz ELISA) adıyla tanımlanmıştır. DIBA'nın prensipleri ELISA ile hemen hemen aynı olup, sadece nitroselüloza giren antikor ya da antijende farklılık vardır ve enzim reaksiyon ürünü çözölememektedir (14).

Almanya'da bir enstitüde üretilen DIBA test kiti (Serion R Immuno Tab) kullanılarak sert çekirdeklielerde dormant dönemde *Prunus necrotic ringspot ilarvirus* (PNRSV) ile *Prune dwarf ilarvirus* (PDV)'ün tespiti için uygulanan DIBA yöntemi, DAS-ELISA ile karşılaştırılmıştır. Her iki test aynı sonuçları vermekle birlikte, ELISA'da 18-20 saatte DIBA testinde ise 165 dakikada sonuç elde edilmiştir. DIBA'nın modifikasyonlarıyla yapılan testlerde, test sürelerinin PDV için 65 dakika, PNRSV için ise 85 dakika kadar kısalmasına olanak sağladığı gözlenmiştir. İnkübasyon süresinin 37 °C'den 21 °C'ye düşmesi etmenlerin tespitinin güvenilirliğini etkilememiştir. DIBA yöntemi kolay ve hızlı olmasından dolayı, virüs tespitinde potansiyel olarak yararlı bir yöntemdir (15,16).

Doğruluk, Tutarlılık ve Duyarlılık

Bir testin kullanılabilirliğinde önemli olan bir başka faktör ise; doğruluk, tutarlılık ve duyarlılıktır. Bununla ilgili olarak yapılan bir çalışmada *Tobacco rattle tobavirus* (TRV) ile bulaşık bir tarladan alınan 82 patates örneği ELISA ve DTBA yöntemleri ile kullanılarak testlenmiştir. ELISA metodu ile 9 örnek, DTBA ile 15 örnek bulaşık olarak saptanmıştır (Çizelge 4) (5).

Cherry leaf mottle nepovirus (CLRV) tespitinde, ELISA ve immunoblotting teknikleri karşılaştırılmıştır. Etmeni saptamada izolatların duyarlılığını karşılaştırmak amacıyla çeşitli serolojik yöntemler değerlendirilmiştir. Virüse spesifik Mab'ler kullanılarak

yapılan PTA-ELISA ve DIBA yöntemlerinin TAS-ELISA ve Western blot testlerine göre daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir (17).

Çizelge 4. Patates dokusunda DTBA ve ELISA ile TRV'nün tespitinin sıklığı

Doku	Örnek sayısı	Pozitif örnek sayısı	
		ELISA	DTBA
Yaprak	23	2	2
Petiol	2	0	1
Kök	18	4	8
Yumru	39	3	4
Toplam	82	9	15

Bitki patolojisi alanındaki araştırma ve teşhis materyallerinde oldukça yararlı olan DIA testlerinin, antijenin düşük konsantrasyonlarının tespit edilebilmesinde güvenilir sonuçlar verdiğı gözlenmiştir. İndirekt ve DAS-DIA yöntemleri rutin teşhisler için yararlı olmuştur. Güvenilirlik, duyarlılık, maliyet ve işgücü açısından ELISA ile karşılaştırılan DIA testlerinde bu yöntemin, bulaşık bitkilerde virüsü saptamada her zaman güvenilir olduğı görülmüştür. İndirekt DIA, ELISA'da olduğı gibi düşük konsantrasyonlarda virüsü tespit edememesine rağmen, yöntemin duyarlılığı birçok amaç için yeterli bulunmuştur. İndirekt DIA, ELISA'dan daha maliyetlidir. Bir örneğin testlenmesi için ihtiyaç duyulan antiserum miktarı DIA yönteminde ELISA'dan daha yüksek olmakla birlikte, antikor solüsyonu en az 6 ay depolanmakta ve hissedilebilir duyarlılık kaybı olmaksızın en az 600 örnek yeniden kullanılabilir. Nitroselüloz alanların bireysel olarak kullanılması durumunda, DAS-DIA ELISA'dan daha fazla sayıda örneğin testlenmesine imkan sağlamaktadır. Nitroselüloz üzerindeki spesifik bir bölgede örneği sınırlandırmak için plastik bir şablon ile bu engel aşılmalıdır. İnkübasyon süresi ELISA'dan daha kısa olan DIA testinde, protein için nitroselüloz membran plastik destekleyicilerden daha büyük bir etkileşime sahip olduğı kaydedilmiştir (9).

Patates virüslerinin tespiti için diagnostik bir araç olarak kullanılabilen DTBA testi, kolay, hızlı, duyarlı olmasının yanı sıra düşük maliyet gerektirmesi açısından da önem kazanmaktadır. Sonuçlar nicel olmasa bile, tanı laboratuvarları ile patates sertifikasyon programlarında fazla sayıda bitkinin izlenmesinde DTBA testi öncelikli bir araç olarak yararlı olabilir (5).

Sonuç

Viral etmenlerin teşhisinde kullanılan serolojik, biyolojik ve moleküler teknikler farklı açılardan incelendiğinde birtakım avantaj ve dezavantajlara sahip oldukları görülmektedir.

Biyolojik test klasik ve hassas bir yöntem olmakla birlikte, gerek indikatör bitkilerin yetişmesi için gerekse inokulasyondan sonra bitkilerden sonuç alınmaya kadar geçen sürenin uzun olması bir dezavantaj olarak görülmektedir.

Serolojik teşhis yöntemlerinden biri olan ELISA testi, 10 yıldan daha fazla bir süredir bitki virüs hastalıklarının tanısı için yaygın kullanım alanına sahip bir metot haline gelmiştir. Patateste virüsten ari sertifikasyon programlarında ve fidanlık stoklarındaki virüsleri elemine etmek amacıyla monoklonal antikorlar kullanılarak yapılan ELISA testi, başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Nükleik asit hibridizasyon metodundan daha az duyarlı olan ELISA testi, büyük ölçekli tarla örneklerinin rutin testlenmesinde çok yararlıdır. Biyolojik indeks testi ise, ELISA'dan daha duyarlıdır fakat işlemin tamamlanma süreci uzun olduğu için büyük ölçekli indekslemelerde problemler meydana gelebilmektedir (18).

Bu tür problemleri minimum seviyede koruyabilmek amacıyla teşhis için alternatif yöntemler kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan biri olan immunodifüzyon yöntemi ELISA'dan sonra ikinci popüler teknik olmuştur. Homolog ve heterolog antijenler arasında görülür bir ayrım ile farklı viral strainler ve türler arasında karşılaştırma imkanı sağlayan bu yöntemde, presipitin hatlarının farklı oluşumları gözlenebilir. Intrajel çapraz absorpsiyon tekniği özellikle viral serotipler arasındaki küçük antijenik farklılıkların varlığını açıklamak için yararlıdır. Üçüncü bir teknik ise, işlenmemiş bitki özsuundaki virüslerin büyük ölçekli testlenmesine uyarlanmış olan dot-blot yöntemidir (18).

Gerek araştırma çalışmalarında gerekse karantina analizlerinde önemli olabilecek kritik nokta, viral etmenlerin teşhisinde etkili ve uygun teşhis metodunu seçebilmektir. Dolayısıyla, kısa sürede sağlıklı ve güvenilir sonuçlar elde etmek suretiyle uygun mücadele programlarının uygulamaya aktarılmasına da imkan sağlanmış olunacaktır. Bununla birlikte, çok sayıda örneğin testlenmesi için gerekli olan süre de korunmuş olacaktır.

Kaynaklar

1. Graddon, D.J. and Randles, J.W., 1986. Single antikor dot immunoassay- A simple technique for rapid detection of a plant virus. *Journal of Virological Methods*. 13, 63-69.
2. Takahashi, Y., Omura, T., Shohara, K. and Tsuchizaki, T., 1991. Comparison of four serological methods for practical detection of ten viruses of rice in plants and insects. *Plant Disease*. 75 :5, 458-461.
3. Tonukari, N.J., 2003. Serological versus molecular diagnosis. *African J. of Biotech.* 2 (7). 169-170.
4. Järvekülg, L., Söber, J., Sinijärv, R., Toots, I. and Saarma, M., 1989. Time-resolved fluoroimmunoassay of potato virus M with monoclonal antibodies. *Annual Applied Biology*. 114, 279-291.
5. Samson , R.G., Allen, T.C. and Whitworth, J.L., 1993. Evaluation of direct tissue blotting to detect potato viruses. *American Potato Journal*. 70. 257-265.
6. Rocha-Penă, M.A. and Lee, R.F., 1991a. Serological techniques for detection of citrus tristeza virus. *Journal of Virological Methods*. 34, 311-333.
7. Rocha-Penă, M.A., Lee, R.F. and Niblett, C.L., 1991b. Development of a dot-immunobinding assay for citrus tristeza virus. *Journal of Virological Methods*. 34, 297-309.
8. Choi, G., YongMun, C., SeonYoung, W., MyoungSoon, Y., Choi, GS., Choi, YM., Won, SY. and Yiem, MS., 1998. Detection of cucumber mosaic virus using rapid immunofilter paper assay. *RDA Journal of Crop Protection*. 40 :2, 115-119.

9. Powell, C.A., 1987. Detection of three plant viruses by dot-immunobinding assay. *Phytopathology*. 77: 2, 306-309.
10. Borgo, M., 1990. Serological determination of grapevine fanleaf nepovirus and grapevine leafroll closterovirus by ELISA testing of grapevine wood samples. *Rivista di Viticoltura ed Enologia*. 43 :3, 3-13.
11. Hughes, J.D.A. and Thomas, B.J., 1988. The use protein A-sandwich ELISA as a means for quantifying serological relationships between members of the tobamovirus group. *Annals of Applied Biology*. 112 : 1, 117-126.
12. Rankovic, M. and Vuksanovic, S., 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plum pox virus. *Zastita Bilja*. 32 : 1, 55-60.
13. Bo, E- dal., Sanchez, ME., Chiarrone, G., Ronco, L. and Dal, Bo-E., 1995. Detection of tomato spotted wilt virus (TSWV) by ELISA using tissue imprints. *Investigacion Agraria, Produccion y Proteccion Vegetales*. 10 : 1, 133-138.
14. Hibi, T. and Saito, Y., 1985. A dot immunobinding assay for the detection of Tobacco Mosaic Virus in infected tissues. *Journal of General Virology*. 66, 1191-1194.
15. Fuchs, E., Otto, F. and Hermann, G., 1991. Detection of several plant viruses by means of a dot-immunobinding assay. *Archiv fur Phytopathologie und Pflanzenschutz*. 27 : 4, 267-271.
16. Otto, F, Fuchs, E. and Hermann, G., 1991. Detection of prune dwarf virus and prunus ringspot virus by means of a rapid variant of the dot-immunobinding assay. *Archiv fur Phytopathologie und Pflanzenschutz*. 27 : 4, 273-278.
17. James, D. and Mukerji, S., 1996. Comparison of ELISA and immunoblotting techniques for the detection of Cherry mottle leaf virus. *Annals of Applied Biology*. 129
18. Van Regenmortel, M.H.V. and Dubs, M.C., 1993. Serological Procedures. *Diagnosis of Plant Virus Diseases*. Ed. by R.E.F., Chapter :7, 159-214. Matthews,:1, 13-23.