

Atf için: Palacıoğlu G, Özer G, Bayraktar H, 2021. Bitki Patojeni Fungusların Tespitinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu'na Dayalı Bazı Moleküler Teknikler. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 11(3): 1831-1845.

To Cite: Palacıoğlu G, Özer G, Bayraktar H, 2021. Some Molecular Techniques Based on Polymerase Chain Reaction in Detection of Plant Pathogen Fungi. Journal of the Institute of Science and Technology, 11(3): 1831-1845.

Bitki Patojeni Fungusların Tespitinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu'na Dayalı Bazı Moleküler Teknikler

Gülsüm PALACIOĞLU^{1*}, Göksel ÖZER², Harun BAYRAKTAR¹

ÖZET: Kültür bitkilerinde ciddi kayıplara neden olan hastalık etmenleri içerisinde bitki patojeni funguslar önemli bir grubu oluşturmaktadır. Bu patojenlere karşı etkin mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi ve neden oldukları ürün kayıplarının en aza indirilmesi için doğru ve hızlı bir şekilde tespit edilmesi en önemli adımdır. Bu kapsamda fungal patojenlerin klasik tespitinde kullanılan morfolojik karakterlere dayalı yöntemler değişkenlik göstermekle birlikte uzun zaman almakta ve taksonomik açıdan deneyimli personel gerektirmektedir. Bu nedenle bitki patojenlerinin tespiti için çok sayıda moleküler teknik geliştirilmiş ve epidemiyolojik çalışmalarda, karantina uygulamalarında, tohum sertifikasyonunda, ıslah programlarında ve fungusit direnci tespitinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada da bitki patojeni fungusların tespitinde yaygın olarak kullanılan polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı bazı moleküler teknikler (Loop aracılı izotermal amplifikasyon, manyetik yakalama hibridizasyon, floresan in situ hibridizasyon, yeni nesil dizileme, Real Time PCR) hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır. Bitki patojeni fungusların neden olduğu ekonomik kayıpları azaltmak amacıyla fitopatolojik çalışmalarda moleküler yöntemlerin daha etkin kullanılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Fungal patojenler, LAMP, (MCH)-PCR, moleküler tanımlama, Real Time PCR

Some Molecular Techniques Based on Polymerase Chain Reaction in Detection of Plant Pathogen Fungi

ABSTRACT: Fungi are an important group of plant pathogens and cause devastating losses in cultivated plants. Accurate and early detection of plant pathogens is the first important step for reducing yield losses caused by the pathogens and developing the effective disease control methods. The characteristics used in classical identification of fungal pathogens are very variable and these methods based on the morphological characteristics are time consuming and require taxonomical expertise. Thus, many molecular techniques have been developed for the identification of determination of plant pathogens and used widely in surveys, epidemiological studies, plant quarantine, seed certification, breeding programs, and fungicide resistance. The aim of this study was to provide detailed information about routinely used developed molecular techniques based on PCR (loop mediated isothermal amplification, magnetic capture hybridization, fluorescent in situ hybridization, next generation sequencing, Real-time PCR i.e.) in identification and determination of plant pathogen fungi. These results will contribute to the more effective use of these molecular methods in phytopathological studies and the development of innovative methods for reducing economic losses caused by plant pathogenic fungi.

Keywords: Fungal pathogens, LAMP, (MCH)-PCR, molecular identification, Real Time PCR

¹Gülsüm PALACIOĞLU ([Orcid ID: 0000-0002-3603-2413](https://orcid.org/0000-0002-3603-2413)), Harun BAYRAKTAR ([Orcid ID: 0000-0003-2562-4461](https://orcid.org/0000-0003-2562-4461)), Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Ankara, Türkiye

²Göksel ÖZER ([Orcid ID: 0000-0002-3385-2520](https://orcid.org/0000-0002-3385-2520)), Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Bolu, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Gülsüm PALACIOĞLU, e-mail: gpalacioglu@ankara.edu.tr

GİRİŞ

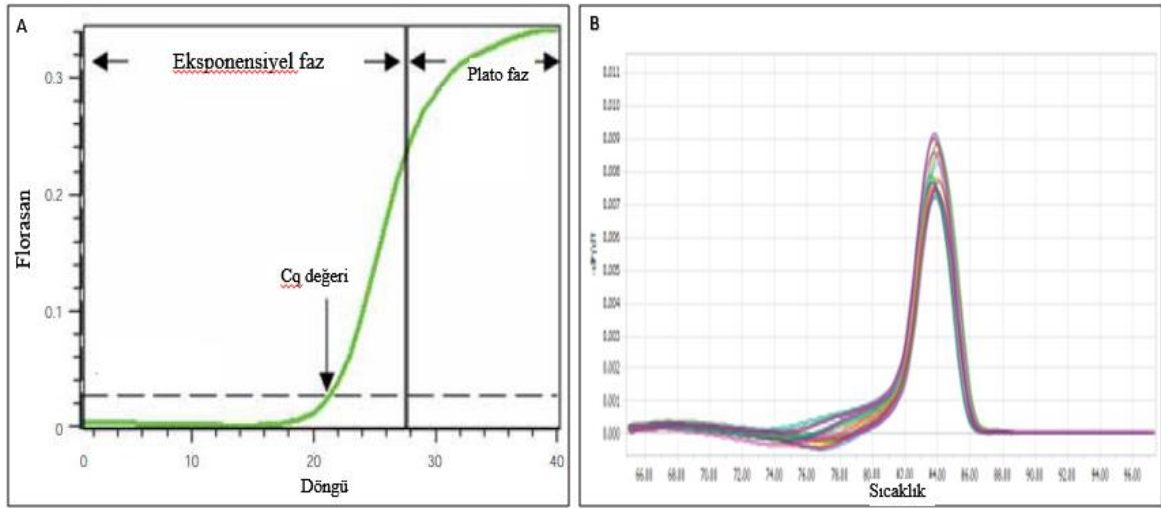
Funguslar, ekosistemdeki en büyük ökaryotik çeşitliliğe sahip bitki patojen grubudur. Doğada yaklaşık 1.5 milyon fungus türü olduğu bilinmekte ve bunların 20 binden fazlası bitkilerde enfeksiyon oluşturmaktadır (Hawksworth, 2001). Bitki patojeni fungusların neden oldukları ekonomik kayıpların, çevreye ve insan sağlığına verdiği zararın en aza indirilmesi için etkin mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi kaçınılmazdır. Bu nedenle, patojenlerin doğru ve hızlı bir şekilde tespit edilmesi gerekmektedir (Garrido ve ark., 2012). Bu amaçla türlerin tespitinde genellikle kültürel koşullar dikkate alınarak oldukça değişkenlik gösteren morfolojik özellikler takip edilmektedir. Bu yöntemler uzun zaman almasının yanı sıra miselyum pigmentasyonu, konidi şekil ve büyüklükleri gibi kültürel karakteristiklerin substrat tipi ve inkübasyon koşullarından etkilenmesinden dolayı her zaman güvenilir sonuçlar vermemektedir. Ayrıca konusunda uzmanlaşmış deneyimli personel gerektirmesi de bir diğer dezavantajı olarak görülmektedir (Capote ve ark., 2012). Bu nedenle son yıllarda hastalık etmenlerinin tespiti ve tanısı amacıyla farklı yöntemler üzerinde yoğun araştırmalar gerçekleştirilmiş ve geliştirilen moleküler yöntemler hastalıkların teşhisinde geniş bir kullanım alanı bulmuştur (Martin ve ark., 2004).

Moleküler yöntemlerin başında gelen Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile hızlı, hassas ve güvenilir sonuçlar elde edilmektedir. Yöntem, birçok etmen içerisinden tek bir hedef molekülü tespit edebilme imkânı sunmakta, klasik yöntemlere göre önemli derecede zaman kazandırmaktadır. Patojenin hedef DNA'sının in vitro koşullarda enzimatik olarak amplifikasyonuna dayanan yöntem, 1985 yılında Kary B. Mullis tarafından geliştirilmiştir (Mullis ve ark., 1986). Düşük miktarlardaki DNA'nın enzimatik olarak çoğaltılarak çok sayıda kopyası elde edilmekte ve farklı görüntüleme yöntemleri ile incelenmektedir. Normal bir PCR reaksiyonu farklı sıcaklıklarda, 3 aşamada (ayrılma (denatürasyon), bağlanma (annealing) ve uzama (extension)), 25-50 döngü arasında gerçekleşmektedir. PCR özgüllüğünü, primerlerin özgüllüğü belirlemekle birlikte bağlanma sıcaklığı, polimeraz enziminin miktarı ve işlevi, primer konsantrasyonu gibi etkenler de PCR reaksiyonunu etkilemektedir. Bitki patojenlerinin tespitinde klasik PCR yöntemi yaygın olarak kullanılmakla beraber moleküler tekniklerdeki gelişmelere bağlı olarak çok sayıda PCR'a dayalı yöntem geliştirilmiş ve fungal etmenlerin tespitinde kullanım olanağı bulmuştur. Bu çalışmada bitki patojeni fungusların tespitinde kullanılan PCR'a dayalı yöntemlerden, Real Time PCR, manyetik yakalama hibridizasyon (Magnetic capture hybridisation; MCH-PCR), Floresan in situ hibridizasyon (Fluorescence in Situ hybridization; FISH), Loop aracılı izotermal amplifikasyon (Loop-mediated isothermal amplification; LAMP), DNA array hibridizasyon ve yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing; NGS) teknolojilerinden bahsedilmektedir.

Real Time PCR

Real Time PCR, hedef DNA'nın miktarında zaman içerisinde meydana gelen değişimi kesin ve hassas bir şekilde tespit edebilen kantitatif analiz yöntemidir. Yöntemde, her döngü sonrasında oluşan ışığa eş zamanlı olarak kaydedilerek araştırılan biyolojik örneğin miktarındaki değişimler floresan ışımalar aracılığıyla görüntülenebilmektedir. Hedef bölgenin amplifikasyonu eksponensiyel faz, lineer faz ve plato faz olmak üzere 3 temel fazda oluşmakta ve doğrusal olarak gözlemlenebilmektedir (Şekil 1). Eksponensiyel faz, floresan ışımaya miktarının ilk anlamlı artış olan eşik değerine ulaştığı noktadır. Bu noktaya eş değer olan döngü sayısı eşik değeri döngüsü (C_q, C_t) olarak adlandırılmaktadır. Bu nokta hedef bölgenin amplifikasyonun başladığını göstermekte ve analiz sonuçlarının hesaplanmasında kullanılmaktadır. C_q değeri hedef DNA'nın başlangıç miktarı ile doğru orantılı olması nedeniyle başlangıçtaki hedef DNA miktarı ne kadar fazla ise eksponensiyel faz o kadar erken başlamakta ve PCR ürünlerinin artışı ile sinyal üretimi doğru orantılı olarak çoğalmaktadır. Bu aşamada PCR ürünleri her

döngüde iki katına çıkar ve reaksiyon etkinliği %100 olarak tüm reaksiyon bileşenleri aktif olarak kullanılmaktadır. Lineer fazda reaksiyon yavaşlayarak PCR ürünleri degrede olmaya başlar, plato fazda ise reaksiyon sonlanarak yeni ürün oluşmamaktadır. PCR reaksiyonunun verimi (efficiency), slope ve R^2 değerleri ile değerlendirilerek %90-%100 ($-3.6 > \text{slope değeri} > 3.1$) arasında olması beklenmektedir (Anonim, 2014; Anonim, 2016). Ayrıca erime eğrisi (melting curve) analizi ile erime sıcaklığı grafiklerinden yararlanılarak spesifik olmayan bağlanmalar tespit edilmektedir. Bu kapsamda PCR ürünlerinin aynı erime sıcaklığına sahip olması beklenerek oluşan farklı sıcaklıklar ile dimer oluşumları veya bulaşmalar tespit edilmektedir (Şekil 1) (Anonim, 2014). Bununla birlikte yüksek çözünürlüklü erime eğrisi (High Resolution Melting; HRM) yöntemi ile de 65°C 'den 95°C 'ye kadar her 0.5°C 'lik artışta floresan sinyalindeki değişimler ile örneğin tespiti ve analizi de melting eğrisinin şekli ve pozisyonuna göre yapılabilmektedir (Ririe ve ark., 1997). Real time PCR yönteminde, mutlak (absolute) ve bağıl (relative) olmak üzere iki adet kantifikasyon yöntemi bulunmaktadır. Mutlak kantifikasyonda, test örnekleri farklı oranlarda seyreltilen bir dilüsyon serisine ait standart eğri kullanılarak belirlenmektedir. Bağıl kantifikasyonda ise araştırılan genin miktarı normalizasyon için kullanılan başka bir gen ile kıyaslanarak (korunmuş gen) belirlenmektedir.



Şekil 1. qPCR faz göstergesi (A), erime eğrisi analizi (B) (Anonim, 2016)

Real time PCR 'da iki temel floresan sistemi ile tespit yapılmaktadır. Bunlar DNA'ya bağlanabilen ajanlar (SYBR Green, EvaGreen, SYTO boyalar vb.) ile tespit ve sekansa spesifik problemlere dayalı tespit yöntemleridir. DNA'ya bağlanan ajanlar arasında SYBR Green (2-[N-(3-dimethylaminopropyl)-N-propylamino]-4-[2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene]-1-phenylquinolinium) en yaygın kullanılanıdır. Ortamda tek başına bulunduğu floresan ışımaya yapamazken, çift sarmal DNA'ya bağlandığında ışımaya meydana gelmektedir. Bu kapsamda PCR reaksiyonunda her döngü sonucunda oluşan ürün, boyanın verdiği floresan ışımaya ile izlenebilmektedir. Diğer tespit yöntemlerinden daha ucuz olmasına rağmen hedefe özgü diziyeye sahip olmadığından dolayı ortamdaki tüm çift sarmal DNA'lara bağlanarak yanlış pozitif sonuçlar vermesi en önemli dezavantajı olarak görülmektedir (Anonim, 2014; Mirmajlessi ve ark., 2015).

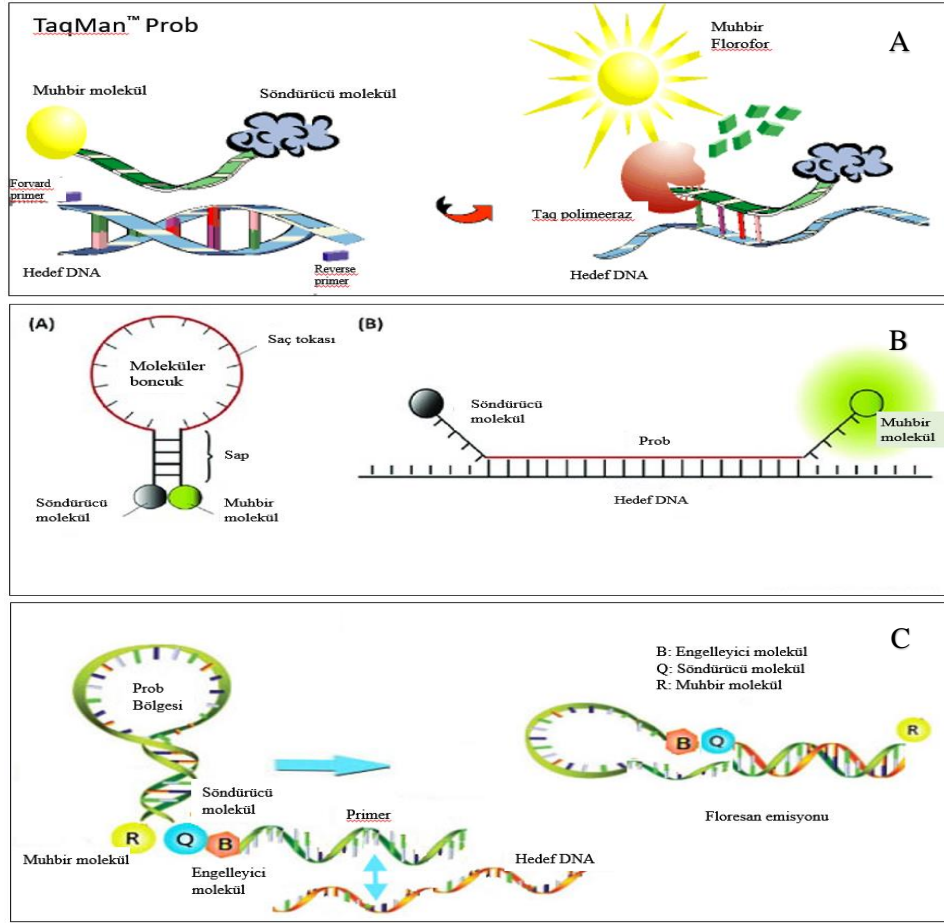
Sekansa spesifik problemlere dayalı tespit için TaqMan™, moleküler boncuk, Scorpion® gibi farklı prob teknolojileri bulunmaktadır. Bunlardan en yaygın TaqMan™ proplar olup, en yüksek sinyali veren prob sistemidir. Probin 3' ucunda söndürücü molekül (quencher), 5' ucunda muhbir molekül (reporter) bulunmakta ve 25-30 nükleotid uzunluğunda hedefe spesifik sekanslardan oluşmaktadır. Muhbir molekül, ışık enerjisini absorbe eden bir moleküldür ve uyarıldığı durumda harekete geçmektedir. Hedef sekans bulunmadığında söndürücü, muhbirdeki enerjiyi dağıtarak ışımaya meydana gelmesini

engellemektedir. Hedef sekansın miktarını ölçmek için Taq DNA polimerazın 5' ekzonükleaz aktivitesini kullanılmaktadır. Hedef DNA'ya öncelikle TaqMan™ problemler ardından primerler bağlanmakta ve Taq polimeraz ile uzama gerçekleşmektedir. Taq polimerazın 5' ekzonükleaz aktivitesi sayesinde proba bağlı muhbir molekül kesilerek floresan açığa çıkmaktadır (Şekil 2A) (Anonim, 2014; Anonim, 2016).

Diğer bir prob sistemi olan moleküler boncuk ise bir sap ve saç tokası yapısından oluşan tek sarmal oligonükleotit problemlerdir. Saç tokası yapısı hedef sekansa spesifik, sap kısmının iki ucu ise birbirinin komplementeri olarak dizayn edilmektedir. Probun 5' ucunda muhbir molekül, 3' ucunda söndürücü molekül bulunmaktadır. Toka yapısındaki prob sekansı hedef nükleik asit sekansına bağlandığında boncuğun uç kısımlarındaki muhbir ve söndürücü ayrılarak hedefe hibridize olmakta ve floresan ışımaya meydana gelmektedir (Şekil 2B). Muhbir molekül olarak FAM, TAMRA, TET, ROX; söndürücü molekül olarak DABCYL en çok kullanılan boyalardır. Proba uygun hedef sekans olmadığında toka kapalı kalarak floresan ışınım gözlenmemektedir. Saç tokası yapısı PCR boyunca bozulmaz ve her döngüde hedef sekansa bağlanarak ışımaya meydana getirmektedir (Anonim, 2014; Mirmajlessi ve ark., 2015).

Akrep (Scorpion) problemler ise spesifik prob sekansına kovalent olarak bağlı olan, bir ucunda muhbir diğer ucunda söndürücü molekül bulunan saç tokası şeklindeki iki fonksiyonlu primerlerdir. 5' ucunda bulunan akrep primer PCR engelleyici olarak hedefi olmayan sekans içermektedir. Bu yapı muhbir molekülü söndürücü molekülün yakına getirerek floresanı önlemektedir. Hedef sekans olmadığında söndürücü, muhbir tarafından yayılmış floresanı absorbe etmektedir. Primer-prob ve hedef bölge arasında bağlanma oluşur oluşmaz akrep primer, PCR ürününü toplayarak, kuyruk kıvrımlarındaki prob sekansı hedef sekansla hibridize olmak için dönmektedir. Amplifikasyon, muhbir ve söndürücü molekülü ayırarak floresan ışımaya yaymaya neden olan saç tokası yapısını çözmektedir (Şekil 2C). Akrep problemler, 5' PCR primerinin ve probun işlevini birleştirerek moleküler boncuklara göre daha etkili sonuç vermektedir (Didenko, 2001).

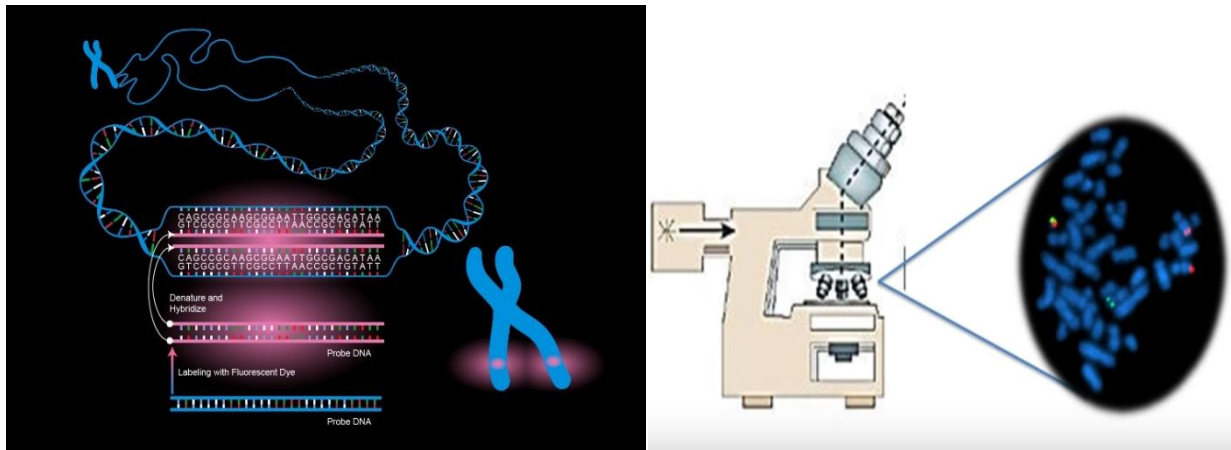
Real time PCR reaksiyonunun etkinliği ve özgünlüğü için doğru primer ve prob seçimi oldukça önemlidir. Etkinliği yüksek primer ve prob için DNA'nın 3' ucundaki baz spesifikliği dikkate alınmaktadır (Fredslund ve Lange 2007, Schena ve ark., 2013). Yüksek etkinlik ve hassasiyet ile optimum 70-200 baz çifti (bc) aralığındaki fragmentlerin çoğaltılmasına olanak sağlamaktadır (Garrido ve ark., 2009). Hedef bölge, dalga boyu emisyonu ve amplifikasyon büyüklük farkı ile belirlenmektedir (Okubara ve ark., 2005). Amplifikasyon ürününün büyüklüğü uygun ise klasik PCR'da kullanılan primerler Real time PCR için de kullanılabilir. Primer ve problemler, Primer Express (PE Applied Biosystems, USA), Primer3 (Whitehead Institute, USA), Clustal X (Version 2.0) ve Beacon designer (PREMIER Biosoft International, USA) gibi programlarda PCR yöntemlerine uygun bir şekilde tasarlanabilmektedir. Yöntem, başta önemli karantina etmenleri olmak üzere birçok fungal patojenin tespitinde geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Bu kapsamda çok sayıda patojenin tohum, yaprak ve gövde gibi farklı bitki dokularından tespit edilmesine olanak sağlamıştır (Bonants ve ark., 2004; Bilodeau ve ark., 2007; Zouhar ve ark., 2010; Bayraktar ve ark., 2016). Bitki patojenlerinin tespitinin yanı sıra tek nokta mutasyonlarının belirlenmesi, metilasyon tespiti, SNP analizi, DNA hasarı belirleme, kromozom bozukluklarının tespitinde de yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2. TaqMan™ prob ile tespiti şematik gösterimi (A); Moleküler boncuk ile tespiti şematik gösterimi (B); Akrep (Scorpion) prob ile tespiti şematik gösterimi (C) (Anonim, 2020a, 2020b; Kuang ve ark., 2017)

Floresan in Situ Hibridizasyon (FISH)

Floresan in situ hibridizasyon (Fluorescence in Situ hybridization; 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 yanı sıra kısa sürede tür düzeyinde ayırım yapmaya olanak sağlamaktadır (Amann, 1995). 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 olarak patojenin varlığı floresan mikroskopta tespit edilmektedir (Şekil 3) (Zwirgmaier, 2005; Amann ve ark., 1995).



Şekil 3. FISH ile tespiti şematik gösterimi ve mikroskopta görüntü elde edilmesi (Anonim, 2020c)

Yöntem, fiksasyon, preparatların hazırlanması ve dehidratasyon, hibridizasyon, yıkama ve görüntüleme basamaklarından oluşmaktadır. Fiksasyonda problemlerin hücre içerisine girebilmesi için uygun ortam hazırlanmaktadır. Bu işlem hücrenin morfolojik yapısını bozmamak, nükleik asitlerin korunmasını sağlamak ve probun hücreye girişini kolaylaştırmak için yapılmaktadır. Fiksasyon solüsyonu olarak genelde % 4'lük PFA kullanılmaktadır (Amann, 1995; Kempf, 2000). Fiksasyona tabii tutulmuş örnekler kuyucuklara koyularak preparatlar hazırlanmakta ve etil alkol içerisinde bekletilerek dehidratasyon gerçekleştirilmektedir (Amann, 1995). Hibridizasyonda ise türe spesifik oligonükleotit, polinükleotit, peptid nükleik asit (PNA), kilitli nükleik asit (LNA) gibi farklı problemler kullanılmaktadır. Bunlardan en çok kullanılanı 15-25 nükleotit uzunluğundaki tek sarmal oligonükleotit problemlerdir. Polinükleotit problemler ise oligonükleotit problemlere göre çok daha hassas olup yüksek floresan vermesi nedeniyle zayıf sinyal üreten hücrelerde kullanılması tavsiye edilmektedir. Bununla birlikte PNA ve LNA problemlerin nükleik asitlere bağlanma gücü oldukça yüksektir. PNA problemler hem DNA'ya hem de RNA'ya bağlanabilirken, LNA problemler sadece RNA'ya bağlanabilmektedir (Amann, 2008).

Hibridizasyon, floresan işaretli prob ile hedef bölgenin uygun solüsyonlar içerisinde birleştirilmesiyle gerçekleşmektedir. Probun spesifikliği, hibridizasyon ısısı gibi faktörler bu aşamayı etkilemektedir. Optimum konsantrasyonda prob ve hibridizasyon solüsyonunun 1.5 saat bekletilmesiyle hedef patojen ile prob hibridizasyonu oluşmaktadır. Hibridizasyon ısısı nükleotidlerin çözülmesine göre değişmekle birlikte genel olarak 37-55°C arasında gerçekleşmektedir (Arnoldi ve ark., 1992). Hibridizasyonun ardından non-spesifik bağlanmaları ortadan kaldırmak için Tris HCl, 0,5 M EDTA, %10 SDS, 5M NaCl, distile su gibi solüsyonlar içerisinde 10-20 dakika kadar tutularak yıkama yapılmaktadır. Yıkama sonrasında preparatlar distile suyla yıkanıp kurutulularak her örneğe floresan boya (DAPI-4',6-diamidino-2-phenylindole) konulup karanlıkta bekletilmektedir (Wagner ve ark., 2003). Son olarak kurutulan preparatların üzerinde bulunan kuyucuklara citifluor veya antifade gibi özel solüsyonlar damlatılarak, floresan mikroskopta görüntüleme yapılmaktadır. Mikroskopta görüntüyü elde edebilmek için kullanılan floresan boya filtre ile uyumlu olmalı, kullanılan prob sayısına göre tek prob için tekli filtreler, iki ve daha fazla işaretli problemler için ikili veya üçlü filtreler kullanılmalıdır (Amann, 1995). Ayrıca hedef bölge, radyoaktif olmayan boylarla veya radyoaktif izotoplarla işaretlenebilmektedir. Radyoaktif izotopların bazı dezavantajlarından dolayı daha çok radyoaktif olmayan Fluorescein isothiocyanate (FITC), Cyanine3 ve Cyanine5 gibi boylar kullanılmaktadır (Amann, 1997). Kullanılan florofor boylar, epifluoresan mikroskop, flow sitometri veya konfokal lazer taramalı mikroskop aracılığıyla görüntülenmektedir. Epifluoresan boylarda görüntüleme yapmak için DAPI, FITC ve TRICH gibi filtreler kullanılmaktadır. Konfokal lazer taramalı mikroskop, epifluoresan mikroskoba göre daha yüksek çözünürlük sağlayarak görüntü daha net elde edilmektedir.

FISH, bitki dokusu içerisinde çok sayıda etmen arasından istenilen patojenin tespit edilebilmesini, patojenlerin kültüre alınmadan tanımlanmasını ve kültüre alınması zor olan veya yapay ortamda gelişmeyen bitki patojenlerinin incelenmesine imkan sunmaktadır (Kempf ve ark., 2000). Bu kapsamda bitki patojeni funguslar arasında önemli bir yer tutan, kök çürüklüğü ve geriye doğru ölüme sebep olan çok sayıda *Phytophthora* türü arasından *Phytophthora cinnamomi*, FISH yöntemi ile başarılı bir şekilde ayırt edilebilmiştir (Li ve ark., 2014). Diğer bir çalışmada, Ellison ve ark. (2016) krizantem japon beyaz pası etmeni *Puccinia horiana* fungusunun bitki dokusundaki gelişimini FISH ile izlemiş ve pas funguslarının morfolojisini, konukçu dokuda fungal gelişimlerini ve hayat döngülerinin belirlenmesi için yöntemin bir araç olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Yeni Nesil Dizileme

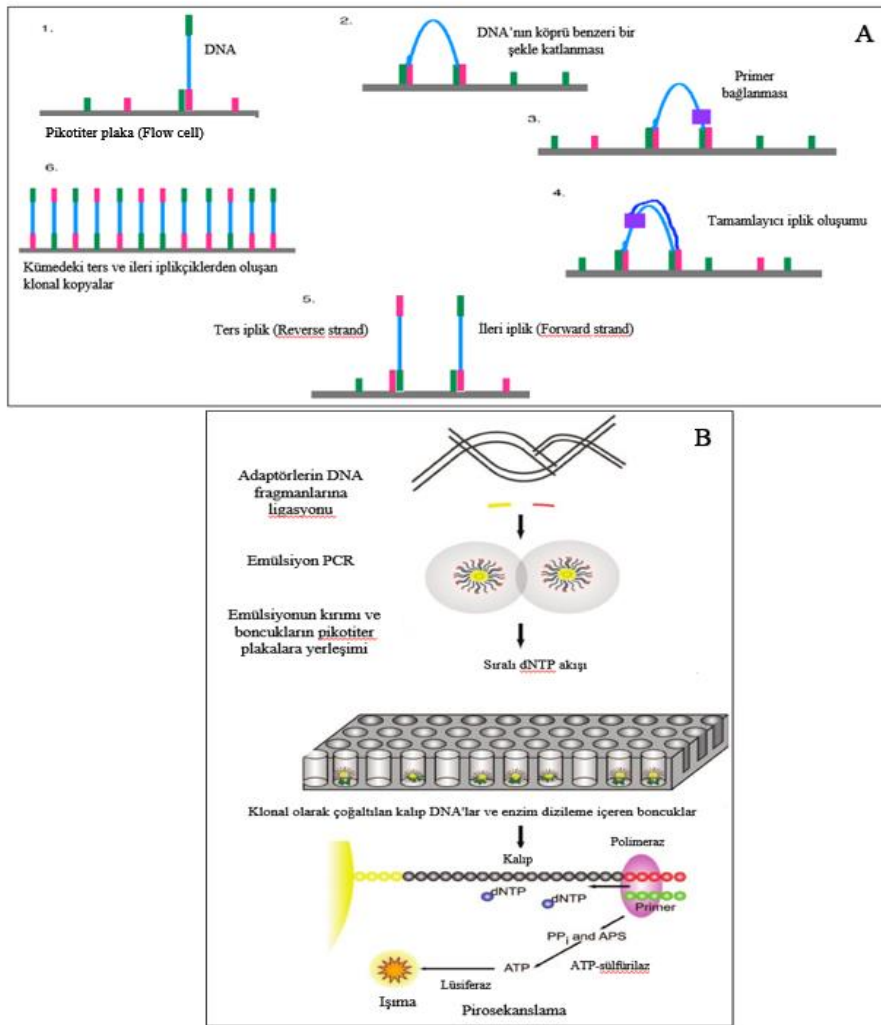
Yeni nesil dizileme (Next generation sequencing; NGS) yöntemi tüm genom, transkriptom, DNA-protein interaksiyonunu ortaya koymak için uygulanabilen geniş kapsamlı bir teknolojidir ve biyolojik araştırmaların hızlı bir şekilde yapılmasına olanak sağlamaktadır. Yöntemin esası DNA'nın enzimatik reaksiyonlarla rastgele kesilerek çok sayıda DNA fragmentiyle bir kütüphane elde edilmesi ve bu DNA fragmentlerinin çoğaltılmasına dayanmaktadır (Shendure ve Ji, 2008). Günümüzde farklı dizileme yöntemlerinden faydalanan NGS teknolojileri geliştirilmiştir. Illumina Miseq, ABI SOLiD (Applied Biosystems), Roche 454 FLX, Polonator, Ion Torrent, HeliScope (Helicos, Inc.) ve Pacific BioSciences en yaygın kullanılan teknolojilerdir ve dizileme yöntemleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Bu kapsamda Roche 454 FLX, Illumina Miseq, Ion Torrent sentez aracılığıyla, ABI SOLiD ve Polonator ligasyon aracılığıyla, HeliScope (Helicos, Inc.) ve Pacific BioSciences ise tek molekül dizileme yöntemlerinden faydalanmaktadır.

Sentez aracılığıyla sekanslama yönteminde parçalara ayrılmış DNA fragmentlerine adaptör dizilerin bağlanması sağlanır ve diziler amplifiye edilerek floresan veya kimyasal sinyaller oluşturulması sağlanmaktadır. Dizilerin sentezlenmesinde DNA polimeraz enzimi kullanılmaktadır. Bu yöntemi kullanan Roche 454 GS20 cihazı pirodizileme ile sekans yapmakta ve emülsiyon PCR'dan yararlanmaktadır. Ancak yüksek maliyet gerektirmesi nedeniyle günümüzde kullanımını oldukça azalmıştır. Diğer bir sekanslama yöntemi olan Illumina Miseq ise özellikle bitki patojeni fungusların tanımlanmasında yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. Dizileme farklı floresan boylarla işaretlenmiş dört tersine dönüşür sonlandırıcı nükleotidin pikotiter plaka (flow-cell) üzerinde sentezlenmesi ile gerçekleştirilmektedir. Bir ucunda adaptör olan tek DNA molekül yüzeye bağlanıp tamamlayıcı adaptörlerle hibridize olarak köprüleşen PCR tekniği ile komplementer iplikler sentezlenmektedir (Şekil 4A). Amplifikasyon sonrasında bir kalıp molekülden yaklaşık 1000 klon kopya oluşmaktadır. Farklı dalga boylarına ait dört ayrı renkle işaretlenmiş nükleotidler algılanarak DNA fragmentinin nükleotid dizisi açığa çıkmaktadır (Anonim, 2020d). Ortalama 4 gün süren dizileme sonucunda her cluster sekansı hesaplanarak düşük kalitedeki okumaları elimine etmek için kalite testi yapılır ve ortalama kaliteli okuma uzunluğu 40-50 megabayt (50-300 bç) civarındadır (Varshney ve ark., 2009; El-Metwally ve ark., 2014). Ion torrent yöntemi ise semikonduktör teknolojisi kullanılarak, bazların bağlanması sonucu açığa çıkan H⁺iyonuna bağlı olarak pH değişiminin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Ion PGM ve Ion Proton olmak üzere 2 sistemi bulunmaktadır. Örnek hazırlama aşaması diğer sekans teknolojilerine göre daha ucuz olması ve kısa sürede sonuç elde edilmesi nedeniyle patojenlerin tüm genomunun dizilenmesinde yaygın bir kullanım alanı bulmuştur (Rothberg ve ark., 2011).

Ligasyon aracılığıyla sekanslama yöntemini kullanan ABI SOLiD ve Polonator sistemlerinin esası ise floresan işaretli farklı uzunluktaki oligonükleotit problemlerin DNA parçaları ile hibridizasyonunu sağlayacak bilinen kısa bir dizi ile birleştirilmesine dayanmaktadır (Şekil 4B). Floresan etiketleme hangi problemin bağlandığını tespit etmek için kullanılmaktadır. İşlem, dizileri değerlendirmek için farklı problemler kullanılarak tekrarlanmaktadır (Egan ve ark., 2012). Diğer bir sekanslama yöntemi olan tek molekül dizileme ise üçüncü nesil sekanslama olarak bilinmekte ve tek bir nükleik asitten DNA dizisini elde ederken kimyasal ışımaya ile nükleotid bağlanması esasındaki sinyalin tespit edilmesine dayanmaktadır. Bu yöntemden yararlanan HeliScope (Helicos, Inc.) ve Pacific BioSciences sistemleri floresan görüntüleme kullanılmaktadır. Floresan işaretli nükleotidler sırayla ortama bırakılarak nükleotid dizisi tespit edilmektedir (Deschamps ve Campbell, 2010). Bununla birlikte günümüzde Single-Molecule Real-Time (SMRT) ve Nanopore sequencing (Oxford Nanopore MinION system) teknolojilerinin kullanımı da yaygınlaşmaktadır. SMRT sıfır modlu dalga boyu (zero-mode waveguide; ZMW) modelini kullanan tek molekül sekanslama yöntemidir ve ZMW tek bir DNA nükleotidinin DNA polimeraz ile

birleştiğini tespit edebilecek kadar küçük bir hacme sahiptir (Levene ve ark., 2003). ZMW modelini kullanan Pacific BioSciences sekanslama yönteminin okuma uzunluğu yüksek olmasına rağmen hata oranı %5-15 arasındadır ve örnek hacminin Illumina sekanslama yönteminden daha düşük olduğu bildirilmektedir (Pollock ve ark., 2018). Nanopore sequencing yönteminin çalışma prensibi ise nükleik asitlerin bir protein nanoporundan geçerken elektrik akımındaki değişimlerin izlenmesi esasına dayanmaktadır. Elde edilen sinyal kodları spesifik DNA veya RNA dizisini elde etmek için çözümlenmektedir (Anonim, 2021).

NGS teknolojilerini genel olarak değerlendirdiğimizde en büyük avantajları DNA parçalarının klonlanması gerekmeksizin, 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.



Şekil 4. Sentez aracılığıyla sekanslama yöntemlerinden Illumina Miseq (A), Ligasyon aracılığıyla sekanslama yöntemlerinden ABI SOLiD (B) sekanslama şemaları (Voelkerding ve ark. 2009; Anonim, 2020d)

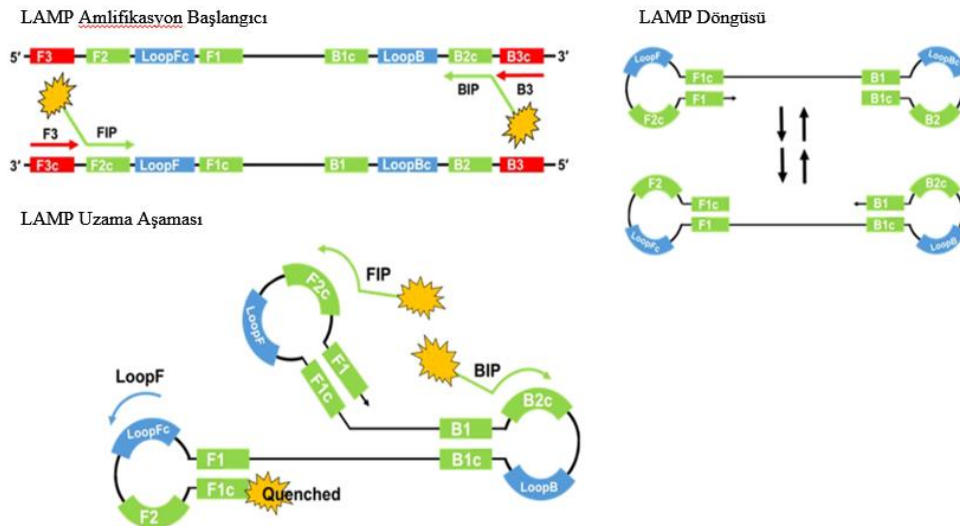
NGS teknolojilerine dayalı yöntemler özellikle bitki patojeni virüslerin tanısı ve karakterizasyonunda yaygın bir şekilde kullanılmasının yanı sıra, patojen bakteri ve fungusların tespiti ve karakterizasyonunda da önemli bir yer tutmaktadır (Adams ve ark., 2009; Kreuze ve ark., 2009; Cantu ve ark., 2011; Barba ve ark., 2014). Bu kapsamda farklı sekanslama teknolojileri kullanılarak *Phytophthora infestans*, *Ustilago maydis*, *Magnaporthe grisea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis*

cinerea, *Aspergillus flavus*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium graminearum* gibi birçok model fungusun tüm genom sekansları elde edilmiştir (Anonim, 2020e).

Loop Aracılı İzotermal Amlifikasyon (LAMP)

Loop aracılı izotermal amlifikasyon (Loop-mediated isothermal amplification; LAMP), Notomi ve ark., (2000) tarafından hepatit B virüsünün tespiti için geliştirilen hedef DNA'nın yüksek özgünlükte ve etkinlikle tespitini sağlayan güçlü bir nükleik asit amlifikasyon yöntemidir. LAMP, özel olarak tasarlanan primer setleri ve *Geobacillus stearothermophilus* termofilik bakterisinden elde edilen *Bst* polimeraz enzimi aracılığıyla hedef DNA'nın, izotermal koşullar altındaki su banyosu, ısı blokları gibi alanlarda 1 saatten daha kısa sürede amlifikasyonu ile gerçekleşmektedir (Mumford ve ark., 2006). Klasik ve Real time PCR gibi pahalı ekipmanlara ve uzun süren ön hazırlıklara ihtiyaç duyulmaması en önemli avantajları arasındadır (Fu ve ark., 2011).

Uygun hedef bölge tanımlandıktan sonra primerler (forward primerler (F1-F2-F3); backward primerler (B1-B2-B3)) hedef sekansın birbirinden ayrı 6 bölgesine spesifik olarak dizayn edilmektedir. Reaksiyonun başlarında tüm primerler çalışırken daha sonraki döngülerde sadece içteki primerler kullanılmaktadır. Dıştaki primerler F3 ve B3 olarak nitelendirilirken, içteki primerler forward inner primer (FIB) ve backward inner primer (BIP) olarak isimlendirilmektedir (Şekil 5). Hem BIP hem de FIB hedef DNA'nın sense ve antisense sekanslarıyla ilişkili iki ayrı sekans içermektedir. Primerlerin erime sıcaklığı, sekansı ve boyu, *Bst* polimerazın optimum çalıştığı sıcaklık (60-65°C) aralığına göre seçilmektedir. İçteki primerlerin dıştaki primerlerden daha erken senteze başladığından emin olmak için, F3 ve B3'ün Tm sıcaklıkları F2 ve B2'den daha düşük olmak durumundadır. Ayrıca, içteki primerlerin konsantrasyonu dıştakilerin konsantrasyonundan daha yüksek olması gerekmektedir (Notomi ve ark., 2000, Tomita ve ark., 2008). F2c ile F1c ve B2c ile B1c arasında loop (dambıl)'un farklı boyları değerlendirilmiş ve en iyi sonuç 40 bç büyüklüğündeki veya daha uzun looplarda görülmüştür. Amlifikasyon hızının DNA sentezine bağlı olması nedeniyle hedef DNA'nın büyüklüğü, LAMP etkinliği için önemli bir kriterdir (Notomi ve ark., 2000).



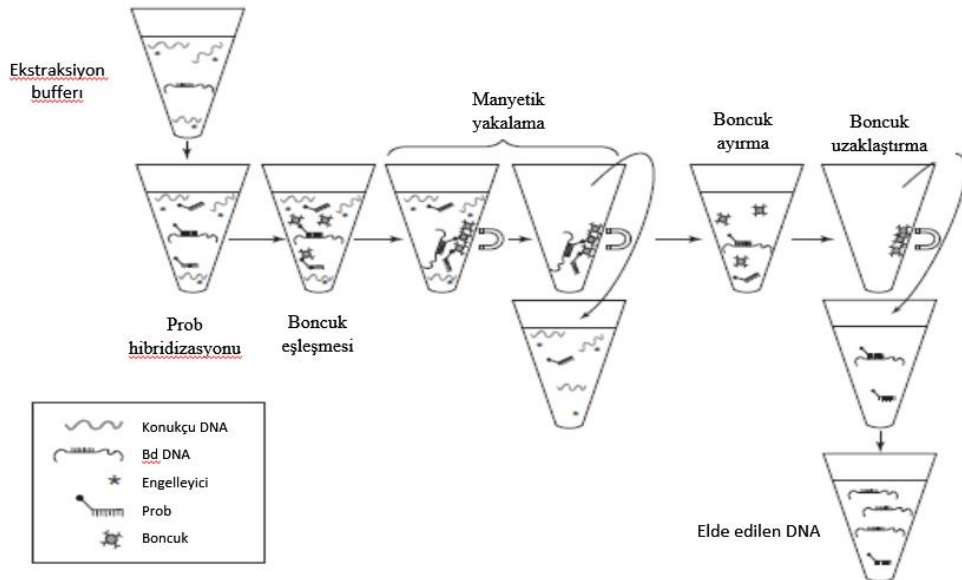
Şekil 5. LAMP amlifikasyon uygulama şeması (Hardinge ve Murray 2019)

LAMP, insanlarda ve hayvanlardaki bakteriyel ve viral hastalık etmenlerinin tespitinde, bitkilerde ve vektör böceklerde patojen olan bakteri ve virüslerin tanımlanmasında başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Fukuta ve ark., 2003; Nie, 2005; Okuda ve ark., 2005). Funguslarda ilk uygulama, enfekteli buğday danelerindeki *Fusarium graminearum* gelişiminin tespiti için yapılmış ve toksik *Fusarium* türlerinin erken tespit edilmesini sağlamıştır (Niessen ve Vogel, 2010). Nohut tohumlarında ve bitki dokusunda

Ascohyta rabie'nin düşük miktarlardaki varlığı klasik PCR ile belirlenemezken, LAMP yöntemi ile tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2016). Diğer bir çalışmada, *Sclerotinia sclerotiorum* fungusuna ait SsoS5 sekans bölgesi hedef alınarak patojen varlığı LAMP yöntemi ile ortaya konmuştur (Duan ve ark., 2014). Amplifikasyon öncesi hydroxynaphthol mavisi (HNB) reaksiyona eklenmiş ve patojen DNA'sının olduğu örnekler karakteristik gökyüzü mavisi rengini alırken, enfekteli olmayan ve diğer funguslarla enfekteli olan örneklerde renk değişimi gözlenmemiştir. LAMP ile $0.1 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$ patojen miktarı tespit edilebilirken, geleneksel PCR'da bu miktar $100 \text{ fg } \mu\text{l}^{-1}$ olmuştur. Erken dönemde çok düşük konsantrasyonlardaki patojen miktarını tespit edebilme ve hızlı sonuç alınabilmesi ile LAMP'in hastalıkların erken tanısında ve epidemi risklerini azaltmada potansiyel bir uygulama olacağı bildirilmiştir (Yao ve ark., 2016).

Manyetik Yakalama Hibridizasyon (MCH)-PCR

Manyetik yakalama hibridizasyon (Magnetic capture hybridization; MCH-PCR) yöntemi, hedef patojen DNA'sının çok düşük miktarlarda olması durumunda, klasik DNA ekstraksiyonları ile patojen DNA'sının izole edilememesi ve PCR inhibitörlerinden dolayı karşılaşılan negatif sonuçların azaltılması amacıyla geliştirilmiştir. İlk olarak biyotin ile etiketlenmiş patojene spesifik propların manyetik boncuklarla kaplanarak hedef DNA'ya bağlanması sağlanmaktadır (Şekil 6). Bu amaçla örnek süspansiyonu 100°C de inkübe edilerek çift sarmal patojen DNA'sının tek sarmal hale gelmesi sağlanarak, manyetik boncuklarla kaplı propların tek sarmal DNA'lara bağlanması beklenmektedir. Hibridize olan prob-patojen DNA'sı, üstlerinde bulunan manyetik boncukların özel mıknatıslar yardımıyla tutulması ile tüpün cidarında toplanmaktadır. Klasik ekstraksiyon yöntemleriyle karşılaştırıldığında, hedef DNA'nın kayıpları büyük oranda engellenerek düşük miktarlardaki patojen DNA'sının diğer moleküllerden ayrılması sağlanmaktadır. Elde edilen DNA, klasik PCR reaksiyonunda kullanılarak patojenin tanısı yapılmaktadır (Rodriguez ve ark., 2012).



Şekil 6. MCH-PCR uygulama şeması (Rodriguez ve ark. 2012)

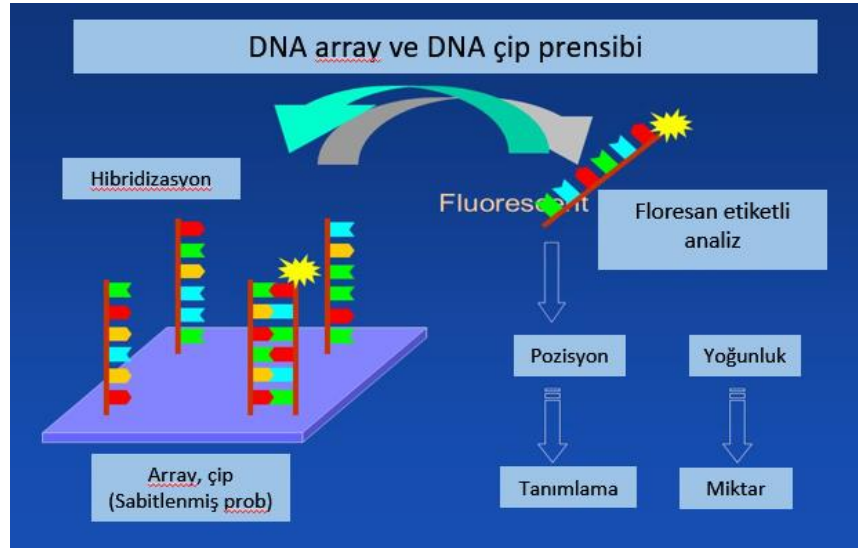
Çok sayıda patojenin bulunduğu örneklerde ve düşük miktarlarda DNA elde edilen tohum ve toprak kökenli patojenlerin tespiti için uygun bir yöntem olduğu bildirilmektedir (Walcott ve ark., 2004; Ha ve ark., 2009). Soğanda boyun çürüklüğü etmeni *Botrytis aclada* tespitinde klasik ve (MCH)-PCR yöntemi karşılaştırılmış ve klasik PCR ile $1 \times 10^{-1} \text{ ng/ml}$ patojen DNA'sı tespit edilebilirken, (MCH)-

PCR ile 1×10^{-4} ng/ml kadar düşük oranlardaki patojen DNA'sı tespit edilmiştir (Walcott ve ark., 2004). Bir başka çalışmada, (MCH)-PCR multiplex Real Time PCR yöntemiyle birleştirilerek, kavun ve karpuz tohumlarından iki farklı patojenin (*Didymella bryoniae*, *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) tespit edilmesi için kullanılmıştır. MCH ile birleştirilmiş Real time PCR ile doğrudan Real Time PCR karşılaştırıldığında, (MCH)-PCR ile birleştirilmiş Real time PCR'in daha hassas sonuçlar verdiği görülmüştür (Ha ve ark., 2009).

DNA array hibridizasyon

DNA array teknolojisi naylon filtre (makroarray) veya cam lam (mikroarray) üzerinde sabitlenmiş oligonükleotit problemlerden oluşmaktadır. Mikroarray 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 amplikonları arasındaki hibridizasyona bağlıdır. En iyi hibridizasyon 50 ve 80 bp arası uzunluktaki problemlerde elde edilmektedir (Yang ve ark., 2001). Yüksek ayırım gücü ile iki amplikon arasındaki tek nükleotid farklılıklarını (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) açığa çıkarmaktadır (Lievens ve ark., 2006, Zhang ve ark., 1991). 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 (Bumgarner R, 2013).

Uygulamada, oligonükleotitler veya mikrokodlar taksonomik olarak uygun genom bölgelerine göre tasarlanmaktadır. Oligonükleotitler manuel olarak, SigOli ve Array Designer (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) gibi bilgisayar programları aracılığıyla seçilmektedir. Sentezlenen 5' amin modifikasyonlu oligonükleotitler naylon membran veya cam tabaka gibi bir destek platformu üzerine yerleştirilmektedir. Amplikon ile eşleşen oligonükleotitler arasındaki pozitif reaksiyon sonucu kemilüminesans sinyal üretilmektedir (Şekil 7). Üretilen bu sinyal karanlık odada dijital kamera veya röntgen filmi aracılığıyla tespit edilerek elde edilen görüntüler GenePix Pro gibi bilgisayar programlarında analiz edilmektedir (Bumgarner, 2013).



Şekil 7. DNA array hibridizasyon uygulama şeması (Anonim, 2020f)

Bitki patojeni fungusların tespitinde ise *Fusarium* gibi yakın akraba türlerin tanısında ve ayrımında uygun olduğu bildirilmiştir (Kristensen ve ark., 2007). Liebe ve ark. (2015) şeker pancarında kök çürüklüğüne neden olan patojenleri tespit etmek için DNA mikroarray teknolojisini kullanmış ve yaptıkları çalışmada ITS, translation elongation factor 1 alpha (TEF 1 alpha), 16S ribozomal DNA bölgelerini hedef alan problemler tasarlamıştır. *Aphanomyces cochlioides*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium*

expansum patojenlerin tanısının yapıldığı çalışmada, mikroarray teknolojisinin, çok sayıda patojenin olduğu durumlarda hızlı ve güvenilir bir tespit yöntemi olduğu bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada ise DNA çip hibridizasyon yöntemi ile ras-related GTP-binding protein 1 gen (*Ypt1*) ve ITS bölgelerini hedef alan probalar aracılığıyla *Phytophthora* türlerinin tespiti gerçekleştirilmiş ve aynı anda bir mikroarray çipi üzerinde 40 *Phytophthora*, 2 *Pythium* ve bir tane *Phytopythium* türü tespit edilmiştir (König ve ark., 2015).

SONUÇ

Bitki patojenlerinin neden oldukları ekonomik kayıpların azaltılabilmesi için hızlı ve doğru bir şekilde tespit edilmesi, uygun kontrol stratejilerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Özellikle karantinaya dâhil olan etmenlerin en hızlı şekilde tanısı yapılmalı ve bu hastalıkların ülkeye girişi ve yayılması engellenmelidir. Birçok bitki patojeninin klasik tespitinde karşılaşılan genel sorunlar ve günümüzde bazı bitki patojenlerinin taksonomik gelişmelere bağlı olarak morfolojik karakterler ile ayrılabilmesi nedeniyle bitki patojenlerinin tespiti ve tanısında moleküler tekniklerin kullanılması zorunlu hale gelmiştir. Ancak patojenlerin tanınması ve doğru tespit yöntemlerinin seçilmesinde patojenin karakteristik özellikleri, miktarı, ortam koşulları ve mevcut imkânlar göz önüne alınmalıdır. Bu kapsamda mevcut patojene ve ortam koşullarına göre kullanılan yöntemler farklılık göstermektedir. Bu nedenle ülkemizde de uluslararası standardize olmuş tekniklerin kullanılabilir hale getirilmesi ve bu alanda çalışmaların yapılması bitki mikolojisi açısından önem teşkil etmektedir. Bu derleme çalışmasının, ülkemizdeki bitki patojenlerinin hızlı bir şekilde tespit edilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

Yazar Katkısı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamıştır.

KAYNAKLAR

- Adams IP, Glover RH, Monger WA, Mumford R, Jackeviciene E, Navalinskiene M, Boonham N, 2009. Next-Generation Sequencing and Metagenomic Analysis: A Universal Diagnostic Tool in Plant Virology. *Molecular Plant Pathology*, 10 (4): 537-545.
- Amann R, Glöckner FO, Neef A, 1997. Modern Methods in Subsurface Microbiology: in Situ Identification of Microorganisms with Nucleic Acid Probes. *FEMS Microbiology Reviews*, 20 (3-4): 191-200. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00308.x>.
- Amann RI, 1995. In Situ Identification of Micro-Organisms by Whole Cell Hybridization with rRNA-Targeted Nucleic Acid Probes. In: Akkermans A.D.L., Van Elsas J.D., De Bruijn F.J. (eds) *Molecular Microbial Ecology Manual*. 331-345. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0351-0_23.
- Amann, R, Fuchs BM, 2008. Single-cell Identification in Microbial Communities by Improved Fluorescence in Situ Hybridization Techniques. *Nature Reviews Microbiology*, 6 (5): 339-348.
- Anonim, 2014. Real-time PCR Handbook, Life Technologies, <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>. (Erişim Tarihi: 29.01.2020).
- Anonim, 2016. Real-Time PCR Applications Guide. https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf. (Erişim Tarihi: 29.02.2020).
- Anonim, 2020a. Scorpions® Primers and Probes. <https://www.biosyn.com/scorpions-primers.aspx> (Erişim Tarihi: 28.03.2020).
- Anonim, 2020b. Dual-Labeled Probes. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/dual-labeled-probes.html> (Erişim Tarihi: 27.03.2020).

- Anonim, 2020c. Fluorescence in Situ hybridization (FISH). <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Fluorescence-In-Situ-Hybridization> (Erişim Tarihi: 29.03.2020).
- Anonim, 2020d. Illumina dye sequencing. https://en.wikipedia.org/wiki/Illumina_dye_sequencing (Erişim Tarihi: 25.02.2020).
- Anonim, 2020e. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Erişim Tarihi: 25.02.2020).
- Anonim, 2020f. Transcriptome and analysis of gene transcription. <https://slideplayer.com/slide/5880309/> (Erişim Tarihi: 25.02.2020).
- Anonim 2021. Oxford Nanopore Technologies. <https://nanoporetech.com/applications/dna-nanopore-sequencing> (Erişim Tarihi: 01.04.2021).
- Arnoldi J, Schlüter C, Duchrow M, Hübner L, Ernst M, Teske A, Flad HD, Gerdes J, Böttger EC, 1992. Species-Specific Assessment of Mycobacterium Leprae in Skin Biopsies by in Situ Hybridization and Polymerase Chain Reaction. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 66 (5): 618-623.
- Barba M, Czosnek H, Hadidi A, 2014. Historical Perspective, Development and Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Virology. *Viruses* 6: 106–36.
- Bayraktar H, Özer G, Aydoğan A, Palacioğlu G, 2016. Determination of Ascochyta Blight Disease in Chickpea Using Real-Time PCR. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 123 (3): 109-117.
- Bilodeau GJ, Lévesque CA, De Cock Awam, Duchaine C, Brière S, Uribe P, Martin FN Hamelin RC, 2007. Molecular Detection of *Phytophthora ramorum* by Real-Time Polymerase Chain Reaction Using Taqman, SYBR Green, Molecular Beacons. *Phytopathology*, 97 (5): 632-642.
- Bonants PJ, van Gent-Pelzer MP, Hooftman R, Cooke DE, Guy DC, Duncan JM, 2004. A Combination of Baiting and Different PCR Formats, Including Measurement of Real-Time Quantitative Fluorescence, for the Detection of *Phytophthora fragariae* in Strawberry Plants. *European Journal of Plant Pathology*, 110 (7): 689-702.
- Bumgarner R, 2013. Overview of DNA Microarrays: Types, Applications, and Their Future. *Current Protocols in Molecular Biology*, 101 (1): 22-1.
- Cantu D, Govindarajulu M, Kozik A, 2011. Next-Generation Sequencing Provides Rapid Access to the Genome of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, The Causal Agent of Wheat Stripe Rust. *PLoS ONE* 6 (8): e24230.
- Capote N, Aguado A, Pastrana AM, Sánchez-Torres P, 2012. Molecular Tools for Detection of Plant Pathogenic Fungi and Fungicide Resistance, 151-202.
- Chen X, Ma L, Qiang S, Ma D, 2016. Development of A Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for the Rapid Diagnosis of *Ascochyta rabiei* L. in Chickpeas. *Scientific Reports*, 6.
- Deschamps S, Campbell MA, 2010. Utilization of Next-generation Sequencing Platforms in Plant Genomics and Genetic Variant Discovery. *Molecular Breeding*, 25 (4): 553-570.
- Didenko VV, 2001. DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications. *Biotechniques*, 31 (5): 1106.
- Duan Y, Ge C, Zhang X, Wang J, Zhou M, 2014. A Rapid Detection Method for the Plant Pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* based on Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Australasian Plant Pathology*, 43 (1): 61-66.
- Egan AN, Schlueter J, Spooner DM, 2012. Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Biology.
- Ellison MA, McMahon MB, Bonde MR, Palmer CL, Luster DG, 2016. In Situ hybridization for the detection of rust fungi in paraffin embedded plant tissue sections. *Plant Methods*, 12 (1): 37.
- El-Metwally S, Osama OM, Mohamed H, 2014. Next Generation Sequencing Technologies and Challenges in Sequence Assembly. *Springer No:7, s. XII-118, New York-USA*.
- Fredslund J, Lange M, 2007. Primique: Automatic Design of Specific PCR Primers for Each Sequence in a Family. *BMC Bioinformatics*, 8 (1): 369.
- Fu S, Qu G, Guo S, 2011. Applications of Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163: 845–50.
- Fukuta S, Iida T, Mizukami Y, 2003. Detection of Japanese Yam Mosaic virus by RT-LAMP. *Archives of Virology*, 148: 1713–20.

- Garrido C, Acero FGF, Carbú M, Rodriguez VEG, Liniero E, Cantoral JM, 2012. Molecular Microbiology Applied to the Study of Phytopathogenic Fungi. Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. Rijeka, InTech, 139-156.
- Garrido C, Carbu M, Acreo FJ, Boonham N, Coyle A, Cantoral JM, Budge G, 2009. Development of Protocols for Detection of *Colletotrichum acutatum* and Monitoring of Strawberry Anthracnose Using Real-Time PCR. Plant Pathology, 58: 43–51.
- Ha Y, Fessehaie A, Ling KS, Wechter WP, Keinath AP, Walcott RR, 2009. Simultaneous Detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citricola* and *Didymella bryoniae* in Cucurbit Seedlots Using Magnetic Capture Hybridization And Real-time Polymerase Chain Reaction. Phytopathology, 99 (6): 666-678.
- Hardinge P, Murray JA, 2019. Reduced False Positives and Improved Reporting of Loop-Mediated Isothermal Amplification Using Quenched Fluorescent Primers. Scientific Reports, 9 (1): 1-13.
- Hawksworth DL, 2001. The Magnitude of Fungal Diversity: the 1.5 Million Species Estimate Revisited. Mycological Research, 105 (12): 1422-1432.
- Kempf VA, Trebesius K, Autenrieth IB, 2000. Fluorescent in Situ Hybridization Allows Rapid Identification of Microorganisms in Blood Cultures. Journal of Clinical Microbiology, 38 (2): 830-838.
- König S, Schwenkbier L, Pollok S, Riedel M, Wagner S, Popp J, Weber K, Werres S, 2015. Potential of *Ypt1* and *ITS* gene regions for the detection of *Phytophthora* species in a lab-on-a-chip DNA hybridization array. Plant Pathology, 64 (5): 1176-1189.
- Kreuze JF, Perez A, Untiveros M, Quispe D, Fuentes S, Barker I, Simon R. 2009. Complete Viral Genome Sequence and Discovery of Novel Viruses by Deep Sequencing of Small RNAs: a Generic Method for Diagnosis, Discovery and Sequencing of Viruses. Virology. 25;388(1):1-7. doi: 10.1016/j.virol.2009.03.024. Epub 2009 Apr 23. PMID: 19394993.
- Kristensen R, Berdal KG, Holst-Jensen A, 2007. Simultaneous Detection and Identification of Trichothecene and Moniliformin producing *Fusarium* Species Based on Multiplex SNP Analysis. Journal of Applied Microbiology, 102 (4): 1071-1081.
- Kuang T, Chang L, Peng X, Hu X, Gallego-Perez D, 2017. Molecular Beacon Nano-sensors for Probing Living Cancer Cells. Trends in Biotechnology, 35 (4): 347-359.
- Levene MJ, Korlach J, Turner SW, Foquet M, Craighead HG, Webb WW, 2003. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. Science, 299 (5607): 682-686.
- Li AY, Crone M, Adams PJ, Fenwick SG, Hardy GE, Williams N, 2014. The Microscopic Examination of *Phytophthora cinnamomi* in Plant Tissues Using Fluorescent in Situ Hybridization. Journal of Phytopathology, 162 (11-12): 747-757.
- Liebe S, Christ DS, Ehrlich R, Varrelmann M, 2015. Development of a DNA Microarray-based Assay for the Detection of Sugar Beet Root Rot Pathogens. Phytopathology, 106 (1): 76-86.
- Lievens B, Claes L, Vanachter AC, Cammue BP, Thomma BP, 2006. Detecting Single Nucleotide Polymorphisms Using DNA Arrays for Plant Pathogen Diagnosis. FEMS Microbiology Letters, 255 (1): 129-139.
- Martin FN, Tooley PW, Blomquist C, 2004. Molecular Detection of *Phytophthora ramorum*, The Causal Agent of Sudden Oak Death in California, and Two Additional Species Commonly Recovered From Diseased Plant Material. Phytopathology, 94 (6): 621-631.
- Mirmajlessi SM, Loit E, Maend M, Mansouripour SM, 2015. Real-Time PCR Applied to Study on Plant Pathogens: Potential Applications in Diagnosis—A Review. Plant Protection Science, 51 (4): 177-190.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki RK, Horn GT, Erlich H, 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA in vitro: the Polymerase Chain Reaction. In Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 51: 263-273.
- Mumford R, Boonham N, Tomlinson J, Barker I, 2006. Advances in Molecular Phytodiagnosics – New Solutions for Old Problems. European Journal of Plant Pathology, 116: 1–19.
- Nie XZ, 2005. Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA for Detection of Potato virus Y. Plant Disease, 89: 605–10.

- Niessen L, Vogel RF, 2010. Detection of *Fusarium graminearum* DNA Using A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay. *International Journal of Food Microbiology*, 140: 183–91.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T, 2000. Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28 (12): e63-e63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63. PMID: 10871386; PMCID: PMC102748.
- Okubara PA, Schroeder KL, Paulitz TC, 2005. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Applications to Studies on Soilborne Pathogens. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 27 (3): 300-313.
- Okuda M, Matsumoto M, Tanaka Y, Subandiyah S, Iwanami T, 2005. Characterization of the Tufb-Sece-Nusg-Rplkajl-Rpob Gene Cluster of the Citrus Greening Organism and Detection by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Plant Disease*, 89: 705–11.
- Pollock J, Glendinning L, Wisedchanwet T, Watson M, 2018. The Madness of Microbiome: Attempting to Find Consensus “Best Practice” for 16s Microbiome Studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(7).
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT, 1997. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves During the Polymerase Chain Reaction. *Analytical Biochemistry*, 245(2): 154-160.
- Rodriguez D, Longo AV, Zamudio KR, 2012. Magnetic Capture Hybridization of *Batrachochytrium dendrobatidis* Genomic DNA. *Journal of Microbiological Methods*, 90 (3): 156-159.
- Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, Leamon JH, Johnson K, Milgrew MJ, Edwards M, Hoon J, 2011. An Integrated Semiconductor Device Enabling Non-Optical Genome Sequencing. *Nature*, 475 (7356): 348-352.
- Schena L, Li Destri Nicosia MG, Sanzani SM, Faedda R, Ippolito A, Cacciola SO, 2013. Development of Quantitative PCR Detection Methods for Phytopathogenic Fungi and Oomycetes. *Journal of Plant Pathology*, 7-24.
- Shendure J, Ji H, 2008. Next-generation DNA Sequencing. *Nature Biotechnology*, 26 (10): 1135-1145.
- Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T, 2008. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) of Gene Sequences and Simple Visual Detection of Products. *Nature Protocols*, 3 (5): 877-882.
- Varshney RK, Nayak SN, May GD, Jackson SA, 2009. Next-Generation Sequencing Technologies and Their Implications for Crop Genetics and Breeding. *Trends in Biotechnology*, 27: 522–30.
- Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD, 2009. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical chemistry*, 55 (4): 641-658.
- Wagner M, Horn M, Daims H, 2003. Fluorescence In Situ Hybridisation for the Identification and Characterisation of Prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*, 6 (3): 302-309.
- Walcott RR, Gitaitis RD, Langston DB, 2004. Detection of *Botrytis aclada* in Onion Seed Using Magnetic Capture Hybridization and The Polymerase Chain Reaction. *Seed Science and Technology*, 32 (2): 425-438.
- Yang YP, Corley N, Garcia-Heras J, 2001. Reverse Dot-Blot Hybridization As an Improved Tool for the Molecular Diagnosis of Point Mutations in Congenital Adrenal Hyperplasia Caused By 21-Hydroxylase Deficiency. *Molecular Diagnostics*, 6: 193–199.
- Yao X, Li P, Xu J, Zhang M, Ren R, Liu G, Yang X, 2016. Rapid and Sensitive Detection of *Didymella bryoniae* by Visual Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Zhang Y, Coyne MY, Will SG, Levenson CH, Kawasaki ES, 1991. Single-Base Mutational Analysis of Cancer And Genetic Diseases Using Membrane Bound Modified Oligonucleotides. *Nucleic Acids Research*, 19: 3929–3933.
- Zouhar M, Mazáková J, Prokinová E, Váňová M, Ryšánek P, 2010. Quantification of *Tilletia caries* and *Tilletia controversa* Mycelium in Wheat Apical Meristem by Real-Time PCR. *Plant Protection Science*, 46 (3): 107-115.
- Zwirgmaier K, 2005. Fluorescence in Situ Hybridisation (FISH)–The Next Generation. *FEMS Microbiology Letters*, 246 (2): 151-158.