

# POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) VE BİTKİ BİYOTEKNOLOJİSİNDE YAYGIN UYGULAMALARI

Suat YILMAZ

Zübeyir DEVRAN

Narenciye ve Seracılık Araştırma Enstitüsü, Antalya

## ÖZET

Polimeraz zincir reaksiyonu bitki biyoteknoloji çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir metottur. Teknik, *in vitro* koşullarında oligonükleotid primerler kullanılarak DNA polimeraz enzimi tarafından DNA'nın çoğaltılmasıdır. Kısa süre içerisinde çok küçük bir miktar DNA baz dizisinden milyonlarca defa DNA parçacığı çoğaltmak mümkündür. Tekniğin en önemli özelliği; hızlı, güvenli ve spesifik olmasıdır. Bu özelliğinden dolayı, bitki biyoteknolojisinde çok farklı alanlarda kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları; gen klonlaması, patojenlerin teşhis ve tespiti, gen aktarılmış bitkilerin ve DNA baz dizilerinin belirlenmesidir.

**Anahtar Kelimeler:** PCR, PCR metotları, PCR optimizasyonu, bitki biyoteknolojisi

## POLYMERASE CHAIN REACTION AND COMMON APPLICATIONS IN PLANT BIOTECHNOLOGY"

### ABSTRACT

Polymerase chain reaction (PCR) is one of the most widespread used method in plant biotechnology. Technique is an *in vitro* enzymatic reaction in which small DNA fragments can be amplified by DNA polymerase enzyme using oligonucleotide primers. In a very short time, millions of DNA fragments can be amplified from a very small amount of DNA sequences. The most important advantages of PCR is to be fast, reliable, and specific. Therefore; PCR is used in very different areas of plant biotechnology. Some of them are gene cloning, detection and identification of plant pathogens, screening of transgenic plants and sequencing of DNA fragments.

**Keywords:** PCR, PCR methods, PCR optimization, plant biotechnology

## 1. GİRİŞ

Hızla artan dünya nüfusuna paralel olarak insanoğlu, birim alandan daha kaliteli, yüksek verimli, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklı ürün elde etmeyi amaçlamaktadır. Bunun için dayanıklılıktan sorumlu genlerin, klasik ıslah çalışmalarıyla veya gen aktarma yöntemleriyle istenilen bitkilere aktarılması ve aktarılan bireylerinde hızlı şekilde belirlenmesi gerekmektedir. Bununla birlikte kültür bitkilerinde dayanıklılık genlerini kimi durumlarda kıran patojenlerin ve zararlıların da hızlı ve güvenli şekilde teşhisi çok önemlidir. Bunlar yeni tekniklerin geliştirilmesi ve uygulamaya aktarılmasıyla başarılabilmektedir. Bu tekniklerin en önemlilerinden biriside PCR'dır. Teknik ilk bulunduğu 1985 yılından itibaren

hızlı bir gelişme göstermiş ve günümüzde bitki biyoteknolojisinin her alanında yaygın şekilde kullanılmaktadır (Innis ve Gelfand 1990; Mullis 1990; Henson ve French, 1993).

Bu makalede; PCR'ın temel prensipleri, optimizasyonu, farklı PCR metotları ve bitki biyoteknolojisinde uygulama alanları hakkında bilgi verilmiştir.

## 2. PCR'IN TEMEL PRENSİPLERİ

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), *in vitro* koşullarında DNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. PCR; basit, spesifik ve hassas bir tekniktir (Saiki ve ark, 1985; Mullis, 1990). PCR tekniği, temelde üç aşamadan oluşmaktadır.

### **2.1. DNA Zincirinin Açılması (Denaturation):**

Kalıp DNA (template DNA), 92-95 °C'de 1-2 dakika tutularak çift sarmal yapıdaki DNA iplikçikleri birbirlerinden ayrılmaktadır. DNA zincirini ayırmak için, bazı durumlarda 5-10 dakika ön ısıtma yapmak gerekebilir (Watson ve ark., 1992; Hadidi ve ark., 1995).

### **2.2. Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması (Annealing):**

Reaksiyon sıcaklığının, 37-65 °C'ye düşürülerek oligonükleotid primerlerinin açılan DNA zincirlerinin kendi baz dizilerine karşılık gelen bölgeye yapışması işlemidir. Bu işlem, üretilecek baz uzunluğuna bağlı olarak 30-60 saniyede gerçekleşmektedir (Innis ve Gelfand 1990).

### **2.3. Primer Uzaması (Primer Extension):**

DNA zincirleri üzerine yapışan primerlerin DNA polimeraz enzimi (Taq DNA polymerase) vasıtasıyla uzatılmasıdır. Taq DNA polymerase 72 °C sıcaklıkta daha iyi çalıştığı için genel olarak tüm çoğaltma işlemleri bu sıcaklıkta yapılmaktadır (Erlich ve ark. 1991). PCR sonucunda elde edilen ürün, çoğaltılması hedeflenen DNA parçası ile iki primerin toplam uzunluğu kadardır (Hadidi ve ark., 1995). Üç basamaktan (denaturation, annealing, primer extension) oluşan işlem, bir PCR devrini temsil eder. Bu işlem, genel olarak 25 ile 40 defa tekrar edilerek başlangıçtaki DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA parçası çoğaltılır. PCR sonucunda elde edilen DNA parçacıkları agaroz veya poliakrilamid jellerde yürütüldükten sonra, ethidium bromide (EtBr) veya gümüş nitrat (GN) ile boyanarak gözlemlenir (Hadidi ve ark., 1995).

## **3. PCR OPTİMİZASYONU**

PCR teknolojisinin gelişmesiyle çok farklı PCR uygulamaları da ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, yeni PCR uygulamasının düzenli ve optimum bir şekilde çalışması için her laboratuarda yeniden ayarlanması gerekmektedir (Hadidi ve ark., 1995). Eğer PCR şartları yeni PCR uygulaması için uygun bir şekilde yeniden ayarlanmazsa bazı problemlerle karşılaşılabilir (Innis ve Gelfand 1990; Erlich ve ark., 1991; Hadidi ve ark., 1995). Bu problemler;

1. PCR'dan beklenen ürün ya az alınır yada hiç alınmaz
2. Primerlerin yanlış bağlanmasından dolayı spesifik olmayan bantlar oluşabilir.
3. Primerler yanlış şekilde uzayabilir
4. Primer-dimer oluşumu ortaya çıkabilir ve bu oluşumlar çoğaltma işlemini yavaşlatır.
5. Yeni sentezlenen DNA dizilerinde mutasyon veya istenilenden farklı diziler ortaya çıkabilir.

### **3.1. PCR Çalışma Şartlarını Etkileyen Faktörler**

#### **3.1.1. Enzim Konsantrasyonu:**

Diğer PCR şartları optimum seviyede olduğu zaman 100 µl reaksiyon için önerilen Taq DNA polimeraz enzim konsantrasyonu 1-2.5 ünitedir. Fakat enzim gereksinimi kullanılan kalıp DNA veya primere göre değişebilir. Enzim konsantrasyonu düşük olursa elde edilecek ürün (DNA) az olur. Enzim konsantrasyonu yüksek olursa spesifik olmayan bantlar ortaya çıkabilir (Innis ve Gelfand, 1990; Erlich ve ark. 1991; Yang ve ark., 1992).

### **3.1.2. Magnezyum Konsantrasyonu:**

PCR uygulamalarında magnezyum (Mg) iyon konsantrasyonunu ayarlamak çok önemlidir. Çünkü Mg konsantrasyonu primerlerin açılan DNA zincirlerine yapışmasını, kalıp DNA'nın açılma sıcaklığını, PCR sonucunda elde edilen DNA kalitesini, primer-dimer bağ oluşumlarını, enzim aktivitesi ve güvenilirliğini etkilemektedir. Ayrıca, *Taq* DNA polimeraz enziminin iyi bir şekilde çalışabilmesi için; kalıp DNA, primerler ve nükleotid bazları üzerinde serbest Mg iyonlarının bulunması gerekir. Bu yüzden 0.5-2.5 mM arasında Mg iyonlarının dNTP konsantrasyonu içerisinde bulunması gerekmektedir (Innis ve Gelfand, 1990; Hadidi ve ark., 1995).

### **3.1.3. Deoksinükleotid Trifosfatlar (Deoxynucleotide Triphosphates=dNTPs)**

Her bir deoksinükleotid (A, G, C, T) konsantrasyonu 20- 200 µM arasında olduğunda genellikle PCR uygulamalarından iyi sonuç alınabilmektedir. Bu dört bazın konsantrasyon içerisindeki oranı eşit olmalıdır. Başlangıç stok solüsyonu 10 mM kadar seyreltikten sonra, küçük hacimlere ayrılarak -20 °C de saklanmalıdır. dNTP konsantrasyonunun yüksek olması yeni sentezlenen DNA dizilerinde istenilenden farklı dizilerin (misincorporation) hatalı olarak ortaya çıkmasına sebep olabilir. Bu yüzden mümkün olduğu kadar düşük konsantrasyonda dNTP'leri kullanmak PCR spesifikliğini ve güvenilirliğini artırmaktadır (Innis ve Gelfand, 1990; Hadidi ve ark., 1995; Weising ve ark., 1995).

### **3.1.4. Diğer Reaksiyon Unsurları:**

PCR uygulamalarında genel olarak 10-50 mM arasında Tris-HCl tampon çözeltisi (pH 8.3-8.8) kullanılır. Bu

tampon çözeltinin 20 °C de pH'sı 6.8 ile 7.8 arasında değişir. PCR karışımı içerisine 50 mM KCl ilave edilirse primer bağlanmasını kolaylaştırır. Fakat 50 mM'ın üzerindeki KCl veya 50 mM NaCl *Taq* DNA polimeraz aktivitesini engeller. Ayrıca, PCR solüsyonuna Jelatin (gelatin), bovine serum albumin veya Tween 20 deterjanı eklenirse enzimin daha iyi çalışmasına yardımcı olurlar. Fakat bu maddeler eklenmeden de PCR protokolleri çok iyi bir şekilde çalışabilmektedir (Innis ve Gelfand, 1990; Demeke ve Adams 1992; Henson ve French 1993).

### **3.1.5. DNA Zincirinin Açılması İçin Gerekli Zaman ve Sıcaklık:**

PCR uygulamalarında sistemin çalışmamasının en önemli sebeplerinden birisi kalıp DNA zincirinin veya üretilen DNA parçacığının yeterince açılmamasıdır. Genel olarak DNA moleküllerinin 95 °C de 2 dakika tutulması zincirin açılması için yeterli olmaktadır. Fakat GC bazlarınca zengin kalıp DNA zincirlerinde bu süre ve sıcaklığın fazla olması istenmektedir (Innis ve Gelfand, 1990; Erlich ve ark., 1991).

### **3.1.6. Primerlerin Açılan DNA Zincirlerine Yapışması:**

Primerlerin açılan DNA zincirlerine yapışması için gerekli sıcaklık derecesi ve zaman aralığı primerlerin konsantrasyonu, elde edilecek DNA'nın uzunluğu ve kullanılan bazların kompozisyonuna göre değişir. Primerlerin kalıp DNA'ya bağlanması 37- 65 °C sıcaklıklarda gerçekleşir. Primerler açılan DNA'ya bağlanması sırasında sıcaklığın artırılması DNA seçiciliğini artırmaktadır. Dolayısıyla primerlerin yanlış yerlere bağlanması ve hatalı DNA dizilerinin elde edilmesi önlenmiş olmaktadır. Özellikle PCR işleminin ilk birkaç devrinde sıcaklığın

artırılması PCR uygulamasının hassasiyetini çok yükseltmekte ve spesifik olarak beklenen DNA parçacıkları sentezlenmektedir. Sıcaklığın düşürülmesi primerlerin hatalı şekilde uzamasına ve yeni sentezlenen DNA dizilerinde hatalı baz bağlanmalarına sebep olmaktadır (Innis ve Gelfand, 1990; Dieffenbach ve ark., 1993; Kwok ve ark., 1994).

### **3.1.7. Primer Uzunluğu, Konsantrasyonu ve Yapısı:**

Primer konsantrasyonunun 0.1-0.5 µM arasında olması sistemin iyi çalışmasını sağlamaktadır. Yüksek primer konsantrasyonu primerlerin yanlış bağlanmasına ve spesifik olmayan DNA bantlarının üretilmesine sebep olur. Ayrıca primer-dimer oluşumunu teşvik ederek elde edilecek ürünün (DNA) az olmasına sebep olmaktadır. Tipik primer uzunluğu 16-30 baz arasında değişmekte fakat genel olarak 18-24 baza (nükleotid) sahip primerler eğer primer yapışma sıcaklığı (T<sub>m</sub>) da iyi ayarlanmış olursa çok spesifik ürün elde edilebilmektedir. Ancak daha kısa (14 bazdan aşağı) primerlerde bazı özel amaçlar için kullanılmaktadır (Innis ve Gelfand, 1990; Dieffenbach ve ark., 1993; Kwok ve ark., 1994).

Primerlerin baz dizilişinde Guanin, Citosin (GC) miktarı ve primerlerin yapışması için gerekli sıcaklık miktarı (T<sub>m</sub>) arasında çok iyi bir ilişki kurmak gerekir. Bu denge sağlanmadığı takdirde PCR uygulamalarından iyi sonuç almak mümkün olmamaktadır. Bu bakımdan primer dizilerinde GC bazlarının toplam oranı % 50 veya daha yukarı olması istenmektedir. Örneğin bir primerin baz dizisinde GC oranı % 50 ve T<sub>m</sub> değeri 56-62 °C arasında olursa bu primerin sorunsuz bir şekilde çalışması beklenir. Primerlerin açılan DNA kalıplarına hatasız bir şekilde bağlanabilmesi için yapışma sıcaklığının iyi hesaplanması

gerekmektedir. Primerlerin yapışma sıcaklığını hesaplamak için bir formül geliştirilmiştir. Bu formül  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$  şeklinde ifade edilmiştir. Burada T<sub>m</sub> yapışma sıcaklığını, G,C,A ve T ise nükleotid bazlarını ifade etmektedir (Innis ve Gelfand, 1990; Dieffenbach ve ark., 1993).

Primerlerin 3' uçlarındaki baz dizilişi, primerin yanlış veya doğru yere bağlanmasını belirlemektedir. Eğer aşağı ve yukarı yönlü (upstream ve downstream) primerlerin karşılıklı olarak 3' uçlarında birbirlerine bağlanabilecek baz dizilişi (complementarity) mevcut olur ise bu durum istenmeyen primer-dimer oluşumlarına sebep olmaktadır (Innis ve Gelfand, 1990).

### **3.1.8. Primer uzaması:**

Primerlerin DNA polimeraz tarafından uzatılması için gerekli zaman, çoğaltılması hedeflenen kalıp DNA parçasının uzunluğu, kalıp DNA'nın konsantrasyonu ve ortam sıcaklığına bağlı olarak değişmektedir. Genel olarak primer uzatılma işlemi 72 °C de yapılmaktadır. Çünkü bu sıcaklık *Taq* DNA polimeraz enziminin iyi çalışması için uygun bir ortam oluşturmaktadır. Primerlerin uzatılması için gerekli süre ise baz uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir (Innis ve Gelfand, 1990; Dieffenbach ve ark., 1993).

### **3.1.9. Devir sayısı:**

PCR'ın çalışma şartları iyi ayarlandığı takdirde 25-40 devir sayısı yeterli olmaktadır. Devir sayısı çoğaltılacak kalıp DNA miktarı ile yakından ilişkilidir. Devir sayısının fazla olması spesifik olmayan bantların ortaya çıkmasına, devir sayısının az olması üretilen DNA miktarının az olmasına sebep olmaktadır (Innis ve Gelfand, 1990; Watson ve ark., 1992).

## **4. PCR METOTLARI**

PCR tekniğinin bulunmasından bu yana teknolojiye çok hızlı gelişmeler olmuş ve buna bağlı olarak da çok farklı PCR metotları geliştirilmiştir.

#### **4.1. Çoğaltılması İstenen DNA Dizisinin Bilindiği Durumlarda Kullanılan PCR Metotları:**

Bu tip PCR metotlarında çoğaltılması hedeflenen DNA dizisinin sekans yapısı bilimektedir. Oligonucleotide primer çifti kullanılarak çift sarmal DNA dizileri *Taq* DNA polimeraz enzimi tarafından 5'→3' yönünde okunmaktadır (Innis ve Gelfand, 1990; Dieffenbach ve ark., 1993).

##### **4.1.1. Standart PCR (Standart PCR):**

Temel PCR'ı içermektedir. Bir PCR reaksiyonu için, 0.5 ml'lik PCR tüpü içerisinde 100 µl'lik bir reaksiyon oluşturmak için genel olarak aşağıda belirtilen kimyasallar tüpe ilave edilmektedir:

Kalıp DNA (10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> hedef molekül)  
20 pmol yukarı yönlü (upstream) primer  
20 pmol aşağı yönlü (downstream) primer  
20 mM Tris-HCl (pH 8.3) (20 C)İ  
1.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
25 mM KCl\*  
0.05 % Tween 20\*

50 µM dNTPs  
2 unite *Taq* DNA polimeraz enzimi  
Kalan miktar steril suyla 100 µl ye tamamlanır (Innis ve Gelfand, 1990).

\* Bunlar reaksiyona eklenmese de PCR reaksiyonu çalışır.

##### **4.1.2. Ters Transkriptaz PCR (Reverse Transcriptase PCR, RT-PCR):**

Çoğaltılması hedeflenen RNA (mRNA, tRNA, viral RNA veya viroid RNA'sı) önce ters transkriptaz enzimi ile tamamlayıcı DNA'ya (complementary

DNA: cDNA) çevrilir ve daha sonra standart PCR kullanılarak çoğaltma işlemi yapılır (Rowhani ve ark., 1995; MacKenzie ve ark., 1996; Chandler ve ark., 1998).

##### **4.1.3. Katlı PCR (Multiplex PCR):**

Bu PCR metodunun aslında standart PCR ve RT-PCR'dan çok farklı bir yanı yoktur. Farklı olarak aynı kalıp DNA dizisini çoğaltmak amacıyla aynı reaksiyon içerisinde birden fazla primer çifti ilave edilerek çoğaltma işlemi yapılmaktadır. Bu metot ağırlıklı olarak virüs ve viroidlerin genlerinin çoğaltılmasında kullanılmaktadır (Levy ve ark., 1992; Colined ve ark., 1993; Minafra ve ark., 1993).

##### **4.1.4. Antiserumla Sabitleme PCR (Immunocapture PCR):**

PCR veya RT-PCR yapılmadan önce, geni çoğaltılacak virüs steril katı bir yüzey üzerinde o virüse spesifik antiserum kullanılarak sabitlenir. Bu işlemten sonra PCR veya RT-PCR metotlarına devam edilir ve hedef virüsün geni çoğaltılır. Bu metot özellikle bitki virüslerinin hastalıklı dokulardan veya vektör böceklerden izolasyonu ve tanılanması işlemlerinde kullanılmaktadır (Nolasco ve ark., 1993; Rowhani ve ark., 1995; Munford ve Seal, 1997).

##### **4.1.5. İç içe PCR (Nested PCR):**

PCR tekniğinin spesifikliğini artırmak amacıyla Nested PCR, ve Heminested PCR metotları geliştirilmiştir. Nested PCR metodunda iki farklı set primer çifti (P1,P2 ve P3, P4) kullanılır. İlk çoğaltma işleminde birinci set primerler (P1, P2) kullanılır. Bu PCR çoğaltma işlemi sonucunda elde edilen DNA dizisi üzerinde ikinci set primerler (P3, P4) kullanılarak yeniden çoğaltma işlemi yapılır. İkinci set primerlerin çoğalttığı DNA parçası

birinci set primerlerin çoğalttığı DNA parçasından daha kısa ve birinci set primerlerin çoğalttığı DNA parçasının içerisinde yer alır. Heminested PCR metodu ise aslında Nested PCR metodunun aynısıdır. Fakat Heminested PCR metodunda ikinci PCR çoğaltma işlemi iki yeni primer ile değil de sadece bir yeni primer (P3) ve bir birinci setten alınan primer (P1 veya P2) ile yapılmaktadır (Spiegel ve ark., 1996; Rosner ve ark., 1997; Olmos ve ark. 1997).

#### **4.1.6. Renkli PCR (Colorimetric PCR):**

Son zamanlarda RT-PCR metodunun spesifikliğini ve ELISA serolojik yönteminin kullanma kolaylığını birleştiren bir metodur. Çoğaltılan DNA parçacıkları yeni bir tüp içerisine ilave edilir. Bu tüp önceden biotin ile işaretlenmiş, çoğaltılan DNA parçacıklarının belirli bir bölgesine spesifik problemlerle kaplanır. Bu problemler üzerindeki biotin, streptavidin ilavesiyle tespit edilir. Daha sonra da digoxigenin veya psoralin işaretleme sistemi kullanılarak çoğaltılan DNA parçacıkları tespit edilir. Eğer sistem hatasız çalışıp hedef gen parçasını çoğalttı ise tüp içerisinde renk değişimi ortaya çıkmaktadır (Kemp ve ark., 1989; Walter ve ark., 1996; Rowhani ve ark., 1998).

#### **4.1.7. Damlatma PCR (Spot PCR):**

Virüs veya viroid içeren hastalıklı bitki öz suyu ya naylon membran üzerine bir damla damlatılır yada yeni kesilmiş dal veya yaprak parçası membran üzerine bastırılarak öz suyunun membrana geçmesi sağlanır. Bu işlemden sonra bu membran parçasığı bir mikrofütj tüp içerisine konularak RT-PCR işlemi yapılır. Bu teknik özellikle arazi uygulamalarında çok yararlı olmaktadır (La Notte ve ark., 1997).

#### **4.1.8. Kademeli Sıcaklık Düşürme PCR (Touchdown PCR):**

Bu teknik, standart PCR çalışmalarına çok benzemektedir. Bu PCR'da farklı olarak primer sıcaklıkları ilk önce çok yüksek tutularak primerlerin spesifik şekilde hedef diziyeye bağlanması amaçlanmaktadır. Primerin bağlanma sıcaklığı ilk önce 65 °C tutulmakta ve her döngüde 1°C azaltılarak (10 döngü) 56 °C'ye kadar düşürülmektedir. 56 °C'den sonra ise 20-25 döngü yapılarak PCR tamamlanmaktadır. PCR tekniği, DNA dizileri üzerindeki belirli bir bölgenin spesifik olarak tespit edilmesinde kullanılmaktadır (Don ve ark., 1991).

#### **4.1.9. Canlı Hücre Belirleyen PCR (Bio PCR):**

Bu teknik, ağırlıklı olarak bitki patojeni bakterilerin canlı olarak tespit edilmesinde kullanılmaktadır. Tekniğin temeli, hastalıklı dokulardan izole edilen bakterilerin spesifik yada yarı spesifik ortamlarda geliştirildikten sonra DNA izolasyonu yapılması ve bu DNA'dan PCR reaksiyonu kurulmasına dayanmaktadır (Schaad ve ark., 1997).

#### **4.2. Çoğaltılması İstenen DNA Dizilerinin Bilinmediği Durumlarda Kullanılan PCR Metotları**

Bu tip PCR metodlarında çoğaltılması amaçlanan DNA dizisinin baz dizilimi ya çok az bilinir veya hiç bilinmez. Bu tip baz dizilerini çoğaltmak için farklı PCR metotları geliştirilmiştir.

#### **4.2.1. Değişken DNA Dizilerinin Tesadüfen Çoğaltılması (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD-PCR):**

Bu teknik, DNA dizilişi bilinmeyen veya az bilinen DNA fragmentlerinin analizlerinin yapılmasında kullanılmaktadır. Rastgele hazırlanmış

6-10 baz uzunluğundaki oligonükleotid primerleri ile PCR yapılır ve PCR ürünleri agaroz jelde yürütülüp ethidium bromide ile boyanır. Karşılaştırılan örnekler arasında görünen aynı (monomorphic) ve farklı (polymorphic) DNA bantları sayılarak sonuçlar değerlendirilmektedir. RAPD-PCR, genetik çeşitliliğin araştırılmasında, genom haritalamalarında yoğun şekilde kullanılmaktadır (Williams, 1991; Cenis, 1993).

#### **4.2.2. Ters PCR (Inverse-PCR):**

Bilinen DNA dizileri kullanılarak, bilinmeyen DNA dizilerinin çoğaltılmasında kullanılmaktadır (Ochman ve ark., 1988). Tekniğin temeli, bilinen sekanslara bitişik olarak bulunan fakat bilinmeyen bazlara sahip olan DNA bazlarının çoğaltılmasında kullanılmaktadır. Bilinen diziler ters çevrilerek içe alındığı için bu şekilde adlandırılmaktadır (Triglia ve ark., 1988).

#### **4.2.4. Kanca PCR (Anchored PCR):**

Bu metot, DNA fragmentinin sadece bir ucunun baz dizilişi bilinip diğer ucunun bilinmediği durumlarda kullanılmaktadır. Baz dizilişi bilinmeyen tarafa universal primerler kullanılırken baz dizilişi bilinen tarafa bir primer sentezlenerek PCR işlemi yapılır. Bu teknik daha çok virüs ve viroidlerin gen dizilişlerinin tespit edilmesinde kullanılmaktadır (Loh ve ark., 1989).

#### **4.2.5. Asymetric PCR:**

Bu PCR metodu, tek iplikçikli DNA dizilerinin üretilmesinde kullanılır. Bu amaçla PCR reaksiyonunda kullanılan primerlerin konsantrasyonları farklı oranlarda (50:1, 100:1 gibi) tutulmaktadır. PCR reaksiyonunda başlangıçtaki primerlerin oranlarının farklı olması elde edilecek üründe farklı oranda çoğaltılmasına sebep olur

ve üretilen DNA fragmentlerinden birinin miktarı (başlangıçta fazla olan) çok artar. Aynı zamanda çok miktarda tek iplikçikli DNA dizileri üretilmiş olur. Bu tip tek iplikçikli DNA dizileri klonlama işlemleri ve farklı uygulamalarda kullanılabilir (Scott ve Deahl 1998).

### **4.3. PCR'ın Diğer Tekniklerle Birlikte Kullanıldığı Metotlar**

Bazı moleküler çalışmalar, farklı yöntemlerin birlikte kullanılması ile yapılmaktadır. Bu tekniklerin belli basamaklarında PCR kullanılmaktadır.

#### **4.3.1. Çoğaltılan Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism; AFLP):**

Bu teknikte, genomik DNA iki kesim (restriksiyon) enzimi ile kesilmekte, kesilen parçacıklar bu enzimlere uygun bağlayıcılarla (adaptor) bağlanır (ligation). Bağlanılan DNA parçacıkları, AFLP primerlerine birer baz ilave edilerek ön PCR yapılır. Daha sonra bu primerlerin her birine 2 baz ilave edildikten sonra (primerlerin biri biotin veya <sup>33</sup>P ile işaretlenir) seçici (selektif) PCR yapılır. Bu PCR ürünleri poliakrilamid jelde yürütüldükten sonra X-ray filmi üzerine görüntü aktarılır. Metot, genom haritalarının yapılmasında, genom varyabilitesinin belirlenmesinde yoğun şekilde kullanılmaktadır (Vost ve ark., 1995; Semblat ve ark., 1998; Tzortzakakis ve ark., 1999).

#### **4.3.2. PCR Ürününün Enzimle Kesilmesi (PCR-RFLP):**

Bazı çalışmalarda PCR ürünleri arasında farklılık görülmez bu durumda PCR ürünleri bir veya birkaç kesim (restriksiyon) enzimi kullanılarak kesilmektedir. Böylece çalışılan DNA

örnekleri üzerinde varsa farklılıklar belirlenebilmektedir (Wetzel ve ark., 1991; Devran ve ark., 2002).

#### **4.3.3. Çoğaltılmış DNA Dizilerinin Enzimle Kesilmesi (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence; CAPS):**

Üzerinde çalışılan organizmanın genomuna özgü belli DNA fragmentlerinin (19-24 merlik oligonükleotid primerler) sekansı yapılarak bunlara özgü primerler oluşturulmakta ve bu primerlerle PCR yapılmaktadır. PCR ürünlerinden genelde tek bir DNA bandı elde edilmektedir ve bunlar arasında herhangi bir farklılık yoktur. Bu nedenle kesim enzimleri ile PCR ürünleri kesilmekte ve agaroz jelde elektroforez yardımı ile ayrımları sağlanarak farklılık tespit edilmektedir (Jarvis ve ark., 1994).

#### **4.3.6. RAPD Bantlarının Spesifik Primere Dönüştürülmesi (Sequence Characterized Amplified Region; SCAR):**

Bu teknikte, RAPD sonucu elde edilen DNA bantları klonlanmakta ve DNA baz dizilişleri belirlenmektedir. Bu farklılık gösteren DNA parçacığının bir bölümüne 18-24 baz uzunluğunda spesifik primerler dizayn edilmekte ve PCR çalışmasında kullanılmaktadır. Bu teknik haritalama çalışmalarında, genom kütüphanelerinin taranmasında kullanılmaktadır (Michelmore ve ark. 1993; Weising ve ark., 1995).

## **5. BİTKİ BİYOTEKNOLOJİSİNDE YAYGIN UYGULAMALARI**

### **5.1. Gen Aktarılmış Bitkilerin Takibi:**

Viral, bakteriyel, fungal ve diğer organizmalardan veya bir bitkiden alınan bir gen parçasının, hedef bir bitkiye aktarılması sonucunda ortaya çıkan transgenik (gen aktarılmış) bitkilerin

genomları içerisindeki aktarılmış gen parçası hızlı, hassas ve spesifik bir şekilde PCR tekniği ile tespit edilebilmektedir (McGarvey ve Kaper, 1991; Scorza ve ark., 1993).

### **5.2. Bitki Patojenlerinin Tespiti ve Teşhisi:**

Günümüzde bir çok bitki patojeninin genom dizilişleri tespit edilmiş olup bu patojenler için spesifik DNA primerleri yapılmıştır. Bu primerleri kullanarak bir çok bitki hastalık etmenini çok kısa süre içerisinde hassas bir şekilde teşhis ve tespit etmek mümkündür (Hadidi ve Yang, 1990, Bereswill ve ark., 1992, Olmos ve ark., 1998, Yılmaz, 1999). Virus ve viroidler, bitkilerin yapraklarından (Hadidi ve ark., 1992, Korschineck ve ark., 1991), çiçeklerinden (Kohnen ve ark., 1992) meyvelerinden (Hadidi ve Yang, 1990), köklerinden (Hadidi ve ark., 1993) kabuklarından (Korschineck ve ark., 1991), tohumlarından (Kohnen ve ark., 1992, Hadidi ve ark., 1993) ve virus taşıyan böceklerden (Lopez-Moya ve ark., 1992), genomdaki çeşitli bölgeler (ITS, rDNA, mtDNA) kullanılarak fungus (Mills ve ark., 1992; Ward ve ark., 1992; Elliott ve ark., 1993) nematod (Harris ve ark., 1990; Devran ve ark., 2002) ve bakteriler (Hartung ve ark., 1993) hassas ve hızlı bir şekilde teşhis ve tespit edilmektedirler.

### **5.3. Virüs ve Viroid Genlerinin Klonlanması:**

PCR tekniğini kullanarak virüs ve viroid genlerinin bir bölümü veya tamamı klonlanabilmektedir. Virüs ve viroidlerin RNA genleri, ters transkriptaz (reverse transcriptase:RT) enzimi kullanarak DNA'ya çevrilir. Bu işleme ters transkripsiyon (reverse transcription), sonucunda elde edilen



DNA parçasına tamamlayıcı DNA (complementary DNA:cDNA) denir (Puchta ve Sanger, 1989, Watson ve ark., 1992). Bu cDNA parçaları PCR da çoğaltılarak uygun vektörlere klonlanmaktadır (Yılmaz, 1999).

#### **5.4. Bitki Patojenlerinin Gen Dizilişlerinin PCR Yardımıyla Analizi:**

Virüs, viroid, bakteri, fungus, nematod vb. bitki patojenlerinin genleri PCR yardımı ile klonlanıp gen dizileri çıkartılabilmektedir ( Puchta ve Sanger, 1989; Puchta, 1990; Zijlstra ve ark., 1995).

#### **5.5. Bitki ve Patojenlerin Akrabalık İlişkilerinin Belirlenmesi:**

Günümüzde bir çok bitki ve patojen türlerinin gen haritaları çıkarılmakta ve PCR yardımıyla akrabalık ilişkileri belirlenmektedir (Karp 2000).

#### **5.6. PCR'ın Islah Çalışmalarında Kullanılması:**

Başta hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık olmak üzere çeşitli karakterlere özgü moleküler işaretleyiciler (markers) oluşturulmaktadır. Bu işaretleyiciler bitki ıslahın her aşamasında hızlı ve güvenli şekilde kullanılarak ıslah çalışmaları kısıtlanmaktadır (Vost ve ark., 1995; Becker ve ark 1995; Madan ve ark., 1997).

#### **5.7. Safiyet Testlemelerinde:**

Tohum üretiminde, karışıklıkların belirlenmesi ve tohumların saflığının ortaya konulmasında PCR tekniğinden yararlanılmaktadır (Dow ve Ashley, 1996; Lexner ve ark., 1999).

#### **5.8. Sınıflandırmada:**

Organizmaların tür içi, türler arası ve cins düzeyindeki sınıflandırılmaları PCR tekniği kullanılarak yapılmaktadır (Milligan ve ark., 1994).

### **6. PCR'IN AVANTAJLARI VE DEZAVANTAJLARI**

Bu tekniğin en önemli avantajı çok küçük miktarda DNA veya RNA'nın, belirli bir bölgesi kısa süre içerisinde, milyarlarca defa çoğaltılabilmektedir. Teknik aynı zamanda çok hassas, spesifik ve güvenilirdir. Elde edilen ürünlerdeki hata payı diğer metotlarla (örneğin serolojik yöntemler) karşılaştırıldığında daha düşük olmaktadır.

PCR tekniği için başlangıçta pahalı laboratuvar ekipmanlarına ihtiyaç olması, çok iyi eğitilmiş eleman gerekliliği, kullanılan sarf malzemelerin pahalılığı ve zaman, zaman bulaşmalar veya diğer faktörlerden dolayı hatalı sonuçlar alınabilmesi tekniğin en önemli dezavantajı oluşturmaktadır.

### **7. KAYNAKLAR**

- Becker, J., P. Vos, M. Kuiper, F. Salamini and M. Heun. 1995. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol Gen Genet*, 249:65-73.
- Bereswill, S., A. Pahl, P. Bellemann, W. Zeller, and K. Geider. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwini amylovora* by polymerase chain reaction analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 58:3522-3526.
- Cenis, J.L. 1993. Identification of four major *Melioidogyne* spp. by random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). *Phytopathology*, 83:76-80.
- Chandler, D.P., C.A. Wagnon and H. Bolton. 1998. Reverse transcriptase (RT) inhibition of PCR at low concentrations of template and its implications for quantitative RT-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (2):669-677.
- Colinet, D., J. Kummert, P. Lepoivre and J. Semal. 1994. Identification of distinct potyvirus in mixedly-infected

- sweetpotato by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Phytopathology*, 84:65-69.
- Demeke, T. and F.P. Adams 1992. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *BioTechniques*, 12: 332-335.
- Don, R.H., P.T. Cox., B.J. Wainwright, K. Baker and J.S. Mattick 1991. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.*, 19:4008.
- Dieffenbach, C.W., T.M.J. Lowe and G.S. Dveksler. 1993. General concepts for PCR primer design. *PCR Methods and Applications*, 530-537.
- Dow, B.D., and Ashley, M.V. 1996. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak. *Quercus macrocarpa*. *Mol. Ecol.* 5:615-627.
- Elliott, M.L., Des Jardin, E. A., Henson, J.M. 1993. Use of a polymerase chain reaction assay to aid in identification of *Gaeumanomyces graminis* var. *graminis* from different grass hosts. *Phytopathology*. 83:414-418.
- Erlich, H A, D. H. Gelfand and J. J. Sninsky. 1991. Recent advances in polymerase chain reaction. *Science*, 252:1643-1650.
- Hadidi, A., and X. Yang. 1990. Detection of pome fruit viroids enzymatic cDNA amplification. *Journal of Virological Methods* 30:261-270.
- Hadidi A, Y. Terai, C. A. Powell, S. E. Scott, J. C. Desvignes, L. M. Ibrahim, and L. Levy. 1992. Enzymatic cDNA amplification of hop stunt viroid variants from naturally infected fruit crops. *Acta Horticulturae* 309:339-342.
- Hadidi, A. A. J. Hansen and C. L. Parish. 1993. Apple scar scin and dapple apple viroids are seed borne. *Acta Horticulturae* 309:297-304
- Hadidi A, L. Levy, Podleskis E. V. 1995. Polymerase chain reaction technology in plant pathology. In: *Molecular Methods in Plant Pathology*, pp.167-187. Eds. R. P. Singh, U. S. Singh. Boca Raton: CRS Press.
- Harris, T.S., Sandall, L. J., Powers, T. O. 1990. Identification of single Meloidogyne juveniles by polymerase chain reaction amplification of mitochondrial DNA. *J. Nematol.* 22: 518-524.
- Henson J. M. and Frech, R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 31:81-109.
- Innis, M.A. and D.H. Gelfand. 1990. Optimization of PCRs In Innis, M.A, Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White T.J (eds.). *PCR protocols A guide to methods and applications*. Academic Press. 3-12 pp.
- Jarvis, P., C. Lister, V. Saabo, and C. Dean 1994. Integration of CAPS markers into the RFLP map generated using recombinant inbred lines of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 24:685-687.
- Kemp, D.J., D.B. Smith, S.J. Foote, N. Samaras and M.G. Peterson. 1989. Clorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions. *Prac. Natl. Acad. Sci.*, 86:2423-2427.
- Kohnen, P. D., W. G. Dougherty and R. O. Hampton. Detection of pea seedborne mosaic potyvirus by sequence specific enzymatic amplification. *Journal of Virological Methods* ,36:51-57.
- Korschineck, I., G. Himmler, R. Sagl, H. Steinkellner, and H. W. Katinger. 1991. A PCR membrane spot assay for the detection of plum pox virus RNA in bark of infected trees. *Journal of Virological Methods*, 31:139-145.
- Karp, A. 2000. Molecular tools for detecting genetic diversity in Proc. Int. Symp. On Meth. and Marks. For Qual. Assur. In Micropropagation. Eds. A. C. Casells, B.M. Doyle, R.F. Curry. *Acta Hort.* 530.
- Kwok, S., S-Y. Chang, J.J. Sninsky and A., Wang. 1994. A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. *PCR Methods and Applications*, 539-547.
- La Notte, P., A. Minafra, and P. Sandarelli. 1997. A spot-PCR technique for the detection of phloem-limited grapevine viruses. *Journal of Virological Methods*, 66: 103-108.
- Levy, L., A. Hadidi and S.M. Garsey. 1992. Reverse transcription-polymerase chain reaction assays for the rapid detection of citrus viroids using multiplex primer sets. *Proc. Int. Soc. Citriculture*, 2:800.
- Lexer, C., Heinze, B., Steinkellner, H., Kampfer, S., Ziegenhagen, B., and Glössl, J. 1999. Microsatellite analysis of maternal half-sib families of *Quercus robur*, pedunculate oak: detection of seed contamination and inference of the seed parents from the offspring. *Theor. Appl. Genet.* 99:185-191.

- Loh, E.Y., J.F. Elliot, S. Cwirla, L. Lanier and M.M. Davis. 1989. Polymerase chain reaction with single-sided specificity: Analysis of T cell receptor chain. *Science*, 243:217-223.
- Lopez-Moya, J. J., J. Gubero, D. Lopez-Abella, and J. R. Diaz-Ruiz. 1992. Detection of cauliflower mosaic virus (CaMV) in single aphids by the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Virological Methods*, 37:129
- MacKenzie, D.J., M.A. McLean, S. Mukerji and M. Green. 1996. Improved RNA Extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 81:222-226.
- Madan, M., S. Nair, A. Bhagwat, T.G. Krishna, M. Ano, C.R. Bhatia and T. Sasaki. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding*, 3: 87-115.
- McGarvey, P. and J. M. Kaper. 1991. A simple and rapid method for screening transgenic plants using the PCR. *BioTechniques*, 11:428-433.
- Milligan, B.G., Leebens-Mack J., and Strand, A.E., 1994. Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. *Molec. Ecol.* 3:423-435.
- Mills, P. R., Sreenivasaprasad, S., Brown, A.E. 1992. Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 98:137-144.
- Minafra, A., A. Hadidi and P. Sandarelli. 1993. Sensitive immunocapture and multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of grapevine leafroll associated virus III and grapevine virus B, 11<sup>th</sup> Meeting of the International Council for the Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine (ICVG), (Abstr.), 137.
- Mullis K. B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, April:56-61.
- Munford, R.A and S.E. Seal. 1997. Rapid single-tube immunocapture RT-PCR for the detection of two yam potyviruses. *Journal of Virological Methods*, 69: 73-79.
- Nolasco, G., C. de Blas, V. Torres and F. Ponz. 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *Journal of Virological Methods*, 45:201-218.
- Ochman, H., A.S. Gerber and D.L. Hartl. 1988. Genetic application of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*, 120:621
- Olmos, A., M. Cambra, M. A. Dasi, T. Candresse, O. Esteban, M. T. Garris and M. Asensio 1998. Simultaneous detection and typing of *plum pox potyvirus (PPV)* isolates by heminested PCR and PCR-ELISA. *Journal of Virological Methods*, 68:127-137.
- Puchta, H and H. L. Sanger. 1989. Sequence analysis of minute amounts of viroid RNA using the polymerase chain reaction (PCR). *Archives in Virology*, 106:335-339
- Puchta, H.1990. Nucleotide sequence and secondary structure of apple scar scin viroid (ASSVd) from China. *Plant Molecular Biology*, 14 (6):1065-1067.
- Rosner, A., L. Maslenin and S. Sara. 1997. The use of short and long PCR products for improved detection of prunus necrotic ringspot virus in woody plants. *Journal of Virological Methods*, 67: 135-141.
- Rowhani, A., M.A. Maningas, L.S. Lile, S.D. Daubert, and D.A. Golino. 1995. Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology*, 85:347-352.
- Rowhani, A., L. Biardi, G. Routh, S.D. Daubert and D.A. Golino.1998. Development of a sensitive colorimetric-PCR Assay for detection of viruses in woody plants. *Plant Disease*, 82:1-15.
- Semblat, J.P., Wajnberg, E., Dalmasso, A., Abad, P. Castagnone-Sereno, P. 1998. High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis. *Molecular Ecology* 7: 119-125.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of B-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230:1350-1354.
- Scorza, R., L. Levy, V. Damstegt, M. Yepes, J. Cordts, A. Hadidi, J. Slighton and D. Gonsalves. 1993. Plum pox virus protection in transgenic plum expressing the papaya ringspot virus coat protein

- gene. 6<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology, Canada (Abst.) 192.
- Schaad N.W., M. Hendson, L. Kumagai, T. Matsumoto, R.L. Forster and H. Efstathios 1997. Assessment of the reliability of a bio-pcr test for routine detection of *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* in commercial seed beans. <http://www.nal.usda.gov/ttic/tektran/data/000008/04/0000080497.html>
- Scott, D. and K. L. Deahl. 1998. The differentiation of *Phytophthora* species that are pathogenic on potatoes by an asymmetric PCR combined with single-strand conformation polymorphism analysis. *Lett. Appl. Microbiol.*, 27:39-44.
- Staub, J.E., F.C. Serquen, M. Gupta. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Hort Science*, 31 (5):729-741.
- Spiegel, S., S.W. Scot, V. Bowman-Vance, Y. Tam, Galiakparov, N.N. and A. Rosner. 1996. Improved detection of prunus necrotic ringspot virus by the polymerase chain reaction. *European Journal of Plant Pathology*, 102:681-685.
- Triglia, T., M.G. Peterson and D.J. Kemp. A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences, *Nucleic Acids Res.*, 16:8186-8190.
- Tzortzakakis, E.A. Blok, V.C. Phillips, M.S. and Trudgill, D.L. 1999. Variation in root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) in Crete in relation to control with resistant tomato and pepper. *Nematology* 1 (5): 499-506.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 21: 4407-4414.
- Walter, N.G., P. Schwillie and E. Manfred. 1996. Fluorescence correlation analysis of probe diffusion simplifies quantitative pathogen detection by PCR. *Prac. Natl. Acad. Sci.*, 93:1205-12810.
- Ward, E., Gray, R. M. 1992. Generation of a ribosomal DNA probed by PCR and its use in identification of fungi within the *Gaeumannomyces-Phialophora* complex. *Plant Pathol.* 41:730-736.
- Watson, J. D., M. Gilman, J. Witkowski and M. Zoller. 1992. The polymerase chain reaction In: *Recombinant DNA*. Second Edition. New York. 79-98.
- Weising, K., H. Nybom., K. Wolff, and W. Meyer 1995. *DNA Fingerprinting in plants and fungi*. CRS Press. Florida.
- Wetzel, T., T. Candresse, M. Ravelonandro and J. Dunez. 1991. A polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, 33:355-365.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafaski and S.V. Tingey 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18:6531-6535.
- Yang, X., A. Hadidi and S.M., Garnsey. 1992. Enzymatic cDNA amplification of citrus exocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts. *Phytopathology*, 82: 279.
- Zijlstra, C., Lever, A.E.M., Uenk, B.J. and Van Silfhout, C.H. 1995. Differences between ITS region of isolates of the root-knot nematodes *Meloidogyne hapla* and *M. chitwoodi*. *Phytopathology*, 85: 1231-1237.
- Yilmaz, S. 1999. Development of Non-Radioactive Detection Methods for the Genomic RNAs of Iarviruses that Cause Diseases in Peach and Their Use in Studying the Molecular Basis of the Synergistic Interaction Between Prunus Necrotic Ringspot Virus and Prune Dwarf Virus. *Clemson University, USA. Dissertation*. pp.30-32.