

BİTKİ ISLAHINDA MOLEKÜLER BELİRTEÇLERİN KULLANIMI ve GEN AKTARIMI

Application of the Molecular Marker and Gene Transfer in Plant Breeding

Çiğdem VARDAR-KANLİTEPE¹, Sümer ARAS¹, Demet CANSARAN-DUMAN²

¹ Ankara Üniversitesi,
Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
Tandoğan, ANKARA

² Refik Saydam Hıfzıssıhha
Merkezi Başkanlığı,
İlaç ve Kozmetik Araştırma
Müdürlüğü, ANKARA

Geliş Tarihi: 25.09.2009
Kabul Tarihi: 12.05.2010

İletişim:
Sümer ARAS
Ankara Üniversitesi,
Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü
Tandoğan - ANKARA
Tel : +90 312 212 67 20-1088
E-posta : aras@science.ankara.edu.tr

ÖZET

Tarımsal olarak önemli pek çok tür için moleküler belirteç haritaları oluşturulmuştur. Dünyada bu alanda fazla sayıda kaynak ve potansiyel var olmasına rağmen, henüz belirteç yardımcı seleksiyonla (MAS) gelişen tarım ürünleri için ticari ıslah programlarında beklenen düzeyde yarar sağlanamamaktadır. Bu derlemede, MAS kullanımındaki teknikler ile ilgili genel bilgilerin yanısıra bitki ıslahının hem temel genetik ilkeleri hem de klasik ıslah yöntemlerinden bahsedilmiştir. Ayrıca, bitki ıslahında karşılaşılan sorunlar biyoteknoloji ve genetik mühendislik yöntemleri dikkate alınarak ayrıntılı olarak incelenmiştir. Genetik ıslah aracı olarak belirteç yardımcı seleksiyon kullanımının potansiyel önemi değerlendirilirken bu tekniğin ekonomik maliyeti, yararları, potansiyel zararları da göz önünde bulundurulmalıdır.

Anahtar Sözcükler: Bitki, ıslah, moleküler belirteç

ABSTRACT

Molecular marker maps have been constructed for the majority of agricultural important species. Despite the enormous potential and considerable resources invested in this field in the world, MAS has not yet delivered its expected benefits in commercial breeding programmes for crops development. This study provides an overview related to the techniques in using, MAS and the basic genetic principles of plant breeding and conventional breeding methods were discussed. In addition, the problems encountered of plant breeding by taking into account the biotechnology and genetic engineering methods were examined in detail. When evaluating the potential merits of applying MAS as a tool for genetic improvement, economic cost, benefits and potential hazards of this technique should be considered.

Key Words: Plant, breeding, molecular marker

GİRİŞ

Bitkilerin genetik yapılarındaki ve doğal yayılışlarındaki varyasyonlardan yararlanılarak kalıtım yoluyla istenilen özelliklere sahip yeni bitkiler elde edilmesine 'bitki ıslahı' denir. Son yıllarda, biyoteknoloji ve genetik mühendisliğindeki tekniklerde önemli gelişmelerin olması, farklı canlılar arasında da gen aktarımına olanak sağlamıştır. Böylece insanoğlu tarımda, gıda teknolojisinde, ekolojide yaşamı tehdit eden pek çok sorunun çözülmesini sağlayabilecek anahtarlar 'bitkilere gen aktarımı' yaparak sahip oldular.

Günümüzde tarımla uğraşan çiftçinin zor ve olumsuz koşullarda daha fazla ürün almasına yardımcı olacak tohumların üretimi konusunda araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Yine bitkilerin sıcaklık ve kuraklık stresine karşı geliştirecekleri savunma mekanizmaları üzerinde çok sayıda çalışmalar ortaya konmaya başlanmıştır (1).

Gen aktarımı yapılmış organizmalar dünya ticaretine de girmiştir. İnsanların genel olarak "Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar - GDO" olarak tanıdığı tarımsal ürünler oldukça dikkat çekmekte ve hızla artan dünya nüfusunu doyuracak kaynaklar olarak görülmektedir. 2025 yılında dünya nüfusunun 8 milyar olacağı tahmin edilmektedir. Bu nüfusu besleyebilmek için, gıda üretimi her yıl % 1.2 artmak zorundadır (1).

BİTKİ İSLAH ÇALIŞMALARININ YARARLARI VE RİSKLERİ

1. Potansiyel Yararlar

a. Besin Miktarının Artırılması ve İçeriğinin Zenginleştirilmesi: Özellikle üçüncü dünya ülkelerinde olmak üzere açlık ve kötü beslenme başta gelen halk sağlığı problemlerinden biridir. Besin içeriğini zenginleştirmeye yönelik çalışmalara vitamin A içeriği zenginleştirilmiş pirinç üretimini örnek verebiliriz. Dünya üzerinde okul öncesi dönemdeki

3 milyon kadar çocuğun A vitamini eksikliğinden kaynaklanan görme bozukluğu varken her yıl 250 000 ile 500 000 kadarı kör olmakta bunların da üçte ikisi izleyen birkaç aylık süreçte ölmektedir.

Biyoteknolojik yöntemlerle geliştirilen, A vitamini zenginleştirilmiş pirinç sayesinde özellikle pirincin temel tüketim maddesi olduğu bölgelerde A vitamini eksikliğinin önüne geçilebileceği öngörülmektedir (1).

b. Besinlerin Alerjik Özelliklerinin Azaltılması:

Genelde toplum içinde besin alerjisi olan kişilerin ortalaması yaklaşık olarak %2-8 kadardır. Bu alerjik reaksiyonların büyük bir kısmından sekiz tür besin sorumludur. Bunlar yer fıstığı, yumurta, inek sütü, soya, buğday, kabuklu deniz canlıları, balık ve fındıktır. Besinler içindeki alerjik proteinlerin çıkarılması veya yapısının değiştirilmesi yönündeki çalışmalarla bu besinlerin alerjik özelliklerinin azaltılması hedeflenmektedir (1).

c. Aşı ve İlaç Üretiminde Kullanımı: GDO'lar hem

gıda hem de ilaç olarak etki edecek ürünler halinde tüketilebilirler. Örneğin brokoli, anti-oksidant içeriğini zenginleştirmek için; çay, flavonoidlerle zenginleştirmek için genetik olarak değiştirilebilir. Özellikle olgunlaştığı zaman çiğ olarak tüketilen muz gibi bazı tropikal ürünler; hepatit, kuduz, dizanteri, kolera ve ishal ile gelişmekte olan ülkelerde yaygın olan diğer bağırsak enfeksiyonlarına karşı kullanılabilen proteinleri üretmek için genetik olarak değiştirilebilmektedir. Bu ürünlerin yetiştirildiği ve düşük maliyetle dağıtıldığı ve özellikle aşı üretimi için kaynağın ve tıbbi alt yapının yetersiz olduğu gelişmekte olan ülkelerde çocuklar için faydalı olacaktır (1).

Bazı biyoteknoloji şirketleri tütün gibi bazı bitkileri bile ilaç sentezi için değiştirebilmektedir. Tütün, aynı zamanda insan ve çiftlik hayvanlarında kullanılan antikorları üretmek içinde değiştirilmiştir (1).

d. Çevresel Faydaları: Tarımsal amaçlı bitkilerin çoğunun genetiği değiştirilerek virüsler; böcekler, yabancı otlar, herbisitler, hastalık ve çeşitli çevresel etkenlere karşı direnç kazanabilmeleri sağlanabilir. Örneğin; patates, soya ve mısır gibi bitkisel ürünlerin çoğuna insektisidal (böcek öldürücü) potansiyele sahip *Bacillus thuringiensis*'li bir gen aktararak böceklerle karşı dirençli Bt bitkiler elde edilmiştir (2).

Günümüzde bitkilerin topraktan daha fazla azotu doğrudan kendilerinin alabilmesi için genetiği değiştirilmiş bitki üretimi hızlandırılmıştır. Bu da buharlaşarak veya nehir ağzlarına sürüklenip su kirliliğine neden olarak çevreyi tehdit eden kimyasal gübre gereksinimini azaltacağından çevre için yararlı bir uygulama olacaktır (2).

Genetiği değiştirilmiş bitkiler ya da mikroorganizmalar, çevredeki toksik atıkların uzaklaştırılmasını sağladıkları için bioremediasyon (biyolojik iyileştirme; su kalitesinin zehirli atıklardan uzaklaştırılarak iyileştirilmesi) için de kullanılabilirler (2).

2. Potansiyel Riskler

a. Artmış Alerjik Reaksiyon Riski: Biyoteknolojik yöntemler ile üretilmiş besinler üzerinde en önemli tartışma konularının başında alerjik reaksiyon riskinin artışı gelmektedir. Genetik yapı değişiminde, verici kaynağın alerjen özelliklerinin transfer edilen bitkiye ya da hayvana geçmesi engellenemeyebilir. Bu besinler için ileri sürülen potansiyel alerji riskini üç kategoriye ayırabiliriz:

- i. Bir üründeki bilinen bir alerjik proteini kodlayan genin bir başka ürüne transferi,
- ii. Zaten alerjik olduğu bilinen bir besinin yapılan uygulamalar sonunda alerjik özelliğinin daha da artması,
- iii. Yeni alerjik proteinlerin ortaya çıkması.

Genetiği değiştirilmiş besinler, alerjik bir özellik taşıyıp taşımadıklarının belirlenmesi amacıyla bir dizi testten geçmektedirler, bu testlerin amacı:

- i. Aktarılan genlerin alerjik bir üründen aktarılıp aktarılmadığını,
- ii. Alerjik olduğu bilinen proteinlerle benzer aminoasit dizilerinin olup olmadığını,
- iii. Aktarılan genlerin kodladığı proteinlerin sindirim enzimlerine dayanıklılığını saptamaktır.

Biyoteknolojik yöntemlerle besin üretme çalışmalarında alerjik reaksiyonların oluşmasına örnek olarak Brezilya fındığı ile yapılan deneyler verilebilir. Besin içeriği zengin soya geliştirmek amacıyla yapılan çalışmalarda Brezilya fındığından alınan bir gen soyaya aktarılmıştır. Brezilya fındığı alerjik özelliği bilinen bir besin türüdür. Yapılan çalışmalar aktarılan genin sentezlediği proteinin Brezilya fındığındaki alerjik proteinlerden biri olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bunun üzerine transgenik soyanın geliştirilmesine son verilmiştir (1).

b. Potansiyel Kanserojenlik: GDO'lu bitkilerin doğrudan ya da dolaylı olarak kanserojen etkisinin olabileceği birçok araştırmacı tarafından belirtilmektedir. Özellikle, herbisitlere dayanıklı GDO'lu pamuk, soya ve mısır çeşitlerinde kullanılan bazı kimyasal maddelerin doğrudan kanser yapıcı oldukları bilinmektedir. Öte yandan, sindirim sisteminde tam olarak sindirilmeden dolaşım sistemine geçerek kan hücreleri aracılığı ile normal genomu katılabilen yabancı DNA parçalarının da hastalıklara yol açma ihtimali söz konusudur (1).

c. Potansiyel Toksikite: Genetik olarak değiştirilmiş organizmalar, aktarılan yeni gen ürünlerini ve onlardan kaynaklanan sekonder metabolitleri içerdiğinden, potansiyel bir toksisiteye sahiptir. GDO'lu bitkilerde bulunan özellikle zararlı ot ve böcek öldürücü genler toksin üretirek çalıştıklarından, dokularda birikme durumunda, önemli riskler oluşturmaktadırlar. Bu genlerin kullanılması pestisit kullanımını ortadan kaldırmıştır. Ancak, bu toksik madde kalıntılarının ortadan kalktığı

anlamına gelmemektedir. Bu toksinlerin, uzun dönemde insan sağlığına olan etkilerine ilişkin yeterli bilgi bulunmamaktadır. GDO'lu ve normal patateslerle beslenen iki grup farede yapılan çalışmada; normal patateslerle beslenenlerde hiçbir sorun olmamış, GDO'lu patateslerle beslenenlerin ise sindirim sistemlerinde önemli tahribatlar gözlemlenmiştir (1).

d. Antibiyotik Direnç Genleri: GDO'lar konusunda önemli bir diğer tartışma konusu direnç genlerinin durumudur. Direnç genleri, aktarılmak istenen asıl genle birlikte aktararak, gen aktarımının başarılı olduğu organizmaları seçmek için işaretleyici gen olarak kullanılmaktadır. Transgenik bitki üretiminde kullanılan bu genlerin doğaya yayılma ihtimali kimi çevrelerce çok büyük bir tehlike olarak görülmektedir. Zira antibiyotik direnç genlerinin patojen mikroorganizmalara geçmesi durumunda bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları kontrol altına almak oldukça zorlaşacaktır.

e. Besin Değerlerinde Bozulma: GDO'lu bitkilere; yeni özellikler kazandırılırken, bitkinin orijinal yapısında bulunan bazı kalite öğelerinde önemli azalmalar olduğu tespit edilmiştir. Örneğin, kalp hastalıklarına ve kansere karşı önemli bir koruyucu madde olan "fitoöstrojen" bileşiklerinin, klasiklere oranla, GDO'lu bitkilerde daha az olduğu bilinmektedir (1).

f. Sosyo-Ekonomik Riskler: GDO'lu bitkiler doğada yaşayan diğer bitkilerden farklı olarak, genomlarında kendi türlerine ait olmayan genleri taşıdıklarından, bu bitkilerin yetiştirildiği ülkelerde, başta sağlık olmak üzere, çevre ve sosyo-ekonomik yapı üzerinde önemli riskler söz konusu olmaktadır (1).

g. Pahalılık: GDO'lu ürünlerin tohumları GDO'lu olmayanlara göre; % 25 ile % 100 arasında daha pahalı olup, her yıl yenilenme zorunluluğu söz konusudur. Tohumluluk alımını uzun süre devam ettiremeyecek olan küçük çiftçiler bu durumdan zarar göreceklerdir.

BİTKİ İSLAHINDA KULLANILAN BELİRTEÇ TİPLERİ

Seleksiyonda kullanılacak belirteç tipleri şunlardır; morfolojik belirteçler, biyokimyasal belirteçler, DNA belirteçleri. Bunlar içinde en güvenilir ve en çok kullanılanı DNA belirteçleridir. Başlıca DNA belirteçleri 2'ye ayrılır (2):

1. Sekansa spesifik olmayanlar: Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD), Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP).

2. Sekansa spesifik olanlar: Basit dizi tekrarı (SSR), Basit sekans tekrarlamaları arası polimorfizm (ISSR) ve bu tekniklere ilaveten son yıllarda kullanılan; Organel mikrosatellitleri, Sekansı karakterize edilmiş (belirlenmiş) çoğaltılmış bölgeler (SCAR), Bölünerek çoğaltılmış polimorfik diziler (CAPS), Rastgele çoğaltılmış mikrosatellit polimorfizmi (RAMP), Sekansa bağlı çoğaltılmış polimorfizm (SRAP), Hedef bölge çoğaltma polimorfizmi (TRAP), Tek iplik konformasyon polimorfizmi (SSCP).

DNA belirteçlerinin avantajları şöyledir (2):

- Moleküler belirteç sistemlerini kullanmanın fenotipik karakterler yoluyla ıslah çalışmalarına temel üstünlüğü bu sistemlerin biyotik ve abiyotik stres koşullarından bağımsız olmalarıdır.
- Moleküler belirteçler yoluyla ıslah tekniği tahıllar ve diğer ürünlerde kolaylıkla adapte olmuş teknikler arasındadır.
- Moleküler belirteç sistemleri ıslah çalışmalarına hız sağlarlar.
- Doğrulama ya da tanımlama, genetik kaynakların tespiti ve tanımlanması, genetik çeşitliliğin belirlenmesi gibi amaçlarla kullanılabilir.

Islah programları sadece fenotipik ya da moleküler bilgilere dayanabildiği gibi her ikisini de birleştirebilir.

DNA BELİRTEÇLERİNİN BİTKİ ISLAHINDAKİ ROLÜ

1. Genetik Kimlik Tanısı ve Akrabalık Düzeylerinin Belirlenmesi

Genotipik tanımlama ile mevcut veya potansiyel gen kaynaklarının taranması; bu da ileride ıslah çalışmalarının temelini oluşturacak materyallerin genetik düzeyde incelenmesini sağlar.

2. Hibrit Bitki Tanısı

Islah çalışmaları sürecinde ıslah programlarının çeşitli aşamalarında moleküler belirteçlerden yararlanılarak genetik düzeyde tanımlamalar yapılabilmektedir. İstenen genetik özellikteki bitkiler seçilebilmekte buna göre ıslah programına yön verilebilmektedir. Ayrıca en önemli kullanım alanından bir tanesi de melezlemeler sonucunda elde edilen döllerin tanısının bu yolla gerçekleştirilebilmesidir (2).

3. Belirteç Yardımı ile Seleksiyon (Marker Assisted Selection, MAS)

Bu yöntemle; özellikle hastalık ve zararlılara dayanıklılık, üzümlerde çekirdeklilik/ çekirdeksizlik veya herhangi bir maddenin sentezi ile ilişkili belirteçler kullanarak seleksiyon gerçekleştirilmektedir. Böylece zamandan ve enerjiden tasarruf ederek kısa zamanda istenilen özelliğe sahip bitkileri belirleme, gerektiğinde bunları ıslah çalışmaları başlangıcında ebeveyn olarak kullanma gibi avantajlara sahip olunabilir (2).

4. Bulk Segregasyon Analizi

Bu teknik Michelmore ve arkadaşları tarafından 1991 yılında geliştirilmiştir. Genomun spesifik bölgelerindeki belirteç belirlenmesi için geliştirilmiş bir yöntemdir. Orijini tek bir çapraz olan, ayrılmış bir popülasyondan gelen bireylerin iki tane havuzlanmış DNA örneklerinde karşılaştırılması esasına dayanır. Her havuz ya da toplanmış kümede bireyler, ilgilenilen gen ya da özellik bakımından özdeştir ama diğer genler için özdeş değildirler. Bir karakter

için karşılaştırılan iki havuz onları birbirinden ayıran belirteçleri belirlemek için analiz edilirler (örneğin, bu özellik bir hastalığa direnç olabilir) (1).

5. Tohum Islahı

Tohum ıslahı yapılırken moleküler belirteçler de dahil olmak üzere özel teknikler uygulanır. Bir özelliğe ait bir ya da daha çok karakteristik özellik her örnekte analiz edilir. Tohumlar aşağıdaki özellikleri değiştirmek için seçime uğrarlar: Herbisit toleransı, hastalık direnci, böcek direnci, ürün artışı, yağ miktarı artışı, besin değeri artışı, strese toleransı artırma, büyüme oranını artırma, tercih edilen olgunluk, organsal özellikleri artırma, endüstriyel bazı özellikleri artırma (1).

Tohum ıslahında çeşitli aşamalar bulunur (1): Popülasyonlardan elde edilen tohumlardan istenilen karakteri bulunduran tohumlar seçilir. Seçilen tohumlardan double haploid tohumlar alınır. Her double haploid tohumdan bir numune çıkarılır (tohumların çimlenebilme yeterliliği korunur). Bir özelliğe ait bir ya da daha çok karakteristik her örnekte analiz edilir. Analiz sonuçlarına dayanarak bir ya da daha fazla double haploid tohum seçilir. Seçilmiş double haploidlerden bitki ya da bitki dokuları kültüre alınır ve yetiştirilir.

MAS VE BİTKİ ISLAHINDAKİ UYGULAMA ALANLARI

1. MAS Deneysel Uygulama Basamakları

MAS uygulamalarının gelişimi mısır ile başlamış ve bunu buğday takip etmiştir. Arpa uygulamaları da buğdayda yapılan çalışmalara çok benzemektedir. Tahıllar arasında model bitki olması nedeniyle pirinç üzerinde de birçok araştırma yapılmıştır.

- Genom dizi haritası geliştirilir. Quantitative Trait Loci (QTL), spesifik bir özelliği kontrol eden çoklu genlerin dizi haritalarında bulunduğu bölgedir. Popülasyonların ayrımında kullanılan etkili bir yöntemdir.

- Küçükte olsa QTL üzerindeki değişiklikler fenotiplerde farklılıklar ortaya çıkarır.
- ii. İslah sürecinde QTL ile bağlantılı PCR temelli moleküler belirteçler seçilir. Bitki genomlarının fiziksel haritalaması için Rekstriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP, PCR temelli olmayan), Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) ve Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP) ilk olarak genellikle popülasyon genetiği ve ıslah çalışmalarında kullanılmıştır (3). Fenotipik bir özelliğin izlenmesi için de kullanılırlar.
 - iii. Genomik fiziksel dönüm noktalarındaki rastgele primerlenmiş PCR ürünlerini dönüştürmek için 'Sequence-Specific Markers (SCAR)' tekniği dizayn edilmiştir. Mikrosatellit belirteç teknikleri, birey içi ve bireyler arası mikrosatellitlerdeki ya da tek dizi tekrar bölgelerindeki varyasyonlarda parmak izi analizleri için kullanılmıştır.
 - iv. Kloroplast ve mitokondri mikrosatellit teknikleri de ıslah ve evrim çalışmalarında kullanılmıştır. Bitki genomunda Expressed Sequence Tags (EST)'nin bulunmasıyla Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPs) gibi sekansa spesifik belirteçler geliştirilmiştir. Genellikle Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) formundaki popülasyonda genlerin allelik varyasyonlarında kullanılmıştır. Yeni genomik elemanlardan retrotranspozon temelli belirteçler yardımıyla da yakın bireyler arasındaki genom boyunca devamsızlıklar analiz edilmiştir (4).

2. MAS Çalışmalarının Avantajları

MAS çalışmalarının avantajları aşağıdaki gibi özetlenebilir (4):

- Fenotipik taramaya göre daha kolay bir metottur. Özellikle tanımlanması zahmetli özelliklerde zaman ve kaynak israfını engeller.

- Çimlenme aşamasında seleksiyon sağlayarak tane kalitesi gibi özelliklerin tanısında kolaylık sağlar. Örneğin pirinçte ekimden önce seleksiyon yapılarak tane kalitesi belirlenmiş olur.
- Çevresel faktörlerden etkilenmediği için güvenilirliği yüksektir. Homozigot ve heterozigot ırkları ayırarak tek bitkinin seçimini sağlar.
- Ülkemizde var olan genetik kaynakların tam bir kimlik tespitlerinin yapılmasını bu yolla genetik rezervin korunmasını sağlar.
- Herhangi bir çeşit karışıklığı durumunda ayrımı ve bu yolla çeşitlerin satış işlemi gibi ticari haklarının korunmasına yardımcı olur.
- Spesifik özellikteki genotiplerin daha titiz, doğru şekilde ayrımını sağlar.

3. MAS Çalışmalarında Yaklaşımlar

MAS çalışmalarında yaklaşımlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir (4):

- i. **Geri Çaprazlama:** Hedef bölgenin etkili bir şekilde seçimini sağlar, bağlantı taramalarını minimize eder, tekrar eden ebeveynlerin tespitini kolaylaştırır.
- ii. **Piramitleme:** Patojenlerin spesifik dozları için çoklu hastalık direnç genlerinin tespitinde hız sağlar (geleneksel yöntemlerle olanaklı değildir).
- iii. **Erken Safhada Döl Seçimi:** MAS F2 ve F3 basamaklarında gerçekleştirildiğinden, ıslah programlarının sonraki aşamalarında avantaj sağlar çünkü kaynak tam olarak tespit edilmiş olur.
- iv. **Birleştirilmiş yaklaşımlar:** Bazı durumlarda fenotipik çalışmalar ile MAS'ı birleştirmek faydalı olabilir.

4. MAS Uygulamalarına Örnekler

Solanum chilense bitkisinde RAPD, SCAR, CPS belirteç yöntemleri ile ToMoV virusuna karşı belirlenmiş dayanıklılık geni, Ty-3. Kahverengi pas dayanıklılık genlerine ait belirteçlerinin belirlenmesinde SSR ve diğer DNA belirteçleri başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. SSR belirteçlerini iki farklı ekmeklik buğday popülasyonunda kullanarak Lr13 genine ait belirteci belirlenmiş; Slovakya kışlık buğday çeşitlerinde Lr13 geni SSR belirteçleriyle araştırılmış ve Lr13 genine ait belirteci belirlemek için PstIAFLP tekniği kullanılmıştır (5). Çay bitkisi için ilk (gen) bağlantı haritası RAPD belirteçleri kullanılarak yapılmıştır ve belirteçlerin, tehanine içeriği, tomurcukların filizlenme tarihleri, antraknoza karşı direnç ve soğuğa karşı toleransla ilişkileri belirlenmiştir (5). RFLP tekniğini kullanarak ve kloroplasttan izole ettikleri DNA ile, 10 *Pistacia* türü arasında filogenetik sınıflandırma yapmışlardır. Çalışma sonunda elde ettikleri verilere göre, *Pistacia vera* ile *P. khinjuk* ve *P. mexicana* ile *P. texana* türleri arasında farklılık bulunmadığını, bunların aynı tür olabileceğini bildirmişlerdir (6).

Pistacia eurycarpa, *P. vera*, *P. atlantica* ve *P. terebinthus* türlerini morfolojik ve moleküler seviyede tanımlamışlardır. Morfolojik çalışma sonucunda oluşturulan soyağacında *P. khinjuk* olarak toplanan örneklerin *P. vera*'ya, *P. atlantica* türünden daha yakın olduğunu görmüşlerdir. Moleküler çalışmada ise RAPD tekniğini kullanarak, 40 yabancı *Pistacia* genotipi ve iki *P. vera* çeşidi üzerinde analiz yapmışlar, analizde 10 polimorfik RAPD primeri ile türler arasında ve türler içinde 128'i polimorfik olan toplam 138 skorlanabilir bant elde etmişlerdir (5). Dokuz *Pistacia* türünde RAPD tekniğini kullanarak türler arası akrabalıkları incelemişlerdir (7).

Antep fıstığında Simple Sequence Repeats (SSR) primeri geliştirmek için Kerman çeşidinin DNA'sını kullanarak genomik kütüphane oluşturmuşlardır. Araştırmacılar CA, CT ve CTT tekrarlarını kullanarak sekanslamaya hazır klonlar elde etmişlerdir.

Bu kütüphanelerden faydalanarak dizayn edilen primer çiftlerinden 25 tanesinin sentezinin yapıldığı ve primerlerin değişik orijinli Antep fıstığı çeşitlerinde Li-Cor sekanslama ünitesi kullanılarak test edildiğini bildirmişlerdir (8). SSR ve Sequence-related Amplified Polymorphism (SRAP) yöntemlerini kullanarak *P. atlantica*, *P. integerrima* ve iki türler arası melez PioneerGold-II ve UCB-I bitkilerinde çalışmışlardır (9).

RAPD, Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) ve AFLP yöntemlerini kullanarak Türkiye'de bulunan 69 Antep fıstığı çeşidini tanımlamışlar ve bunlar arasındaki genetik ilişkileri belirlemişlerdir. Çalışmada toplam 572 belirteç elde etmişlerdir. Bunlardan 307 (%53.6) tanesinin polimorfizm gösterdiğini bildirmişlerdir (7). Avrupa ladininde (*Picea abies*) AFLP ve SAMPL yöntemlerini kullanarak parmak izi analizi çalışması yapmışlardır (10). Okalüptüs bitkisinde AFLP belirteçleriyle genetik harita oluşturmuşlardır. *Eucalyptus tereticornis* x *E. globulus* çaprazına ait 91 F1 bitkisi kullanmışlardır (11).

Kayıda, Goldrich x Valenciano çaprazına ait 81 F1 bitkisinde, AFLP, RAPD, RFLP ve SSR belirteçleriyle genetik haritalama çalışması yapmışlardır (12). RAPD, AFLP ve ISSR belirteçleriyle ananas bitkisinde (2n=50), *Ananas comosus* x *Ananas bracteatus* çaprazına ait 46 F1 bitkisi kullanarak, ilk genetik haritayı yapmışlardır (13). Pikan cevizi (*Carya illinoensis*) çeşitlerinde RAPD ve AFLP belirteçlerini kullanarak ilk genetik haritayı yapmışlardır. Haritalama popülasyonu için *Pawnee* x *Eliot* çaprazına ait 120 F1 bitkisini (fullsibling) seçmişler ve double-pseudo-testcross haritalama stratejisini kullanmışlardır (14). SSR, ISSR ve SAMPL yöntemlerini kullanmışlardır. Bu üç belirteç sisteminin polimorfizm bulmadaki etki derecesini, 30 çavdar popülasyonunda yapılan çalışmalarla kıyaslamışlar; bu belirteç sistemlerinden elde edilen verileri farklı istatistiksel metotlar ve katsayılar kullanarak karşılaştırmışlardır (15).

Farklı bölgelerden topladıkları 307 mango genotipi ile yaptıkları çalışmada, genom kütüphanesinden

faydalanarak (GA)n ve (GT)n tekrarlarını içeren SSR primeri geliştirmişlerdir (16). Kanada için ekonomik önemi olan *Picea* cinsinde SAMPL yöntemi kullanarak genetik karakterizasyon çalışması yapmışlardır (17). Yaygın olarak yetişen ve ticari önemi olan domates ve biberdeki genetik akrabalığı belirlemek için SSAP, AFLP ve SSR yöntemlerini kullanmışlar, SSAP yöntemiyle elde ettikleri sonuçları dominant belirteç sistemi olan AFLP ve kodominant belirteç sistemi olan SSR yönteminden elde ettikleri sonuçlarla karşılaştırmışlardır (18). Çalışmada domates için 34 homozigot hat ve biber için 35 homozigot hat kullanmışlardır. SSAP yönteminde domates için bilinen bir retrotranspozon bölge içeren üç primer seti, biber için de yine bilinen bir retrotranspozon bölge içeren üç primer seti kullanmışlardır. Sonuçta, biberde 92 (%76.03)'si polimorfik olan 121 bant elde etmişlerdir. Domateste ise 79 (%57.3)'ü polimorfik olan 138 bant skorlamışlardır. Primer başına düşen toplam bant sayısını domates için 46 ve biber için 40.33, primer başına düşen polimorfik bant sayısını yine sırasıyla 26.33 ve 30.67 olarak bulmuşlardır. AFLP yönteminde dokuz primer seti kullanmışlar, domateste 123 (%14.56)'ü polimorfik olan toplam 845 ve biberde 115 (%8.031)'i polimorfik olan toplam 1432 bant skorlamışlardır. Domateste primer başına düşen toplam bant sayısını 93.89 ve primer başına düşen polimorfik bant sayısını 13.67 olarak tespit etmişlerdir. Yine AFLP yönteminde, biberde primer başına düşen toplam bant sayısını 159.11 ve primer başına düşen polimorfik bant sayısını 12.78 olarak hesaplamışlardır. SSR yönteminde ise domates için 16, biber için 13 primer seti kullanmışlardır. Domates için 39 farklı allel, biber için 31 farklı allel skorlamışlardır. Domateste primer başına düşen toplam allel sayısını 2.44 ve polimorfik allel sayısını yine 2.44 (%100) olarak bulmuşlardır. Biberde ise SSR yöntemiyle primer başına düşen allel sayısı 2.385 ve polimorfik allel sayısı yine 2.385 (%100) olmuştur. SSAP, AFLP ve SSR yöntemlerinden elde edilen polimorfizm bilgi içeriği değerlerini

ise sırasıyla domateste, 0.175, 0.046, 0.393 ve biberde yine sırasıyla, 0.229, 0.026 ve 0.354 olarak bulmuşlardır. SSAP yönteminin üç belirteç sistemi arasında, domates ve biber için, en çok bilgi veren belirteç sistemi olduğunu bildirmişlerdir. En yüksek belirteç indeksini (MI) SSAP yönteminde hesaplamışlardır. Domates için SSAP yönteminin genetik varyasyon ve akrabalığın belirlenmesinde uygun bir yöntem olduğunu, SSR yönteminin ise spesifik özellikleri ortaya koyan bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Biber için, üç belirteç sisteminin de genel olarak benzer sonuçlar verdiğini ve bir türden izole edilen retrotranspozon sekansın genel olarak familya içerisindeki (*Solanacea*) diğer türler için de kullanılabilir olduğunu bildirmişlerdir (18).

Texasbademçeşidine ait genomkütüphanesinden 47 yeni SSR primeri geliştirmişlerdir (19). AFLP ve SSR belirteçleriyle çimende (*Festuca arundinacea*) ilk genetik haritayı oluşturmuşlardır. 91 F1 bitkisinde çalışmışlardır (20). İtalya'nın merkezinde bulunan Trasimeno Gölü'nün etrafında birbirine komşu olan üç araziden toplanmış üç RL popülasyonuna ait bürülcede SAMPL ve AFLP yöntemlerini kullanarak hangi yöntemin genetik çeşitliliği belirlemede daha üstün olduğunu kıyaslamışlardır (21). Pamukta C-AFLP ve AFLP yöntemleriyle çalışmışlardır (22). Kaju fıstığında (*Anacardium occidentale*) CP1001 (cüce klon) x CP96 (dev klon) çaprazına ait 85 F1 bitkisinde AFLP ve SSR belirteçlerini kullanarak genetik harita oluşturmuşlardır (23). SAMPL yöntemini kullanarak azot fiksasyonu yapan bir bitki olan *Lupinus angustifolius*'a ait RIL (Recombinant Inbreed Lines) F8 haritalama popülasyonunda genetik haritalama çalışması yapmışlar ve ıslah edilecek genle bağlantılı belirteç bulmaya çalışmışlardır. Çalışmada kullanılan popülasyonu yabani ve ıslah edilmiş iki türün çaprazlanmasıyla elde etmişlerdir (24).

22 ekmeklik buğday ile 12 esmer buğday olmak üzere toplam 34 buğday çeşidinde SAMPL ve AFLP yöntemleriyle genetik varyasyonu ve

türe özgü bantları tespit etmeyi amaçlamışlardır (25). Şeftalide (*Prunus persica* L.) SSR yöntemiyle çalışmışlar ve 51 çeşit şeftalide filogenetik ilişkiyi ve evrimsel gelişimi incelemişlerdir (26).

Doğal bir popülasyon olan *Ilex paraguariensis* türünün dört farklı popülasyonunun genetik çeşitliliği, RAPD tekniği kullanılarak karakterize edilmiştir. Doğal popülasyonlara sahip *Flax* genotiplerinin ve *Eucalyptus argutifolia*'nın polimorfizminin belirlenmesinde de RAPD tekniği kullanılmıştır. Skepner ve arkadaşları tarafından *Acer nigrum* ve *A. saccharum* gibi iki farklı türün genetik benzerliği RAPD belirteçler ile ortaya çıkarılmıştır. Nadir görülen klonal bir bitki olan *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae)'ın geniş ve dar popülasyonlarının içinde ve bu popülasyonlar arasındaki varyasyon, genetik uzaklık ve coğrafik uzaklığın bağıntısı (RAPD belirteçler sayesinde) belirlenmiştir.

Pinus halepensis ve *P. brutia* Akdeniz bölgesinin önemli çam türlerinden iki tanesidir. Bu türlerden oluşan bir doğal hibrit popülasyonu RAPD belirteçler kullanılarak analiz edilmiştir. Türkiye için önemli kültür bitkilerinden olan *Vitis vinifera* genomları da RAPD tekniğiyle başarıyla belirlenmiştir.

Labiatae familyasına ait ve İspanya'nın endemik türlerinden olan *Rosmarinus tomentosus*'un (Huber-Morath and Maire) yaşam alanları insan etkisiyle zarar görmüştür. Bu nedenle tür tehdit altında bulunmaktadır. Bu bitkide zonlar arası, popülasyonlar arası ve bireyler arası genetik varyasyonun ilk değerlendirilmesi RAPD belirteçler kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışma ile tehlike altındaki türün korunması için yapılması gerekenleri belirlemede RAPD analizi sonuçları temel alınmıştır.

RAPD belirteç sistemi, özellikle bitki moleküler biyolojisinde Bulk Segregant Analysis (BSA) gibi uygulamalarda da geniş kullanım alanı bulmuştur.

İslah çalışmalarında örnekleme stratejisinin başarısı, türün doğal popülasyonlarında bulunan genetik çeşitliliğin büyük bir kısmının korunabilmesiyle ölçülür. Çünkü gelecekteki çevresel koşullarda değişme, biyolojik zararlılar bugünden bilinmemektedir ve bunlar ortaya çıktığında uzun hayat evrelerine sahip, soy içi eşleşme etkilerine hassas orman ağaçları bu değişen koşullara kolaylıkla adapte olamayabilirler (27). Bu risklerin tahmin edilememesi nedeniyle genetik çeşitlilik önemli bir savunma mekanizması olarak değerlendirilmektedir (28, 29).

SONUÇ

Son yıllarda moleküler biyolojide görülen hızlı ilerleme, bitki genetiği çalışmalarında, genetik çeşitliliğin korunması, üretimi, korunması, ıslah gibi hedefler doğrultusunda kullanımına çok büyük ve önemli katkı sağlamıştır. Fakat bu belirteç yardımcı moleküler biyolojik uygulamalar, moleküler belirteçlerin tamamlayıcısı olmaktadır. Zaman içerisinde, Belirteç destekli seleksiyon (MAS) uygulanan bitki ıslahı çalışmaları, klasik çalışmalardaki seleksiyon hızını ve etkinliğini artırma yönünde önemli katkılar sağlayacaktır.

Sonuç olarak, genetik teknolojileri doğru yönlendirilip desteklendiğinde insanlığa faydalı olabilir, bu nedenle de bu konudaki çalışmalar titizlikle devam etmelidir.

KAYNAKLAR

1. Yıldırım A. Bitki Islahında Markörler Yardımıyla Seleksiyon (MAS). Gaziosmanpaşa Üniv. Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Bölümü, Tokat, <http://genelbilgiler1.googlepages.com/AY-Markorler-Yardımıyla-Seleksiyon.pdf>
2. fenbilimleri.ege.edu.tr/files/dersler/fen/9129Dokt.htm
3. Althoff DM, Gitzendanner MA, Segraves KA. The utility of amplified fragment length polymorphisms in phylogenetics: a comparison of homology within and between genomes. *Syst Biol*, 2007; 56:477-84.
4. Hafez EE, Ghany AGAA, Zakil EA. LTR-retrotransposons based molecular markers in cultivated Egyptian cottons *G. barbadense*. *Afr J Biotechnol*, 2006; 5:1200-4.
5. Kafkas S, Perl-Traves R, Kaska N. Unusual *Pistacia atlantica* Desf. (Anacardiaceae) monoecious sex type in the Yunt Mountains of the Manisa Province of Turkey. *Israil J Plant Sci*, 2000; 48: 277- 80.
6. Parfitt DE, Badenes ML. Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997; 94: 7987-92.
7. Kafkas S, Perl-Traves R. Interspecific relationships in *Pistacia* based on RAPD fingerprinting. *Hortscience*, 2002; 37(1): 168-71.
8. Ahmad R, Ferguson L, Southwick SM. Identification of Pistachio (*Pistacia vera* L.) nuts with microsatellite markers. *J Amer Soc Hort Sci*, 2003; 128 (6): 898- 903.
9. Ahmad R, Ferguson L, Southwick SM. Molecular marker analyses of *Pistachio* rootstocks by simple sequence repeats and sequence related amplified polymorphisms. *J Hort Sci Biotech*, 2005; 80 (3): 382-6.
10. Paglia G, Morgante M. PCR based multiplex DNA fingerprinting techniques for the analysis of Conifer genes. *Mol Breeding*, 1998; 4: 173-7.
11. Marques CM, Araujo JA, Ferreira JG, Whetten R, O'malley DM, Liu B-H, Sederoff R. AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*. *Theor Appl Genet*, 1998; 96: 727-37.
12. Hurtado MA, Romero C, Vilanova S, Abbott AG, Llacer G, Badenes ML. Genetic linkage maps of two apricot cultivars (*Prunus armenica* L.) and mapping of PPV (sharka) resistance. *Theor Appl Genet*, 2002; 105: 182-91.
13. Carlier JD, Reis A, Duval MF, Coppens G, Leita JM. Genetic maps of RAPD, AFLP and ISSR markers in *Ananas bracteatus* and *A. comosus* using the pseudo-testcross strategy. *Plant Breeding*, 2004; 123: 186-92.
14. Beedanagari SR, Dove SK, Wood WB, Conner JP. A first linkage map of pecan cultivars based on RAPD and AFLP markers. *Theor Appl Genet*, 2005; 110: 1127-37.
15. Bolibok H, Rakoczy-Trojanowska M, Hromada A, Pietrzykowski R. Efficiency of different PCR based marker systems in assessing genetic diversity among Winter rye (*Secale cereale* L.) inbreed lines. *Euphytica*, 2005; 146: 109-16.
16. Duval MF, Bunel J, Sitbon C, Risterucci MA. Development of microsatellite markers for Mango (*Mangifera indica* L.). *Mol Ecol Notes*, 2005; 5: 824-6.
17. Gupta AK, Kang BY, Roy JK, Rajora OP. Large scale development of selectively amplified microsatellite polymorphic loci (SAMPL) markers in Spruce (*Picea*). *Mol Ecol Notes*, 2005; 5: 481-3.
18. Tam SM, Mhiri C, Vogelaar A, Kerkveld M, Pearce SR, Grandbastien M, Grandbastien A. Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon based SSAP, AFLP and SSR. *Theor Appl Genet*, 2005; 110: 819-31.
19. Mnejja M, Garcia-Mas J, Howad W, Arus P. Development and transportability across *Prunus* species of 42 polymorphic almond microsatellites. *Mol Ecol Notes*, 2005; 5: 531-5.
20. Saha MC, Mian R, Zwonitzer JC, Chekhovskiy K, Hopkins AA. An SSR- and AFLP based genetic linkage map of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Theor Appl Genet*, 2005; 110: 323-36.
21. Tosti N and Negri V. On going on farm micro evolutionary processes in neighbouring cowpea landraces revealed by molecular markers. *Theor Appl Genet*, 2005; 110: 1275- 83.
22. Zhang J, Lu Y, Yu S. Cleaved AFLP (C-AFLP), a modified amplified fragment length polymorphism analysis for cotton. *Theor Appl Genet*, 2005; 111: 1385-95.
23. Cavalcanti JVJ, Wilkinsin JM. The First genetic maps of Cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Euphytica*, 2007; 157: 131-43.
24. Boersma JG, Pallotta M, Li C, Buirchell JB, Sivasithamparam K, Yang H. Construction of a genetic linkage map using M-AFLP and identification of molecular markers linked to domestication genes in narrow-leaved Lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Cell Mol Bio Lett*, 2007; 10: 331- 44.

25. Altintas S, Toklu F, Kafkas S, Kilian B, Brandolini A, Özkan H. Estimating genetic diversity in durum and bread wheat cultivars from Turkey using AFLP and SAMPL markers. *Plant Breeding*, 2008; 127: 9-14.
26. Li HT, Li YX, Li ZC, Zhang HL, Qi YW, Wang T. Simple sequence repeat analysis of genetic diversity in primary core collection of Peach (*Prunus persica*). *J Integr Plt Biol*, 2008; 50(1): 102-10.
27. Wei RP. Predicting Genetic Diversity And Optimizing Selection In Breeding Programmes. Ph. D. Thesis. Sweedish University of Agricultural Sciences, Department of Forest Genetics and Plant Physiology, Umea, 1995.
28. Ledig FT. The conservation of diversity in forest trees. why and how should genes be conserved? *Bioscience*, 1988; 38: 471-3.
29. Lindgren D. The Population Biology of Clonal Deployment. In: *Clonal Forestry I, Genetics and Biotechnology*, Springer Verlag, 1993, 34-49.