

Bitki patojenlerinin tespitinde klasik pcr yöntemi yaygın olarak kullanılmakla beraber moleküler tekniklerdeki gelişmelere paralel olarak değişik PCR'a dayalı yöntemler hastalık etmenlerinin tespitinde kullanım alanı bulmuştur.

Bio PCR

Tohumla taşınan fungal hastalık etmenleri genellikle değişik kısımlarda düşük miktarlarda bulunabilmekte ve bu sebeple patojen DNA'sının PCR ile tespiti mümkün olmayabilmektedir. Bu kapsamda yüksek hassasiyete sahip 'BİO PCR' yöntemi geliştirilmiştir (Schaad vd. 1995).

Yöntem, tohum dokularındaki fungal patojen miktarını artırmak için ön inkübasyon aşaması içermekte ve daha sonra DNA ekstraksiyonu ve PCR reaksiyonu ile patojen tespiti yapılmaktadır. Bu yöntemin fungal etmenlerin teşhisinde etkili bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Munkvold 2009). Ancak bu yöntemde inkübasyon esnasında hastalık etmeninin diğer saprofit organizmalar tarafından baskılanması bu PCR yöntemindeki en önemli engel olarak karşımıza çıkmaktadır.

PCR öncesinde tohumlar filtre kâğıdı arasında veya petri kaplarında nemli koşullarda inkübasyona tabi tutulmaktadır. Ortamda besin olmaması, tohum yüzeyinde çok az veya hiç bakteri olmadan fungus gelişimine izin vermektedir. Hedef patojenin gelişmesi ve saprofitik fungusların engelleme oranını belirlemek için inkübasyon periyodunun süresi önem taşımaktadır.

BİO PCR geleneksel PCR'a göre oldukça avantajlı bir yöntemdir. Yüksek hassasiyet, PCR inhibitörlerinin engellenmesi, sadece canlı organizmaların tespit edilebilmesi ile ölü dokulardan elde edilen yanlış sonuçlardan kaçınılmasını sağlamaktadır. Klasik PCR'a göre dezavantajları ise seçici ortam kullanılması ile daha maliyetli olmasıdır. Bununla birlikte fungus kültürlerinin gelişmesi zaman almaktadır (Marcinkowska 2002).

Nested PCR

PCR spesifitesini arttırmak için geliştirilen bir diğer yöntem Nested PCR'dır. Non-spesifik bağlanmaları ortadan kaldırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem birbirini izleyen iki PCR reaksiyonundan oluşmaktadır. İlk amplifikasyonda elde edilen PCR ürünü ikinci primer seti ile tekrar amplifiye edilmektedir. İlk uygulamada hedef patojenin genomu içerisindeki bir bölge spesifik olarak çoğaltılmakta, ikinci uygulamada ise ilk amplifiye edilen bölgenin iç kısmına

primer çifti bağlanarak daha küçük bir hedef bölgenin çoğaltılmasını sağlamaktadır (Şekil 2.1). Yöntemin PCR hassasiyetini 10^4 kat arttırdığı belirtilmektedir (Sevindik ve Murathan, 2013).

RT PCR

mRNA ve viral RNA gibi RNA dizilerinin amplifikasyonu amacıyla kullanılır. Bu PCR çeşidinde bir reverse transkriptaz enzimi ve DNA primeri kullanılır. Öncelikle RNA revers transkriptaz enzimi ile RNA tamamlayıcı DNA'ya (complementary DNA: cDNA) çevrilir . Daha sonra standart PCR kullanılarak çoğaltma işlemi yapılır

PCR-RFLP

Restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA'nın farklı büyüklükteki fragmentlere ayrılması RFLP (Restriktion Fragment Length Polymorphism) olarak adlandırılır. İlk olarak spesifik primerler kullanılarak belirli bir DNA bölgesi (ITS, IGS vb.) çoğaltılır. Hedef DNA üzerinde yaklaşık 5-10 baz uzunluğunda belirli bir nükleotid dizisini tanıyarak belirli noktadan kesim yapan Restriksiyon enzimleri kullanılır. Restriksiyon enzimleri çift zincirli DNA'nın sadece spesifik baz dizilerini tanımakta ve diziyi bu bölgelerden kesmektedir.

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD):

Genetik marker olarak kullanılabilen amplifikasyon ürünleri oluşturmak için kısa, rasgele sentezlenen 9-10 bp lik oligonükleotit primerler ile gerçekleştirilen RAPD yöntemi ilk kez 1990 yılında Williams *et al.* tarafından bulunmuştur. Bu yöntemde amplifikasyonlar total genomik DNA üzerinde gerçekleştiği için RAPD analizi tek bir genetik bölge içindeki varyasyondan ziyade tüm genomdaki genetik varyasyonun değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Amplifikasyon koşullarına bağlı olarak farklı DNA ürünleri meydana gelmekte ve her amplifikasyon ürünü genomik DNA ile kullanılan primerler arasındaki kısmi sekans benzerliklerini göstermektedir .

Inter-simple sequence-repeat (ISSR) polymorphism

Bu yöntem genetik farklılıkların araştırılmasında, genom haritalamasında filogenetik araştırmalarda evrimsel biyoloji alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu metotta basit sekans tekrarları ISSR bölgelerini amplifiye etmek için primer olarak kullanılmaktadır. Temel

olarak ISSR tekniği karşıt iplikçiklerde bulunan iki aynı mikrosatellit tekrar bölgesi arasındaki DNA segmentinin amplifikasyonuna dayanan bir PCR metodudur.

Real time PCR

Real time PCR hedef DNA amplifikasyonunun eş zamanlı olarak değeriendirilmesine olanak sağlayan hızlı ve hassas bir yöntemdir. Yöntemde her döngü sonrasında oluşan ışımaya eş zamanlı olarak değeriendirilerek patojen miktarındaki değerişimler görünlenebilmektedir. Klasik PCR'a göre önemli üstünlükleri bulunmaktadır. İlk olarak Real time PCR, klasik PCR'da olduğu gibi PCR sonrası işlemler (elektroforez) gerektirmemektedir. Ayrıca daha yüksek seviyede etkinlik ve hassasiyet ile daha kısa DNA fragmentlerinin çoğaltılmasına olanak sağlamaktadır (Garrido vd. 2009, Okubara vd. 2005). Bu yöntem başta önemli karantina etmenleri olmak üzere birçok hastalık etmeninin tespitinde yaygın bir kullanım alanı bulmuştur.

Real time PCR'ın en önemli özelliği kantitatif analiz yapmasıdır. Hedef DNA'nın zaman içerisinde miktarında meydana gelen değerişimi kesin bir şekilde tespit etme imkânı sunmaktadır. Tespit için farklı kimyasallar bulunmasına rağmen bitki patojeni fungusların tespitinde daha çok SYBR green teknolojisi tercih edilmektedir. Multiplex Real time PCR gibi farklı teknikler ile birden fazla patojen teşhis edilebilmektedir. Yöntemin temelini raporter moleküllerin oluşturduğu floresan miktarının ölçümü oluşturmaktadır. Her döngü sonucunda ortaya çıkan floresan ışımaya kaydedilerek reaksiyon tüpünde oluşan ilk anlamlı artış eksponensiyal fazdan itibaren görünlenebilmektedir.

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

Floresan in situ hibridizasyon (FISH), patojenlerin ribozomal RNA bölgelerini hedef alan spesifik problemlerin kullanımı ile kültüre alınmadan doğrudan floresan veya konfokal mikroskop ile tanımlanmasını sağlayan bir yöntemdir. Spesifik ve duyarlı olmasının yanısıra kısa sürede tür düzeyinde ayırım yapmaya olanak sağlamaktadır (Amann 1995). Fish yöntemi tıbbi genetik, patojen tespiti, biyoteknoloji ve moleküler ekoloji gibi bilim dallarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Yöntemin en büyük avantajlarından birisi nükleik asit dizilerini hücre bütünlüğü bozulmadan inceleme imkânı sunmasıdır. Hedef alınan bölgeye spesifik floresan işaretli problemler, hücre

içerisinde hedef gen ile hibridize olmakta ve daha sonrasında patojenler floresan mikroskopta tespit edilmektedir (Zwirgmaier 2005, Amann vd. 1995).

Next generation

Yeni nesil dizileme yöntemi tüm genom, transkriptom, DNA-protein interaksyonunu ortaya koymak için uygulanabilen geniş kapsamlı bir teknolojidir. Biyolojik araştırmaların hızlı bir şekilde yapılmasına olanak sağlamaktadır. Günümüzde farklı yeni nesil sekanslama teknolojileri geliştirilmiştir. Bunlar 454 GS20 pirodizileme (Roche Applied Science), Solexa 1G (Illumina, Inc.), SOLiD (Applied Biosystems), Heliscope (Helicos, Inc.) ve Ion Torrent teknolojileridir. Yeni nesil sekans teknolojilerinin en büyük avantajı DNA parçalarının klonlanmasına gerek olmadan amplifiye olmuş tek zincir DNA üzerinden dizi verilerinin elde edilmesidir. En büyük dezavantajı ise yüksek maliyet gerektirmesi ve elde edilen verilerin değerlendirilmesi için gelişmiş bilgisayar yazılımlarına ihtiyaç duyulmasıdır.

Yeni nesil sekanslama 3 temel adımda gerçekleştirilmektedir. İlk olarak DNA rastgele kesilmektedir. Daha sonra universal adaptörler kesilen DNA fragmentlerine bağlanmakta ve bu fragmentler çoğaltılmaktadır (Shendure ve Ji, 2008). Dizileme 3 şekilde yapılmaktadır: sentez aracılığıyla, ligasyon aracılığıyla ve tek molekül dizileme. Bu dizileme şekilleri arasında okuma uzunluğu, hata oranı, verim açısından farklılıklar bulunmaktadır.

LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), özel olarak tasarlanan 4 primer seti ve DNA polimeraz kullanılarak izotermal koşullar altında hedef DNA'nın yüksek özgünlükte, etkinlikle ve hızlı bir şekilde amplifiye eden güçlü ve yenilikçi bir nükleik asit amplifikasyon yöntemidir (Notomi vd. 2000, Parida vd. 2008, Tomita vd. 2008). Bir saatten daha az sürede hedef DNA'nın 10^9 'dan 10^{10} 'a kadar kopyası oluşturulabilmektedir. Hızlı amplifikasyonun yanısıra bulaşıcı hastalıkların izlenmesinde çok yönlü ekipmanlara ve deneyimli personele ihtiyaç duyulmadan klinik teşhislerin uygulanmasına olanak sağlamaktadır. Yöntem ilk olarak Notami ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır ve hepatit B virüsünün tespiti için değerlendirilmiştir (Notomi vd. 2000). LAMP yöntemi daha çok bakteri, virüs ve parazit etmenin tespitinde kullanılmasına rağmen tohumlarda patojen olan fungusların hızlı tespitinde yaygın kullanım alanı bulmuştur (Mancini vd. 2016).

Magnetic capture hybridization (MCH) PCR

MCH PCR patojen DNA'sının oldukça düşük miktarda olan örneklerde, klasik DNA ekstraksiyonlarında patojen DNA'sının izole edilememesi ve PCR inhibitörlerinden dolayı karşılaşılan negatif sonuçların azaltılması için geliştirilmiş PCR yöntemidir. Bu yöntemde ilk olarak biyotin ile etiketlenmiş patojene spesifik problemlerin manyetik boncuklarla kaplanarak hedef DNA'ya bağlanması sağlanmaktadır. Bu amaçla örnek süspansiyonu 100 °C de inkübe edilerek çift sarmal patojen DNA'sının tek sarmal hale gelmesi sağlanmakta ve manyetik boncuklarla kaplı problemler tek sarmal DNA' lara bağlanmaktadır. Daha sonrasında bu şekilde hibridize edilen prob-patojen DNA'sı, üzerlerinde bulunan manyetik boncukların özel mıknatıslar ile tutulması ile tüpün cidarında toplanmaktadır. Bu şekilde klasik yöntemlerle karşılaştırıldığında hedef DNA'nın kayıpları engellenerek düşük miktarlardaki patojen DNA'sının diğer moleküllerden ayrılması sağlanmaktadır. Hazırlanan DNA örnekleri daha sonra PCR amplifikasyonunda kullanılmakta ve spesifik primerler kullanılarak hedef DNA tespit edilebilmektedir.

DNA array hybridization

DNA array teknolojisi naylon filtre (macroarray) veya cam lam (microarray) üzerinde sabitlenmiş oligonükleotid problemlerden oluşmaktadır. Microarray genellikle daha sık prob noktalarına sahip olmasına rağmen her iki array teknolojisi de türe spesifik problemler ve türlerin ayrımı için gerekli varyasyonu sağlayan sekans bölgeleri ile etiketlenmiş PCR ampliconları arasındaki hibridizasyona bağlı olmaktadır. Yüksek ayırım potansiyeli ile iki ampliconda tek nükleotid farklılığını (SNP) ortaya koyulmaktadır (Lievens vd. 2006, Zhang vd. 2008). Gen ifade profillemesi, hastalıkların tanısı, SNP tespiti, gen tanımlama, patojen tespiti gibi alanlarda kullanılmaktadır. Aynı zamanda array teknolojisi, DNA chips, biochips, gene chips, gene arrays, genome chips, genome arrays gibi farklı isimlerle de bilinmektedir.