

## Patateste Virüslerin PCR ve ELISA Teknikleri İle Belirlenmesi ve Başarıyı Etkileyen Faktörler

Hidayet BOSTAN

Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Erzurum, Türkiye

Kamil HALILOĞLU

Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Erzurum, Türkiye

Geliş Tarihi : 31.05.2002

**ÖZET:** Bu derlemede patatesin farklı aksamalarında ve vektörlerde virüslerin belirlenmesinde moleküler bir tanı tekniği olan polimer zincir reaksiyonu (PCR) ve serolojik bir tanı tekniği olan enzyim-linked immunosorbent assay (ELISA) yönteminin kullanımındaki avantaj ve dezavantajlar ile PCR çalışmalarında dikkat edilmesi gereken hususlar değerlendirilmiştir. Dormansisi kırılmış yumrular, mikro-yumrular ve yeşil yaprak örneklerinde ELISA'nın, dormant yumrular ve afidler de ise PCR'ın kullanılması önerilmiştir. Diğer taraftan, PCR çalışmalarında başarıya etki eden inhibitör maddelerin eliminasyonu, RNA ekstraksiyonunda kullanılacak yöntem ve primer seçimi gibi faktörlerin göz önünde tutulması duyarlı ve güvenilir bir tanımlama için gerekli olduğu ortaya konulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** patates, virüs, PCR, ELISA

### Identification of Potato Viruses By PCR and ELISA and Factors Effecting the Success

**SUMMARY:** Advantages and disadvantages of polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) applications for detection of viruses in different plant tissues and vectors as well as factors affecting PCR applications were discussed in this review. It has been suggested to use ELISA in green leaves, micro-tubers, tubers having broken dormancy if more samples are available; and to use PCR technique in dormant tubers and aphids. In addition, paying attention to parameters such as elimination of inhibitors influencing the success of PCR, RNA extraction method, primer selection are necessary steps for sensitive and reliable detection.

**Key words:** Potato, virus, PCR, ELISA

### GİRİŞ

Patates dünya nüfusunun beslenmesinde en önemli gıda kaynaklarından birisi olup; bu kültür bitkisinde verim ve kalite azalmasına neden olan faktörlerden biri de virüs hastalıklarıdır (Spiegel ve Martin, 1993). Virüs hastalıklarından bazıları lokal olarak bulunurken, bazıları dünya genelinde önemli derecede ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Schilde-Rentschler ve Schmiediche, 1984; Hooker, 1986; Slack, 1995).

Virüs hastalıkları tohumluk yumrular ile yıldan yıla, yıl içerisinde de mekaniksel olarak ya da vektörlerle taşınarak hızlı bir şekilde yayılmaktadır (Cortbaoui, 1984; Jones, 1988). Diğer taraftan, virüsler bitkilerdeki metabolizma faaliyetleri ile çok sıkı bir ilişki içerisinde olduğu için fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerinin aksine virüs hastalıklarının doğrudan kimyasal mücadele ile kontrol edilmesi de mümkün olmamaktadır (Walkey, 1991). Bu nedenle, virüs hastalıklarından kaynaklanan verim ve kalite düşüşlerinin önlenmesinde virüssüz sertifikalı tohumluk kullanılması ve tohumluk üretiminin farklı aşamaları ile tüketime yönelik üretim alanlarında virüs hastalıklarının yaygınlık oranlarının takip edilmesi ve virüslerin duyarlı bir şekilde tanılanması büyük önem taşımaktadır (Jones, 1988; Matthews, 1993; Spiegel ve Martin, 1993). Bunun için patatesteki virüs hastalıklarının tanısında kullanılacak tekniklerin duyarlılık, süratlilik, doğruluk, süreklilik, maliyet ve uygulamada kolaylık gibi özellikleri içermesi gerektiği belirtilerek (Avila ve ark., 1989; Samson ve ark., 1993); serolojik bir tanı tekniği olan ELISA ile moleküler

tekniklerden PCR'ın bu özellikleri taşıdıkları kaydedilmiştir (Singh ve Somerville, 1992; Barker ve ark., 1993; Spiegel ve Martin, 1993).

Bu tekniklerden polimer zincir reaksiyonu (PCR), genetik materyalin (DNA, RNA) üzerinde seçilmiş bir ya da birden fazla bölgenin oligonükleotit primer ve Taq polimeraz enzimi kullanılarak bir otomatik "termocycle" sistem (PCR cihazı) yardımıyla çoğaltılması (sentezlenmesi=amplifiye edilmesi) işlemidir (Mathews, 1993). PCR tekniği ilk kez 1985 yılında Saiki ve arkadaşları tarafından insanlarda kansızlık hastalığının tanısı için geliştirilmiş olup, günümüzde insan, hayvan ve bitkilerde hastalığa neden olan patojenlerin tanısı, farklı kaynaklardan elde edilen DNA'lar arasındaki genetik akrabalıkların saptanması, klonlama ve baz dizilişinin belirlenmesi gibi çok farklı alanlarda ve farklı amaçlarla kullanılmaktadır (White, 1993).

Bu derlemede; bitki virüs hastalıklarının tanılanmasında ve belirlenmesinde PCR tekniğinin seçilmesinin nedenleri, patateste enfeksiyona neden olan virüslerin tanılanmasında ELISA tekniğine göre avantaj ve dezavantajları; patatesin farklı dokularında ve vektörlerde virüslerin belirlenmesinde PCR tekniğinin kullanılması, çalışmalarda dikkat edilecek hususlar ve başarıya etki eden faktörler değerlendirilmiştir.

### PCR Tekniğinin Seçilme Nedenleri ve ELISA Tekniği ile Karşılaştırılması

Farklı amaçlarla farklı alanlarda yaygın bir kullanım alanına sahip olan PCR son derece duyarlı ve özel bir tanı tekniği olup, günümüzde bitki virüslerinin sınıflandırılmasında ve tanınmasında, düzenlenecek pirimerlere bağlı olarak bir gruba mensup virüslerin, tek bir virüsün ya da ırklarının hatta izolatlarının (Saiki ve ark., 1988; Langeveld ve ark., 1991; Mathews, 1993); odunsu dokularda (Korschineck ve ark., 1991; Rowhani, ve ark., 1998); dormant yumrularda (Robertson, ve ark., 1991; Barker ve ark., 1993; Spiegel ve Martin, 1993; Russo ve ark., 1999); soğanlarda (Vunsh ve ark., 1991); ve afitlerde (Spiegel ve Martin, 1993; Singh ve ark., 1996; Singh ve ark., 1997) düşük yoğunluklarının bile belirlenebilmesini olanaklı kılmaktadır.

Bununla birlikte, PCR çalışmalarında başarıya etki eden çok sayıda faktör olup, patatesteki virüslerin *in vitro* koşullarda elde edilen mikro yumrulara, sertifikasyon programlarında, sürvey çalışmalarında ve virüslerin taşınmasında rol oynayan afitlerde belirlenmesinde diğer bir tanı tekniği olan ELISA'ya göre bazı avantaj ve dezavantajlarının olduğu görülmektedir.

ELISA'ya göre PCR'ın 100-10.000 kat daha duyarlı ve spesifik olduğu (Vunsh ve ark., 1990; Koerscheneck ve ark., 1991; Rowhani ve ark., 1995); virüslerin dormant yumrulara PCR ile belirlenebilmesine karşın ELISA ile duyarlı ve güvenilir şekilde belirlenemediği ve dormansilerinin kırılmasına gereksinim duyulduğu (Spiegel ve Martin, 1993; Russo ve ark., 1999; Singh ve Singh, 1996; Loebenstein ve ark., 1997; Singh ve ark., 1999); 30 °C civarında sıcaklıkta yetiştirilen bitkilerde virüs yoğunluğunda meydana gelen düşüşten dolayı bu bitkilerden alınan yaprak örneklerinde virüslerin ELISA ile belirlenemediği saptanmıştır (Loebenstein ve ark., 1997). Buna karşın, PCR çalışmaları için donanımlı laboratuarlara gereksinim duyulduğu (Henson ve French, 1993); PCR'ın bulaşmaya karşı daha hassas olduğu (Sauza-Dias ve ark., 1999b); ELISA tekniğine göre daha fazla zaman gerektirdiği, özellikle geniş çaplı örnek taramalarında pratik ve ekonomik olmadığı ve daha yoğun iş gücü gerektirdiği belirtilmektedir (Barker ve ark., 1993; Garner, 1994; Russo ve ark., 1999; Singh ve ark., 1999).

### 1. Mikro Yumrulardaki Virüslerin Belirlenmesi

Doku kültürü, patateste meristem uç kültürü ile virüslerin elemine edilmesi, virüssüz bitkilerin çoğaltılması, *in vitro* koşullarda mikro yumru üretimi, uzun süreli muhafaza gibi alanlarda rutin olarak kullanılmaktadır (Tovar ve ark., 1985; Ahloowalia, 1994). Sertifikalı tohumluk üretiminde doku kültürü uygulamaları önemli bir yer tutmaktadır. *In vitro* koşullarda yetiştirilen bitkiciklerin ya da mikro yumruların toprağa dikilmesi ile mini yumru, mini yumruların toprağa dikilmesi ile de anaç kademe

tohumluk üretimi gerçekleştirilmektedir (Ahloowalia, 1994). Tüm bu işlem basamaklarında virüslerin duyarlı ve güvenilir bir şekilde belirlenmesi gerekmektedir. Gerek *in vitro* koşullarda yetiştirilen bitkiciklerde gerekse mikro yumrulardaki virüsler hem ELISA hem de PCR ile duyarlı ve güvenilir bir şekilde belirlenebilmektedir. Nitekim Spiegel ve Martin (1993), "Russet Burbank" ve "Deseree" çeşitlerine ait dormant mikro yumrulara patates yaprak kıvrıcıklık virüsünü (PLRV) ELISA ve PCR ile belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada "Russet Burbank" çeşidine ait dormant mikro yumrulara ekstrete ettikleri bitki öz suyunun 1:480, "Deseree" çeşidinde ise 1:120 oranında seyreltilmiş durumunda virüsü her iki teknikte de belirlemişlerdir.

### 2. Afitlerde Virüslerin Belirlenmesi

Bitkilerdeki virüs hastalıklarının en önemli taşıyıcılarından birisi de afitler olup, 370 virüsten % 66'sının afitler tarafında etkili şekilde taşındığı belirtilmiştir (Mathews, 1993). Patateste enfeksiyona neden olan virüslerin bazıları da afitler tarafından farklı şekillerde taşınmaktadır. Nitekim, en önemli virüslerden PLRV afitler tarafından "persistent-circulative" (Harrison, 1984); patates Y virüsü (PVY) ise "non-persistent" şekilde taşınmaktadır (Delgado-Sanchez ve Grogan, 1970). Bu nedenle, afitlerde virüslerin belirlenmesi mücadele açısından önemli olup, RT-PCR ile tek bir afitte bile virüsler belirlenebilmektedir (Lopez-Mayo ve ark., 1992; Spiegel ve Martin, 1993; Singh, 1998). Singh ve ark. (1996), PVY'nin yaygın bir ırkı olan PVY<sup>0</sup>'ı *Myzus persicae* Sulzer ve *Aphis nasturtii* türlerinde belirlenmek amacıyla yaptıkları çalışmada bu afit türlerini PVY<sup>0</sup> ile enfekteli patates bitkilerinde beslenmişler ve buradan toplanan afitlerde virüsün kapsül protein geninden düzenledikleri pirimerleri kullanarak virüsün bu ırkı belirlemişlerdir. Ayrıca afitleri 45 gün süre ile etanolde saklayıp, tekrar PCR uygulandıklarında virüslerin aynı oranda belirlenebildiği ve etkinlikte herhangi bir hassasiyet kaybının olmadığını saptamışlardır. Singh ve ark. (1997), uzun süre muhafaza edilen afitlerde virüslerin PCR ile belirlenmesinde bir hassasiyet kaybının olup olmadığını saptamak için RT-PCR tekniği ile PLRV'ye spesifik pirimerler kullanarak etanol içerisinde 7 yıl kadar uzun bir süre muhafaza edilmiş *Myzus persicae* Sulzer, *Aphis nasturtii* Kaltenbach ve *Macrosiphum euphorbiae* Thomas afit türlerinde virüsün belirlenebildiğini kaydetmişlerdir.

### 3. Dormant Patates Yumrularında Virüslerin Belirlenmesi

Hastalıklardan arındırılmış temiz üretim materyalinin kullanılmaması, gelişmekte olan ülkelerde patates üretimini artırmada en önemli engellerden birisidir. Diğer taraftan tohumluk patates üretimi yavaş ve uzun bir süreç olup, bu işlemler aşamasında enfeksiyon

kaynağı mevcut olduğu takdirde hastalık oranları artış göstermektedir (Uyen ve Zaag, 1983). Bu nedenle, virüs hastalıklarının hasat sonrası yayılışının engellenmesinin bir yolu dikimden önce tohumluklardaki virüslerin düşük yoğunluklarının bile güvenilir bir şekilde belirlenmesi büyük önem taşımakta olup, bu sertifikalı tohumluk üretiminin bir parçasıdır (Spiegel ve Martin, 1993; Lobenstein ve ark., 1997; Souza-Dias ve ark., 1999b; Singh ve ark., 1999).

Yapılan çalışmalarda ELISA tekniğinin yeşil yaprak örneklerinde, sürgün vermiş yumrulara, *in vitro* koşullarda yetiştirilmiş bitkicikler ile mikro yumrulara virüsleri belirlemede RT-PCR kadar etkin olmasına karşın dormant yumrulara güvenilir olmadığı, bu teknik kullanılacaksa mutlaka yumruların sürgün vermesinin sağlanması gerektiği (Hill ve Jacson, 1984; Barker, 1987; Spiegel ve Martin, 1993; Loebenstein ve ark., 1997; Russo, ve ark., 1999); bununda iş gücünü dolayısıyla maliyeti arttıracak belirtmiştir (Schoen ve ark., 1996). Diğer taraftan, RT-PCR tekniği ile dormant yumrulara virüslerin belirlenebildiği ve dormansilerin kırılmasına gerek duyulmadığı saptanmıştır (Singh ve Singh, 1995, Singh ve Singh, 1996). Nitekim Singh ve ark. (1999), tarladan hasat edilen 8 farklı patates çeşidine ait dormant patates yumrularında PVY'nin yaygın bir ırkı olan PVY<sup>0</sup>'in belirlenmesinde RT-PCR ile ELISA metodunu karşılaştırmışlardır. Sonuçta, yapraklarda virüsün bu ırkının belirlenmesinde ELISA'nın RT-PCR tekniği kadar duyarlı olduğu ancak dormant yumrulara ELISA'nın güvenilir sonuç vermediğini belirlemişlerdir.

Bu durumda yeşil aksamdan yapılacak testlerde ELISA'nın; afitlerde, dormant yumrulara ve örnek sayısının az olduğu ve duyarlılık gerektiren dokularda virüslerin belirlenmesinde ise PCR'in tercih edilmesi uygun olmaktadır. Bununla birlikte bu tekniğin başarısı virüs yoğunluğu, inhibitör maddelerin etkileri, nükleik asit ekstraksiyon yöntemi, pirimer düzenlenmesi ve genom diziliminin belirlenmesi gibi faktörlere bağlıdır (Henson ve French, 1993).

#### a. Virüs Yoğunluğu

Enfekteli dokularda virüslerin yoğunlukları bitki türüne, çeşidine, bitki aksamına, örneklerin alındığı zamana, enfeksiyon zamanına, virüse ve virüs ırkına bağlı olarak değişim göstermektedir. Singh ve Singh (1996), farklı patates çeşitlerinin sürgün, göz ve yumrularında PVY<sup>0</sup>'in yoğunlukları arasında farkın bulunup bulunmadığını belirlemek için yaptıkları çalışmada çeşitlere ait yumrulara virüs yoğunlukları arasında 128 kat farklılığın olduğunu belirlemişlerdir.

Barker ve ark. (1993), dormant patates yumrularında depolama süresinin virüslerin RT-PCR ile belirlenmesi üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmada, PVY'nin RT-PCR ile belirlenmesinde 2-3 haftalık depolamalarda farklılığın olmadığını, 20 haftalık depolamalardan sonra ise duyarlılığın azaldığını saptamışlardır. Singh ve Singh (1996), "Shepody" çeşidine ait yumruları 30, 45, 60 ve

90 gün süre ile 4 ve 10 °C de depolanmışlardır. Virüsün 10 °C de 60 güne kadar ki depolama süresince RT-PCR ile belirlenmesinde herhangi bir düşüşün olmadığını; 60-90 günlük depolama süresinden sonra depolanmayan yumrularla karşılaştırıldığında duyarlılığın azaldığını, buna karşın 4 °C de depolanan yumrulara virüsün bu teknikte belirlenmesinde duyarlılığın değişmediğini ancak virüs yoğunluğunun düştüğünü ve bu durumun "potyvirus" grubuna ilişkin virüslerin tipik özelliği olduğunu belirtmişlerdir. Yine aynı araştırmacılar "Atlantik", "Russet Norkotah" ve "Shopody" çeşitlerine ait yumrulara PVY'nin yaygın bir ırkı olan PVY<sup>0</sup>'in yoğunlukları arasında farkın bulunup bulunmadığını araştırmışlardır. Çalışmada RT-PCR ile PVY<sup>0</sup>'in nükleik asit yoğunluğu "Atlantik" ve "Russet Norkotah" çeşitlerinde 1:4096 seviyesinde seyreltilinceye kadar RT-PCR ile belirlenebilmesine karşın; "Shepody" çeşidinde bu oranın 1:16-1:32 oranında olduğunu ve virüs yoğunluğunun çeşitlerde farklılık gösterdiğini saptamışlardır.

Virüs yoğunluğu çeşitlere göre farklılıklar gösterdiği gibi aynı çeşidin farklı aksamlarında da farklılıklar göstermektedir. Singh ve Singh (1998), "Russet Burbank" çeşidinin yaprak ve yumrularından PVA'nın RT-PCR ile belirlenmesi amacı ile yaptıkları çalışmada, yapraklardan ekstrakte ettikleri nükleik asitlerin 1:1024 ile 1:4096, yumrulara ise 1:256 ile 1:1024 oranındaki seyreltmeye kadar belirlenebileceği fakat bu sınırın altında ise şüpheli sonuçların alınabileceğini belirtmişlerdir.

#### b. İnhibitör Maddelerin Etkileri

Bitkilerin bazı dokularında ve afitlerde bulunan polifenoller ve polisakkaritler gibi pigmentli maddelerin nükleik asit ekstraksiyonu esnasında serbest kaldığını ve PCR reaksiyonunu inhibe ettiği belirtilmektedir (Korschineck ve ark., 1991; John, 1992; De Boer ve ark., 1995; Hanni ve ark., 1995; Singh ve Singh, 1996). Bu nedenle, enfekteli bitki dokularında ve afitlerde virüslerin RT-PCR ile güvenilir bir şekilde belirlenebilmesi nükleik asit ekstraksiyonunda böyle maddelerin elemine edilip edilememesine bağlı olduğu bildirilmektedir (Spiegel ve Martin, 1993; Singh ve Singh, 1996; Singh ve ark., 1996; Singh, 1999). Böyle maddelerin inhibisyonunu engellemek için ise nükleik asit preparasyonunun isopropanol ile seyreltilmesi, ekstraksiyon tamponu içerisine 1.6-2 µl PBS-Tween-20 ilave edilmesi (Barbara ve ark., 1995; Hanni ve ark., 1995; Singh ve Singh, 1996); ve cDNA sentezi esnasında % 1 polivinylpyrolidone kullanılması önerilmektedir (John, 1992). Diğer taraftan Singh ve Singh (1996), yüksek virüs yoğunluğuna sahip olan çeşitlerde polifenoller ve polisakkaritler gibi maddelerin inhibisyonunun engellenmesinde nükleik asit yoğunluğunun seyreltilmesinin yararlı olabileceğini; fakat, virüs yoğunluğunun düşük olduğu durumlarda ise PCR inhibitörlerinin kaldırılması için diğer yöntemlerin

kullanılmasını önermişlerdir. Zira, RT-PCR ile PVY<sup>0</sup>'ın farklı izolatlarının belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmalarda 7 pirimer çifti kullanmışlar ve virüs yoğunluğunu 1:40 oranında seyreltiklerinde bantların silik çıktığını belirlemişlerdir.

Singh (1999), patates bitkisinin yapraklarında, petiollerinde, sürgünlerinde, yumrularında ve tek bir afitte (*Myzus persicae*), PLRV'yi belirlemek için Triton X serisinden 7 iyonik olmayan deterjan kullanmış ve PLRV RNA'sının serbest kalmasında bunların en etkilisinin Triton X405R olduğunu belirlemiştir. Yine aynı çalışmada yüksek virüs yoğunluğuna sahip olan "Atlantic" ve "Shebody" çeşitlerine ait dormant yumrularda PLRV'nin RT-PCR ile belirlenmesinde polifenoller ve polisakkaritler gibi maddeleri elemine etmek için nükleik asitlerin seyreltilmesinde 1 % PVP, BLOTTO, isopropenol çözeltisi ve PBS-Tween-20 kullanmış ve sonuçları karşılaştırmıştır. Sonuçta, en güçlü bantı cDNA sentezinde isopropenol çözeltisi ve PBS-Tween-20 içeren cDNA karışımından elde etmiştir. Diğer taraftan, PVP ilavesinin sentezlenen bazı ürünlerde sonucu iyileştirdiği, bazılarında ise olumsuz etki gösterdiği, isopropenol çözeltisinin ise yalnız başına en iyi sonuç verdiğini saptamıştır.

#### c. Nükleik Asid Ekstraksiyon Yöntemlerinin Etkisi

PCR çalışmalarında başarıya etki eden faktörlerden birisi de nükleik asit ekstraksiyonunda kullanılan yöntem ile ekstraksiyon sonucunda elde edilen viral RNA'nın kalitesidir. Nicolas ve Laliberte (1991), RT-PCR ile şalgam mozaik virüsü (TuMV)'nü belirlemek için yaptıkları çalışmada, saflaştırılmış viral RNA'lardan formaldehit agoroz jel elektroforezde tek bir band elde ederlerken, saflaştırılmayanlarda band elde edememişler ve bu nedenle PCR çalışmalarında başarılı bir sentezleme için direkt ham bitki öz suyu yerine saflaştırılmış RNA'nın kullanılmasını önermişlerdir. Diğer taraftan, dejenere pirimerlerin bulaşık nükleik asit materyalinde spesifik olamayan bir bölgeye bağlanma olasılığını ortadan kaldırmak için saflaştırılmış RNA kullanılmasının önemli olduğu vurgulanmıştır (Langeveld ve ark., 1991).

Nitekim, PVY<sup>0</sup>'ın +4 °C de depolanmış "Shebody" çeşidine ait dormant ve depolanmış yumrularda RT-PCR ile belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada viral RNA Spiegel ve Martin (1993), göre ekstrakte edildiğinde virüs belirlenemezken; Lopez-Moya ve ark. (1992), tarafından kullanılan yöntemle göre belirlenmiş ve RT-PCR çalışmalarında nükleik asit ekstraksiyon yönteminin önemli rol oynadığını belirtmişlerdir (Singh ve Singh, 1996). Spiegel ve Martin (1993), "Russet Burbank" ve "Desiree" patates çeşitlerinin dormant yumruları ile mikro yumrularında PLRV'nin RT-PCR ile belirlenmesinde viral RNA ekstraksiyon yöntemlerinin etkinliğini araştırmışlardır. Bunun için "hot-cold phenol" (Shizadegan ve ark., 1991), "guanidinium thiocyanate"

(Chomcynski ve Sacchi, 1987), ve "lithium chlorid" (Hughes ve Galau, 1988), ekstraksiyon yöntemlerini kullanmışlar ve sonuçta "hot-cold phenol" ile "lithium chlorid" yönteminde bantları görüntülemişler; fakat, "guanidinium thiocyanate" yönteminde ise görüntü elde edememişlerdir.

#### d. Pirimerlerin Düzenlemesi

Nükleik aside dayalı olarak patojenlerin belirlenmesi ve tanılanması nükleik asidin konukçuya ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişmemesi nedeniyle PCR diğer tanı tekniklerine göre önemli bir avantaja sahiptir. Bu teknikte en önemli belirleyici faktör pirimerlerin düzenlenmesi olup, pirimerlerin bağlanacağı bölgenin belirlenmesi için eşsiz bir bölgenin seçilmesi gerekir (Nicolas ve Laliberte, 1991). Zira, PCR tekniği ile seçilen pirimerlerin spektrumuna (geniş ya da dar) bağlı olarak virüs izolatu, tek bir virüs, ya da bir familyaya mensup çok sayıda virüsün belirlenmesi ve tanılanması yanında aynı virüsün farklı izolatlarının farklılık ve akrabalık derecelerinin belirlenmesi de mümkün olabilmektedir (Vunsh ve ark., 1990; Langeveld ve ark., 1991; Dekker ve ark., 1993; Henson ve French 1993; Mathews, 1993; Thomson ve ark., 1995; Singh ve Singh, 1997; Sauza-Dias ve ark., 1999a). Nitekim kılıf protein genlerinin yüksek derece korunmuş bölgelerinden düzenlenecek geniş spektrumlu pirimerlerin "potyvirus" (Langeveld ve ark., 1991; Nicolas ve Laliberte, 1991; Pappu ve ark., 1993); ve "luteovirus" grubunda (Robertson ve ark., 1991), yer alan bitki virüslerinin tanılanmasında ve sınıflandırılmasında büyük bir değer taşıdığı belirtilirken; "carlavirüs" ve "potexvirüs" grubunda ise (Langeveld ve ark., 1991), güvenilir bir şekilde kullanılamayacağı vurgulanmıştır.

Robertson ve ark. (1991), gruba spesifik pirimerlerle aynı grupta yer alan fakat dizilimleri belirlenmemiş virüslerin belirlenip belirlenemeyeceğini saptamak için "Luteovirus" grubunda yer alan arpa sarı cücelik virüsü (BYDV), şeker pancarı batı (western) sarılık virüsü (BWYV) ve PLRV'nin korunmuş bölgelerinden düzenledikleri pirimerleri kullanarak halen nükleotit dizilişleri belirlenmemiş aynı gruptaki diğer virüslerin belirlenebileceğini göstermişlerdir. Yine Singh ve Singh (1996), PVY<sup>0</sup>'ın depolanmış yumrularda RT-PCR ile belirlenmesinde geniş spektrumlu pirimer çiftlerinin kullanılmasının daha önemli rol oynayabileceğini, sadece bir izolata özgü pirimerlerin ise virüsü kaçırabileceği kaydetmişlerdir.

Diğer taraftan, seçilen pirimerlerin özelliğine bağlı olarak bir gruba mensup virüsler belirlenebileceği gibi aynı grupta yer alan virüslerin hatta izolatlarının akrabalık derecesi de belirlenebilmektedir. Nitekim Colinet ve Kummert (1993), "potyvirus" grubunun bir üyesi olan tatlı patates feathery mottle virüs (SPFMV) genomunun korunmuş bölgelerinden yüksek homologluk yüzdesi gösteren ve düşük dejenere kodonlara sahip 4 pirimer çifti düzenlemişler ve bu virüsün SPFMV-CH

izolatının 830 bp uzunluğunda parçasının sırasıyla 62 %, 48 %, 52 %, ve 46 % oranında erik şarka virüsü (PPV), patates Y virüsü Y (PVY), tütün etc virüsü (TEV) ve tütün damar benek virüsü (TVMV) ile homologluk gösterdiğini belirleyerek; yine kullandıkları pirimerler ile aynı virüsün farklı izolatları arasındaki akrabalık ilişkilerini saptamışlardır.

PCR'da pirimerlerin seçildiği bölgeye bağlı olarak virüslerin ya da ırklarının karışık enfeksiyonları da belirlenebilmektedir (Langeveld et al., 1991). Singh ve Singh (1998), farklı çeşitlerin yumru ve yapraklarından patates M virüsü (PVM), patates S virüsü (PVS), patates X virüsü (PVX), PVY<sup>0</sup>, PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>NTN</sup>, PLRV, ve patates iğ yumru viroid (PSTV)'inin nükleik asitlerini ekstrakte etmişler ve PVA genomundan düzenlenen pirimer çiftleri ile sentezlenip sentezlenemediğini araştırmışlardır. Sonuçta bu pirimerlerin PVA'nın haricindeki diğer virüsler ile amplifiye olmadığını belirleyerek seçilen pirimerler ile sadece bir virüsün diğer virüslerden ayırt edilebileceğini göstermişlerdir.

PCR çalışmalarında dikkat edilmesi gereken hususlardan birisi de seçilecek pirimerler ile virüs nükleik asidinde sentezlenecek bölgelerin ve çalışmalarda kullanılacak virüs nükleik asit yoğunluğunun iyi belirlenmesidir. Nicolas ve Laliberte (1991), sentezlenecek bölgenin 3'(downstream) ucuna yakın olmasının 5' (upstream) bölgesine yakın olandan daha verimli olduğunu; cDNA'nın geniş spektrumlu primerlerin bağlanabilmesi için mümkün olduğu kadar uzun olması gerektiğini, fakat *Taq* polimerazın uzun DNA parçalarını sentezleme gücünün sınırlı olduğunu ve bu nedenle uzun parçaların sentezlenmesinde hata yapma yüzdesinin de yüksek olabileceğini belirtmişlerdir. Bu durumda, hata yüzdesini azaltmak ve sonucun doğruluğundan emin olmak için diziliminin en az iki bağımsız klondan seçilmesi gerektiğini kaydetmişlerdir.

Singh ve Singh (1997), PVY'nin yaygın bir ırkı olan PVY<sup>0</sup>'in dormant yumrularda belirlenmesinde RT-PCR'ın hassasiyeti üzerinde sentezlenecek bölgenin ve pirimer yoğunluğunun belirlenmesi maksadıyla 5' ucundan 1040, 690, 412, ve 217 bp, 3' ucundan ise 1016, 704, 388 ve 249 bp uzunluğundaki parçaları sentezlemek için 4 farklı pirimerin 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 500 fg, 100 fg, 10 fg, 5 fg, 1 fg, ve 0.2 fg yoğunluklarını test etmişlerdir. Sonuçta saflaştırılmış RNA kullanılacaksa 1016-1040 parçalarının bulunmasında 1-10 pg; 217 ve 249 bp uzunluğundaki parçaların sentezlenmesinde ise 1 fg'e kadar düşük pirimer yoğunluğunun yeterli olacağını, bunda 10<sup>3</sup> oranında duyarlılık sağladığını saptamışlar ve 3' bölgesinden düzenlenecek pirimerlerin 5' den düzenlenenlere göre düşük yoğunlukların belirlenmesinde daha etkili olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, sentezlenen ürünlerin büyüklük farklılıklarına bağlı olarak RNA molekülü üzerindeki hedef dizilişin yerinin de virüslerin belirlenmesindeki duyarlılığı etkileyebileceğini ve küçük

parçaların 2-64 kat daha büyük parçalardan duyarlı olduğunu saptamışlardır.

PCR ile aynı virüsün izolatları arasındaki benzerlik ve farklılıkları da belirlenebilmektedir. Souza-Dias ve ark., (1999a), 5 farklı coğrafi bölgeden toplanmış ve baz dizilimleri belirlenmiş PLRV genomlarının farklı bölgelerinden düzenledikleri 3 pirimer çiftini kullanarak Brezilya'dan topladıkları PLRV izolatlarının diğer ülkelerdeki izolatlarla akrabalık ilişkilerini araştırmışlardır. Sonuçta Brezilya'dan toplanan izolatların % 99 oranında birbiri ile % 97 oranında Avrupa ve Kanada izolatlarıyla ve % 95 oranında ise Amerika ve Avustralya izolatları ile homolog bölgelere sahip olduğunu saptayarak, seçilecek pirimerler ile izolatlar arasındaki farklılık ve benzerliklerin belirlenebileceğini göstermişlerdir.

### Sonuç ve Öneriler

Önemli bir kültür bitkisi olan patatesten birim alandan daha fazla ve kaliteli ürün elde edebilmek için virüs hastalıkları ile bilinçli bir mücadelenin yapılması büyük önem taşımaktadır. Vejetatif olarak yumruları ile üretilen patatesten virüs hastalıkları tohumluk yumrular ile yıldan yıla, yıl içerisinde de mekaniksel olarak ya da vektörlerle taşınarak hızlı bir şekilde yayılmaktadır. Bu nedenle, patates tohumluk üretiminin farklı aşamalarında, tüketime yönelik üretim alanlarında, *in vitro* koşullarda elde edilen mikro yumrulara, sertifikasyon programlarında ve virüslerin taşınmasında rol oynayan afitlerde virüslerin belirlenmesi ve yaygınlık oranlarının izlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla günümüzde en yaygın kullanılan ELISA ve PCR teknikleri olup, bunun nedeni de bu tekniklerin diğer tekniklere oranla daha duyarlı, güvenilir ve ekonomik olmalarıdır. Bununla birlikte hangi tekniği nerede kullanmamız gerektiğini bilmemiz zaman ve sarf malzemesi israfının önlenmesi açısından önem taşımaktadır. Bu bakımdan; survey çalışmalarında, sürgün vermiş yumrulara, *in vitro* koşullarda elde edilen bitki ve mikro yumrulara ELISA'nın, sertifikasyon programlarında, dormant yumrulara, afitlerde, virüs yoğunluğunun düşük olduğu dokularda, 30 °C civarında sıcaklıkta yetiştirilen bitkilerden alınan yaprak örneklerinde ise PCR tekniğinin kullanılması önerilmektedir.

ELISA'ya göre 100-10.000 kat daha duyarlı ve spesifik olduğu belirtilen PCR ve bitki virüslerinin sınıflandırılmasından izolatlar arasındaki akrabalık derecelerinin belirlenmesine kadar geniş bir kullanım alanına sahip olmakla birlikte PCR çalışmalarında başarıya etki eden çok sayıda faktörün olduğu da bilinmesi gerekmektedir. Bunlar:

1. Enfekteli dokularda virüslerin yoğunluğunun çeşide, bitki aksamına, örneklerin alındığı zamana, enfeksiyon zamanına, depolama süresine, virüs grubuna, virüse ve virüs ırkına bağlı olarak değişim gösterdiği belirtilerek, yapılacak seyreilmelerde dikkatli olunması önerilmektedir.

2. Bitkilerin bazı dokularında ve afitlerde polifenoller ve polisakkaritler gibi pigmentli maddelerin nükleik asit ekstraksiyonu esnasında serbest kaldığı ve PCR reaksiyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu nedenle, yüksek virüs konsantrasyonuna sahip olan dokularda böyle maddelerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak için nükleik asit preparasyonunun isopropenol ile seyreltilmesi, ekstraksiyon tamponu içerisine 1.6-2 µl PBS-Tween-20 ilave edilmesi ve cDNA sentezi esnasında % 1 polivinylpyrolidone kullanılması önerilmektedir. Diğer taraftan, virüs yoğunluğunun düşük olduğu durumlarda ise seyreltme yerine diğer RNA ekstraksiyon metotlarının kullanılması gerektiği belirtilmektedir.

3. PCR çalışmalarında başarıya etki eden faktörlerden birisi de ekstraksiyon sonucunda elde edilen viral RNA'nın kalitesi olup, dejenere pirimerlerin bulaşık nükleik asit materyalinde spesifik olamayan bir bölgeye bağlanma olasılığını ortadan kaldırmak için direk ham bitki öz suyu yerine saflaştırılmış RNA'nın kullanılması önerilmektedir.

4. Bu teknikte en önemli belirleyici unsurlardan birisi de pirimerlerin çalışmanın amacına göre düzenlenmesidir. Burada amaç bir gruba mensup virüsleri diğer gruplara mensup virüslerden ayırt etmek ise pirimerlerin aynı gurup içerisinde yer alan virüslerin genomları üzerindeki ortak bölgelerden, izolat düzeyinde bir tanılamaya gidilecekse bunun içinde diğer izolatlardan farklı olan eşsiz bir bölgenin belirlenip pirimerlerin bu bölgeden düzenlenmesi gerektiği vurgulanmaktadır.

5. Diğer taraftan seçilecek pirimerler ile virüs nükleik asidinde amplifiye edilecek bölgelerin iyi belirlenmesi gerekmektedir. Zira yapılmış çalışmalarda amplifiye edilecek bölgenin 3' (downstream) ucuna yakın olmasının 5' (upstream) bölgesine yakın olandan daha verimli olduğu belirlenmiş olup güvenilir bir sonuç alınması açısından da pirimerlerin en az iki bağımsız klondan seçilmesi gerektiği kaydedilmiştir.

6. Dikkat edilmesi gereken bir diğer faktörde viral RNA'nın ekstraksiyonunda kullanılacak yöntemin seçimidir. Bunun için farklı metotlar mevcut olmakla birlikte, araştırmacı kullanacağı metodu daha önce yapılmış çalışmalar doğrultusunda belirlemelidir.

7. PCR tekniğini tanılamada kullanılabilmesi için tanısı yapılacak virüsün sequens dizilimin belirlenmiş olması pirimer düzenlenmesi için bir gerekliliktir.

#### KAYNAKLAR

Ahloowalia, B.S., 1994. Production and performance of potato mini-tubers. *Euphytica*, 75, 163-172.  
Avila, A.C., Salazar, L.F., Hidalgo, O.A., Nakashima, J., Dusi, A.N., 1989. Serological techniques and antiserum production. *International Potato Center*, 17, 1-8.  
Barbara, D.J., Morton, A., Spence, N.J., Miller, A., 1995. Rapid differentiation of closely related isolates of two plant viruses by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Virol. Methods*, 55, 121-131.

Barker, H., 1987. Multiple components of the resistance of potatoes to potato leaf roll virus. *Annals of Applied Biology*, 111:641-648  
Barker, H., Webster, K.D., Reavy, B., 1993. Dedection of potato virus Y in potato tubers: a comparison of polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. *Potato Res.* 36, 13-20.  
Chomynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol, chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162:156-159.  
Colinet, D., Kummert, J., 1993. Identification of a sweet potato feathery mottle virus isolate from China (SPFMV-CH) by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Journal of Virol. Methods*, 45:149-159.  
Cortbaoui, R., 1984. Roguing Potatoes. *Technical Information Bulletin 5*, International Potato Center (CIP), Lima, Peru, 13p.  
Dekker, E.L., Derks, A.F.L., Asjes, C.J., Lammers, M.E.C., Bol, J.F., Langeveld, S.A., 1993. Characterization of potyvirus from tulip and lily which cause flower breaking. *J. Gen. Virol.* 74:881-887.  
De Boer, S.H., Ward, L.J., Li, S. Chittaranjan, X., 1995. Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of BLOTTO. *Nucleic Acids Res.* 23, 2567-2568.  
Delgado-Sanchez, S., Grogan, R.G., 1970. *Potato Virus Y*. C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses. No:37.  
Garner, H.R., 1994. Automating the PCR process. Pages182-198 in: *The Polymerase Chain Reaction*. K. B. Mullis, F. Ferre, and R.A. Gibbs, eds. Birkhauser, Boston.  
Harrison, B.D., 1984. *Potato Leaf Roll Virus*. C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses, No: 291.  
Henson, J.M., French, R., 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:81-107.  
Hooker, W.J., 1986. *Compendium of Potato Diseases*. American Phytopathological Society Press., St. Paul, Minnesota, 125p.  
Hanni, C., Brosseau, T., Laudet, V., Stephelin, D., 1995. Isopropanol precipitation removes PCR inhibitors from ancient bone extracts. *Nucleic Acid Res.*, 23:881-882.  
Hill, S.A., Jackson, E.A., 1984. An investigation on the reliability of ELISA as a practical test for detecting potato leafroll virus and potato virus Y in tubers. *Plant. Pathol.*, 33:21-26.  
Hughes, D.W., Galau, G., 1988. Preparation of RNA from cotton leaves and pollen. *Plant Molecular Biology Reporter*, 6:253-257.  
John, M.E., 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Res.* 20, 2381.  
Jones, E.D., 1988. A current assessment of *in vitro* culture and other rapid multiplication methods in North America and Europe. *Am. Potato J.*, 65, 209-220.  
Korschineck, I., Himmler, G., Sagl, R., Steinkellner, H., Katinger, H., 1991. A PCR membrane spot assay for the dedection of plum pox virus RNA in bark of infected trees. *Journal of Virological Methods*, 31:139-146.  
Langeveld, S.A., Dore, J.M., Memmelink, J., Derks, A.F.L.M., Vlugt, V., 1991. Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *J. Gen. Virol.*, 72:1531-1541.  
Lobenstein, G., Akad, F., Filatov, V., Sadvakasova, G., Manadilova, A., Bakelman, H., Teverovsky, E., Lachmann, O., Davida, A., 1997. Improved detection of potato leafroll luteovirus in leaves and tubers with a digoxigenin-labelled cRNA probe. *Plant Disease*, 81:489-490.  
Lopez-Moya, J.J., Cuabero, J., Lopez-Abella, D., Diaz-Ruiz, J.R., 1992. Detection of cauliflower mosaic virus (CaMV) in single aphids by the polymerase chain reaction (PCR). *J. Virol. Methods*, 37:129-138.  
Mathews, R. E. F., 1993. *Diagnosis of Plant Virus Diseases*. CRS Press, N.W., Boca Raton, Florida. 374 p.  
Nicolas, O., Laliberte, J.F., 1991. The use of PCR for cloning of large cDNA fragments of turnip mosaic potyvirus. *Journal of Virological Methods*, 32, 57-66.  
Pappu, S.S., Brand, R., Pappu, H.R., Rybicki, E.P., Gough, K.H., Frenkel, M.J., Niblett, C.L., 1993. A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3' sequences of potyviralgenomes: Application to dasheen mosaic virus. *J. Virol. Methods*, 41:9-20.

- Robertson, N.L., Frech, R., Gray, S.M., 1991. Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. *Journal of General Virology*, 72:1473-1477.
- Rowhani, A., Maningas, M.A., Lile, L.S., Daubert, S.D., Galino, D.A., 1995. Development of a detection system for viruses of wood plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology*, 85:347-352.
- Rowhani, A., Biardi, L., Routh, G., Daubert, S.D., Galino, D.E., 1998. Development of a sensitive colorimetric-PCR assay for detection of viruses in woody plants. *Plant Diseases*, 8: 880-884.
- Russo, P., Miller, L., Singh, R.P., Slack, S.A., 1999. Comparison of PLRV and PVY deduction in potato seed samples tested by Florida winter field inspection and RT-PCR. *Amer. J. of Potato Res.*, 76:313-316.
- Saiki, R.K., Gelfand, G.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G., 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-491.
- Samson, R.G., Allen, T.C., Whitworth, J.L., 1993. Evaluation of direct tissue blotting to detect potato viruses. *Am. Potato J.*, 70, 257-265.
- Sauza-Dias, J.A.C., Russo, P., Miller, L., Slack, S.A., 1999a. Comparison of nucleotide sequences from three potato leafroll virus (PLRV) isolates collected in Brazil. *Amer. J. Of Potato Res.* 76: 17-24.
- Sauza-Dias, J.A.C., Russo, P., Betti, J.A., Miller, L., Slack, S.A., 1999b. Simplified extraction method for ELISA and PCR detection of potato leafroll luteovirus primary infection in dormant potato tubers. *Amer. J. of Potato Res.*, 76:209-213.
- Schilde-Rentschler, L., Schmiediche, P.E., 1984. *Tissue Culture: past, present, and future*. International Potato Center, 12 p.
- Shirzadegan, M., Christie, P., Seamann, J.R., 1991. An efficient method for isolation of RNA from tissue cultured plant cells. *Nucleic Acids Res.*, 19:6055.
- Schoen, C.D., Knorr, D., Leone, G., 1996. Detection of potato leafroll virus in dormant potato tubers by immunocapture and a fluorogenic 5' nuclease RT-PCR assay. *Phytopathology*, 86:993-999.
- Singh, R.P., Somerville, T.H., 1992. Evaluation of the enzyme-amplified ELISA for the deduction of potato viruses A, M, S, X, Y and leafroll. *Am. Potato J.*, 69: 21-30.
- Singh, R.P., Kurz, J., Boiteau, J., G., Bernard, G., 1995. Detection of potato leafroll virus in single aphids by reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application. *J. Virol. Methods*, 55:133-143.
- Singh, M., Sing, R.P., 1996. Factors affecting detection of PVY in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction and nucleic acid spot hybridization. *Journal of Virol. Methods*, 60:47-57.
- Singh, R.P., Kurz, J., Boiteau, G., 1996. Detection of stylet-borne and circulative potato virus in aphids by duplex reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application. *J. Virol Methods*, 59:189-196.
- Singh, M., Sing, R.P., 1997. Potato virus Y deduction: sensitivity of RT-PCR depends on the size of fragment amplified. *Can. J. Plant Pathology*, 19:149-155.
- Singh, R.P., Kurz, J., Boiteau, G., Moore, L.M., 1997. Potato leafroll virus detection by RT-PCR in field-collected aphids. *American Potato Journal*, 74:305-313.
- Sing, R.P., 1998. Reverse-transcription polymerase chain reaction for the detection of viruses from plant and aphids. *J. Virol. Methods*, 74:125-128.
- Singh, R.P., Singh, M., 1998. Specific detection of Potato virus A in dormant tubers by reverse transcription polymerase chain reaction. *Plant Diseases*, 82:230-234.
- Singh, M., Singh, R.P., Moore, L., 1999. Evaluation of NASH and RT-PCR for the detection of PVY in dormant tubers and plants by comparison with visual symptoms and ELISA in plants. *Amer. J. of Potato Res.*, 75:61-66.
- Singh, R.P., 1999. A solvent-free, rapid and simple virus RNA-release method for potato leafroll virus detection in aphids and plants by reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Virol. Methods*, 83:27-33.
- Slack, S.A., 1995. Potato viruses with some implications for production and processing in the United States: a history of problems and solutions. *Summa Phytopathologica*, 21:273-275.
- Spiegel, S., and Martin, R.P., 1993. Improved detection of potato leafroll virus in dormant potato tubers and micro tubers by the polymerase chain reaction and ELISA. *Ann. Appl. Biol.* 121:493-500.
- Thomson, D., Dietzgen, R.G., 1995. Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using rapid virus release protocol without tissue homogenization. *J. Virol. Methods*, 54:85-95.
- Tovar, P., Estrada, R., Schilde-Rentschler, L., Dodds, J.H., 1985. Induction and use of *in vitro* potato tubers. *International Potato Center, Lima, Peru*, 13:1-3.
- Uyen, N.V., Zaag, P.V., 1983. Vietnamese farmers use tissue culture for commercial potato production. *Am.Potato J.*, 60, 873-879.
- Vunsh, R.A., Roster, A., Stein, A., 1990. The use of the polymerase chain reaction (PCR) for detection of bean yellow mosaic virus in gladiolus. *Ann. Appl. Biol.* 117:561-569.
- Vunsh, R., Roster, A., Stein, A., 1991. Detection of bean yellow mosaic virus in gladioli corms by the polymerase chain reaction. *Annals of Applied Biology*. 119:289-294.
- Walkey, D.G.A., 1991. *Applied Plant Virology*. St. Edmundsbury Press, Bury St. Edmunds, Suffolk, USA, 338p.
- White, B.A., 1993. *PCR protocols; current methods and applications*, 397 pp. Humana Press, New Jersey, USA.