

RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)
TEKNIĞİNİN HAYVAN ISLAHINDA KULLANILMASI

Ragıp TIĞLI*

M.Soner BALCIOĞLU**

ÖZET

Genetik marker olarak çok yeni bir teknik olan RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), rekombinant DNA teknolojisiyle ortaya çıkmış yeni bir kavramdır. RFLP, restriksiyon enzimlerinin DNA da kesim yerlerinin dağılımını etkileyen nokta mutasyonları veya kromozomda kesim bölgeleri arasında DNA fragmenti uzunluğunu etkileyen büyük kromozomal değişimler sonucunda meydana gelir. RFLP, restriksiyon enzimleriyle kesilen ve elektroforetik olarak büyüklüklerine göre ayrılan genoma ait DNA fragmentlerinin daha önce radyoaktif olarak işaretlenmiş sonda(probe)lar kullanılarak autoradyografik olarak gözlenmesidir.

RFLP nin diğer genetik markerlere nazaran çok sayıda avantajları vardır. Herhangi bir sonda-enzim kombinasyonu için RFLP' yi tespit etme ihtimali oldukça yüksektir. Ayrıca diğer markerlere nazaran önemli bir avantajı da bilgi taşımayan (intron, regülatör) DNA sıralarında RFLP' yi gözlemektir. RFLP bugün Thallassemia (Akdeniz Anemisi) gibi kalıtsal hastalıkların teşhisinde kullanılmaktadır. Benzer şekilde çiftlik hayvanlarına ait ekonomik karakterlerle ilişkileri ortaya konulduğunda ıslah programlarında yaygın olarak kullanılabilir.

* Yrd.Doç.Dr., Ak.Üni.Zir.Fak., Zootehni Bölümü, Antalya.

** Ar.Gör., Ak.Üni.Zir.Fak., Zootehni Bölümü, Antalya.

1.GİRİŞ

Ekonomik özellikler bakımından hayvan populasyonlarının genetik ıslahında tek yol seleksiyondur. İslahçı bir sonraki generasyonun ebeveynlerini seçerken populasyonda mevcut fenotipik varyasyonu kullanarak bu varyasyonda genotipik varyasyonu tahmine yarayan muhtelif modelleri geliştirmeye çalışır. Genel olarak ıslahta üzerinde durulan özellikler bakımından populasyonda mevcut varyasyon, genotip ve çevre olmak üzere iki kaynağın denetimi altındadır ve kantitatif olan bu özelliklerin kalıtımı poligeniktir.

Kantitatif özellikleri belirleyen poligen blokların kromozomda lokalize oldukları bölge QTL (Quantitative Trait Loci) olarak belirtilmektedir (Beckmann ve Soller 1983; Soller ve Beckmann 1983; Kashi vd. 1986; Soller ve Beckmann 1986; Beckmann ve Soller 1987). Üzerinde durulan herhangi bir özellik için yüksek etkili allelleri, taşıyan bireylerin tespit edilmesi damızlık seçiminin en zor yanıdır. Bu yüzden, son zamanlarda muhtelif kalitatif özellikler bakımından populasyonda mevcut morfolojik ve biyokimyasal varyasyon ele alınmakta ve kantitatif özelliklerle olan genetik ilişkisi üzerinde yoğun olarak durulmaktadır.

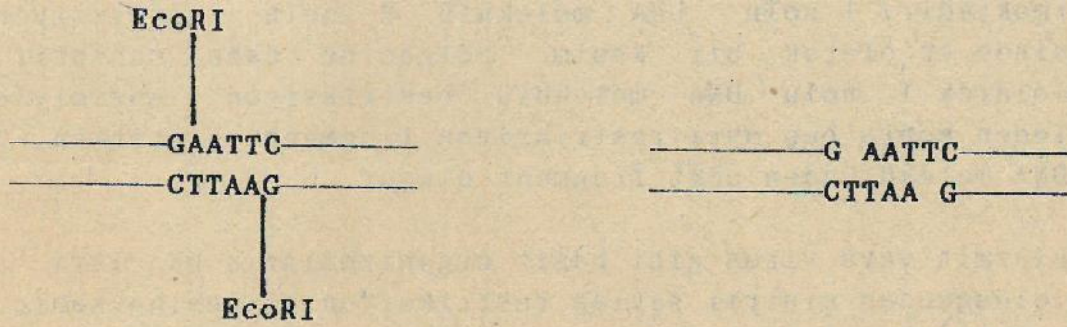
Gerek hayvanlarda ve gerekse bitkilerde, üzerinde durulan özellikler bakımından yüksek etkili genleri taşıyan bireyleri tanımlamada alternatif bir yaklaşım, marker olarak restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizminin (RFLP=Restriction Fragment Length Polymorphism) kullanılma potansiyelidir (Kashi vd 1986; Soller ve Beckmann 1986; Beckmann ve Soller 1987). RFLP kullanılarak genomda kantitatif özelliklere ait lokuslarıda belirlenebileceği ve yüksek etkili allelleri taşıyan bireyler tespit edilerek damızlıkta etkili bir şekilde kullanılabilceği belirtilmektedir (Soller ve Beckmann 1986).

Genetik markerlerin önemli kullanım alanları bulunmaktadır (Beckmann ve Soller 1983; Soller ve Beckmann 1983). Bitki ve hayvan ıslahı, çeşit ve ebeveyn tespiti, kantitatif özelliklere ait lokusların belirlenmesi ve genetik ıslah programlarında söz konusu lokusların manipulasyonu bunlar arasında sayılabilir. Bu yöntemin özellikle insanlarda önemli

uygulama imkanları bulunmaktadır. Bu uygulamada doğum öncesinde kalıtsal hastalıkların teşhisiyle ilgili olarak, restriksiyon fragmentinin büyüklüğünü modifiye eden ve anormal fenotiplere sebep olan genetik lezyonların belirlenmesine çalışılmaktadır (Beckmann ve Soller 1987).

2.RESTRIKSİYON FRAGMENT UZUNLUĞU POLİMORFİZMİ

Bir DNA molekülündeki fosfodiester bağlarını kesen enzimlere nükleaz enzimleri denilmektedir. Bunlardan özel bir grubu oluşturan restriksiyon endonükleazları ise DNA ekseninde belirli nükleotid sıralarını tanıyabilir ve sadece bu noktalardan kesim yapabilirler. Bu yüzden aktiviteleri son derece özgündür. Örneğin E.Koliden izole edilen EcoRI enziminin tanıma sırası şekil 2.1'de görüldüğü gibi palindrom



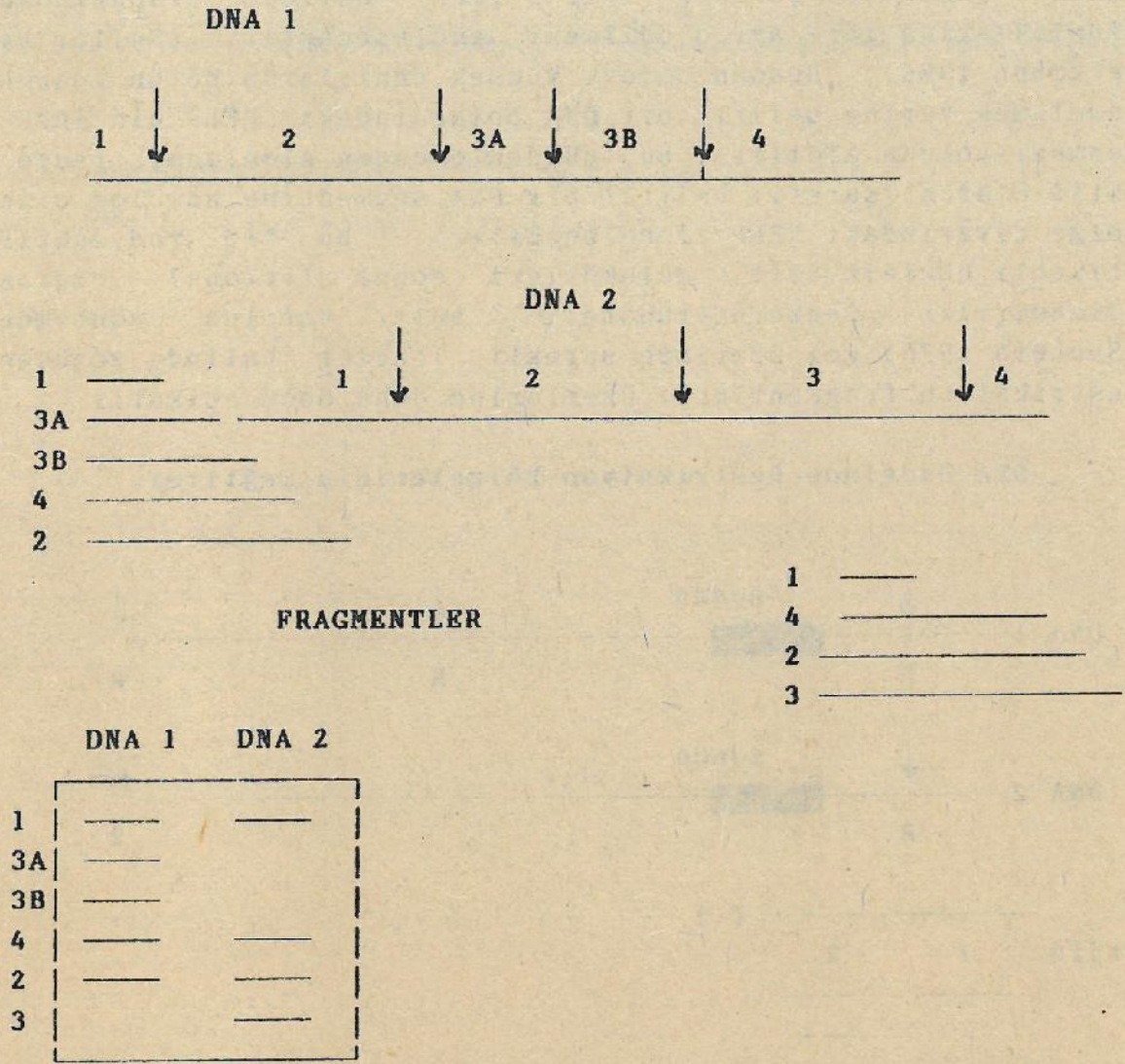
Şekil 2.1. EcoRI enziminin DNA molekülünü kesmesi

olarak adlandırılan, her iki ekseninde de ters tekrarlanan bir yapı gösterir. Enzim DNA'nın her iki ekseninde A ve G nükleotidleri arasından kesim yapar. Böylece DNA molekülü enzimin kestiği yerden iki fragmente ayrılır. Buna benzer yollarla elde edilen fragmentlere restriksiyon fragmentleri denir. EcoRI restriksiyon enzimiyle elde edilen restriksiyon fragmentlerinin her iki ucu rDNA (rekombinant DNA) teknolojisinde son derece önemli olan açık uçlu (yapışkan uç) bir özellik gösterir (bazı restriksiyon endonükleazları ile küt uçlu fragmentler de elde edilebilir).

Restriksiyon endonükleazları ile muamele edilen DNA molekülü; plazmid, virus, mitokondria, veya kloroplast DNA sı büyüklüğünde ise elde edilen restriksiyon fragmenti sayısı, restriksiyon bölgelerinin sayısına ve kullanılan restriksiyon enzimi çeşidine bağlı olarak diğer yüksek canlılara nazaran sınırlı sayıda olması beklenir.

Farklı restriksiyon bölgelerine sahip bir DNA molekülü, muhtelif restriksiyon enzimleri ile muamele edildiğinde, restriksiyon bölgelerinin DNA üzerindeki lokasyonuna bağlı olarak farklı uzunluklarda restriksiyon fragmentlerine parçalanır. Daha sonra bu fragmentler uzunluklarına bağlı olarak gel elektroforezde birbirlerinden ayrılabilir (Beckmann ve Soller 1983; Soller ve Beckmann 1986; Beckmann ve Soller 1987). Şekil 2.2 de iki farklı DNA molekülünde restriksiyon bölgelerinin dağılımı ve restriksiyon enzimiyle kesildikten sonra elde edilen fragmentlerin gel üzerindeki lokasyonunu göstermektedir. 1 nolu DNA molekülü 3 nolu restriksiyon bölgesinde ek olarak bir kesim bölgesine daha sahiptir. Sonuç olarak 1 nolu DNA molekülü restriksiyon enzimiyle muameleden sonra beş ayrı restriksiyon fragmenti üretirken, 2 nolu DNA molekülünden dört fragment oluşur.

Plazmit veya virus gibi basit organizmaların DNA ları küçük olduğundan sınırlı sayıda restriksiyon bölgesine sahip olması beklenir. Bu yüzden farklı uzunluktaki restriksiyon fragmentleri gel elektroforezde direkt olarak gözlenebilir.

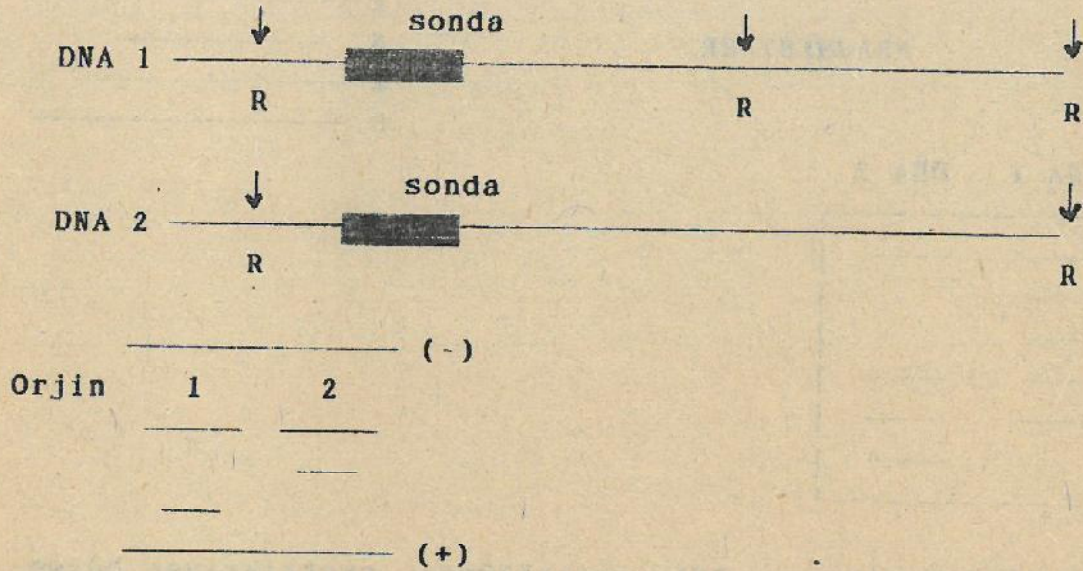


Şekil 2.2. İki farklı DNA molekülünde restriksiyon bölgelerinin dağılımı ve enzimle muameleden sonra fragmentlerin büyüklüklerine göre elektroforetik olarak ayrılması

Ancak yüksek organizmaların sahip olduğu DNA miktarı çok fazla olduğundan, basit organizmalara nazaran çok sayıda ve çeşitte restriksiyon bölgesine sahip olması yanında (Soller ve Beckmann 1986) bu organizmaların genomlarında tekrarlanan bölgelerin sayısı oldukça fazladır. Bu yüzden böyle bir organizmaya ait DNA, her hangi bir restriksiyon enzimi ile muamele edildiğinde oldukça fazla sayıda ve çeşitlilikte restriksiyon fragmenti elde edilir. Bu fragmentlerin gel elektrofo-

rezdeki görüntüsü sürekli bir leke halinde olacağından uzunluklarına göre ayırd edilmesi güçleşecektir. (Soller ve Beckmann 1986). Bundan dolayı yüksek canlılarda bütün genomu incelemek yerine belirli bir DNA bölgesindeki RFLP nin incelenmesi yoluna gidilir. Bu yüzden önceden klonlanmış radyoaktif olarak işaretli belirli bir DNA segmentine homolog olan bölge civarındaki RFLP incelenebilir. Bu tip radyoaktif etiketli nükleik asit molekülleri sonda (=probe) olarak adlandırılır. Sautern transferi adı verilen yöntemde (Sautern 1975) gel üzerinde sürekli lekeler halinde gözükten restriksiyon fragmentleri, üzerlerine daha önce etiketli

DNA Üzerinde Restriksiyon Bölgelerinin Dağılımı



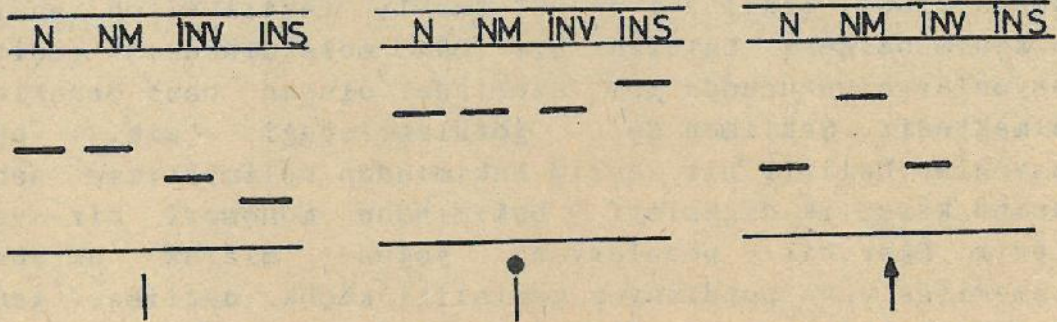
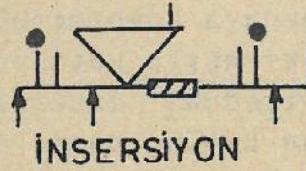
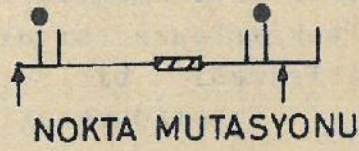
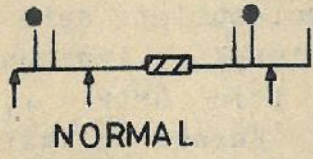
Şekil 2.3. İki farklı DNA da aynı sonda civarında bulunan herhangi bir restriksiyon enzimi için tanıma sıralarının dağılımı ve restriksiyon enzimiyle muameleden sonra restriksiyon fragmentlerinin autoradyografik olarak görülmesi

sondaların fikse edildiği nitroselüloz filtrelerine transfer edilir. Kullanılan sondaya homolog sıraları taşıyan fragmentler, sondalarla hibrit oluştururlar. Burada kullanılan sondaya bağlı olarak DNA/DNA veya DNA/RNA hibritlerinin

meydana gelmesi söz konusudur. Hibrit oluşturmamayan fragmentlerin filtreden yıkanmasından sonra, moleküller autoradyografik olarak belirlenirler. Sonuç olarak genomda belirli bir bölgedeki belirli bir enzim için RFLP 'yi incelemek mümkün hale gelir. (Şekil 2.3). Burada dikkat edilmesi gerekli olan bir nokta bulunmaktadır; genomda sondaya homolog bölgeler eğer tekrarlanan sıralar halinde bulunuyorsa, sondafragment hibritleşmesi bir çok noktada gerçekleşeceğinden sürekli bir autoradyografik leke oluşacaktır.

3.RFLP NİN GENETİK VE METODOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Bir sondaya homolog bölge civarındaki RFLP, bir veya iki nükleotiddeki nokta mutasyonları sonucunda oluşabileceği gibi, bu bölgedeki insersiyon delesyon veya inversiyon benzeri daha büyük parça değişimlerinin yol açtığı fragment uzunluğundaki değişimlerden de kaynaklanabilirler(Soller ve Backmann 1986). Şekil 3.1 de 3 farklı restriksiyon enzimi için kesim bölgesi bulunan bir DNA molekülünde, çeşitli mutasyonların sonucunda gel üzerinde oluşan band örnekleri görülmektedir. Şekilden de görülebileceği gibi bazı mutasyonlar belirli bir enzim bakımından polimorfizme sebep olmasına karşılık diğerleri bakımından monomorf bir yapı gösterir. Eğer bir populasyon yoğun olarak akrabalı yetişmemişse veya populasyon genişliği küçük değilse, genel olarak herhangi bir sonda-enzim kombinasyonu için RFLP oldukça yüksek frekansta gözlenebilir (Soller ve Beckmann 1986). Gerçektende yapılan çalışmalarda insanlarda yaklaşık 1:100 bç nin polimorfik olduğu (Jeffreys, 1979) ve bunun yaklaşık 1:100 bç nin RFLP metoduyla incelenebileceği belirtilmiştir. İnsan genomunun yaklaşık %80 i yüksek derecede tekrarlanan sıralara sahiptir ve toplam haploid genomu yaklaşık 3×10^9 bç olduğundan incelenebilir polimorfizm sayısı cede tekrarlanan sıralara sahiptir ve toplam haploid genomu yaklaşık 3×10^9 bç olduğundan incelenebilir polimorfizm sayısı yaklaşık 60000 olarak tahmin edilmektedir (Soller ve Backmann 1986). Yapılan bir çalışmada insan genomunda 333 RFLP incelenmiş ve bunun bir kısmında bilinen genler sonda olarak



Şekil 3.1. 3 Farklı restriksiyon enzimi için kesim bölgesi bulunan bir DNA molekülünde çeşitli mutasyonlara bağlı olarak gel üzerinde oluşan band örnekleri (Soller ve Beckmann, 1986).

kullanılmıştır. Ancak çoğunda rastgele, bilinen bir gene homolog olmayan sondalar kullanılmıştır. Gerçektende klonlanmış bir sondanın bilinen bir gene veya belirli bir sıraya tam olarak homolog olmasına gerek yoktur. Aynı zamanda restriksiyon bölgesine ait polimorfizmin kodlama sırasında olmasına da gerek yoktur. Herhangi bir sonda sırası civarında restriksiyon bölgesi bulunuyorsa, bu bölgeler; intron, spacer veya regulator bölgelerinde bulunabilir ve üzerinde çalışılabilir.

RFLP nin kalıtım özelliğinin kodominant olduğu belirtilmektedir (Soller ve Beckmann 1986; Beckmann ve Soller 1987). Gerçektende şekil 2.3. incelendiğinde belirli bir enzim için heterozigot kesim yerine sahip olan diploid bir organizmanın gel üzerinde bantlarının her ikisinde fenotipik olarak gözlemlenebilir. Böylece tam dominanslık durumunda resesif allelin dominant alleli tarafından örtülmesi gibi bir durum ortaya çıkmaz RFLP genetik çalışmalarda ve ıslah programlarında diğer klasik, morfolojik veya biyokimyasal markerlerle mukayese edildiğinde önemli avantajlara sahiptir. Bunlar tablo 3.1 de özetlenmiştir. Tablodan görülebileceği gibi DNA örnekleri organizmanın her hangi bir dokusundan, yaşam döngüsünün herhangi bir aşamasında alınabilir. Alınan DNA örnekleri saklanabilir ve muhtelif laboratuvarlar arasında değişimi yapılarak çeşitli enzim-sonda kombinasyonları için üzerinde çalışılabilir. Şekil 3.1.de görüleceği gibi herhangi bir sondaya homolog DNA sırası yakınındaki RFLP yi belirlemek için tek bir restriksiyon enzimi yetmeyebilir. Bu yüzden bir bölgeye ait RFLP yi incelemek için 10-20 sonda-enzim kombinasyonunun yeterli olabileceği belirtilmektedir (Soller ve Beckmann 1986). Bazı sondalar genomda çok değişken bölgeleri incelemek için kullanılmaktadır. Bu gibi sondalar aynı zamanda bir kaç RFLP yi birden aynı zamanda inceleyebilmektedir. Buna benzer şekilde insan genomunda mevcut olan çok değişken bölgeler tandem, tekrarlanan sıralar halinde, olarak bulunmakta ve minisatellit denilen bölgeleri meydana getirmektedir. Bu tekrarlanan bölgeler, bütün diğer tekrarlanan bölgelere benzerlik gösterir. Söz konusu bölgelerdeki RFLP tek bir sondayla bir defada incelenebilir. Örneğin insan myoglobin geninin birinci intronunda tandem olarak tekrarlanan 33 bç uzunluğunda bir sıra bulunmaktadır. Bu sıra halen sonda olarak kullanılmaktadır (Jeffreys vd. 1985). Buna ek olarak mesela kanatlı genomunda sayıları 22 ye varabilen endogen virus ve çeşitli mobil elementler (Crittenden 1986) insersiyon bölgesinde RFLP oluşturabilir. Aynı zamanda bu bölgelerdeki RFLP, insersiyon sıralarının kendilerinin sonda olarak kullanılmasıyla da incelenebilir.

Tablo 3.1. Genetik Marker Olarak RFLP nin özellikleri.

- Oldukça yaygındır,
- Genomik RFLP, Mendel kalıtımı gösterir.
- Organel RFLP, Maternal kalıtım gösterir.
- Kalıtımı stabildir,
- Kodominant özellik gösterir,
- Çoklu allelleri yaygındır,
- Ekonomik özellikler üzerine pleiotropik etkisi bulunmaz,
- Çevre tarafından etkilenmez,
- Allelik varyasyonun özelliğine bağlı olarak informatiftir,
- Bütün dokularda incelenebilir,
- Bütün yaşlarda incelenebilir,
- DNA örnekleri uzun süre saklanabilir,
- Bir çok lokus tek bir sondayla gözlenebilir,
- Sondalar kodlama sıraları ile sınırlı değildir,
- Sondalarla çok değişken bölgeler incelenebilir.

4.HAYVAN ISLAHINDA RFLP TEKNİĞİNİN KULLANILMASI

RFLP tekniği açısından hayvanlarda damızlık değerinin iyileştirilmesi süreci insanlarda kalıtsal hastalıkların doğum öncesi teşhisine büyük benzerlik gösterir. Bu nedenle RFLP yönteminin çiftlik hayvanlarında ıslah amaçlı kullanım potansiyeline geçmeden önce, RFLP nin kalıtsal hastalıkların doğum öncesinde nasıl kullanıldığını anlamak gerekir.

RFLP tekniği ile hastalıklar doğrudan veya dolaylı olarak teşhis edilebilmektedir (Soller ve Beckmann 1986). Direkt teşhiste, üzerinde durulan gende hastalığa yol açan nükleotid değişiminin, bu gen içindeki bir kesim noktasını değiştirebilme özeliğinden yararlanır. Örnek vermek gerekirse, orak hücre anemisine hemoglobin proteinini kodlayan bölgedeki bir nokta mutasyonu sebep olmaktadır. Bu nokta mutasyonu aynı zamanda DdeI restriksiyon enzimi için restriksiyon bölgesini

değiştirmektedir. Söz konusu kalıtsal hastalığı taşıyan bireyler daha doğmadan önce, klonlanmış hemoglobin geni sondaları ve DdeI enzimi kullanılarak doğrudan tespit edilebilirler. Benzer olarak bazı thalassemlalarda (Akdeniz anemisi) hemoglobin geni içinde delesyon bulunmaktadır. Bu durumdaki hastalarda delesyonlu kısım RFLP tekniği ile bir grup restriksiyon enzimi kullanılarak teşhis edilebilir.

Kalıtsal hastalıklarda mutant allel, delesyon inversiyon veya insersiyon gibi değişimlere bağlı ise, yabancı allel klonlanıp sonda olarak kullanılarak hastalık teşhisi kolayca yapılabilir. Ancak hastalık nokta mutasyonu gibi bir sebebe bağlı ise o zaman DNA üzerindeki bir veya bir kaç nükleotidlik değişim belirli bir enzim için kesim bölgesinde değişime neden olmayabilir. Bunun sonucu olarak RFLP tekniğiyle direkt tanı her zaman mümkün olmayabilir. Bu durumda hastalık dolaylı olarak teşhis edilmeye çalışılır. Dolaylı teşhiste polimorfik restriksiyon bölgesi, hastalığa neden olan bölgede olmayıp polimorfik bir bölgeyle sıkı bir bağlantı halindedir. Bu durumda misal olarak bir aile içinde hastalık alleli ile belirli bir RFLP alleli arasında, oldukça sıkı bir bağlantı ilişkisi bulunmaya çalışılır. Daha sonra bu ilişkiden anormal ve normal alleller taşıyan şahıslar RFLP tekniği ile incelenebilir. Burada önemli bir problem, bağlı lokuslar arasındaki bağlantının derecesidir. Eğer lokuslar arası açıklık fazlaysa parça değişimiyle meydana gelecek yeni bağlantı tipleri hastalık teşhisinde yanıltıcı olabilecektir.

4.1. Ekonomik Özellikler Üzerine RFLP nin Doğrudan Etkisi

RFLP tekniği hayvan populasyonlarında ekonomik özelliklerin ıslahında da aynı yolla kullanılabilir. Ancak herhangi bir kalitatif özellik için mutant allelin varlığı fenotipten anlaşılabilmesine karşılık, QTL deki yüksek ve düşük etkili allellerin varlığı diğer lokuslardaki genetik varyasyon ve çevre tarafından maskelenir. Bu yüzden ekonomik bir özellik üzerine RFLP nin etkisini belirlerken genetik ve çevreye bağlı hata kaynaklarını azaltmak gerekir. Bunun için yapılan denemelerin sayısını artırmak gerekmektedir (Soller ve Beckmann 1986).

Bir populasyonda RFLP lokusu bakımından farklı allelleri taşıyan şahısların herhangi bir ekonomik özellik bakımından ortalamaları arasında önemli bir farklılık varsa, bu durum RFLP nin doğrudan etkisinin bir göstergesidir. Alternatif olarak belirli bir özellik bakımından populasyonda düşük ve yüksek ortalamaya sahip gruplar arasında, belirli bir RFLP ye ait allelik frekanslar bakımından farklılık, RFLP nin üzerinde durulan QTL ye doğrudan etkisini gösterir.

Ekonomik bir özelliğe RFLP nin direkt etkisini araştırmada esas problem, bu şekildeki bir etkiye sahip RFLP nin tespit edilebilme ihtimalinin çok düşük olmasıdır. Misal olarak kanatlı genomundaki mevcut gen sayısının 40000 in üzerinde olduğu tahmin edilmektedir (Soller ve Beckmann 1986). Ancak ticari amaçlar için üzerinde durulan ekonomik özelliklerin sayısı oldukça sınırlıdır. Örneğin yumurtacılar da bu özellikler; vücut ağırlığı, yumurta sayısı, yumurta ağırlığı, yumurta kabuğu kalınlığı, yumurta kalitesi, yem tüketimi ve cinsi olgunluk yaşı vb. Tipik bir safhat kanatlı populasyonunda ele alınan bütün ekonomik özellikler bakımından varyasyona sebep olan + ve - allelik varyasyonun en fazla 200 polimorfik QTL tarafından meydana getirildiği ve her bir lokusun buna olan katkısının %1 olduğu varsayılmaktadır (Soller ve Beckmann 1986). Böylece rastgele seçilen bir sondanın, ekonomik bir özelliğe etkili olan polimorfik bir kromozomal bölgeye hibritlenme ihtimali $200/40000=0.05$ olarak tahmin edilmektedir. Diğer bir deyişle 200 rastgele sondadan birisinin ekonomik açıdan önemli bir özelliğe ait genetik varyasyona sebep olan bir bölgeye hibritlenmesi beklenir.

Herhangi bir sondanın QTL deki allelik varyasyonu inceleyebilme yeteneği, allelik varyasyona sebep olan moleküler değişimin tabiyatına bağlıdır (Soller ve Beckmann 1986). Eğer allelik varyasyona sebep olan değişim insersiyon, delesyon veya inversiyon gibi bir sebebe bağlı ise, böyle bir varyasyonu bir sonda yardımı ile incelemek nispeten kolaydır. Bu durumda rastgele bir sondanın QTL deki genetik varyasyonu incelemedeki ihtimali $1/200$ e eşit olur Ancak QTL deki genetik varyasyon, nokta mutasyonuna bağlı ise RFLP ile incelenebilme ihtimali $1/100$, ve rastgele bir sonda ile bu varyasyonun tespit edilebilme ihtimali $1/100 \times 1/200 = 1/20000$ olarak tahmin edilebilir. Doğaldır ki böyle bir ihtimal son derece

küçüktür. Bu ihtimali artırmada muhtelif yollar önerilmektedir. Bunlar; fenotip üzerinde önemli etkileri olduğu bilinen büyüme hormonu, MHC (Büyük Doku Uyuşurluk Kompleksi) interferon gibi önemli proteinelere ait genlerin sonda olarak kullanılabilme potansiyelidir (Soller ve Beckmann 1986; Beckmann ve Soller 1987). Bu şekilde süt sığırlarında büyüme hormonu geni sonda olarak kullanılmış ve söz konusu lokustaki RFLP çeşitli sığır ırkları için gösterilmiştir (Beckmann ve Soller 1987). Diğer bir alternatif, hareketli (mobil) genetik elementler ve kanatlılarda yaygın olarak bulunan endogen virusların sonda olarak kullanılmasıdır. Bahsi geçen insersiyon elementleri genomun herhangi bir yerine, örneğin, kodlama bölgeleri veya regülatör bölgelere entegre olarak hem RFLP hemde genetik varyasyona sebep olurlar. Söz konusu hareketli elementler klonlanarak sonda olarak kullanılabilir ve genomda bu elementlerin taraması yapılabilir.

Direkt etkinin belirlenmesinde diğer bir yol haplotip etkisidir. Haplotip, sınırlı bir bölgede lokalize olmuş 2 ila 3 RFLP lokusundaki allellerin özgün kombinasyonu ile karakterize edilen küçük bir kromozomal bölgedir (Soller ve Beckmann 1986; Beckmann ve Soller 1987). Böyle bir bölgede rekombinasyon olayı nadir olduğundan rastgele çiftleşmeden sapma ve seleksiyon, farklı allel kombinasyonlarının popülasyondaki nispi miktarını artıracaktır. Sonuçta sınırlı sayıdaki RFLP haplotipleri içinde belirlenmiş bir QTL varsa, bu durum ıslah programlarında göz önüne alınıp kullanılabilir.

4.2. Ekonomik Özellikler Üzerine RFLP nin Dolaylı Etkisi

RFLP nin ekonomik bir özelliği determine eden QTL lokusu üzerine dolaylı etkisini tespit etmek için, RFLP ve QTL arasındaki bağlantı ilişkisini belirlemek gerekir. RFLP nin QTL üzerine dolaylı etkisinin incelenebilmesi için bağlantının 15-20 cM (santiMorgan) olduğu zaman mümkün olacağı belirtilmektedir (Soller ve Beckmann 1986). Kanatlı popülasyonlarında bütün ekonomik özelliklerde potansiyel olarak mevcut polimorfik QTL sayısının 50-100 olduğu tahmin edilmiştir. Bir kanatlı türünde ekonomik özellikler için toplam genom büyüklüğü 1500 cM olarak alındığında (Soller ve Beckmann), polimorfik QTL yoğunluğu için, yaklaşık 15-30 cM lik bir mesafede 1 QTL hesaplanabilir. Böylece üzerinde

durulan bir RFLP nin tanımlayabildiği belirli bir aralıkta 1-2 polimorfik QTL bulunabilir (Soller ve Beckmann). Belirli bir RFLP alleli ve QTL alleli arasındaki bağlantı ilişkisini kullanırken lokuslar arasındaki bağlantının rekombinasyon oranını azaltacak sıklıkta olması gerekmektedir. Bir başlangıç popülasyonunda belirli bir RFLP alleli belirli bir QTL alleli ile coupling fazında bağlantı halinde olduğu farzedilirse, (Herhangi bir A geni B geninin aynı kromozomda olması hali) RFLP allelleri M ve m, QTL allelleri A ve a ile gösterirsek, popülasyonda mevcut genotipler; MA, Ma, mA ve ma şeklinde olacaktır. Burada RFLP ve QTL allelleri arasındaki ilişkinin kodominans olduğunu kabul etmek gerekir (Soller ve Beckmann 1986).

Üzerinde durulan bir RFLP lokusu bakımından farklı allellere sahip şahısların, ekonomik bir özellik bakımından genotipik değerleri arasında bir farklılık olduğunda RFLP-QTL bağlantı ilişkisinin varlığına hükmedilir. Benzer şekilde bir popülasyonda düşük ve yüksek ortalamaya sahip gruplar arasında belirli bir RFLP lokusu bakımından allelik frekansları arasındaki farklılık da RFLP-QTL arası bağlantı ilişkisini belirler.

İki farklı popülasyonun melezlenmesiyle de RFLP-QTL bağlantı ilişkisi belirlenebilir. Eğer popülasyonlardan birinde genotip MA/MA, diğesinde ma/ma ise bu popülasyonların melezlenmesiyle, elde edilen F₁ generasyonu, MA/ma genotipinde olacaktır. RFLP-QTL bağlantısı çok sıkı olması halinde rekombinasyon olayı nadir olacağından F₂ döllerinin hemen hemen tamamının genotipi; MA/MA, MA/ma ve ma/ma şeklinde olacaktır. Diğer genotipler ise nadir olarak meydana gelecektir. F₂ Popülasyonundaki MA/MA ve ma/ma genotipindeki şahıslar arasında üzerinde durulan herhangi bir özellik bakımından farklılık RFLP nin söz konusu özellik üzerine dolaylı etkisini gösterir. MA/ma heterozigot şahıslarından heterozis etkisini de araştırmak mümkündür (iki homozigot grupların ortalamalarından sapma olarak). Yukarıda belirtilen melezlemeleri farklı ırklar arasında veya aynı ırk içinde, tavukçuluk sektöründe yaygın olarak uygulandığı gibi akrabalı yetişmiş hatlar arasında da gerçekleştirilebilir. Bu arada çevre ve genetik unsurlardan ileri gelen varyasyonunun

etkisinin giderilmesi için denemenin çok tekerrürle yapılmasına ayrıca dikkat edilmelidir (Soller ve Beckmann 1986).

Ebeveyn ve döl gruplarının incelenmesiyle de RFLP-QTL bağlantı ilişkisi tespit edilebilir. Rastgele çiftleşen bir populasyondan alınan bir şahıs, F₁ dölllerine benzer şekilde MA/ma genotipinde olabilir. Böyle bir erkek ebeveyn çok sayıda dişiyle çiftleştirildiğinde (özellikle yapay tohumlamanın yaygın olarak kullanıldığı boğalar) döllerin yarısı MA kromozomuna diğer yarısı da ma kromozomuna sahip olacaktır. Farklı kromozom taşıyan bu döllerin üzerinde durulan özellikler bakımından mukayesesi, marker olarak RFLP nin etkisini gösterecektir. Burada rekombinasyon ihtimalinin azaltılması için, RFLP ve QTL lokuslarının çok yakın olmalarına dikkat etmek gerekmektedir.

RFLP-QTL bağlantı ilişkisine ait bilgiler çiftlik hayvanlarının ıslah programlarında iki yoldan yararlı olacaktır. İlk olarak belirli bir populasyonda veya belirli bir şahısta + QTL allelleri için ve ikinci olarak belirli bir RFLP ve QTL bağlantısı için bilgi sağlar. Bu şekilde bir ilişki kurulduğunda, ıslah programlarında + QTL allellerinin izlenerek populasyonda yaygınlaşması sağlanabilir.

Sonuç olarak rDNA teknikleri ve klasik biyometrik yaklaşımların birlikte kullanımı çiftlik hayvanlarının genetiği ve ıslahı üzerine çalışanlara beraberinde önemli fırsatları beraberinde getirecektir. Özellikle ıslah popülasyonlarında, ekonomik özelliklere ait genetik yapının ortaya konmasında ve bunların manipülasyonunda oldukça yararlı olacaktır.

SUMMARY

THE USE OF RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) IN ANIMAL BREEDING

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) which is very new method of genetic marker appeared with recombinant DNA technology. RFLP occur due to point mutations which effect restriction sites of enzymes within effect the length of DNA fragment between restriction sites. DNA fragments

within genome cut with restriction enzymes and separated with electrophoresis followed by hybridization.

RFLP has many advantages over other genetic markers. It is likely to determine RFLP for any probe-restriction enzyme combination. Also it is possible to observe RFLP from DNA sequences which do not carry information (intron, regulator). To day RFLP is used to determine genetical diseases like Thalassemia (Akdeniz Anemisi). In addition, it might be used for breeding programs of economic characters of farm animals.

KAYNAKLAR

Beckmann, J.S. ve M.Soller, 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. *Theor. Appl. Genet.* 67:35-43.

Beckmann, J.S. ve M.Soller, 1987. Molecular markers in the genetic improvement of farm animals. *Bio/Technology*, 5:573-576.

Crittenden, L.B., 1986. Identification and cloning of genes for insertion. *Poultry Sci.* 65:1468-1473.

Jeffreys, A.J., 1979. DNA sequence variants in the α and β -globin genes of man. *Cell* 18:1-10.

Jeffreys, A.J., V.Wilson, and S.L. Thein, 1985. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314:67-73.

Kashi, Y., Soller, M., Hallerman, E. ve J.S.Beckmann, 1986. Restriction fragment length polymorphisms in dairy cattle genetic improvement. *Third World Congress Genetics Applied to Livestock Production, Lincoln, NE U.S.A.*, 12:57-63.

Soller, M., J.S.Beckmann, 1983. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. *Theor. Appl. Genet.* 67:25-33.

Soller, M., J.S. Beckmann, 1986. Restriction fragment length polymorphisms in poultry breeding. Poultry Sci. 65:1474-1488.

Sautern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517.