

Moleküler Markörlerin Bitki İslahında Kullanımı

Mustafa YORGANCILAR¹ Enes YAKIŞIR² Münüre TANUR ERKOYUNCU¹

¹Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Konya
²Bahri Dağdas Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Konya
myorg@selcuk.edu.tr

Özet

Konvansiyonel bitki ıslahı zaman alıcıdır ve çevresel şartlara bağlıdır. Yeni bir çeşidin ıslahı uzun yıllar sürebildiği gibi geliştirilen çeşidin piyasaya çıkarılması garanti edilemeyebilir. Bu nedenle araştırmacılar ıslah sürecinde daha etkili kullanılacak yeni yöntemlerle ilgilenmişlerdir. Moleküler markör teknolojisi bitki ıslahında seleksiyon stratejilerini geliştirmek için geniş kapsamlı yeni uygulamaların benimsenmesini sağlamıştır.

Materyal değerlendirmede daha deneyimli olan klasik bitki ıslahçıların moleküler genetik ya da hücre biyolojisi konusunda çalışma yapması, elde edilen yeni bitkilerin yaygın kullanımı ya da materyalin değerlendirilmesi açısından gerekli görülmektedir. Bitki ıslahçıları DNA üzerindeki araştırmalardan çok azını kullanma fırsatı bulmuştur. Özellikle bitki moleküler genetiği ile ilgili olarak son yıllarda elde edilen bilgiler, bitki ıslahı çalışmalarına yansiyabilecek niteliktedir. Bu nedenle, yeni geliştirilen ya da değiştirilmiş bitki ıslahı yöntemleri, bitki moleküler biyolojisi çalışmalarından elde edilen bilgilere dayanılarak kullanılmalıdır.

Bu derlemede genel olarak bitkilerde yaygın olarak kullanılan başlıca moleküler markörlerin tipleri, avantajları/dezavantajları ve bitki ıslahında kullanım alanları ile ilgili çalışmalar ele alınmıştır.

Anahtar kelimeler: Bitki ıslahı, moleküler markörler, markör destekli seleksiyon, DNA

The Usage Of Molecular Markers In Plant Breeding

Abstract

Conventional plant breeding is a time-consuming technic and mostly depends on the environmental conditions. Breeding of new varieties may takes approximately many years and even it cannot be guaranteed the presenting of the varieties on the market. Thus plant breeders were interested in alternative methods that can be done in a more efficient procedure. Molecular marker technology led to the adoption of new practices to develop a comprehensive strategy for selection of in plant breeding.

In terms of the widespread use of new plant or evaluation of materials, it is needed to study in molecular area or cell biology for classical plant breeders. Plants breeders with more experience in material evaluation are needed to help. Plant breeders had the opportunity to use very little of the research on DNA. The information obtained in recent years, particularly in plant molecular genetics, are capable of reflecting in plant breeding activities. Therefore, new or modified plant breeding methods, must be applied based on information obtained from the plant molecular biology studies.

In this review, molecular marker types and its usage in plant breeding area were discussed in general.

Keywords: Plant breeding, moleculer marker, marker assisted selection, DNA

1. Giriş

Ekonomik yönden önemli olan bitki cins, tür ve çeşitlerinin genetik yapısını, genetik ve sitogenetik esaslardan yararlanarak yetiştirici ve tüketicinin istekleri doğrultusunda planlı şekilde değiştirme ve geliştirmeye bitki ıslahı denmektedir (Tosun ve Sağsöz, 2005). Bitki ıslahında temel amaç, genetik yapıda gerçekleştirilecek değişiklik ile ortaya çıkacak varyasyondan yararlanıp, yapılacak seleksiyonla daha kaliteli, yüksek verimli, hastalık ve

zararlılara dayanıklı ve adaptasyon yeteneği yüksek olan yeni çeşitleri mümkün olduğunca kısa sürede elde etmektir. Bitki ıslah çalışmalarında melezlemeler yoluyla genetik işlemlerin ve seleksiyonun etkinliği artırılmaya çalışılır. Bunlar da çok uzun zaman alan, zahmetli ve yüksek maliyetli işlemlerdir.

Watson ve Crick'in 1953 yılında DNA'nın yapısını açıklamasıyla başlayan moleküler biyoloji çalışmaları, özellikle 1990 yılından sonra büyük gelişmeler göstermiş ve transgenik bitkilerin üretilmeye başladığı 1996 yılından sonra ise farklı bir boyut kazanmıştır. Günümüzde ise klasik bitki ıslahı programlarını tamamlayan ve destekleyen yeni moleküler ve biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması alternatif olarak görülmektedir.

Moleküler markörlerden genel olarak kalitatif ve kantitatif özelliklerin ıslahında, seleksiyonda, genetik ve linkage haritalamalarında, çeşit tanımlaması ve korunmasında, genotipler arası genetik uzaklığın belirlenmesinde yararlanılmaktadır (Bilgin ve Korkut, 2005). Ayrıca çeşit tescil ve sertifikasyonunda stabil, yüksek verimli ve kaliteli çeşitlerin belirlenmesinde tarla denemeleri ve laboratuvar testleri yanında moleküler markörlerin kullanılması oldukça önem kazanmaktadır.

2. Moleküler Markörler

2.1. Moleküler markör tanımı

Moleküler markörler, genomda herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilişkili DNA parçasıdır. Moleküler markörler; genetik markörlerin, DNA tabanlı tipini oluşturduklarından, DNA markörleri olarak da bilinirler. DNA markörleri farklı genotiplere ait DNA diziliş farklılığını çeşitli şekillerde ortaya koyan markörlerdir. Nükleik asit temeline dayalı genetik markörlerin genom analizlerinde kullanımı ıslahçılar için ihtiyaç duyulan bir alandır. Bu markörler kullanılarak birbirine morfolojik olarak çok yakın olan kültür çeşitleri ayrılabilir ve tanımlanabilir.

Moleküler markör yöntemleri DNA molekülündeki polimorfik bölgelerin saptanması prensibine dayanır. Popülasyonda her hangi bir genin veya özelliğin birden fazla formu bulunuyorsa o gen ya da fenotipik özellik polimorfik olarak kabul edilmektedir. Polimorfizm, DNA dizisi, amino asit dizisi, kromozomal yapı ya da fenotipik özellik varyantları gibi birkaç düzeyde görülebilir.

Bütün bir genomun analiz edilebileceği DNA'yı elde etmek için, herhangi bir kısımdan alınan az miktarda doku parçası yeterli olmaktadır (Botstein ve ark., 1980). Ayrıca; DNA markörleri stabil olup, tüm dokularda ortaya çıkabilirler, çevre koşullardan etkilenmezler, kodominant ya da dominant özellikte olabilirler ve kalıtımı basit ilkelere sahiptirler (Williams ve ark., 1990).

Moleküler markörler, DNA bazların'da oluşan nokta mutasyonları, araya girme (insersiyonlar), silme (delesyonlar) veya tekrarlanan DNA'nın replikasyonunda oluşan hatalardan meydana gelirler ve nötraldirler. Genellikle DNA'nın kodlanmayan kısımlarında oluşurlar. DNA markörleri teorik olarak sınırsız sayıda kabul edilir, morfolojik ve biyokimyasal markörlerin aksine, çevresel faktörlerden ve bitki gelişim evrelerinden etkilenmezler.

2.2. Moleküler markör teknolojisinin kullanım alanları

Moleküler markörler; QTL (Quantitative Trait Loci) analizlerinde, genetik haritalamada (Rafalski ve ark., 1996), kültür çeşitlerinin tanımlanmasında, yeni geliştirilen çeşitlerin koruma altına alınmasında, genetik akrabalıkların belirlenmesinde (Lowe ve ark., 1996), tohumculukta safiyet analizlerinde, gen kaynaklarının karakterizasyonunda, genetik kaynağın yapısını anlamada, duplike olan genotiplerin belirlenmesinde, genetik kaynağın

tekrar organizasyonunda ve ıslah programında kullanılacak ebeveynlerin belirlenmesinde kullanılırlar. Ayrıca moleküler markör teknolojisi, çeşitli stres etmenleri ile ilişkili genom bölgelerinin belirlendiği ve genom yapısı hakkında bilgi edinildiği çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır.

Markör destekli seleksiyon (MAS) ile ıslah çalışmaları ile özel bir fenotipik karaktere indirilebilmekte, ıslah çalışmaları daha kısa sürede ve daha az işgücü ile tamamlanabilmekte ve bunların yanı sıra gereksinim duyulan populasyon büyüklüğü de klasik ıslaha nazaran çok daha küçük olmaktadır (Gupta ve Rustgi, 2004).

2.3. Moleküler markörlerde bulunması gereken özellikler

Moleküler markörlerde bulunması gereken özellikleri maddeler halinde şu şekilde sıralanabilir;

- Yüksek derecede polimorfik davranış göstermeli ve farklı genotipleri ayırt edebilmelidir.
- Bütün dokularda gözlemlenebilmelidir.
- Kodominant (eşbaskınlık) kalıtım göstermeli ve heterozigot bireyleri, homozigot dominant bireylerden ayırt edilebilmelidir.
- Genomda sıkça bulunmalıdır.
- Genomda düzgün dağılım göstermelidir.
- Seçici, nötr davranış göstermelidir.
- Kolay ulaşım sağlanmalı ve uygulama maliyeti düşük olmalıdır.
- Yüksek oranda tekrarlanabilirlik göstermelidir.
- Otomasyona uygun kolay ve hızlı değerlendirme sağlamalıdır.
- Aynı genetik materyal üzerinde yapılan bir markör analizi her zaman aynı sonuçları vermelidir.
-

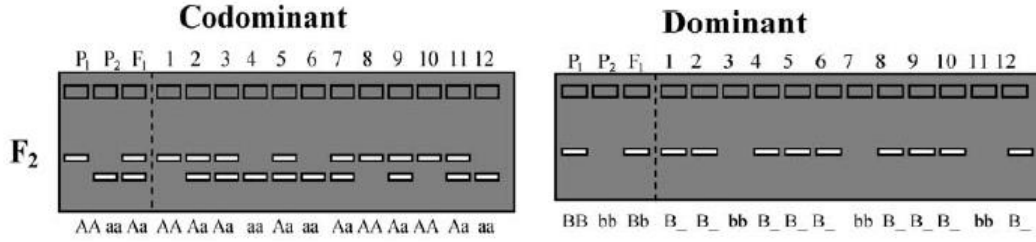
3. Moleküler Markör Tipleri

Kullanılan yöntemler bakımından moleküler markörler, Hibridizasyona Dayalı Markörler ve Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) Dayalı Markörler olarak iki ana gruba ayrılabilir. Hibridizasyona dayalı markörlere örnek olarak; RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism/Sınırlı Parça Uzunlukları Polimorfizmi), PCR tabanlı markörlere örnek olarak; SSR (Simple Sequence Repeat/Basit Tekrarlı Diziler veya Mikrosatelitler), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA/Rastgele Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism/Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat/Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm) verilebilir.

Bu markör sistemlerinin dışında; SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism), SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), STS (Sequence Tagged Site), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic), ALP (Amplicon Length Polymorphism) ve bunlara ilaveten DNA sekanslamasına dayalı SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markörleri ve MP-PCR (Microsatellite Primed Polymerase Chain Reaction), AP-PCR (Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction), AS-PCR (Allele Specific Polymerase Chain Reaction), DAF (DNA Amplification Fingerprinting) stratejileri de polimorfizmin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

Genotipler arasında farklılık göstermeyen markörler, monomorfik markörler olarak bilinirler. Aynı veya farklı türlerin bireyleri arasında farklılık gösteren markörler ise polimorfik markörler olarak isimlendirilirler ve bunlar, farklılıkları belirlediği için monomorfik olanlardan daha yararlıdır.

Polimorfik markörler, homozigot ve heterozigotlar arasında ayımlanabilmelerine göre dominant ve kodominant özellik gösterirler. Dominant markörler var veya yok olarak belirlenirken, kodominant markörler boyut olarak farklılık gösterirler. Kurallara bakılırsa, bir DNA markörünün farklı formları (örneğin jel üzerindeki farklı boyuttaki bantlar) markör allelleri olarak adlandırılır. Bu durumda kodominant markörler farklı birçok allele sahip olabilirken dominant bir markör sadece 2 allele sahiptir. Şekil 1’de kodominant markörlerle heterozigot ve homozigotlar arasındaki farklılık açık bir şekilde görülebilmektedir. Ancak dominant markörler bu ayrımı yapamamaktadır.



Şekil 1. Kodominant ve dominant markörlerin karşılaştırılması

3.1. Hibridizasyona dayalı moleküler markörler

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism/Sınırlı Parça Uzunlukları Polimorfizmi)

Hücrelerden izole edilen genomik DNA'nın, belirli bir noktadan nükleik asit dizilişlerini tanıyan DNA kesim enzimlerince spesifik olarak kesilmesi ve prob DNA'nın melezlendiği DNA etrafındaki farklı kesim yapılarının saptanması esasına dayanır.

RFLP, PCR esaslı olmayan geliştirilmiş ilk markör sistemidir. RFLP markörleri kodominant (eşbaskın) özelliktedir (Bark ve Havey, 1995). Bu özellik sayesinde heterozigot bireylerin de karakterize edilmesi mümkün olabilmektedir.

PCR temelli tekniklerin ortaya çıkışına kadar çok yaygın kullanılan RFLP, sahip olduğu dezavantajları ve PCR temelli tekniklerin sağladığı avantajlar nedeniyle kullanımı özel çalışmalarla sınırlı kalan bir teknik olmuştur.

RFLP tekniğinin avantajları:

- Türler, cinsler hatta familyalar arasında transferi mümkündür.
- Farklı laboratuvarlarda ve farklı araştırmacılar tarafından aynı sonuçlara ulaşılabilmesi bakımından oldukça güvenilirdir.
- RFLP markörleri kodominant özellikte oldukları için heterozigotların belirlenmesinde ve karakterizasyonlarında kullanılmaktadırlar.
- Orta düzeyde polimorfizm göstermektedirler.

RFLP tekniğinin dezavantajları:

- Analizleri pahalı, fazla zaman alıcı ve çok fazla iş gücü gerektirmektedir.
- Çoğu durumlarda yaygın olarak radyoaktif etiketleme yöntemi kullanılmaktadır.
- Yüksek kalitede DNA'ya (10-20 µg) ihtiyaç vardır.
- Az kopya edilen dizilişlerin genomlarda belli noktalarda kümelenmelerinden dolayı RFLP markörleri genom üzerinde rastgele dağılım göstermezler. Bu da haritalamayı olumsuz yönde etkilemektedir. Bu durumda, RFLP markörleriyle elde edilen haritalarda yaygın olarak büyük boşluklar görülmesine neden olabilir.

3.2. Polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayalı moleküler markörler

1980'li yılların ortalarında Cetus firması araştırmacıları tarafından geliştirilen klonlama tekniği, dizi analizi ve DNA haritalaması gibi temel moleküler biyoloji araştırmalarında kullanılmaya başlanmıştır. PCR, DNA'nın *in vitro* koşullarda enzimatik olarak sentezlenmesidir. PCR tekniğinin geliştirilmesinde anahtar rolü *Thermus aquaticus*'dan elde edilen sıcaklığa dayanıklı polimeraz enziminin (*Taq* DNA polimerase) keşfi oynamıştır. Bu enzim sayesinde hücrede normal şartlar altında gerçekleşebilen doğal DNA replikasyonu laboratuvar şartlarında 'termocycler' adı verilen özel cihazlar yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Botstein ve ark. (1980)'na göre, PCR tekniğinin ortaya koyulması ile RAPD, SSR, AFLP markör sistemleri de geliştirilmiştir.

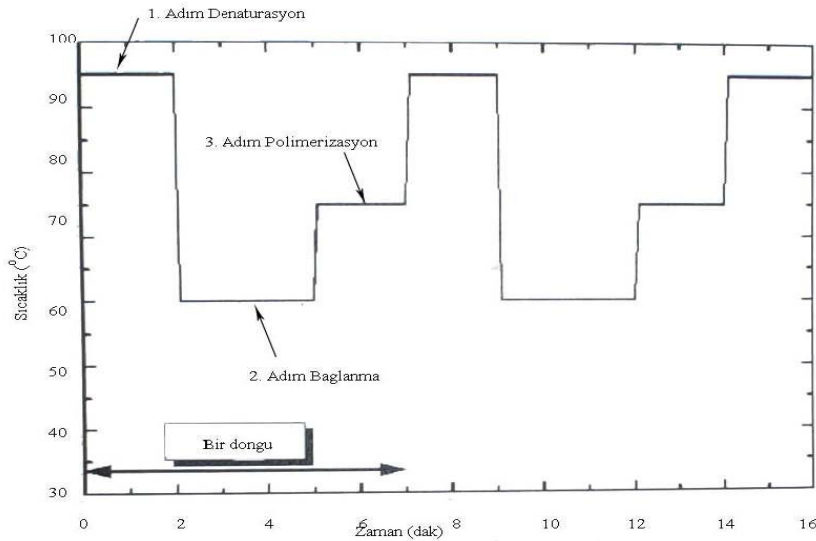
Yöntem, küçük miktardaki spesifik bir DNA parçasının, bir dizi enzimatik reaksiyon sonucu milyonlarca kez çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Ancak çoğaltılabilen unsurlar DNA'nın tamamı değil, DNA'nın istenilen veya rastgele sentezlenen bazı bölgeleridir.

PCR, çift iplikli bir DNA molekülünün tek zincire ayrıştırılması, hedef dizilere oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Primerler, kalıp DNA molekülleri yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelere bağlanırlar. Primerlerin hedef bölgelere bağlanması, düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. Ayrıca reaksiyon ortamında pH'yı ve tuz konsantrasyonunu optimum hale getiren tampon çözelti, polimeraz enzimi, polimeraz enziminin ihtiyaç duyduğu $MgCl_2$ ve DNA üretiminde kullanılacak Adenin (A), Timin (T), Guanin (G), Sitozin (C) nükleotidlerinden her biri yeterli miktarda bulunur. Polimeraz enzimi sayesinde başlatıcı DNA, bir kalıp DNA üzerine bağlandıktan sonra, onu 3' ucundan 5' yönünde uzatmaya başlar ve kalıp DNA'nın aynısını üretir.

Bir PCR döngüsü;

- DNA ipliklerinin birbirinden ayrılarak açılması (Denatürasyon),
- Primerin bağlanması (Annealing),
- Uzama (Extention) olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur.

Önce 95 °C civarında bir sıcaklık kullanımıyla kalıp DNA'nın çift sarmal yapısı açılır ve DNA tek iplik haline getirilir (denatürasyon). Sonra primerin nükleotid içeriğine bağlı olarak 30-60 °C arasında bir sıcaklıkta başlatıcı DNA'nın kalıp DNA'ya yapışması sağlanır (bağlanma). Son olarak 72 °C'de *Taq* DNA polimeraz enzimi ortamdaki nükleik asitleri (A-G-C-T) kullanarak uygun DNA bölgesini çoğaltır (uzama). Bu adımların her birinde sadece 1-2 dakika kullanılır (Şekil 2). Bu üç adım isteğe bağlı olarak defalarca (yaklaşık 30-45 defa) tekrarlanır ve DNA amplifikasyonu, her DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile tamamlanmış olur.



Şekil 2. PCR'in çalışma prensibi

PCR tekniği günümüzde farklı birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. PCR tekniğinin başlıca kullanım alanları şunlardır:

- Tanı ve teşhis,
- Genetik yapısı değiştirilen bitki veya mikroorganizmaların tespiti,
- Moleküler klonlama (DNA klonlaması),
- DNA baz dizilişlerinin belirlenmesi,
- Genetik akrabalık ve adli tıp vakalarının tespiti.

DNA dizilişi her genotipte farklı olduğu için, aynı primerler kullanılsa bile her genotipte farklı DNA ürünleri elde edilir ve bu farklı üretimler genetik markör olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla çok değişik DNA markör tipleri kullanılmakla ve geliştirilmeye devam edilmektedir. SSR, RAPD, AFLP ve ISSR gibi DNA markörleri çalışmalarda yaygın olarak kullanılan PCR kullanımına dayalı markörlerdir.

SSR (Simple sequece repeat/Basit tekrarlı diziler veya Mikrosatellitler)

SSR veya mikrosatellitler, ökaryotik genomlar boyunca dağılmış ve ardışık olarak tekrarlanmakta olan 2-6 nükleotid gruplarından oluşmaktadır. Bu gruplar örneğin (AT)_n, (GT)_n, (ATT)_n, (GACA)_n şeklinde gösterilmekte ve n ardışık tekrar sayısını belirtmektedir. En yaygın SSR dizileri dinükleotid (AC)_n, (AG)_n, (AT)_n, trinükleotid (TCT)_n, (TTG)_n veya tetranükleotid (TATG)_n yapıdadır.

Mikrosatellitleri çevreleyen DNA dizileri genellikle aynı türün bireyleri arasında korunmuş olduklarından, farklı genotiplerde çakışan SSR'ların PCR primerleri ile çoğaltılarak seçimine izin vermektedir. Ardışık SSR tekrarlarının sayısındaki farklılık PCR sonucu farklı uzunlukta parça çoğaltımı ile sonuçlanır. Bu tekrarlar çok yakın tür ve çeşitler arasında dahi tekrarlanan ünitelerin sayısında değişikliğe yol açan mutasyonlar nedeni ile oldukça polimorfiktir (Gupta ve ark., 1994). SSR'ları çevreleyen korunmuş DNA dizileri primer olarak kullanılarak PCR metodu vasıtasıyla bir lokustaki farklı alleller tespit edilebilir. Ancak bu metodun kullanılabilmesi için ilgili lokuslara ait primer sekanslarının önceden bilinmesi gerekir. Bu da oldukça zahmetli bir iştir. Kullanılacak primerler belirlendikten sonra farklı araştırmacılar tarafından rahatlıkla kullanılabilir.

Mikrosatellitlerin en önemli dezavantajı yeni markör geliştirilmesinin güçlüğüdür. Yeni markör geliştirilmesi için genomik DNA klonlarının tekrarlanan oligonükleotid içeren problemlerle melezlenme yoluyla bulunması, nükleotid dizilişlerinin belirlenmesi ve yan yana tekrarlanan yapıların başlangıç ve bitiş yerlerine özel başlatıcı DNA'lar geliştirilmesi gerekmektedir. Bu da oldukça işgücü gerektiren pahalı bir işlemdir.

SSR, ilk olarak insanlarda tanımlandıktan sonra (Litt ve Luty, 1989) aynı bulgular hızlı bir şekilde diğer organizmalarda da kullanılmaya başlanmıştır. Farelerde yapılan çalışmalar (Love ve ark., 1990), domuzlarda (Johansson ve ark., 1992) ve sığırlarda (Kemp ve ark., 1993) yapılan çalışmalarla devam etmiştir. Bitkilerde de birçok tür için oldukça önemli olan markörler başarılı bir şekilde izole edilmiş ve araştırmalarda kullanılmaya başlanmıştır.

Bitkilerdeki genetik haritalama çalışmalarında SSR tekniğinin kullanımı, sağladığı avantajlardan dolayı her geçen gün artmaktadır. SSR'lar yüksek oranda polimorfik olduklarından bitkilerde oldukça fazla bilgi vermektedir. Ayrıca kodominant (eşbaskın) markör vermesi ve PCR kolaylığına sahip olması da kullanım oranını arttırmaktadır (Röder ve ark., 1995). Son yıllarda dünya çapındaki birçok moleküler genetik laboratuvarında farklı bitki türlerinde SSR'lar başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Buğday (Röder ve ark.,

1995), yabani buğday (Pestsova ve ark., 2000), soya fasulyesi (Akkaya ve ark., 1992), mısır (Senior ve Heun, 1993) ve patates (Provan ve ark., 1996) gibi bitkiler SSR'ların başarılı bir şekilde kullanıldığı bitkilere örnek verilebilir.

RAPD (Random amplified polymorphic DNA/Rastgele çoğaltılmış DNA polimorfizmi)

RAPD markörleri basit, kısa oligonükleotid primerler kullanılarak genomik DNA'nın tesadüfi olarak dağılmış bölgelerinin amplifikasyonu olarak tanımlanmaktadır (Williams ve ark., 1990). Uzunluğu 10 nükleotid olan başlatıcı DNA'lar (primer) kullanılarak genom üzerindeki rastgele DNA bölgelerinin çoğaltılması esasına dayalı bir yöntem olup, yalnızca bir tip primer kullanılır. Kullanılan bu primer, her iki DNA ipliğinde de 5'→3' yönünde çalışır. Dolayısıyla kullanılan primerin yapılabildiği DNA üzerinde birbirine yakın iki bölgenin amplifikasyonu yapılır.

Amplifikasyon ürünleri agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezde ayrılabilir ve etidyum bromür ya da gümüş nitrat boyaması ile görüntülenebilir. RAPD tekniği markör teknolojisinde uygulanmasındaki kolaylık, sentetik oligonükleotidlerin çok fazla sayıda bulunması ve kolay olması, RFLP'nin tersine az miktarda DNA'ya gereksinim duyulması gibi nedenlerden dolayı tercih edilen markörlerdir.

Diğer PCR esaslı teknikler gibi RAPD tekniğinin de haritalama ve karakterizasyon çalışmalarında daha az zamana, çalışmaya ve maliyete gereksinim duyulması nedeniyle daha çok tercih edildiği bildirilmektedir (Devos ve Gale, 1992). Özellikle RAPD yöntemi çok az bir kalıp DNA'ya gereksinim duyulması sebebiyle tercih edilmekte ve birçok bitki türünde beklenen düzeyde sonuçlar vermektedir.

RAPD markörleri zaman ve maliyet yönünden olumlu olmasına rağmen, dominant markör olmaları nedeniyle yorumlanmasının zorluğu, kompleks olması ve kolaylıkla tekrarlanamaması dezavantajlarına sahiptir (Lavi ve ark., 1994). Hatta bazı durumlarda tekrarlanan büyük bantlarının kullanıldığı durumlarda bile varyasyonun genetik ya da değişik mikroorganizma kökenli kontaminasyon ve amplifikasyon sırasında meydana gelen bir sorundan mı kaynaklandığının tespit edilememesi bu markörlerin olumsuz yönlerindedir.

RAPD-PCR metodunun, genetik varyasyonun araştırılmasında, bitkilerin genetik haritaların çıkarılmasında ve markör yardımıyla seleksiyonda yoğun olarak kullanılmasının nedeni, metodun diğer moleküler metotlara göre daha ucuz, daha az DNA gerektirmesi ve otomasyona uygun olmasındandır.

RAPD tekniğinin avantajları:

- Çabuk sonuç verir, daha ucuzdur ve daha az iş gücü gerektirir.
- Az miktarda DNA yeterli olmaktadır.
- Polimorfizm oranı yüksektir.

RAPD tekniğinin dezavantajları:

- Güvenilirliği sınırlıdır.
- Farklı laboratuvarlarda farklı sonuçlar elde edilebilir, hatta bir termocycler cihazından diğerine geçildiğinde bile farklı sonuçlar çıkabilmektedir.
- Dominant markör olması, bu yolla elde edilen markörlerin diğer haritalara transferinde zorluklar çıkarabilmektedir.

Dünya çapındaki birçok moleküler genetik laboratuvarında farklı bitki türlerinde RAPD tekniği başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Örneğin; buğday (Devos ve Gale, 1992), arpa (Tinker ve ark., 1993), mısır (Osipova ve ark., 2001), fasulye (Tiwari ve ark., 2005),

nohut (Hajj-Moussa ve ark., 1996) ve patates (Hu ve Quirose, 1991) gibi bitkilerde RAPD tekniği etkin bir şekilde kullanılmıştır.

Ravi ve ark. (2003), türler arasındaki akrabalığı değerlendirebilmek için kültürü yapılan çeltik ve yabani çeltikte RAPD ve SSR markör tekniklerini kıyaslamalı olarak kullanmışlardır. RAPD tekniğine göre SSR tekniğinin sonuçlarının genetik akrabalığın tespitinde daha doğru bilgiler verdiği araştırmacılar tarafında belirtilmiştir.

AFLP (Amplified fragment length polymorphism/Çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi)

Vos ve ark. (1995), RAPD-PCR metodunun prensiplerinden yararlanarak RAP tekniğinin dezavantajlarını gidermek üzere AFLP metodunun geliştirmişlerdir. AFLP tekniğinin tekrarlanabilirliği ve polimorfizm düzeyi RAPD-PCR metoduna göre daha yüksektir. Bu teknikte genomik DNA önce birisi altı, diğeri dört taban tanıyan iki kesim enzimi tarafından kesilir. Kesilen parçaların uçlarına nükleotid dizilişi sentetik olan DNA'lar eklenir. Eklenen sentetik DNA'nın nükleotid dizilişini de taşıyan başlatıcı DNA'lar (primerler) kullanımıyla nispeten spesifik DNA çoğaltımı yapılır. Bu çoğaltma iki aşamada gerçekleştirilir. İlk aşamada, her iki uçtan DNA kesim enzimlerinin tanıdığı diziden sonraki ilk nükleotide göre seçici çoğaltımın yapıldığı ön üretim yapılır. Asıl üretimde ön üretimde elde edilen parçaların kullanımıyla kesim enzimi tanıma yerinden sonraki ikinci ve üçüncü nükleotidler için seçici üretim yapılır. Bütün başlatıcılar sentetik uçların nükleotid dizilişini de taşıdığı için üretim oldukça spesifik şartlarda yapılmış olur.

Tekniğin polimorfizm oranı çok yüksektir. Masraf, işgücü gereksinimi ve güvenilirliği RAPD ve RFLP arasında yer almaktadır. Çok sayıda lokusu aynı anda ve etkili bir şekilde taraması nedeniyle parmak izi analizine çok uygundur. AFLP tekniğinin önemli dezavantajları arasında çoğunlukla dominant markörler vermesi ve farklı genetik haritalar arasında transferinin güç olması gelmektedir (Walton, 1993)

Russel ve ark. (1997), kültürü yapılan 18 arpada genetik varyasyonu belirlemek için RFLP, AFLP, RAPD ve SSR gibi moleküler teknikler kullanmışlardır. Bu dört markör tipinin de polimorfizmi belirlemede farklı etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. AFLP ve RFLP'nin sonuçları birbirlerine benzerlik göstermesine rağmen SSR orta, RAPD ise daha düşük sonuç vermiştir.

AFLP tekniğinin avantajları:

- RAPD'den yavaş RFLP'den hızlıdır.
- Masraf, işgücü ve güvenilirlik açısından RAPD ve RFLP arasındadır.
- Çok sayıda aynı anda etkili bir şekilde tarama yapması nedeni ile parmak izi analizine çok uygundur.
- Sayıları RAPD ve RFLP'den daha fazladır.
- Genomik DNA ile ilgili ön bilgiye gerek yoktur.
- Polimorfizm oranı çok yüksektir.
- Bu özelliklerinden dolayı otomasyona uygundur.

AFLP tekniğinin dezavantajları:

- Çoğunlukla dominant markör özelliğindedir. Ancak son zamanlarda kodominant markörde verdiği bildirilmiştir.
- Farklı genetik haritalar arasında transferleri güçtür.

ISSR (Inter simple sequence repeat/Basit tekrarlı diziler arası polimorfizm)

ISSR yöntemi, ökaryotik genomlarda tekrar eden 2, 3, 4, 5 gibi nükleotid birimlerinin lokustan bağımsız bir şekilde genomda rastgele dağılımlarını esas alan ancak RAPD yöntemine göre çok daha hassas ve tekrarlanabilirliği yüksek olan bir yöntem olarak öne çıkmaktadır (Zietkiewicz ve ark., 1994; Gupta ve ark., 1994).

ISSR markörleri genetik çeşitliliğin belirlenmesinde, filogenetik çalışmalarda, genom haritalarının oluşturulmasında ve evrim biyolojisinde birçok tarla bitkisinde uygulanabilen etkili bir tekniktir (Reddy ve ark., 2002).

ISSR markörlerinin kullanımı hızlı, uygulanması kolay ve primerleri daha uzun olduklarından güvenilirlikleri fazladır (Bornet ve Branchard, 2001). Yeterli bilgi sunan ISSR primerlerini kullanmak düşük bir maliyet, zamandan tasarruf ve genetik analizlerde kolaylık sağlamaktadır.

ISSR markörleri Mendel kalıtımına uygun olarak dominant markörler vermektedir (Wang ve ark., 1998). Bununla beraber kimi durumlarda homozigot ve heterozigotluğun tanımlanmasında kodominant markör de vermektedirler.

RAPD markörlerinin düşük üretkenliği, AFLP markörlerinin yüksek maliyeti ve primer sentezlenebilmesi için sekans bilgisinin gerektiği SSR markörleri, birçok çalışmada önemli kısıtlamalar oluşturmaktadır. ISSR markörleri bu kısıtlamaların birçoğunun üstesinden gelinmesinde önemli bir tekniktir (Zietkiewicz ve ark., 1994).

Son yıllarda dünya çapındaki birçok moleküler genetik laboratuvarında farklı bitki türlerinde ISSR tekniği başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Örneğin; buğday (Nagaoka ve Ogihara, 1997), çeltik (Blair ve ark., 1999), arpa (Fernandez ve ark., 2002), mısır (Kantety ve ark., 1995), nohut (Iruela ve ark., 2002), çavdar (Matos ve ark., 2001) ve patates (Prevost ve Wilkinson, 1999) gibi bitkilerde ISSR tekniğinin kullanımı artmaktadır.

4. Markör Destekli Seleksiyon (MAS)

Markör Destekli Seleksiyon (MAS) uygulamalarının gelişimi mısır ile başlamış ve bunu buğday takip etmiştir. Tahıllar arasında model bitki olması nedeniyle çeltik üzerinde de birçok araştırma yapılmıştır. Günümüzde markör destekli ıslah çalışmaları çoğunlukla geriye melezleme yönteminde uygulanmaktadır (Yıldırım, 2005). MAS, önemli agronomik karakterleri kontrol eden genlerle sıkı bir bağlantı durumunda olan ve kolaylıkla tanımlanabilen moleküler markörlerin kullanılması esasına dayanır. MAS uygulanan bitki ıslahı çalışmaları, klasik ıslah çalışmalarındaki seleksiyon hızını ve etkinliğini artırma yönünde önemli ilerlemeler sağlamaktadır.

Birçok bitkide moleküler markörler ile çoğu agronomik özelliğin genetik bağlantı haritası oluşturulmuş ve oluşturulmaktadır. Bağlantı haritalarını geliştirmedeki amaç, agronomik özelliklerin genomdaki pozisyonlarını belirlemek, moleküler markörler aracılığıyla ıslahta dolaylı seçim yapabilmek için sıkı bağlı markörleri tanımlamaktır. Yani MAS, agronomik olarak önemli genlere sıkı bağlı DNA markörleri, fenotipik seleksiyon yerine veya fenotipik seleksiyona yardımcı olmak için kullanılmaktadır. Dikkatlice düşünülmüş bir stratejiye dayalı olarak, MAS ve fenotipik seleksiyonun birlikte yapılması olumlu sonuçlar alınmasını garantileyecektir.

Geri melezleme hedef bölgenin etkili bir şekilde seçimini sağlar, bağlantı taramalarını minimize eder ve tekrar eden ebeveynlerin tespitini kolaylaştırır. MAS yardımıyla F₂ ve F₃ basamaklarındaki genetik kaynak tam olarak tespit edilebildiği için, ıslah programlarının sonraki aşamalarında önemli avantajlar sağlar.

Markör Destekli Seleksiyon çalışmalarının avantajları şu şekildedir;

- Fenotipik taramaya göre daha kolay bir metottur. Özellikle tanımlanması zahmetli özelliklerde zaman ve kaynak israfını engeller.
- Çimlenme aşamasında seleksiyon sağlayarak tane kalitesi gibi özelliklerin tanısını kolaylaştırır.
- Çevresel faktörlerden etkilenmediği için güvenilirliği yüksektir. Homozigot ve heterozigot genotipleri ayırarak tek bitkinin seçimine imkan tanır.
- Genetik kaynakların tam kimlik tespitlerinin yapılmasını ve bu yolla genetik rezervin korunmasını sağlar.
- Herhangi bir çeşit karışıklığı durumunda ayırımı ve bu yolla çeşitlerin ticari haklarının korunmasına yardımcı olur.
- Spesifik özellikteki genotiplerin daha titiz ve doğru bir şekilde ayırımını sağlar.

Son yıllarda moleküler biyolojide görülen hızlı ilerleme, bitki genetiği çalışmalarında, genetik çeşitliliğin korunmasında, üretimi, korunması, ıslah gibi hedefler doğrultusunda kullanımına çok büyük ve önemli katkı sağlamıştır. Zaman içerisinde MAS uygulanan bitki ıslahı çalışmaları, klasik çalışmalardaki seleksiyon hızını ve etkinliğini artırma yönünde daha çok önemli katkılar sağlayacaktır.

5. Sonuç

Moleküler markörlerin bitki ıslahında kullanımı ile geri melez ıslahı, gen piramitlerinin oluşturulması, resesif genlerin seleksiyonu, yabancı gen kaynaklarından gen transferleri ve erken seleksiyon gibi avantajlar sağlanarak klasik ıslahın etkinliği artırılmakta, böylece yeni çeşitlerin geliştirilmesi hız kazanmaktadır. Moleküler markör uygulamaları tek başına klasik ıslahın yerine kullanılamamakla birlikte, klasik ıslahın başarısını artıran tamamlayıcı ve destekleyici teknikler olarak kabul edilmektedir. Gelişen moleküler markör teknolojisi ve markör destekli seleksiyon tekniği sayesinde bitki ıslahı çalışmaları daha etkili bir şekilde yürütülebilecek, klasik ıslaha oranla çok daha kısa bir sürede başarılı ve güvenilir sonuçların elde edilmesi mümkün olacaktır.

Kaynakça

- Akkaya, M. S., Bhagwat, A. A. and Cregan, P. B., (1992). Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean, *Genetics*, 134; 1131-1139.
- Bark, O. H., and Havey, M.J., (1995). Similarities and relationship among population of the bulb onion as estimated by RFLPs. *Theor. Appl. Genetics* 90:407-414.
- Bilgin, O., Korkut, K.Z., (2005) Bazı Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Çeşit ve Hatlarının Genetik Uzaklıklarının Belirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi* 2005 2(3).
- Blair, M.W., Panaud, O. & McCouch, S.R., (1999). ISSR amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genetics* 98: 780–792.
- Bornet, B. & Branchard, M., (2001). Nonanchored inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Mol Biol Reporter* 19: 209–215.
- Botstein, D., White, R., Skolnick, M. and Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *Am. J. Of Human Genetic*, 32; 314-331.
- Bretting, P. K. and Widrechner, M. P., (1995). Genetic markers and horticultural germplasm management. *Hort. Sci.*, 30 (7); 1349-1356.
- Devos, K. M. and Gale, M. D., (1992). The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genetics*, 84; 567-572.
- Fernandez, M.E., Figueiras, A.M. & Benito, C., (2002). The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theor Appl Genetics* 104: 845–851.

- Gupta, M., Chyi, Y.S., Romero-Severson, J. ve Owen, J.L., (1994). Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theor. Appl. Genetics*, 89: 998-1006.
- Gupta, P.K. and Rustgi, S., (2004). Molecular markers form the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Funct Integr Genomics*, 4, 139-162.
- Hajj-Moussa, E., Millán, T., Gil, J., Cubero, J.I., (1996). Variability and genome length estimation in chickpea (*Cicer arietinum* L.) revealed by RAPD analysis. *J Genet Breed* 51:83-85.
- Hu, J. & Quirose, C.F., (1991). Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep* 10: 505- 511.
- Iruela, M., Rubio, J., J.I. Cubero, Gil, J. & Millán, T., (2002). Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. *Theor Appl Genet* 104: 643-651.
- Johansson, M., Ellegren, H. and Andersson, L., (1992). Cloning and characterization of highly polymorphic porcine microsatellites. *J. Hered.*, 83;196-198.
- Kantety, R.V., Zeng, X.P., Bennetzen, J.L. & Zehr, B.E., (1995). Assessment of genetic diversity in Dent and Popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Mol Breed* 1: 365-373.
- Kemp, S.J., Brezinsky, L. and Teale, A. J., (1993). A panel of bovin, ovine and caprine polymorphic microsatellites. *Animal Genet.*, 24; 363-365.
- Lavi, U., Cregan, P., Scchap, T. and Millel, J., (1994). Amplification and breeding of perennial fruit crops. In: Janick, J. (ed) *Plant Breeding Reviews*. John Wiley Sons, Inc: NY Vol: 397-401.
- Litt, M. and Luty, J. A., (1989). A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle action gene. *AmJ. Hum. Genet.*, 44; 397-401.
- Love, J.M., Knight A.M., Mcaleer, M.A. and Todd, J.A., (1990). Towards construction of a high-resolution map of the mouse genome using PCR analysed microsatellites. *Nucleic Acids Res.*, 21; 1111-1115.
- Lowe, A.J., Hinotte, O. and Guarino, L., (1996). Standardization of Molecular Genetic Techniques for The Characterization of Germplasm Collections: The Caase of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Plant Genetic Resources Newsletter*, 107,50-54.
- Matos, M., Pinto-Carnide, O. & Benito, C., (2001). Phylogenetic relationships among Portuguese rye based on isozyme, RAPD and ISSR markers. *Hereditas* 134(3): 229-236.
- Nagaoka, T. and Ogihara, Y., (1997). Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor Appl Genet* 94: 597-602.
- Osipova, E.S., Kokaeva, Z.G., Troitskij, A.V., (2001). RAPD Analysis of Maize Somaclones, *Rus. J. Genetics* 37(1):80-84.
- Pestsova, E, Ganal, M.W., Röder, M., (2000). Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. *Genome* 43: 689-697.
- Prevost, A. & Wilkinson, M.J., (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor Appl Genet* 98: 107-112.
- Provan, J., Powell, W. and Waugh, R., (1996). Microsatellite analysis of relationship within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theor. Appl. Genet.* 92: 1078-1084.
- Rafalski, A., Morgante, M., Powell, W., Vogel, J.M. and Tingey, S.V., (1996). Generating and Using DNA Markers in Plants. In: Birren B., Lai E. (Eds.): *Analysis of Non-Mammalian Genomes - A Practical Guide*. Academic Pres., New York.
- Ravi, M., Geethanjali, S., Sameeyafarheen, F. and Maheswaran, M., (2003). Molecular Marker based Genetic Diversity Analysis in Rice (*Oryza sativa* L.) using RAPD and SSR markers *Euphytica* Volume 133.
- Reddy, M.P., Sarla, N. & Siddiq, A., (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding *Euphytica* 128: 9-17.
- Röder, M.S., Plaschke, P., Konig, S.U., Borner, A., Sorrells, M.E., Tanksley, S.D. and Ganal, M.W., (1995), Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genetics* 246: 327-333.
- Russel, J.R., Fuller, J.D., Macaulary, M., Hatz, B.G., Jahoor, A, and Waugh, R., (1997). Direct Comparison of Levels of Genetic Variation Among Barley Accessions Detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genetic*, 95; 714-722.

- Senior, M.L. and Heun, M., (1993). Mapping maize microsatellites and polymerase-chain-reaction confirmation of the targeted repeats using a ct primer. *Genome* 36:884-889.
- Tinker, N.A., Fortin, M.G., Mather, D.E., (1993). Random Amplified Polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley. *Theor. Appl. Genet.* 85: 976-984.
- Tiwari, M., Singh, N.K., Rathore, M. and Kumar, N., (2005). RAPD markers in the analysis of genetic diversity among common bean germplasm from Central Himalaya Genetic Resources and Crop Evolution Volume 52.
- Tosun, F., Sağsöz, S., (2005) Bitki Islahı Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi DersYayınları No:172.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Peleman, J., Kuper, M. and Zabeau, M., (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucl. Acids Res.*, 23; 4407-4414.
- Wang, Mahalingan, G., R. & Knap, H.T., (1998). (C-A) and (GA) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *Theor Appl Genet* 96: 1086–1096.
- Walton, M., (1993). Molecular markers: which ones to use? *Seed World*, July (1993), p: 23-29.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., (1990). DNA Polimorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucl. Acids Res.*, 18, 6531-6535.
- Yıldırım, A., (2005). Molecular marker facilitated pyramiding of resistance genes for fungal diseases of wheat. *Workshop on Genomics and Marker Assisted Selection (MAS) in Plant Breeding. 3-7 Ekim 2005 (Sunulu Bildiri)*, İzmir.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, J.A. & Labuda, D., (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176–183.