

Balık Hastalıklarında Moleküler Genetik Belirteçler ve Kullanımları

Mustafa TÜRE^{1*}, Oğuzhan EROĞLU¹, Ercüment AKSAKAL²

¹Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü, Vali Adil Yazar Cad. No:14 Kaşüstü Beldesi Yomra/Trabzon.

²Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Erzurum

* Sorumlu yazar: Tel: +904623411053, Faks: +904623411152,
e-mail: mtüre@sumae.gov.tr, mustafa61ture@gmail.com

Geliş Tarihi : 06.07.2012
Kabul Tarihi: 27.09.2012

Abstract

Molecular Genetic Markers for Fish Diseases and Their Usage

Molecular techniques developed in recent years relatively faster and more sensitive than traditional methods that are used to research fish pathogens. Regard to detection and spread of fish pathogens can be obtained quick and reliable information thanks to techniques such as polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP), Pulse-field gel electrophoresis (PFGE), and multiplex PCR. Thus can be prevented outbreak diseases, reduced so that creation of antibiotic resistant bacteria and cost of treatment in aquaculture. In this paper, common molecular techniques are reviewed for detection and epidemiology of fish pathogens and their application are described.

Keywords: Aquaculture, fish pathogens, molecular methods.

Özet

Balık patojenleri ile yapılan araştırmalarda, son yıllarda geliştirilen moleküler teknikler, geleneksel metotlara göre nispeten daha duyarlı, güvenilir ve hızlıdır. Polimerize zincir reaksiyonu (PZR), restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmi (RFLP), itilmiş alan jel elektroforesizi (PFGE) ve çoklu PZR (multiplex PCR) gibi teknikler sayesinde, balık patojenlerinin tespiti ve yayılımı hakkında hızlı ve güvenilir bilgi alınabilmektedir. Böylelikle akuakültürdeki salgın hastalıkların önüne geçerek, hem antibiyotik dirençli bakteri gelişimi engellenmekte hem de tedavi harcamaları azaltılabilmektedir. Bu derlemede, balık patojenlerinin tespitinde ve epidemiyolojik araştırmalarında yaygın olarak kullanılan moleküler teknikler irdelenmiş ve kullanım alanlarından söz edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Akuakültür, balık patojenleri ve moleküler metotlar.

Giriş

İdeal bir çevrede herhangi bir klinik belirti göstermeyen canlılar üzerlerinde taşıdıkları patojenler ile popülasyonda ciddi hastalık riski oluştururlar. Yoğun üretim ve çevresel şartların aniden bozulması gibi stres yaratacak durumlarda hastalıklar ortaya çıkabilir. Bu nedenle taşıyıcı canlılardan hastalık etkenlerinin tespiti hastalıkların kontrol edilmesi açısından

oldukça önemlidir (Plumb, 1999). Geniş bir balık popülasyonunda normal görünen taşıyıcı balıklardan patojen tespiti oldukça zor, yüksek maliyetli ve spesifik sistem gerektirir (Altınok ve Kurt, 2003).

Geleneksel olarak bakteriyel balık patojenlerinin tespiti; etkenin agar üzerinde üretilmesini takiben fenotipik ve serolojik özel-

liklerinin belirlenmesi şeklinde gerçekleştirilir (Bernardet vd., 1990). Fakat yapılan çalışmalar aynı genus içerisinde olan bazı bakteriyel patojenlerin bu klasik testler sonucu farklılık göstermediklerini ortaya koymuştur (Eldar vd., 1996). Ayrıca bu klasik metotlar, yeterince hassas olmamaları, etkenin önce izole edilmiş olma gerekliliği ve düşük düzeyde patojenle sonuç verememesi gibi dezavantajlara sahiptirler (Altınok ve Kurt, 2003).

Son yirmi yılı aşkın sürede balık patojenlerinin tespiti üzerine moleküler biyolojinin kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. Moleküler biyoloji alanında balık patojenlerinin rutin tespiti ve kontrolü, bakteriyel ve viral etkenlerin epidemiyolojilerinin araştırılması rutin çalışmalar haline gelmiştir. Bu sayede birçok etkenin sadece tespiti değil aynı zamanda yayılımı ve korunma önlemleri konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Vela vd., 2000; Çağırğan, 2004; Türe vd., 2012).

Özellikle etkenlerin epidemiyolojisi alanında son yıllarda moleküler tiplendirme konusunda devrim niteliğinde gelişmeler gerçekleşmiştir. Antimikrobiyal duyarlılık testleri, serotiplendirme ve geleneksel biyokimyasal testlerin sonuçlarına göre aynı görünen izolatlar moleküler epidemiyoloji teknikleri sayesinde farklı oldukları ortaya konulmuştur. Yeni teknikler geliştirilirken bir yandan da eski teknikler modifiye edilerek daha az zaman ve çaba ile yüksek kalitede sonuçlar elde edilmiştir. (Mc Ellistrem vd., 2000).

Moleküler teknikler patojenlerin erkenden tespit edilmesinde geleneksel teşhis tekniklerine göre daha hızlı ve duyarlıdır. Asemptomatik balıklardan patojenlerin erken tespiti hastalık salgınlılarının önlenmesine ve antibiyotik kullanımının azaltılmasına yardımcı olur. Böylece antibiyotik dirençli bakterilerin oluşturacağı çevre zararının önüne geçilmiş olur. Hatta, nükleik asitlerin tespiti sayesinde kültür edilemeyen ya da ölü mikroorganizmaların tespiti

gerçekleştirilebilmiştir (Altınok ve Kurt, 2003).

Gelişen moleküler teknikler bakteriyel, viral ve paraziter balık hastalıklarının erken teşhisinde önemli avantajlar sağlarlar. Genel olarak, genetik materyalin (DNA ya da RNA) ilgili örnekten ekstrakt (elde) edilmesi ile işlem başlatılır. Sonrasında, çoğunlukla DNA spesifik primerler kullanılarak PZR işlemi yardımı ile amplifiye edilir. Balık üretimindeki değişik problemleri çözmek üzere Polimerize Zincir Reaksiyonu (PZR), Enterobacterial Repatitive Intragenic Consensus Element (ERIC-PZR), Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (PZR-RFLP), Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP), Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD), Multipleks (Çoklu) PZR, gibi PZR bazlı moleküler araçlar kullanılmaktadır (Prichard, 1997). PZR tabanlı olmayan uygulamalar olarak ise Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP) Pulsed-Field Jel Elektroforesiz (PFGE), In Sütü Hibridizasyon gibi teknikleri sayabiliriz (Yağcı, 2006).

Bu derlemenin amacı; balık üretiminde sıklıkla kullanılan moleküler tekniklerin bir değerlendirmesini yapmak ve bu tekniklerin nasıl kullanıldığı, avantaj ve dezavantajları hakkında güncel bilgi sunmaktır.

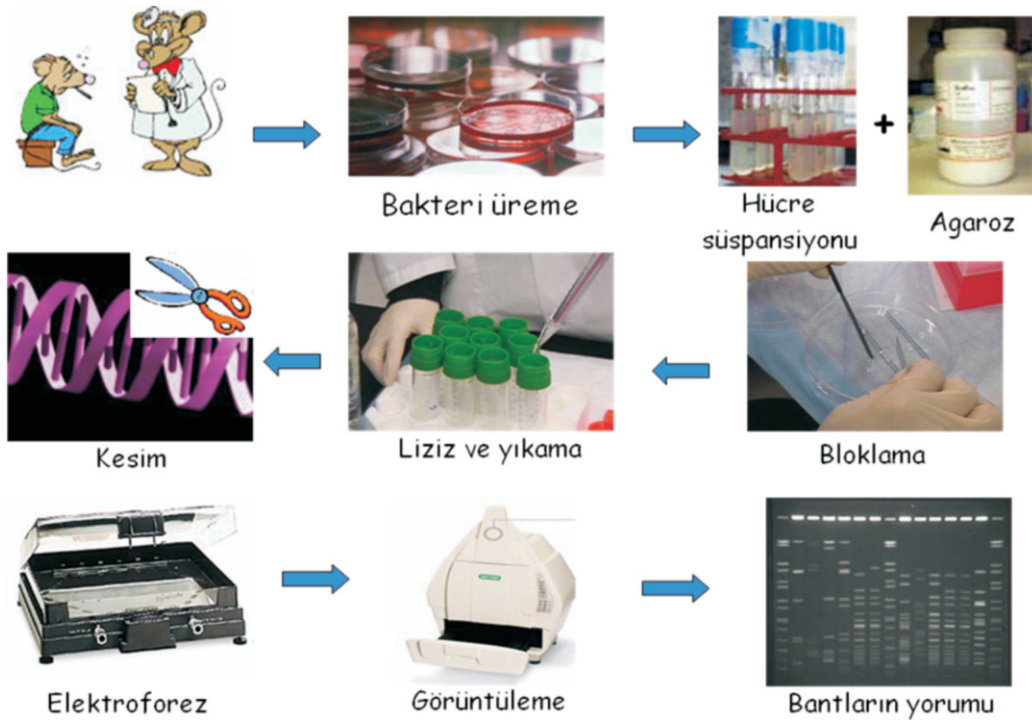
Pulsed-Field Gel Elektroforesiz (PFGE) Metodu

Pulsed-field gel elektroforesiz ilk kez Schwartz ve Cantor tarafından tanımlanmıştır (Schwartz vd., 1994). Bu metot, genomik DNA'nın kesici restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanarak PFGE tarafından fragmentlerin ayrılması ve bant örneklerinin karşılaştırılıp yorumlanması esasına dayanır. Geleneksel jel elektroforesiz 50 kilobaz çift (kb) kadar olan DNA fragmentlerini ayırabilirken, PFGE 10 megabaz çifti (Mb) aşan büyüklükteki bakteri, maya, virüs ve memelilerde dahil birçok

birçok türe ait kromozomal DNA'yı ayrıştırma kabiliyetine sahiptir (Schwartz ve Cantor, 1984; Gardiner, 1991).

PFGE enfeksiyon etkeni suşların karşılaştırılmalarında kullanılan bir metot olup bakteri suşlarının tanımlanmasında nadiren kullanılır. Son yıllarda izolatlar arası benzerlik ya da farklılıkların tespitinde mevcut en tartışmasız ayırıcı metottur (Olive ve Bean, 1999). PFGE'nin temel özelliği, jel üzerinde bir homojen elektrik alanının çoklu elektrot ve farklı voltajlar kullanılarak üretilmesidir (Chu vd., 1986). Bakteri yoğunluğu ve yaşı, DNA'nın kalite ve konsantrasyonu, agaroz konsantrasyonu, yıkama işlemi, kesici enzimin miktarı ve özelliği, bafırın sertliği, voltaj, pulse zamanı, ve sıcaklık gibi birçok faktör PFGE'deki görüntü kalitesini etkiler (Anonim 1). PFGE'de; katı veya sıvı besi yerinde üretilen bakteriler yoğunlukları ayarlandıktan sonra düşük erime ısıyla agaroz katılıp küçük kalıplar içerisine dökülmektedir. Kalıplardan bloklar halinde alınan bakteri hücreleri, deterjan ve enzim yardımıyla parçalanarak DNA

izolasyonu yapılmaktadır. Bu aşamada bakteri türüne göre değişmekle beraber lizozim, proteinaz K ve mutonolizin gibi farklı litik enzimler kullanılır. Liziz işlemi takiben agaroz blokları yıkanarak kontaminantlar uzaklaştırılır. Agaroz içindeki genomik DNA, nispeten az sayıda ve büyük parçalar oluşturabilen bir restriksiyon enzimi ile kesilir. ApaI, SpeI, Xba, SmaI gibi restriksiyon endonükleazlar sıklıkla tercih edilirler (Vela vd., 2000; Kawanishi vd., 2005; Türe vd., 2012). Daha sonra kesime uğratılan DNA blokları sertifikalı PFGE agaroz içerisine yerleştirilir ve belirli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımına tabi tutulur. Bu elektrik akımı ortalama 1 ila 800 kilobazlık DNA segmentlerinin ayırt edilmesini sağlar. Elektroferez işlemi bitince jel etidiyum bromür ile boyanarak her bir izolata ait bant profilleri görünür hale gelir (Turabelidze vd., 2000). Bu profiller, iyi gözlemlenerek, software yada bir istatistik programı ile yorumlanabilir. Şekil 1'de PFGE metodunun pratik adımları şematize edilmeye çalışılmıştır.



Şekil 1. PFGE'nin pratik adımları (Anonim, 1)

Blastula evresinin sonuna doğru, gastrulasyonun başlamasından önce, blastodiskün tüm çevresinde, hızlı hücre artışı ile kalınlaşma oluşmaktadır. Bu kalınlaşmış blastodisk çevresinin bir bölümü, geri kalan çevre bölümünden daha fazla kalınlaşmıştır. Bundan sonra gastrulasyon gerçekleşmektedir (Şekil 1).

Geniş kullanımı, yüksek ayırt etme gücü ve çok iyi epidemiyolojik uygulamalarından dolayı PFGE son 20 yıldır bakteriyel patojenlerin alt tiplerinde altın standart olarak kullanılmaktadır. Özellikle PFGE aynı türe ait bakterilerin tiplenmesinde PZR ve klasik elektroforezde yapılan RFLP'ye göre daha yüksek ayırt edici güce sahiptir (Olive ve Bean, 1999). PFGE tekniği kullanılarak akuakültürde ciddi ekonomik kayıplara yol açan birçok balık patojeninin epidemiyolojisi araştırılmıştır (Turabelidze vd., 2000; Vela, 2000; Kawanishi vd., 2005) Türkiye'nin farklı bölgelerinden alabalıklardan izole edilen *Lactococcus garvieae* suşlarının PFGE metodu kullanılarak epidemiyolojisi çalışılmış ve özellikle gökkuşağı alabalıkları için çok önemli olan bu patojenin genetik çeşitliliği ve yayılımı belirlenmiştir (Türe vd., 2012). Yine, Avustralya'da yapılan bir çalışmada balık ve insanlar için patojen olan *Streptococcus iniae* suşları PFGE metodu yardımıyla ilişkilendirilmiş ve bu zoonoz için koruyucu önerilerde bulunulmuştur (Nawawi vd., 2008).

2. Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus Element (ERIC-PZR)

Tarih boyunca türlerin (ökaryot, prokaryot) genetik yakınlıklarının araştırılması amacı ile birçok metot denenmiştir. Bunlardan PZR bazlı olanları geniş yayılım göstermiştir. PZR reaksiyonları diğerlerine oranla kolay, güvenilirlikleri yüksek ve nispeten ekonomiktir (Duan

vd., 2009).

Mikroorganizmaların ayrımının yapılmasında PFGE son yıllarda en güvenilir metot olarak bilinmesine rağmen RFLP en sık kullanılan metotlardan biridir. Her iki teknikte geniş kalitede DNA, fazla zaman ve uğraş gerektirmektedir. ERIC-PZR son yıllarda elde edilen sonuçlara bakıldığında birçok moleküler karakterizasyon tekniğinin yerini almıştır. Bu metot ile daha az zaman ve masrafla doğru sonuçlara ulaşılabilmektedir (Silveria vd., 2002).

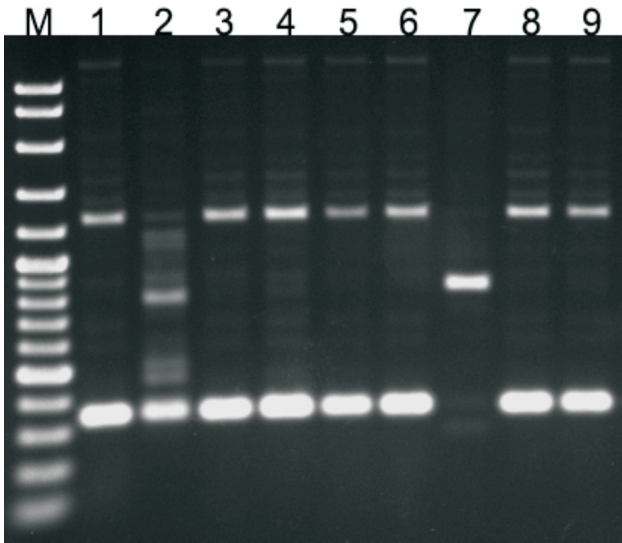
ERIC-PZR dizi tekrarına dayalı DNA amplifikasyonudur. Tüm organizmalar genomlarında tekrarlayan (repetitive) sekanslar bulundurur. Ökaryotik genomlarda DNA sekans organizasyonu tek kopya sekanslardan oluşmuş çok sayıda tekrarın aralıklı olarak dağılmasıyla gerçekleşir. Prokaryotik genomlarda ise çeşitli düşük kopya sayılı tekrar sekansı bulunur. Başlangıçta sadece Enterobacteriaceae ve Vibrinoceae türlerinde oldukları düşünülen ERIC ve REP sekanslarının birçok türde olduğu belirlenmiştir. Bu sekanslara yönelik primerler kullanılarak bakteri genomlarının parmak izleri ilk olarak 1991'de belirlenmiştir (Versalovic vd., 1991).

ERIC bir örnekteki nükleik asidin amplifikasyonu yapılarak kısa zamanda ve yüksek güvenilirlikte gerçekleştirilebilen genotiplendirmede kullanılan PCR bazlı metottur. PCR ürünü DNA'nın agaroz jel elektroforezine tabi tutulması ve sonra etidiyum bromür ile boyanan jelde oluşan DNA bantların yeri ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliktir. Bu metot bakteriyel kromozomal ve ekstra kromozomal DNA'nın veya viral genomun (RNA ve DNA) restriksiyon profillerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Dört temel adımda gerçekleştirilir: DNA'nın izolasyonu (RNA viruslar için önce RNA izole edilip RT-PZR ile cDNA elde edilir),

tek bir primer ile PZR yapılması, amplifiye olan DNA'nın jelde elektroforezi ve en son aşama ise jeldeki DNA'nın görüntülenmesidir (Yağcı, 2006).

ERIC-PCR Enterobakterilerin genotiplendirilmesinde başarıyla kullanılmıştır. Son yıllarda bu metot *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* ve *Aeromonas sp.* gibi balık patojenlerinin epidemiyolojik araştırmalarında kullanılmıştır (Yingwang vd., 2008).

Türkiye'de Gökkuşluğu Alabalıkları'ndan izole edilen kırk adet *Lactococcus garvieae* suşunun fenotipik ve genetik çeşitliliği ERIC-PZR metodu kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır (Türe, 2011). Şekil 2'de gram(+) bir bakteriden elde edilen ERIC-PZR modeli (profili) görünmektedir.



Şekil 2. ERIC-PZR modeli. M: markır (100bp), 1-9: bakteri suşları.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu DNA'nın spesifik bir bölgesinin bir çift primer ve ısıya dayanıklı Taq polimeraz (thermostable DNA polymerase) enzimi yardımı ile laboratuvar

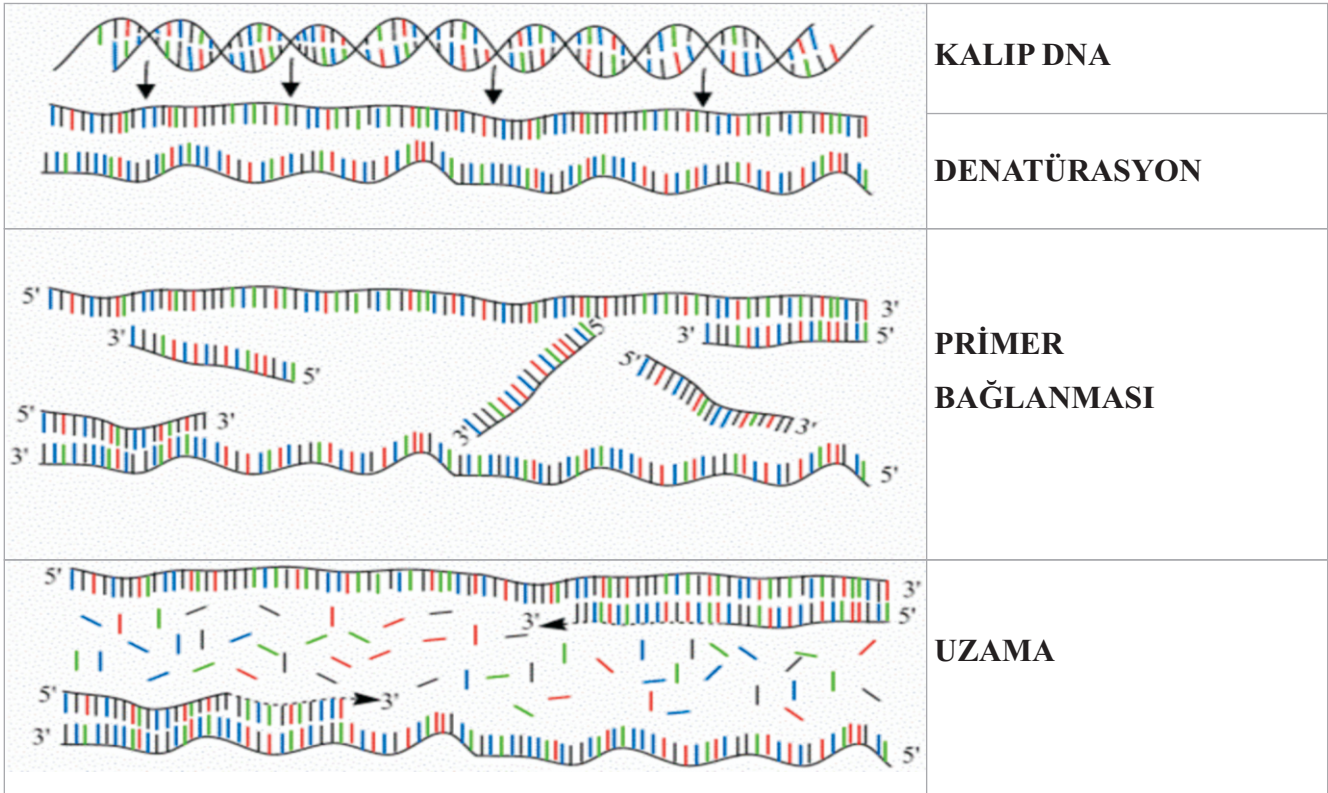
koşullarında en az bir milyon kez çoğaltılması ve ürünün jel elektroforez aracılığı ile tespit edilmesi esasına dayanır. Çoğaltılan bölge 150-3000 baz çifti uzunluğundadır (McPhearson vd., 1991). PZR bir başka deyişle in-vivo DNA replikasyonunun in-vitro gerçekleştirilmesidir. Reaksiyon için denatüre edilmiş DNA, oligonükleotitler (primer), desoksिनükleotid trifosfat (dNTP) ve DNA polimeraz enzimi gibi komponentler gereklidir. Üç basamaklı siklusun tekrarı şeklinde olur.

- İlk aşamada DNA denatüre olur.
- Daha sonra oligonükleotitlerin DNA'nın belirli bir bölgesini tanıyıp o bölge ile reaksiyona girerler.
- Polimeraz enzimi aracılığıyla yeni DNA zincirlerinin üretimi.

Söz konusu PCR basamakları ortalama olarak 25-35 kez tekrarlanmak suretiyle işlem tamamlanmış olur (Ün vd., 2000). Şekil 3'de PZR işlemi şematize edilmiştir.

Tersine PZR denen RT-PZR; RNA virusları ile çalışıldığı durumlarda, spesifik mRNA'nın tespiti ve gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesinde kullanılır (Koo ve Jaykus, 2000). Hücreden RNA'nın kantitesinin tespitinde duyarlı bir tekniktir. Son yıllarda real-time PZR'nin yaygınlaşması ile beraber gen ekspresyon düzeyindeki değişimlerin tespiti bu metotla yapılmaya başlamış ve birçok alanda klasik PZR'nin yerini almıştır (Altınok ve Kurt, 2003).

Ökaryot ve prokaryotlarda rRNA gen bölgeleri korunmuş sekanslar içerir. Bu korunmuş bölgelerin amplifiye edilmesi ile canlıda bulunan hatta kültür edilemeyen bakteri ve virusların isimlendirilmesi gerçekleştirilir (Barry vd., 1990). rRNA gen bölgelerinin çoğaltılması ile gerçekleştirilen PZR metodu, birçok balık patojeninin isimlendirilmesi ve epidemiyolojisi alanında çok sık başvurulan temel metot haline almıştır.



Şekil 3. PZR işlemi (Anonim, 2)

Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP)

Hızlı bir PZR tabanlı teknik olan AFLP, hem prokaryot hem de ökaryotların tiplendirilmesinde kullanılabilir. RFLP ve RAPD gibi metotların güçlü yanlarını toplayan, daha kullanışlı, multi-locuslu bir DNA parmak izi tekniğidir. Ana hedef, türler arası genetik varyasyonun belirlenmesidir. Bu metot tüm genomun restriksiyon enzimi ile parçalara ayrılmış DNA parçalarının seçici çoğaltılması esasına dayanır (Vos vd., 1995). Markırların PZR'de çoğaltılıp selekte edilmesi yöntemini kolay ve hızlı yapar. Bu metot; tarım, botanik, mikrobiyoloji ve hayvan araştırmalarında tür ve alt türlerin isimlendirilmelerinde hızlı, kolay ve güvenilir bir araçtır (Valsangiacomo vd., 1995).

AFLP analizi için küçük bir miktar pürifiye edilmiş genomik DNA gereklidir. Teknik herhangi bir organizmadan elde edilen DNA'nın önce bir çift restriksiyon enzimi (6 baz EcoRI, 4 baz MseI) ile kesimiyle başlar. Parçaların birer uçları yapışkan özelliktedir. Daha sonra 4 baz ve 6 baz

yapışkan uçlarına bağlanmak üzere tasarlanmış 2 adaptör (EcoRI ve MseI) üretilen parçalara bağlanır. Bu ligasyon işlemi PZR çoğaltımına olanak sağlar. Her iki restriksiyon enzimi 500 000 EcoRI-MseI parça üretimi gerçekleştirir. Primerlerdeki spesifik bazların sayısı değiştirilerek çoğaltılan parça sayısı kontrol edilebilir. Bu amaçla PZR primerlerinin 3' ucuna rastgele bir veya iki ekstra baz ilavesi yapılarak restriksiyon parçalarının alt dizilerinin selektif olarak çoğaltılması sağlanır. Son olarak PZR ürünleri jel elektrofrezde görüntülenip yorumlanır (Ajmone-Marsan vd., 1997). Bir adaptör ve bir enzim ilavesi ile alternatif AFLP tipleri üretilmiş ve jel elektrofrez ile analiz edilmiştir (Gibson vd., 1998).

(Congiu vd., 2002), mersin balıklarının tür içi ayrımlarında AFLP'den yararlanmışlardır. Bir başka çalışmada morfolojik olarak üç farklı renkteki kayabalıkları arasındaki genetik farklılık bu teknikten yararlanılarak çalışılmıştır (Kai vd., 2002).

Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP)

Organizmadan alınan doku örneklerinin toplam DNA'larının izole edilip bu ürünün nükleik asit sıralanışını tanıyan restriksiyon enzimleri ile kesilmesi ve oluşan DNA parçacıklarının elektroforezde ayrıldıktan sonra yorumlanması esasına dayanır (Şekil 4). PZR metoduna göre daha fazla örneğin kısa zamanda analiz edildiği bir metottur (Altınok vd., 2003). PZR bazlı olup olmamasına göre iki şekilde yapılır. Kromozomal DNA'nın direkt restriksiyon enzimi ile kesimi ancak temiz ve fazla miktarda DNA varlığında iyi sonuç verir. Yöntemin güvenilirliğini artırmak amacıyla eklenen yeni metotlarda zamanı ve maliyeti arttırmaktadır. Bu nedenle PZR bazlı RFLP çoğunlukla tercih edilmektedir (Yağcı, 2006). RE enzimi olarak, EcoRI, HindIII, HinfI sıklıkla tercih edilirler.

PZR-RFLP moleküler biyolojide en çok kullanılan metotlardan birisidir. DNA sekansına gerek kalmadan populasyon ve türler arasındaki birçok genetik çalışma gerçekleştirilebilir. Mevcut gen kaynaklarının tespiti, soyağacı oluşturmak sureti ile genetik açıdan benzerliklerin hesaplanması, her yaş ve boydaki ayırımı yapılamayan su canlılarının ayırımını yaparak taksonomik açıdan yaşanan sıkıntıların aşılması, mutasyon ve seleksiyon taramaları ve et satışındaki sahteciliklerin önüne geçilmesi bunlardan bazılarıdır (Aksakal ve Erdoğan, 2007).

RFLP metodu ayrıca ökaryot ve prokaryot hücre genomik DNA analizinde, bakteriyel ve viral suşlardaki mutasyonları tanımlamada, epidemiyolojik çalışmalarda, su ürünlerinde tür ve orijin tespitinde, genetik kaynakların kontrol altında tutulması ve korunması ve daha pek çok genetik hastalıkların tanısında kullanılmıştır. RFLP yöntemi uygulaması kolay fazla zaman gerektirmeyen bir yöntemdir. Dezavantajı çok sayıdaki sık bantların seçimi bazen mümkün olmayabilir. Bu nedenle enzim seçimine dikkat

etmek gerekir (Yağcı, 2006; Eroğlu vd., 2011).



Şekil 4. PZR-RFLP analizi

Ülkemizde, alabalıklarda PZR-RFLP analizi ile tür ve orijin belirlenmesi üzerine yapılan bir araştırmada, ülkemiz gen kaynaklarından olan doğal alabalığa ait detaylı bir doku ve DNA bankasının oluşturulması ve farklı metotlarla elde edilecek genetik verileri de kapsayan ulaşılabilir bir veri tabanı oluşturulmasının önemi üzerinde durulmuştur (Eroğlu vd., 2011).

Multipleks (Çoklu) PZR

Bu metot daha az zaman ve düşük maliyetle bir kaç patojenin aynı anda tespitine olanak sağlayan bir tekniktir (Williams vd., 1999). Klasik PZR'ye benzer ancak birden fazla PZR amplifikasyonu, birden fazla primer çifti tarafından aynı reaksiyon içerisinde birden fazla hedefin sekansı şeklinde gerçekleşir. Teknik işgücü, maliyet ve efor bakımından önemli avantajlar sağlar.

Aynı reaksiyon içerisinde birden fazla hedefin amplifikasyonu sağlanacağı için; primerlerin seçimine dikkat edilmesi, bağlanma sıcaklıklarının birbirine uygun olması, farklı primer çiftlerinin bir arada çalışmaları için en uy-

gun konsantrasyonlarının belirlenmesi gibi konulara önem gösterilmelidir (Chamberlain vd., 1988; Altınok, 2011). İnfeksiyöz balık hastalıkları alanında, bakteri, virus, mantar ve parazit gibi hastalık etkenlerinin teşhisine kısa sürede olanak sağlayan çok kullanışlı metotlardan biridir (Altınok ve Kurt, 2003).

Beş farklı balık patojeninin (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium columnare*, *Renibacterium salmoninarum* ve *Yersinia ruckeri*) tespiti amacıyla dizayn edilen çoklu PZR işleminde başarılı görüntüler elde edilmiş ve bu metodun balıklarda hastalıklara sebep olan farklı bakterilerin eş zamanlı olarak tespitinde duyarlı ve kullanışlı bir metot olduğu ispatlanmıştır (Altınok vd., 2008).

Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD)

RAPD ilk kez 1990'lü yıllarda tarımsal bitki varyetelerinin belirlenmesi amacı ile kullanılmıştır. Nokta mutasyonları ile ekleme veya çıkarmaların (delasyon, insersiyon) neden olduğu polimorfizmleri belirler. Bu metot balık çiftliklerinde problemlere sebep olan farklı bazı bakteri ve mantar izolatlarının incelenmesinde ve epidemiyolojik olarak incelemeler de kullanılmıştır. Kısa oligonükleotit primerlerin genom üzerlerinde bağlantı noktalarının farklılıklarına ve birbirlerine olan uzaklıklarına bağlı olarak türler arası genetik çeşitlilik ortaya konur (Lilley vd., 1997).

Basit, kolay ve hızlı bir teknik olarak bilinir. Kontaminasyon riskinden dolayı uygun bir metot olmamakla beraber spesifik primer yada problemlerin geliştirilmesi ile beraber bakteriyel çalışmalarda çabuk sonuç veren uygun bir teknik haline gelmiştir (Altınok ve Kurt, 2003). Bu teknikte mükemmele yakın bağlanma yerleri söz konusu olduğunda tek bir rastgele seçilmiş kısa primer ile DNA'nın çoğaltılmasına imkan sağlanır. Bunun için; bağlanma sıcaklığının düşük

olması, kısa primerin DNA'nın karşı iplikçığıne 3'ucu birbirine karşı gelecek şekilde bağlanması ve iki bağlanma noktasının yeterince yakın olması gibi kriterler gereklidir. Tüm bunların sonucunda DNA'nın rastgele seçilen bölgelerinin PZR ile çoğaltılması sonucu DNA'daki polimorf alanlarının belirlenmesi gerçekleştirilir. Bu teknik tür ayrımı ve taksonomi, filogenetik ilişkiler, hibridizasyon, genom haritalama ve stok ayrımı gibi konularda kullanılabilir. Birçok çalışmada, ticari olarak önemli balık ve omurgasızların genomik DNA segmentlerinin amplifikasyonu amacıyla, farklı balıklar arasındaki polimorfizmin belirlenmesinde ve farklı coğrafik alandan izole edilen bazı önemli balık patojenlerinin genetik olarak ilişkilendirilmeleri amacıyla kullanılmıştır (Ravelo vd., 2003; Okumuş, 2006).

Japonya'da yapılan bir çalışmada, farklı coğrafik alanlardan ve çoğunluğu Gökkuşluğu Alabalıkları'ndan elde edilen 57 *L. garvieae* suşunun parmak izi tespiti amacıyla RAPD tekniği kullanılmıştır. Bu çalışmada farklı alanlardan elde edilen izolatlar, benzerliklerine göre başarılı bir biçimde gruplandırılmış ve tekniğin balık patojenleri ile yapılan epidemiyolojik çalışmalarda uygun bir araç olduğu ispatlanmıştır (Ravelo vd., 2003).

Sonuç ve Öneriler

Son yıllarda moleküler biyolojide kullanılan tekniklerin ilerlemesi, sürekli bunlara yenilerinin eklenmesiyle birlikte su ürünlerinde bu tekniklerinin kullanımı çok yaygın bir hal almıştır. Ülkemizde, biyolojik çeşitlilik ve gen kaynaklarının varlığı açısından sahip olduğumuz doğal zenginliklerin varlığı fark edilmiş ve bunların korunmasına ilişkin genetik sahada yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Bu alanda yapılacak çalışmalara daha da ağırlık verilerek mevcut gen kaynaklarının koruma altına alınması gereklidir.

Balık yetiştiriciliğinin ve ihracatının her geçen gün arttığı ülkemizde, daha sağlıklı ürün yetiştirmek ve üretim giderlerini azaltmak için moleküler biyoloji alanındaki gelişmeleri iyi takip etmek ve bu metotlardan sonuna kadar yararlanmak zorunlu hale gelmiştir. Moleküler araçlar balık patojenlerinin teşhisi ve kontrol altına alınması çalışmalarında önemli avantajlar sağlamışlardır. Nükleik asitlerdeki polimorfaların analizi hızlı teşhisin yanı sıra türler arasındaki fenotipik ve genetik ilişkiyi de ortaya koymuştur. Bu çalışmanın amacı, akuakültürde, ülkemizde yaygın olarak kullanılan genetik markırların çalışma prensipleri, kullanım alanları, avantaj ve dezavantajları hakkında genel bilgi vermektir.

Sonuç olarak, akuakültürde kullanılan genetik markırlar, infeksiyöz balık hastalıklarının teşhis ve epidemiyolojisinde, tür içi ya da türler arası yapılacak taksanomik çalışmalarda, gen kaynakların tespiti ve korunması gibi daha birçok konuda yapılacak araştırmalar için rutin bir araç olmuşturlardır.

Kaynaklar

- Ajmone-Marsan, P., Valentini, A., Cassandro, M.G., Vecchiotti, A., Bertoni, G. ve Kuiper, M. 1997. AFLP markers for DNA fingerprinting in cattle. *Anim. Genet.*, 28: 418-426.
- Aksakal, E. ve Erdoğan, O. 2007. PCR-RFLP uygulamalarının su ürünlerinde kullanım alanları. *Türk Sucul Yaşam Dergisi*, Yıl: 3-5: 5-8.
- Altınok, İ. ve Kurt, I. 2003. Molecular diagnosis of fish diseases: a Review *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 3: 131-138.
- Altınok, İ., Çapkın, E. ve Kayış, ? 2008. Development of Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Five Bacterial Fish Pathogens. *Veterinary Microbiology*, 131: 332-338.
- Altınok, İ. 2011. Multiplex PCR Assay for detection of four Major bacterial pathogens causing rainbow trout. *Disease. Dis. Aquat. Org.*, 93: 199206.
- Anonim (1) www.pulsenetinternational.org. Kara Cooper. PFGE: General Overview and Troubleshooting Tips. Erişim tarihi: 25.03.2011.
- Anonim (2) www.genotyping.wordpress.com. Erişim tarihi: 24.04.2012.
- Barry, T., Powell, R. ve Gannon, F. 1990. A general method to generate DNA probes for microorganisms. *Bio/Tech.*, 8: 233236.
- Bernardet, J.F., Campbell, A.C. ve Buswell, J.A. 1990. *Flexibacter maritimus* is the agent of 'black patch necrosis' in Dover sole in Scotland. *Dis. Aquat. Org.*, 8: 233-237.
- Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N. ve Caskey, C.T. 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.*, 16: 11141-11156.
- Chu, G., Vollrath, D. ve Davis, R.W. 1986. Separation of Large DNA molecules by contour clamped homogeneous electric field. *Science*, 234: 1582-1587.
- Congiu, L., Fontana, F., Patarnello, T., Rossi, R. ve Zane, L. 2002. The Use of AFLP in Sturgeon Identification. *Journal of Applied Ich.*, 18: 286-289.
- Çağırğan, H. 2004. Biotyping of *Lactococcus garvieae* isolated from Turkey E.Ü. *Su Ürünleri Dergisi*, 21, 3-4: 267-269.
- Duan, H., Chai, T., Liu, J., Zhang, X., Qi, C., Gao, J., Wang, Y., Cai, Y., Miao, Z., Yao, M. ve Schlenker, G. 2009. Source Identification of Airborne *Escherichia coli* of Swine House Surroundings Using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environmental Research*, 109: 511517.
- Eldar, A., Ghittino, C., Asanta, L., Bvozzetz, E. ve Gorla, M. 1996. *Enterococcus seriolicida* is a Junior Synonym of *L. garvieae*, a causative agent of septicemia and meningoencephalitis in fish. *Curr. Microbiol.*, 32: 8588.
- Eroğlu, O., Firidin, Ş. ve Çiftçi, Y. 2011. A study on determination of origin and species by using sequense and PCR-RFLP analisis in salmonids. *Bibad Bilological Sciences*, 4(1): 77-83.
- Gardiner, K. 1991. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 63: 658-665.
- Gibson, J.R., Slater, E., Xerry, J., Tompkins, D.S. ve Owen, R.J. 1998. Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 2580-2585.
- Kai, Y., Nakayama, K. ve Nakabo, T. 2002. Genetic Differences among three Colours Morphotypes of the Black Rockfish, *Sebastes inermis*, Inferred from mtDNA and AFLP Analyses. *Molecular Ecology*, 11(12): 2591-2598.
- Kawanishi, A., Kojima, A., Ishihara, K., Esaki, H., Kijima, M. ve Takahashi, T. 2005. Drug Resistance and Pulsed-Field Gel Electrophoresis Patterns of

- Lactococcus garvieae* Isolates from Cultured Seriola (Yellowtail, Amberjack and Kingfish) in Japan. Lett. Appl. Microbiol., 40: 322328.
- Koo, K. ve Jaykus, L.A. 2000. Selective amplification of bacterial RNA: use of a DNA primer containing mismatched bases near its 3' terminus to reduce falsepositive signals. Lettters App. Microbiol., 31: 187-192.
- Lilley, J.H., Cerenius, L. ve Soderhall, K. 1997. RAPD evidence for the origin of crayfish plague outbreaks in Britain. Aquaculture, 157: 181-185.
- Mc Ellistrem, M.E. Stout, J. ve H. Harison, L. 2000. Simplifield Protocol for Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis of *Streptococcus pneumoniae*. Journal of Clinical Microbiology, 351-353.
- McPhearson, R.M., DePaola, A., Zywno, S.R., Motes, M.L. ve Guarino, A.M. 1991. Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria from cultured catfish and aquaculture ponds. Aquaculture, 99: 203-211.
- Nawawi, R.A., Baiano, J. ve Barnes, A.C. 2008. Genetic variability amongst *Streptococcus iniae* isolates from Australia. Journal of Fish Diseases, 31: 305309.
- Okumuş, İ. 2006. Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD PCR). Rize Üniversitesi. (Yayınlanmamış).
- Olive, B.M. ve Bean, P. 1999. Principles and Application of Methods DNA Based Typing of Microorganism. J. Clin. Microbiol. 37; 1661-1669.
- Plumb, J.A. 1999. Health maintenance and principle microbial diseases of cultured fishes. Iowa State University Press. Ames, Iowa: 344 s.
- Prichard, R. 1997. Application of molecular biology in veterinary parasitology. Vet. Parasitol., 71: 155175.
- Ravelo, C., Magarinos, B., Lopez-Romalde, S., Toranzo, A.E. ve Romalde, J.L. 2003. Molecular Fingerprinting of Fish-Pathogenic *Lactococcus garvieae* Strains by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. Journal of clinical Microbiology, 41, 2: 751-756.
- Schwartz, D.C. ve Cantor, C.R. 1984. Separation of yeast chromosomesized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell, 37: 6775.
- Silveria, W., Ferreira, A., Lancellotti, M., Barbosa, I., Leite, D., Castro, A. ve Brocchi, M. 2002. Clonal Relationships Among Avian *Escherichia coli* Isolates Determined by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)PCR. Veterinary Microbiology, 89: 323328.
- Turabelidze, D., Kotetishvili, M., Kreger, A., J. Morris, J.G. ve Sulakvelidze, A. 2000. Improved Pulse-Field Gel Elektroforesis for Typing Vancomycin-Resistant Enterococci. Journal of Clin. Microbiol., 4242-4245.
- Türe, M. 2011. *Lactococcus garvieae*'nin fenotipik ve genetik çeşitliliğinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi. Karadeniz Teknik Üniversitesi.
- Türe. M., Altınok, İ., Işidan, H., Savaş, H. ve Kutlu, İ. 2012. PFGE Metodu Kullanılarak *Lactococcus garvieae*'nin Genetik Çeşitliliğinin ve Yayılımının Belirlenmesi. TAGEM/HS/10/09/02/179. 61 s.
- Ün, C., Wimmer, K. ve Ponsuksili, S. 2000. Mikrosatellitler ve Kullanım Alanları. Hayvansal Üretim, 41: 9-14.
- Valsangiacomo, C., Baggi, F., Gaia, V., Balmelli, T., Peduzzi, R. ve Piffaretti, J. 1995. Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. J. Clin. Microbiol., 33: 1716-1719.
- Vela, A.I., Vazquez, J., Gibello, A., Blanco, M.M., Moreno, M.A. ve Liebana, P. 2000. Phenotypic and Genetic Characterization of *Lactococcus garvieae* Isolated in Spain from Lactococcosis Outbreaks in Comparison with Isolates of Other Countries and Sources. J. Clin. Microbiol., 38: 37913795.
- Versalovic, J., Koeuth, T. ve Lupski, J.R. 1991. Distribution of Repetitive DNA Sequences in Eubacteria and Application to Fingerprinting of Bacterial Genomes. Nucleic Acid Res., 19: 68236831.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. ve Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res., 23: 4407-4414.
- Williams, K., Blake, S., Sweeney, A., Singer, J.T. ve Nicholson, B.L. 1999. Multiplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection of three fish viruses. J. Clin. Microbiol., 37: 41394141.
- Yağcı, A. 2006. Restriction Fragment Length Polymorfizm ve Polimeraz Zincir Reaksiyon Bazlı Tipleme Yöntemleri. İnönü Üniversitesi.
- Yingwang, Y., Qingping, W., Yanhong, Z., Xiaohui, D. ve Jumei, Z. 2008. Analysis of Major Band of *Enterobacter sakazakii* by ERIC-PCR and Development of A Species-specific PCR for Detection of *Ent. sakazakii* in Dry Food Samples. Journal of Microbiological Methods, 75: 392-397.