

HAYVAN ISLAHINDA BİYOTEKNOLOJİ

1. GİRİŞ

Havyan ıslahı tanımı, klasik ıslah metotlarının yanı sıra moleküler genetik teknolojinin de kullanılmaya başlamasıyla birlikte son yıllarda oldukça değişmiştir. Hayvan ıslahı bugün, bilim ve teknolojideki güncel gelişmelerden daha çok etkilenmektedir. Çoğu çiftlik hayvanı türünde ıslah, büyük şirketlerin tekeli altındadır ve bireysel çiftçi bazındaki ıslah çalışmalarında azalmalar görülmektedir. Bu değişimin olası nedenlerinden biri üreme biyolojisi ve moleküler genetik teknolojinin gelişimi ve yaygınlaşmasıyla birlikte güncel biyoteknolojilerin ıslah endüstrisinde kullanımlarının artmasının hayvan ıslahındaki gelişme hızını arttırmasıdır. Bu sayede, izleme, ölçümleme ve sezgi de kısmen hesaplama ve bilimsel tahmin ile yer değiştirmiştir. Bununla birlikte, tabii ki bunların tamamı da yeni teknolojiler değildir. Bu teknolojilerden bazıları uzun zamandan beri uygulanmaktadır. Sığırlarda yapay tohumlama yaklaşık 50 yıldan beri uygulanmaktadır (Akman ve ark., 2005). Şüphesiz, süt sığırlarındaki genetik iyileşmenin üzerine en büyük etkiyi yapay tohumlama yapmıştır ve hala hayvan ıslahı programlarının yapısı üzerine önemli etkisi vardır.

Yine son yıllarda süper ovülasyon, *in vitro* fertilizasyon, genetik kopyalama, gen kopyalama ve seleksiyonda DNA markörlerinin kullanımı hayvan ıslahı çalışmalarında kullanılmaktadır. Bu teknolojilerden bazılarının uygulanması uzun yıllardır sürmekte, bazıları geliştirilme sürecinde, bazıları ise uygulama için beklemektedir. Bunlara ilaveten, bilgisayar ve bilgi teknolojisindeki hızlı gelişim de çiftlik hayvanlarında veri saklama ve genetik gelişim işlemlerinin takibinin kolaylaşması ve genetik değer karşılaştırmalarının sürüler, ırklar ve ülkeler arasında yapılabilmesi üzerine önemli bir katkı yapmıştır.

En uygun ıslah programlamasının yapılabilmesi için; teknolojik bakış açısıyla neyin “mümkün olduğu” ve üretim sisteminin sosyo-ekonomik yapısı içinde yer alan karar vericiler tarafından neyin “kabul edilebilir” olduğu konusunda doğru ayarın bulunması gerekir. Eninde

sonunda, hangi teknolojinin cazip üretim aracı olacağına da karar verecek olan tüketicidir. Çoğu batı toplumunda tüketiciler artan bir şekilde sağlık, çevre ve hayvan refahı konularında hassasiyet göstermektedirler (Anonim, 2005). Gıda güvenliği ve gıda üretim yöntemleri tüketicilerin gıda tüketimi davranışlarını etkileyen faktörlerdir. Bununla birlikte, fiyat ve üretim etkinliği hayvansal üretimin sürdürülebilirliğini etkileyen en önemli faktör olmaya devam etmektedir. Başarılı hayvan ıslahı programları rekabet sürecinde yardımcı olacak doğru düzeydeki teknoloji kullanımının bulunmasıyla hazırlanabilir.

2. MARKÖR DESTEKLİ SELEKSİYON

Moleküler genetik teknoloji son yirmi yılda hızlı bir şekilde gelişmiştir. Bu sayede, genomda hastalıklara dayanıklılık gibi bazı önemli özellikler üzerine etkili kodlama bölgeleri daha kolay tespit edilebilmiştir. Bu özelliklerin bir çoğu kantitatif özelliklerdir ve birçok genin ortak etkisi ile ortaya çıkan özelliklerdir. Hayvanlar arasındaki genetik farklılıklar bu çok sayıdaki genden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, DNA teknolojisi genetik markörleri gündeme getirmiştir. Bu sayede hayvanların sahip oldukları genetik varyasyonun tam olarak ortaya konulmasıyla, potansiyel genetik değerlerinin doğru bir şekilde tahmini mümkün olmuştur. Hayvanların moleküler işaretçiler yardımıyla genotiplenmesi, gerçek genetik değerlerinin bulunması amacı güdülen bir çeşit yatırımdır (Kinghorn ve van der Werf, 2000).

Moleküler markörlerin gerçek genotipin, gen lokusu düzeyinde tanımlanmasında kullanılmaya başlaması ile birlikte tesadüfi ve tesadüfi olmayan çevresel etkilerden kaynaklanan hatalar sorun olmaktan çıkmaya başlamıştır (van der Werf ve Marshall, 2003).

Son yirmi yıla kadar hayvancılık endüstrisinin çoğu en iyi damızlık hayvanın belirlenmesi konusunda başarılı bir şekilde geliştirilmiş olan Damızlık Değer Tahmini (Estimated Breeding

Value)'ne dayanmaktaydı. Bu da en iyi BLUP (Best Linear Unbiased Prediction) yöntemiyle başarılmaktadır (Viklund ve ark., 2005). Yöntem, aday damızlığın kendinden ve onun akrabalarından alınan birkaç özelliğe ait pedigrî ve performans bilgilerine gereksinim duymaktadır. BLUP yönteminden en doğru sonucun alınması için fenotipik performans kayıtlarının çok iyi bir şekilde tutuluyor olması gerekir.

Uygulanacak seleksiyon stratejisi, öncelikle hangi özelliği iyileştirmek istediğimize bağlıdır. Aslında, genetik seleksiyonun ana fikri; damızlık olarak kullanılacak hayvanlarda istenilen gen frekanslarının artırılmasıdır. Ancak gerçekte bu genleri tam olarak gözlemlemek, belirlemek çok zordur. Fenotipe dayalı seleksiyon, hayvanın sahip olduğu bütün genlerin birlikte çalışmasıyla elde edilmiş sonuca dayanmaktadır. Ayrıca hayvanın belirli bir verim karakteri bakımından bireysel performansı yalnızca genler tarafından etkilenmez, özellikle çevresel faktörden de önemli ölçüde etkilenir. Bu yüzden en iyi genlerin seçimi için yalnızca hayvanın performansına göre yapılan seleksiyonda %100'lük başarı görülemez. Geniş çaplı döl kontrolü testleri mükemmel seleksiyon başarısına yaklaşırsa da, örneğin, et kalitesi ile ilgili karakterler gibi bazı özellikler için çok pahalıdır, bunun yanında döl kontrolü testlerinden istenilen başarının sağlanması için birkaç yıllık bekleme süresine ihtiyaç duyulmaktadır. Etkili bir ıslah programı; hayvanların mümkün olan en genç yaşta damızlıkta kullanılmasını, generasyonlar arası sürenin imkânlar oranında kısaltılması ve bu sayede de yıllık daha hızlı bir genetik ilerlemenin sağlanmasına imkan tanınmalıdır. Erken yaşta bir damızlık seçimi için potansiyeli iyi olan genlerin varlığının bilinmesi seleksiyonda kolaylık sağlayacağı gibi isabeti de arttıracaktır (Kinghorn ve van der Werf, 2000).

Kantitatif genetik çalışmalar, faydalı genlere sahip hayvanların tanımlanması için fenotipik verilerden yararlanma ilkesine dayanır. Moleküler genetik tekniklerden yararlanarak elde edilen bilginin kullanım amacı ise kantitatif karakterler üzerine etkili olan majör genlerin yerlerinin tespiti ve ıslahta bunlardan yararlanılmasıdır.

2.1. Genomun, Genetik ve Fiziksel Haritalanması

Genlerin yerleşim düzenleri (lokus) arasındaki mesafenin bilinmesine “genetik haritalama” denir. Genetik haritalardaki mesafeler, iki lokus arasındaki rekombinasyon frekansına göre belirlenir. İki lokus arasındaki rekombinasyon frekansını gösteren ölçü birimi “Morgan (M)” ya da “Santimorgan (cM)”dır. Bir cM ortalama 100 mayozdaki 1 rekombinasyon olayıdır. Bu yüzden, genomdaki iki bölge birbirinden 10 cM uzaklıkta ise, iki bölge arasındaki beklenen rekombinasyon oranı 100 mayozda 10’dur. İki gen arasındaki genetik harita mesafesi bu yüzden rekombinasyon geçirmesi beklenen genlerin frekansının belirlenmesinde kullanılır. Bir genetik harita, kromozomun fiziksel haritası ile karşılaştırılabilir. Burada genler arasındaki mesafe baz çifti (base pairs-bp) ya da kilo bazçifti (kilo basepairs-kb) ile ölçülür. İnsanlarda, 1 cM genetik bir haritada yaklaşık 1-2 Mb DNA’ya karşılık gelmektedir (1-2 Milyon baz çiftine). Fiziksel bir harita yapmak için Maya yapay kromozomu gibi ya da diğer uygun vektörler içinde yer alan klonlar, çok büyük (1 milyon baz çifti civarında) DNA fragmentlerine sahiptirler. Bir takım klon, “gen kütüphanesi” olarak bilinir. Tam bir kütüphane, toplam genomu içeren on binlercesine klondan oluşmaktadır (Kinghorn ve van der Werf, 2000). Genom haritalamasında; synteniy haritalama, in situ hibridizasyon, bağlantı haritalaması ve karşılaştırmalı haritalama gibi farklı haritalama yöntemleri mevcuttur (Kozanoğlu ve Oğuz, 2004).

Eğer, aynı türe ait iki birey arasındaki kromozom sekansları arasındaki farklılığı karşılaştırmak istiyorsak, baz çiftlerinin çoğu özdeş olacaktır. Örneğin, insan DNA dizilişindeki farklılık 1000 baz çiftinde 1 baz çifti kadardır. Bunun yanında, tek yumurta ikizleri hariç, memelilerde genetik materyali oluşturan milyonlarca baz çiftinin her ikisinin dizilişi tamamen aynı olan iki birey yoktur. Kesinlikle, kromozomlar boyunca bireyler arasındaki dizilişler çok büyük farklılıklar gösterir. DNA dizilişinde farklılık gösteren bu bölgeler, “moleküler işaretçiler” olarak isimlendirilirler.

2.1.1. Moleküler işaretçiler

DNA'daki farklılıklar genlerde meydana geldiğinde, bu farklılıklar genin işlevi ve dolayısıyla da bireyin fenotipi üzerine potansiyel bir etki oluşturur. Genetik markörler geçmişte çoğunlukla kan grupları ve enzim polimorfizmini içermiştir. Ardından daha polimorfik olan yeni markör tipleri ortaya konulmaya başlanmıştır.

Çoğu moleküler markör, fenotiple ilişkili değildir. Temel moleküler markör tipleri; Çeşitli sayıdaki birleşik tekrarlar (Variable number tandem repeats-VNTR), Kesilmiş parça uzunluğu polimorfizmi (RFLP - Restriction fragment length polymorphism), Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD - Random amplified polymorphic DNA), Çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP - Amplified fragment length polymorphism)'dir. Moleküler markörler çok farklı yöntemlerle elde edilirler ve bu yöntemlerin her birinin olumlu ve olumsuz yanları vardır. Farklı genetik markörlerin genomdaki dağılımlarının, genotipleme zorluk ve maliyetlerinin, polimorfizm gösterme derecelerinin farklı olması bu markör tiplerinin kullanılmasıyla elde edilen bilginin de çeşitliliğine yol açar. Örneğin, bazı yöntemler (cDNA, RFLP ve EST gibi) doğrudan genom üzerinde bir noktayı hedefleyebilirken, RFLP, RAPD ve SSR gibi yöntemler ise genomik DNA'yı işaretler. PZR temelli yöntemlerin (mikrosatellitler, RAPD ve AFLP) en önemli avantajı çok düşük miktarda DNA'ya ihtiyaç duymaları ve genotiplemede otomasyona uygun olmalarıdır. RAPD ve AFLP yöntemlerinde çalışılan tür hakkında özel bir sekans ön bilgisine gereksinim duyulmadığı gibi mikrosatellitlere göre geliştirilmeleri de daha kolay ve ucuzdur (Kinghorn ve van der Werf, 2000).

2.1.1.1. Çeşitli sayıdaki birleşik tekrarlar (Variable number tandem repeats-VNTR)

Genom üzerindeki farklı yerlerde dağınık şekilde bulunan ve ardışık dizi tekrarlarını içeren çok sayıda bölge vardır. Bu bölgeler "Çeşitli Sayıdaki Birleşik Tekrarlar" adı verilen DNA dizilerini içerirler. Birleşik tekrarlar, baştan sona kadar dizilişi belirlenmiş baz

çiftlerinin çoklu kopyalarıdır. Örneğin, sıklıkla bulunan bir ikili tekrar SA (sitozin ve adenin)'dır, bir zincirde bu tip tekrar dizileri CACACA....., şeklinde okunur ve $(CA)_n$ şeklinde not edilir. Bu örnekte tekrar baz çiftlerinin sayısı ikidir, ancak fazla da olabilir. VNTR'ların tekrarlanan ünitelerinin sayısı 4'den az olduğunda "mikrosatellitler", daha fazla olduğunda ise "minisatellit" olarak da adlandırılabilirler (Kinghorn ve van der Werf, 2000).

Mikrosatellitler, eşsiz bir sekansla çevrelenmiş çeşitli sayıdaki kısa dizi tekrarlarıdır. Mikrosatellitler çok iyi genetik markörlerdir, çünkü her biri tekrar bölgelerinin uzunluğu birbirinden farklı olan çok fazla sayıda allele sahiptir. Bir allel, aynı bölgede tanımlanmış tekrar sayısıdır (Provan ve ark., 1999). Birçok allel varlığından dolayı çoğu birey heterozigottur. Bu ise, yavrulara aktarılmak istenilen QTL'ler ile markör-allel-performans bağıntısının kurulmasında kolaylık sağlar.

"Polimeraz Zincir Reaksiyonu" boyunca tekrar dizlerinin iki tarafındaki primer bağlanma bölgelerinin eşsiz sekansları kullanılır ve mikrosatellit DNA özel bir şekilde çoğaltılır. Bireylere ait özel bir mikrosatellit lokusundaki alleller, çoğaltılmış parça uzunluklarının agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi ile tespit edilir.

2.1.1.2. Kesilmiş parça uzunluğu polimorfizmi (RFLP - Restriction fragment length polymorphism)

DNA kesim enzimleri (restriction endonucleases), kendilerine özel kesim noktalarından DNA dizisini keserler. Örneğin, EcoR-I, tanıma sekansı olan 'GAATTC dizisine rastladığında DNA'yı keser. Eğer, bu sekansta bir mutasyon gerçekleşmiş ise kesim gerçekleşmez ve sonuçta elde edilen DNA fragmenti uzun olur. Ayrıca, mutasyon yeni bir tanıma sekansı ile daha kısa bir çift fragment verir. Bu tip genetik farklılıklar "kesilmiş parça uzunluğu polimorfizmi olarak" bilinir (Kinghorn ve van der Werf, 2000).

2.1.1.3. Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD - Random amplified polymorphic DNA)

RAPD markörleri PZR reaksiyonları sonucu elde edilen DNA fragmentleridir. Bunun için PZR reaksiyonunda oldukça kısa ve tek zincirli DNA fragmentleri kullanılır (genellikle PZR'de iki primer kullanılır). Primer, az sayıdaki baz çifti için (örneğin 2000 bp) birbirine karşılık gelen iki zincirde de tamamlayıcı olmalıdır. Bu iki bölge arasındaki DNA zinciri PZR ile çoğaltılır. Bireylerin bu bölgelerinde görülen mutasyonel farklılıklar, ürünlerin jelde gösterilmesi ile tespit edilebilir (Kinghorn ve van der Werf, 2000).

RAPD yönteminin en önemli avantajı çalışılan türün DNA sekansının bilinmesine gereksinim duyulmamasıdır. Bir primer, rasgele bir şekilde PZR ürünü üretme şansına kesin olarak sahiptir. Dolayısıyla, RAPD markörlerinin geliştirilmesi nispeten daha ucuzdur. Dezavantajlarından biri tekrarlanabilirliğinin düşük olması, laboratuardan laboratuara hatta bir termal cyclus cihazından diğerine farklılık gösterebilmesidir. Bir diğeri ise dominant markör vermesi, homozigotlar ve heterozigotların karşılaştırılmasının mümkün olmamasıdır (Cushwa ve ark., 1996).

2.1.1.4. Çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP - Amplified fragment length polymorphism)

AFLP yöntemi, seçilmiş kesim enzimi fragmentlerinin PZR ile çoğaltılması esasına dayanır. Tıpkı RAPD gibi, AFLP'ler de DNA sekansı ile ilgili ön bilgiye ihtiyaç duymaz. RAPD yöntemine göre en önemli avantajı daha güvenilir olması, DNA kalitesine ve laboratuvar şartlarına bağlı olarak tekrarlanabilirliğinin daha yüksek olmasıdır. Moleküler markör olarak kullanılabilecek polimorfik lokus tanımlama başarısı mikrosatellitlerden ya da RAPD markörlerden 10 ila 100 kat daha fazladır (Kinghorn ve van der Werf, 2000).

2.1.1.5. Tek nükleotid polimorfizmi (SNP - Single Nucleotid Polymorphism)

Tek nükleotid polimorfizmi (SNP), genomun araştırılan bölgesi üzerindeki tez bir baz çiftindeki farklılığa dayanır. Bir SNP, fark edilebilecek bir frekanstaki iki değişen bazın görülme durumudur. İnsanlarda bu sayı bin baz çiftinde birden büyük olabilir. SNP çok değişik yöntemlerle tespit edilebilir, bununla birlikte nispeten yeni bir teknoloji olan DNA çiplerinin kullanımı çok sayıda örneği, mümkün olan en kısa zamanda ve en geniş tarama ölçeğinde incelemeye olanak sağlamış bir yöntemdir (Kinghorn ve van der Werf, 2000).

2.1.1.6. Diğer yöntemler

Üzerinde önemle durulması gereken bir çift terim de STS (sequence tagged sites ve EST (Expressed Sequence Tags)' dir. STS sekansı etiketlenmiş bölge demektir. Bir STS bilinen kromozomal bölgenin kendine özgü sekansıdır. Bunlar çoğunlukla farklı laboratuarlardan elde edilen haritalama bilgilerinin birlikte yerleştirilmesinde kullanılırlar. Bir STS genellikle 200–400 baz çifti uzunluğundadır ve PZR ile çoğaltılabilir. Mikrosatellitler, STS'lere örnek olarak verilebilirler.

Bir memeli sekansında çok fazla kodlama yeteneği olmayan bölge oldukça fazladır. Bu yüzden eşsiz bir sekansa sahip olan STS'lerin de tanımlanmaları uzun zaman gerektirebilir. İfadelenmiş sekans etiketlerinin (EST) kullanımı kendine özgü STS'lerin izolasyonu şansını artırmak için uygulanan bir yöntemdir. EST'lerin üretim şeması şu şekildedir:

Öncelikle, mRNA'nın bir DNA kopyası olan cDNA üretilir. Daha sonra 200 – 400 baz çiftlik cDNA'nın sekansı belirlenir. Bunlar EST'lerdir. mRNA'lar tekrar dizilerinden büyük ölçüde bağımsızdırlar ve muhtemelen de özgündürler (Kinghorn ve van der Werf, 2000).

2.1.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction - PCR)

“PZR” olarak bilinen “Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction - PCR)” metodu Mullis ve ark. (1986) tarafından geliştirilmiştir. PZR bir dizi ardışık reaksiyon sonucunda DNA'nın istenilen bölgesinin binlerce defa kopyalanmasıdır. Aynı işlemlerin

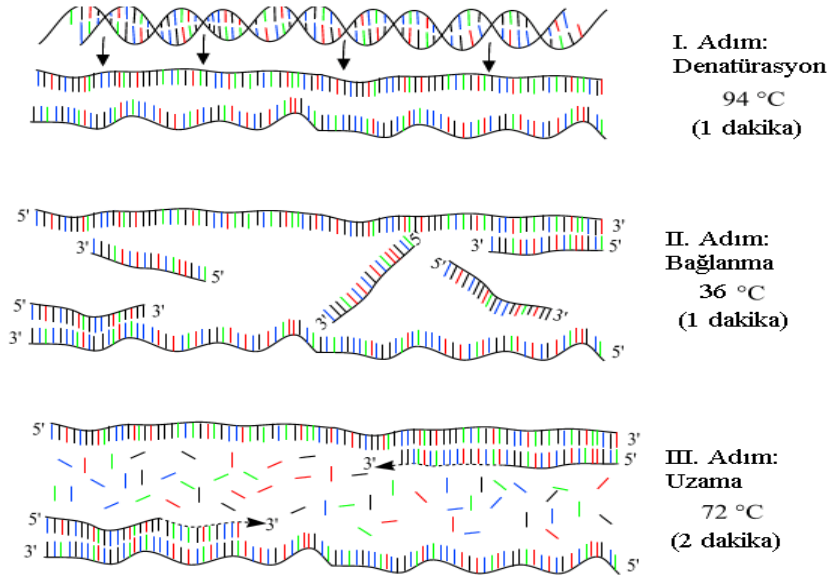
tekrarlanmasıyla oluşan d6ng6ler boyunca uygulanan sıcaklık değişimleriyle DNA zincirinin ayrılması ve sentezi yapılmaktadır (Montaldo ve Herrera, 1998). PZR metodunun keşfi ile DNA seviyesinde polimorfizmin tespiti konusunda daha bir çok teknolojinin gelişmesi sağlanmıştır (Provan ve ark., 1999).

Polimeraz zincir reaksiyonu DNA'nın genellikle iki primer sekansıyla tanımlanan özel bir bölgesinin çoğaltılması işlemidir. Bu yüzden, genomun bir bölgesinin incelenmesi için kullanılabilir.

Genetik materyale ait özel bir bölgenin birçok kopyası oluşturulduğu için bu yöntemle çok düşük miktardaki (örneğin bir tek yapağı örneği ya da bir damla kandan elde edilen) DNA yeterli olur.

PZR işlemi üç aşamalı bir işlemdir. Öncelikle DNA denatüre edilir ve tek zincirli hale dönüştürölür, ikinci olarak, primerler komplementeri olan sekansa sahip bölgelere yapışırılar, üçüncü aşamada ise primerler kalıp DNA sekansı boyunca reaksiyon ortamında mevcut nükleotidleri ve uzamanın gerçekleşmesini sağlayan DNA polimeraz enzimini de kullanarak uzamayı gerçekleştirirler. Bu üç aşama yaklaşık olarak 20 – 40 defa tekrarlanır (Şekil 1).

PZR (POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU)



Şekil 1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

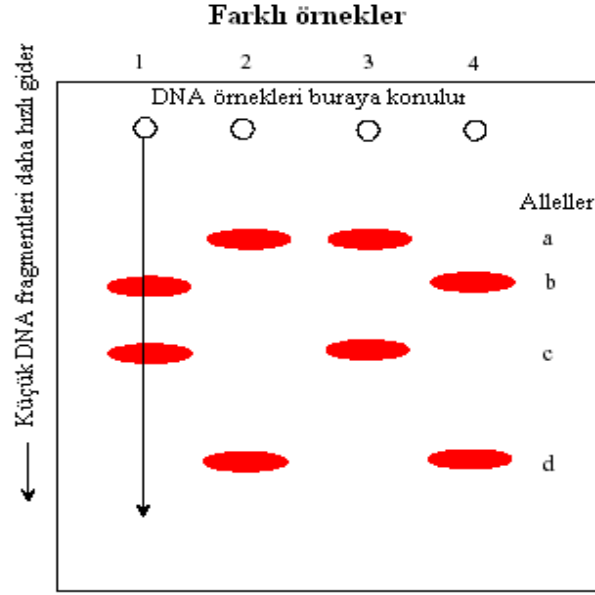
2.1.3. Moleküler markörlerin belirlenmesi

Moleküler teknikler (PZR ya da kesim enzimi farklılığını takip eden jel elektroforez) DNA polimorfizminden kaynaklanan allel farklılıklarının tanımlanmasında kullanılmaktadır.

VNTR'dan elde edilen farklı alleller farklı büyüklükte ve benzerlikte olacaktır. RFLP'ler de isimleriyle anılan farklı ölçülere sahiptirler.

2.1.3.1. Jel elektroforezi

Jel elektroforezi yöntemiyle DNA fragmentleri büyüklüklerine göre ayrılırlar. Jel aslında, jelâtinimsi bir tabakadır. DNA örnekleri tampon çözelti içerisinde bulunan jelin üst kısmındaki kuyucuklara yüklenir ve elektriksel akım uygulanır. DNA negatif yüklüdür ve pozitif elektroda doğru hareket eder. Daha küçük DNA fragmentleri jelde daha hızlı hareket edeceklerdir. Şekildeki örnekle (Şekil 2) farklı büyüklükteki dolayısıyla da farklı allellere sahip mikrosatellit DNA fragmentlerinin jelde yürütülmesi gösterilmektedir.



Şekil 2. Mikrosatellitlerin jel elektroforez yöntemiyle ayrılması

Yukarıdaki örnekte daha küçük olan fragmentler daha hızlı hareket etmişlerdir. Bu örnekte 4 allel görülmektedir. Tabii ki her bir birey, bir genin iki alleline sahiptir. Bu dört hayvanın çalışılan bölge bakımından genotipinin *bc*, *ad*, *ac*, *bb* şeklinde olduğu sonucuna varılır (Kinghorn ve van der Werf, 2000).

2.1.3.2. Southern blot

Southern blot, bir jelde bulunan fragment büyüklüğüne göre ayrılmış DNA'nın özel bir çeşit zara aktarılmasıdır. Zar üzerindeki tek zincirli ya da denatüre DNA 'ya proba muamele edilir. Prob, kısa bir DNA sekansına sahiptir ve ilgilenilen DNA fragmentine tamamlayıcı olarak bağlanır. Prob bağlandıktan sonra DNA fragmenti zarda görünür hale gelir bu da probun radyasyonla işaretlenmesi ve X ışını altında gözlenmesi ile mümkündür.

Southern blot yöntemiyle, tüm kromozomlar üzerindeki VNTR allellerini gösterir ve bu kompleks olgu DNA parmak izi olarak ifade edilir (Kinghorn ve van der Werf, 2000).

2.2. Karşılaştırmalı Haritalama

Bu ifade bilinen genlerin farklı türlerdeki genomik lokasyonlarının yerleşim düzeninin çalışılmasıdır. Genellikle bu bir türdeki haritalanmış genlerin farklı türlerdeki yerlerinin karşılaştırılmasıyla genom yapısının ve evriminin araştırılmasına olanak tanır. Bir türe ait kromozomun homolog bölgeleri ile diğer türün genomunun tamamı ikinci türün genomu boyunca çoğunlukla oldukça geniş bir şekilde yayılmış halde bulunur.

2.2.1.Aday genler

Aday gen, biyolojik sistemlere olan ilişkisi bilinen ve ilgilenilen karakter ya da karakterler üzerine etki edebilecek bir genidir. Bu bilgi insan ve farelerdeki çalışmalardan elde edilmiş bir bilgidir.

2.2.1.1.Konumsal (Positional) aday gen

Bir genomun karşılaştırmalı haritalama ile taranması sonucu genomdaki yeri tanımlanmış olan gene “konumsal aday gen” denir. QTL genomda bir bölgedir. Dolayısıyla da karakter lokusu bir özelliği etkileyen bölgedir. Bu bölge, bir veya bir kaçı ilgilenilen karakteri etkileyen genler boyunca yayılmış olabilir. Her bir gen, gen lokusunda yerleşmiştir.

3. ÇİFTLİK HAYVANLARINDA MARKÖR DESTEKLİ SELEKSİYON UYGULAMASI

Hayvansal üretimde genetik teknolojinin ve markör destekli seleksiyonun kullanımı 90'lı yıllardan itibaren teorik bir kavram olmaktan çıkmış ve uygulamaya dönüşmüştür. Günümüzde hayvan ıslahı çalışmalarında DNA markörlerinden yararlanma oldukça yaygın bir uygulamadır. Belirleyici ya da markör destekli seleksiyon olarak ifade edilen bu ıslah yönteminde iki ana hedef vardır. Bunlardan ilki genomun istenmeyen bölgelerinin uzaklaştırılması (istenmeyen genlerin frekansının azaltılması) diğeri ise istenen allellerin sıklığının arttırılmasıdır. Her iki durumda da genetik ilerlemede önemli artışlar

saptanmaktadır. Bağlantı analizleri ile incelenen özellikle ilişkili bantların tanımlanması seleksiyonda başarıyı arttırmaktadır.

Çiftlik hayvanlarından bir kısmı için (özellikle; sığır, koyun ve domuz için) geniş çaplı genetik haritalar hazırlanmıştır. Bunun yanında geliştirilmekte olan markör destekli seleksiyon programları için çalışmalar devam etmektedir. Markör destekli seleksiyon programları ticari olarak hayata geçirilene kadar üç aşama takip eder. Bunlardan birincisi “tespit etme” aşamasıdır. Burada kantitatif karakter lokusunun yeri ve üzerinde durulan özellik üzerine olan etkisi ölçülür. İkincisi “değerlendirme” aşamasıdır. Bu aşamada markörler ticari sürüler üzerinde değerlendirilirler. Üçüncü ve son aşama ise “uygulama” aşamasıdır. Bu aşamada, fenotip ve pedigri bilgileriyle birlikte markörlerin kullanılmasıyla popülasyon içindeki bireyler için genetik değer tahmini yapılmaktadır (Davis ve DeNise, 1998).

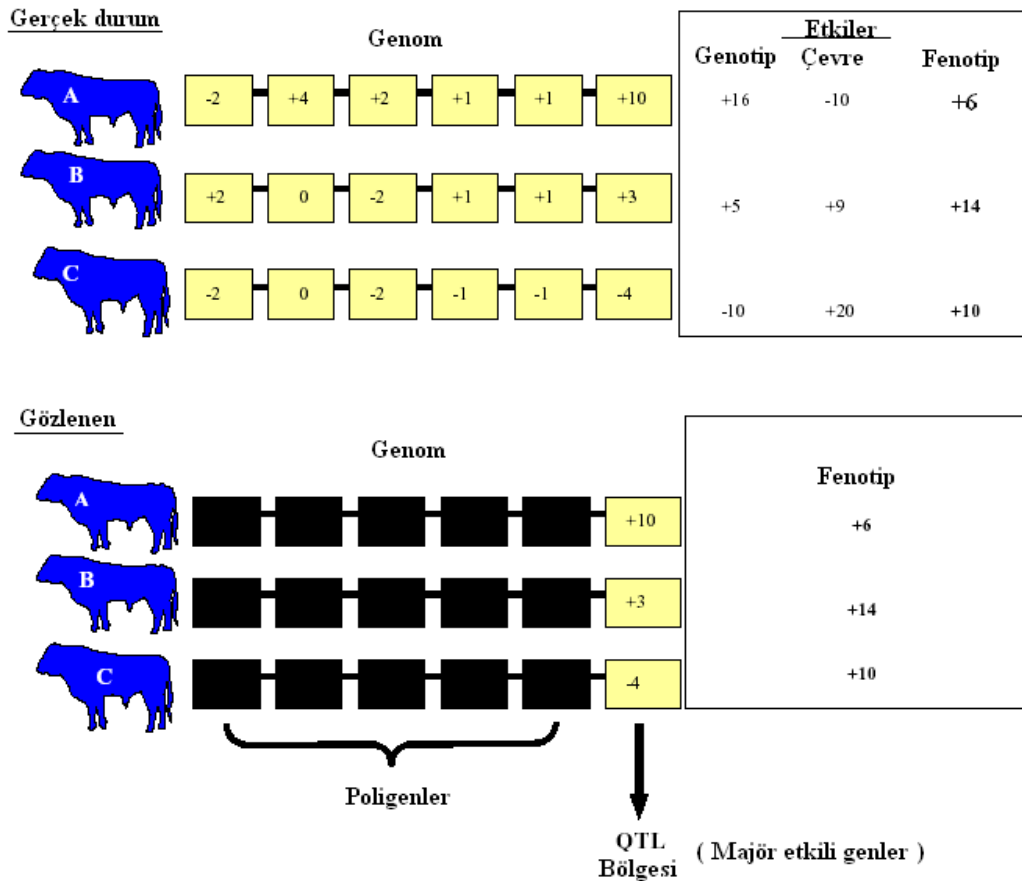
Markör destekli seleksiyonun ana fikri önemli etkilere sahip genlerin hedeflenerek seleksiyonda kullanılmasıdır.

Daha önce de vurgulandığı gibi bazı özellikler tekli genlerle denetlenirken ekonomik önemi olan çoğu özellik bir dizi genin ortak etkisi ile belirlenir ve popülasyonda sürekli varyasyon gösterir. Boynuzluluk ya da kuyruk şekli gibi kalitatif özellikler ise bir ya da birkaç gen tarafından denetlenen özelliklerdir ve bazı hastalıklar, ekspresyondaki ayrık değişimler de bu gruba girer. Bununla birlikte bu genlerin bazıları diğerlerine göre daha etkilidirler. Bunlar, kantitatif karakter lokuslarında yer alan majör etkili genlerdir.

Kantitatif karakter lokusu ifadesi genel olarak etkisinin düzeyi ne olursa olsun ekonomik önemi olan karakterlerle ilgili bütün genleri kapsasa da tercihen majör etkili genlerin buldukları yeri ifade etmek için kullanılır.

Seleksiyon ölçütü olarak DNA markörlerinin kullanımı, özellikle kalıtım derecesi düşük, ölçümü ya da elde edilmesi güç, zaman ve para gereksinimi fazla olan (örneğin hastalıklara direnç gibi), ya da tek eşeyde (yumurta verimi, süt verimi gibi) veya ileri yaşlarda belki de öldükten sonra (karkas özellikleri gibi) saptanan özellikler için daha uygundur.

Şekil 3'de farklı fenotiplere sahip 3 boğa görülmektedir. Üstteki resimde canlı ağırlığı etkileyen genlerin gerçek allelik değerleri verilmiştir. Alttaki resimde ise fenotip yerine QTL bölgelerinin tanımlanması durumunda bunun gerçek genotipik değer hakkında dikkate değer bilgi verebileceği gösterilmiştir. Bu örnek üzerinde kantitatif karakter lokuslarının seleksiyondaki önemi açıkça görülmektedir.



Şekil 3. Farklı fenotiplere sahip 3 boğa ve bunların genotipik ve fenotipik değerleri arasındaki farklılıklar. Üstteki şekilde gerçek genotipik durum, alttaki şekilde ise fenotipik olarak gözlenebilen durum ifade edilmektedir (Kinghorn ve Van der Werf, 2000'den alınmıştır).

Şekil 3’de görüldüğü gibi kantitatif karakter lokusları (QTL’ler), fenotipi etkileyen birçok genden bir kısmını içermektedir. Diğer ilgili genler “poligenler” olarak ifade edilirler. Poligenlerin varyasyonu ile QTL’lerdeki polimorfizm, birlikte toplam genetik varyasyonu oluşturur. Her ne kadar QTL hayvanlar arasındaki genetik farklılıkların sadece bir kısmını da açıklasa QTL bölgelerindeki genlerin içerdiği bilgi bir hayvanın genotipinin doğru olarak tahmininde faydalı olacaktır. QTL’den ulaşılabilen bilgi damızlık değer tahmininin de doğruluğunu arttıracaktır.

3.1. Markör Tipleri

3.1.1. Doğrudan markörler

Doğrudan markör tanımını açıklamak için şu durum örnek verilebilir. Örneğin tanımlanmış bir markör alleli olan “M” ile bağlantılı QTL allelinin genomlar boyunca daima birlikte hareket etmesi durumudur. Bu yalnızca markörün, etkiye neden olan gen içinde ya da çok yakınında yer alması durumunda söz konusudur.

Doğrudan markörler çok kullanışlıdır, çünkü markör genotip, QTL genotipi hakkında doğrudan bilgi verecektir. Bunun yanında, ekonomik olarak önemli karakterler için şimdilik yalnızca birkaç doğrudan genetik markör tanımlanabilmiştir. Bunlardan biri domuzlardaki Haloten genidir. Bu gen, etteki kas/yağ oranının artırılması ve bunun yanında da strese duyarlılık üzerine etkilidir. Bu genin ryanodin reseptör geni olduğu bulunmuştur. Bir diğeri, sığırlardaki çift kaslılık genidir ve kas kütesinin artışına olanak verir. Bu genin de miyostatin geni olduğu belirlenmiştir (Williams, 2005).

Bahsedilen örnekler, haritalanması yapılmadan önce varlığı bilinen ve karakter üzerine etki şiddeti yüksek olan genler için tipik markörlerdir.

Doğrudan markörler, eğer majör gen etkileri hakkında gerçek belirteçler ise genellikle bağlı genlere göre daha fazla tercih edilirler. Bunların en önemli avantajları karakterlerin fenotipik ölçümlerine ya da pedigri kayıtlarına ihtiyaç duyulmadan kullanılabilmeleridir.

Buna rağmen, farklı ırklarda ya da tiplerdeki majör etkili genin şiddetinin ölçülmesi, üretim sistemleri hakkında daha fazla bilgi sahibi olunması açısından karakter ölçümlerine ve pedigrî kayıtlarına ihtiyaç vardır.

Doğrudan markörlerin kullanılmasından kaynaklanan muhtemel riskler ise şunlardır (Kingham ve van der Werf, 2000):

- İstenen gen etkisinin görülmesine neden olan birden fazla mutasyon olabilir. DNA testi ile bunlardan yalnızca biri tespit edileceğinden sürüde bulunan bütün hayvanların durumu hakkında istenen bilgiye ulaşmak oldukça güç olacaktır. Bu duruma örnek olarak çift kaslılık için miyostatin geni verilebilir. Bu gen içinde istenen genetik etkinin aynısına sahip çok sayıda mutasyon vardır. Bu durumda bireyler bazen genetik tanı testlerinde tamamen yanlış bir şekilde negatif tanımlanabilirler.

- Yalnızca gerçek gene yakın olduğundan dolayı aday geni yanlış bir şekilde ilgilenilen karakterin majör geni olarak tanımlama potansiyel riski taşınmaktadır. Bu durumda sorun hatalı pozitif birey tanımlamasıdır. Doğru gen seçilir, ancak dolaylı marköre dönüşmüş olduğundan rekombinasyon geni negatif allele bağlamıştır.

Bu vurgular, farklı ve tamamen ayrı sürülerde markörlerin generasyonlar boyunca izlenmesi ve karakterlere ait performans verilerini kaydetme zorunluluğunu ortaya koymaktadır.

3.1.2. Bağlı markörler

Bağlı markörler, genom üzerinde QTL bölgelerinin yakınlarında yer alırlar ve gen içeriğinde mutasyona neden olmazlar. Popülasyondan rasgele seçilen bir hayvan için tercih edilen QTL alleli ile ilgili bir ya da daha fazla markör hakkında bilgimiz yoktur. Bir boğanın döllerinde değişik allel markörleri arasındaki performans farklılıklarının gözlenmesi durumunda istenilen QTL ile ilişkili markör allelinin hangisi olduğu tespit edilebilir. Bu bilgi yalnızca bireysel olarak bu boğa ve yakın akrabaları için kullanılabilir. Linkage evresi

hakkında sahip olunacak bilgi ile rekombinasyon oranına da bağı olarak bu boğanın yavrularının tercih edilen QTL'leri döllere aktarma olasılığı tespit edebilir. Linkage, yalnızca heterozigot boğalarda tespit edilebilir. Boğalar farklı markör genotipleri için döllerde farklılık göstermediği zaman QTL'ler için homozigot olabilirler. Boğalar markörler için heterozigot olmalıdır bu dişi bireyler için de faydalı olacaktır, zira aksi durumda hangi marker allelinin hangi boğadan alındığı açık olmayabilir. Bunun yanında, çok fazla sayıda markör olması durumunda hayvanlar, bu markör panelince genotiplenmelidir. Bu da dişi partnerlere ait genetik bilgi gereksinimini azaltır (Kinghorn ve van der Werf, 2000).

Bağı markörler ile birlikte hangi markör genotipinin aileye özgü pozitif QTL alleleine bağı olduğu hakkında bilgi sahibi olunabilir. Bu linkage aşaması en azından iki generasyon boyunca (örneğin bir boğa ve dölünde) yavruların fenotipik verileri de kullanılarak tespit edilmelidir. Ailelerin birkaçında linkage tespit edilemez çünkü boğalar markör ya da QTL'lerin ikisi için de homozigottur (Kinghorn ve van der Werf, 2000).

Buraya kadar anlatılanlardan, bağı genetik markörlerin kullanılabilmesi ve markör-QTL arasında linkage bağlantısının kurulabilmesi için karakterlere ait verilerin pedigri bilgisinin çok dikkatli bir şekilde tutulması sonucu ortaya çıkmaktadır. Bunun yanında çoğu damızlık popülasyonda zaten performans ve pedigri kayıtları tutulmaktadır. Ayrıca, geniş üvey akraba aileler için gereksinim duyulacak zaman da azalır ve markör ve karakter bilgisi daha derinlemesine bir pedigri kaydını beraberinde getirir. Bu yüzden tüm akrabalardan gelen bilgileri kullanarak hangi markör varyantının her bir hayvandaki üstün gen varyantına bağı olduğunu tespit etmek için de yöntemler geliştirilmiştir.

3.2. Hayvancılıkta Bazı Markör Destekli Seleksiyon Uygulamaları

Çiftlik hayvanlarının ıslahında moleküler genetik yöntemlerin kullanımı uygulamalarının yaygınlaşmasıyla birlikte moleküler markör düzeyinde üzerinde çalışılan karakterlerin sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Gelişen biyoteknoloji ile birlikte farklı yöntemler, verimle ilgili çok

sayıda geni kontrol eden bölgenin tanımlanmasında kullanıma olanağı bulmuştur. Bunlardan bazıları aşağıda verilmiştir.

Süt sığırcılığında çok önemi bir sorun olan mastitis birçok patojen tarafından oluşturulan ve özellikle süt verimi yüksek olan hayvanlarda yaygın görülen bir hastalıktır. Hastalığın ortaya çıkmasında çok fazla patojenin rol oynaması mastitise karşı dirençlilik geninin ortaya konulmasını zorlaştırmıştır. Bununla birlikte, bu konuda etkin rol oynadığı düşünülen bir lokus majör doku uyumluluğu kompleksi (MHC- major histocompatibility complex)'dir. MHC bölgesi, hücre yüzeyindeki bağlayıcı peptidlere (örneğin patojenlerden gelenlere) karşı bağışıklık sisteminin tepki vermeye başlatılmasını uyaran genlerini kodlayan bölgedir. Bu bölge üzerinde bulunan bazı genlerin mastitise duyarlılık ve direnci meydana getirdiği farklı çalışmalarla ortaya konulmuştur (Williams, 2005).

Çiftlik hayvanlarında üzerinde çalışılan karakterlerden birçoğu verim ile ilgilidir. Bunların bir kısmına ait QTL lokusları, haritalama çalışmaları ile ortaya konulmuştur. Sığırlarda belirlenen çift kaslılık geni de bunlardan biridir (Grobet ve ark., 1997). Temel olarak fare iskelet kaslarında eksprese edildiği belirlenen GDF-8 (Gelişim farklılaştırma faktör 8 – Growth differentiation factor 8) geni bir diğer örnektir. Myostatin geninin kodlama bölgesinde meydana gelen 11 bp'lik bir delesyon sonucu ortaya çıkan aleni taşıyan bireylerde görülmektedir (Grobet ve ark., 1997).

Son yıllarda üzerinde çalışılan bir diğer konu süt sığırlarında ekonomik önem taşıyan olan süttteki yağ miktarıdır. Ticari süt sığırı damızlık sürüleri üzerinde yapılan çalışmalarda süt verimi ve kompozisyonu konusunda QTL lokusları tespit edilmiştir Bu bölgelerden biri 14 numaralı sığır kromozomunda bulunan, süttteki yağ oranı üzerine etkili bir lokustur (Georges ve ark., 1995).

4. SONUÇ

Ekonomik önemi olan canlılar uzun süredir genetik çalışmaların hedefi konumundadır. Yapılan tüm çalışmalarda hedef, insan gereksinimlerinin daha hızlı, kolay ve ucuz bir şekilde karşılanmasıdır.

Son yıllarda biyoteknolojik gelişmelerin en yoğun görüldüğü alanlardan birisi de tarımdır. Tarımın en önemli hedeflerinden biri olan ıslah, markör destekli seleksiyonla ivme kazanmıştır. Çiftlik hayvanları da “tarım” tanımını içerisinde gösterdiği yüksek ekonomik değeri ile en son geliştirilen biyoteknolojilerin uygulanma alanlarının başında gelmektedir.

Buraya kadar verilmeye çalışılan örneklerden de anlaşılacağı üzere markör destekli seleksiyon uygulamaları klasik ıslah yöntemlerinin yerini almak için değil onlarla işbirliği yaparak karşılaşılan sorunların çözümüne katkı sağlamak amacıyla geliştirilmiştir.

Markör destekli seleksiyon uygulamalarının ticari olarak en önemli avantajı elde edilmesi güç, pahalı ve zaman alıcı verilerin kullanımına gerek kalmadan hayvanların seçimine olanak vermesidir. Bununla birlikte bu konu hali hazırda diğer ıslah yöntemleri ile kıyaslandığında oldukça yeni bir alandır. Markör tanımlama ve bunların seleksiyon ölçütü olarak uygulanabilirlikleri üzerindeki çalışmalar aralıksız devam etmektedir. Her geçen gün üzerinde çalışılan karakterlerle ilgili tanımlı markör sayısı arttırılmaya çalışılmaktadır. Yapılan çalışmalar, markör destekli seleksiyonun etkinliğinin en yüksek olduğu dönemin ıslah programlarının başlangıç dönemi olduğunu göstermektedir. Normal seleksiyona göre ilk beş yılda % 2 ila % 60 arasında avantaj sağladığı görülmüştür (Kinghorn ve van der Werf, 2000).

Bunların yanında MAS'ın etkin bir şekilde sürülere uygulanması için her şeyden önce kurucu ebeveyn hatlarının, çiftleştirme yöntemleri ve düzenlerinin çok iyi belirlenmesi gerekir. Ancak F2 bireylerinin soy ağacı kayıtlarına dayalı bilgilerden yola çıkılarak fenotip-genotip ilişkisi kurulabilir. MAS'ta kullanılacak çekirdek sürülerin oluşturulması uzun bir

süreçle birlikte hayvanlara uygulanacak bakım-besleme gereç ve yöntemleri işletme içi girdi masraflarının artmasına neden olacaktır (Koyun ve Okut, 2007).

Ülkemiz hayvancılığında markör destekli seleksiyon işleminin uygulanabilirliği, biyoteknolojik alt yapı ve bilgi birikimi açısından yeterli araştırma gruplarının uygun projelerinin desteklenmesi ile mümkün olabilecek, tüm ıslah programlarında olduğu gibi uzun soluklu ve dirayetli ulusal politikalarla desteklendiğinde sonuç alınabilecek bir konudur. Hayvan ıslahının hiç bitmeyen bir süreç olduğu akıldan çıkarılmamalıdır. Markör destekli seleksiyon yönteminin, sağlıklı temeller üzerine kurulmuş ve süreklilik arz eden ıslah programlarıyla yerli hayvan ırklarımızın ıslahında faydalı olabileceği düşünülmektedir.