

BÖLÜM 2

MOLEKÜLER SİSTEMATİK

Prof. Dr. Fahriye ERCAN¹

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.13145233>

¹ Kırşehir Ahievran University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, Kırşehir, Turkey. fahriyesumer@gmail.com, orcid.org/ 0000-0002-0111-8460

GİRİŞ

Sistematik, filogeni ve taksonominin değerlendirilmesidir. Taksonomi ise bir sınıflandırma bilimidir. Moleküler sistematik, sınıflandırmayı yaparken ve türler arasındaki evrimsel ilişkiyi ortaya çıkarırken moleküler genetiği kullanır. Deoksiribonükleik asit (DNA), genetik materyalin doğrudan analizini sağladığından sistematik çalışmalar için oldukça uygun bir araçtır. Moleküler sistematik çalışmalarda izoenzim analizleri, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA), AFLP (Amplified Length Polymorphism, Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi), SSR (Simple Sequence Repeat, Basit Dizi Tekrarları), ISSR, (Inter simple sequence repeat/Basit tekrarlı diziler arası polimorfizm), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, Polimeraz Zincir Reaksiyonu Restriksiyon

Parça Uzunluk Polimorfizmi) ve DNA dizi analizlerine kadar çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Her yöntemin, sağladığı bilginin miktarı ve niteliği, teknik zorlukları ve maliyet gibi özellikler açısından avantajları olduğu gibi sınırlamaları da vardır.

Son yıllarda moleküler biyolojideki ve özellikle biyoinformatikteki olağanüstü ilerleme, araştırmacılara biyolojinin tüm alanlarında uzun süredir çözülmemiş problemlerin üstesinden gelmek için güçlü araçlar sunmuştur (Page Holmes, 1998). Filogenetik analizler geçmişte organizmaların evrimsel gelişimini ortaya çıkaran çalışmalar ile sınırlıyken günümüzde genomik, koruma biyolojisi veya tarımsal alanda zararlı kontrolü gibi pek çok araştırma alanında standart bir araç haline gelmiştir. Evrimsel genetik çalışmalar, genetik çeşitlilik analizleri, genetik haritalama, bitki gen kaynaklarının korunması, tarımsal açıdan önemli genlerin klonlanması ve marker destekli üreme çalışmaları bu anlamda oldukça ön plana çıkmaktadır (Fang ve ark., 2016).

Moleküler sistematik, canlı organizmaların filogenetik ilişkilerini incelemek için bir araç olarak moleküler yöntemlere ihtiyaç duyar. Moleküler yöntemlerin sistematik çalışmalarda kullanımı ile ilgili tartışmaların odağında ise moleküler veriye göre morfolojik verinin göreceli önemi vardır. Diğer bir konu ise zaman zaman karşılaşılan moleküler ve morfoloji temelli filogeniler arasındaki uyumsuzlukların nasıl çözüleceğidir. Bu tartışmaların yanısıra, moleküler sistematikte DNA ve amino asit dizilerinin kullanılmasının geleneksel morfolojik yaklaşımlara göre; karakter tiplerinin evrenselliği, analiz için çok sayıda karakter sağlaması, gen ve gen bölgeleri arasındaki yüksek

düzeydeki çeşitlilik, moleküler yöntemler ve kullanım alanları ile ilgili giderek daha kapsamlı bilgiye sahip olmamız gibi çeşitli avantajları vardır (Hillis ve Wiens, 2000). Moleküler yöntemlerin kullanılmasıyla birlikte sistematikçiler ve popülasyon genetikçileri, hem tür içi hem de türler arası genetik çeşitliliği incelemek için ortak yaklaşımların kullanılmasının daha doğru olacağını tespit etmişlerdir. Genomik bilgi kullanılarak canlılar arasındaki ilişkiler ve moleküler düzeydeki benzerlikler açıklanabilmektedir.

1960'lardan önce yapılan sistematik çalışmalarda kullanılan karakterler morfolojik, davranışsal ve bazı durumlarda sitogenetik karakterlerden oluşmuştur (White, 1973). Ancak günümüzde moleküler sistematik filogenetik çalışmalarda yerini almış ve türlerin tespiti, tür içi ve türler arası polimorfizmlerin saptanmasında başarı ile kullanılan bir araç haline gelmiştir. Bu bölümde, bu amaçlar için kullanılan teknikler ve yaklaşımlar kısaca özetlenmiştir.

Protein Analizleri:

Protein kodlayan genlerin sıklıkla polimorfik olduğunun ve proteinlerin jel elektroforezinin fonksiyonel olarak benzer enzim formlarının (izoenzim) varlığını ortaya çıkarabileceğinin gösterilmesi ile proteinlerin elektroforezi yeni karakterler sağlamaya başlamıştır (Lewontin ve Hubby, 1966). İzoenzim analizleri, sistematik ve popülasyon genetiği çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

İzoenzim, tek bir enzimin birden fazla formunu ifade eder. İzozimler aynı reaksiyonu katalize etmelerine karşın en iyi çalıştıkları pH veya substrat konsantrasyonu gibi özellikler bakımından farklılık gösterebilirler. Farklı izoelektrik noktalara sahip oldukları için jel elektroforezi ile ayırtedilebilirler.

Protein elektroforezinin moleküler sistematikte kullanımı, homolog proteinlerin elektroforetik hareketliliklerindeki farklılıklardan DNA'daki nükleotid dizi varyasyonunun çıkarılmasına dayanmaktadır. İmmünolojik analizler de 1960'larda kullanılmaya başlayan bir tekniktir ve homolog proteinler arasındaki amino asit dizisi farklılıklarının niteliksel veya niceliksel tahminlerini sağlamaktadır (Maxon and Maxon 1990). Protein çalışmaları DNA'ya göre daha zordur, çünkü proteinler bozunmalara karşı daha duyarlıdır.

Proteinler jel elektroforezi ile proteinler katı bir jel üzerindeki elektrik alanında ayrılırlar. Oluşan elektroforetik bantlar uygun bir boyama yöntemi ile

görsel hale getirilir ve analiz edilir (May 1992). Katı ortam olarak, nişasta, agaroz, poliakrilamid, selüloz asetat jeller kullanılmaktadır. İzoenzim elektroforezi, birçok organizmanın genetik varyasyonunun belirlenmesinde yararlı olduğu kanıtlanmış bir tekniktir ve morfolojik yöntemler kullanarak ayırmanın mümkün olmadığı durumlarda, yakın akraba türlerin ayırt edilmesinde yararlı olabilir (Gomez 1998).

RAPD-PCR:(Random amplified polymorphic DNA-Rastgele çoğaltılmış DNA polimorfizmi)

Genetik varyasyonların tahmini, RAPD, AFLP, RFLP, SSR ve mikrosatellit gibi çeşitli moleküler teknikler kullanılarak DNA seviyesinde değerlendirilmektedir. Bunların arasında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tarafından üretilen RAPD belirteçleri, nükleer düzeyde genetik çeşitliliği ortaya koymak için 1990'lı yıllardan beri yaygın olarak kullanılmaktadır.

RAPD-PCR tekniğinin coğrafi ve genetik olarak izole edilmiş popülasyonları ayırt etmede etkili bir yöntem olduğu rapor edilmiştir (Jain ve ark., 2010). Bu teknik, önceden genomik DNA bilgisi yani bir ön sekanslama gerektirmeden, kısa rastgele primerler kullanılarak genomik DNA'nın rastgele bölümlerinin çoğaltılmasını içerir. Bu teknikte, PCR amplifikasyonunda kullanılacak primerlere ait nükleotid dizileri rastgele seçilir ve dizilemesi yapılır. Genellikle kısa (10 bp), ticari olarak temin edilebilen primerler kullanılır. Bu primerler kullanılarak hedef DNA'da komplementer olan yerlere bağlanır ve bu kısımlar çoğalmış olur. Amplifiye edilen bu DNA parçacıklarını görüntülemek için agaroz jel elektroforezi yapılır. Genel bir yöntem olarak etidyum bromid adı verilen ve DNA'nın UV altında görünür olmasını sağlayan boya kullanılarak molekül büyüklüklerine göre sıralanan ve bantlaşma gösteren DNA parçacıkları je üzerinde görüntülenir ve DNA üzerindeki genetik polimorfizm belirlenir.

RAPD-PCR tekniğinin avantajları arasında anonim genomları analiz edebilmemize imkan sağlaması, verimliliği, düşük maliyeti ve hızlı sonuç alınabilmesi sayılabilir (Hadrys ve ark. 1992). Uygulama kolaylığı, nispeten düşük maliyet, hız ve ihtiyaç duyulan DNA miktarı sebebiyle bu teknik profillemeye çalışmalarında RFLP'ye göre daha çok tercih edilmektedir. Bu yöntemin dezavantajı, tekrarlanabilirliğinin zayıf olması ve meydana gelen bant profillerinin reaksiyon şartlarındaki değişimlere karşı bile çok duyarlı

olmasıdır (Thangaraj et al. al.2011). Özellikle tekrarlanabilirliğin zayıf olması nedeniyle sıklıkla eleştirilse de, bu yöntem hala genotiplerin ayrımında sıklıkla kullanılmaktadır.

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

AFLP, RAPD-PCR tekniğinin prensiplerinden yararlanarak ve bu tekniğin dezavantajlarını gidermek üzere geliştirilmiş bir yöntemdir (Vos ve ark., 1995). Tekrarlanabilirlik ve polimorfizm düzeyi açısından RAPD-PCR tekniğine göre daha üstün olan bu yöntemde farklı protokoller oluşturulmakla beraber temelde beş ana adım vardır: (1) genomik DNA'nın kesilmesi ve adaptörlerin kesilen parçalara bağlanması; (2) kesilen fragmanların bir alt kümesinin ön seçici PCR amplifikasyonu; (3) daha fazla parça sayısını azaltan seçici PCR amplifikasyonu; (4) amplifiye edilmiş DNA fragmanlarının elektroforetik ayrılması; (5) verilerin skorlanması ve yorumlanması (Paun ve Schönsweetter, 2012).

Yöntemin en önemli avantajı, esas olarak hedeflenen genomla ilgili önceden bilgi gerektirmemesinin yanı sıra, DNA dizisindeki polimorfizmi tespit etmek için yüksek tekrarlanabilirlik ve hassasiyete sahip olmasıdır. AFLP, tür içindeki veya yakın ilişkili türler arasındaki genetik çeşitliliği değerlendirmek, popülasyon düzeyinde filogeni ve biyocoğrafik modelleri çıkarmak, genetik haritalar oluşturmak ve akrabalığı belirlemek gibi çeşitli uygulamalar için kullanılabilmektedir. Kıyaslama yapılacak olursa, RAPD'e göre yavaş ancak RFLP'den daha hızlıdır. İşgücü, güvenilirlik ve masraf açısından RAPD ve RFLP arasındadır. Polimorfizm oranı yüksektir. Yöntemin en önemli dezavantajı ise çoğunlukla dominant markör özelliğinde olmasıdır. Bunun yanında son zamanlarda kodominant markör de verdiği saptanmıştır (Yorgancılar ve ark., 2015).

SSR:(Simple sequece repeat-Basit tekrarlı diziler veya Mikrosatellitler)

Mikrosatellitler veya basit dizi tekrarları (SSR'ler), kısa nükleotid birimlerinin tekrarlarını içeren uzantılardır. SSR belirteçleri bitki genetik araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Canlı genomunda belli bir

bölgede bulunan rastgele ard arda dizilmiş kısa baz tekrarlarına STR (Short Tandem Repeats) adı verilmektedir. Bunların 1 ile 6 bazlı tekrarlarından oluşan markörler ise mikrosatellit veya SSR (Simple Sequence Repeats) olarak isimlendirilmektedir. SSR markörleri, PCR temelli moleküler çalışmalarda en çok tercih edilen markörlerden biridir (Liu, 1997). SSR'da tekrar bölgelerini çevreleyen DNA dizileri bir türün bireylerinde aynı olmasına karşın tekrar dizilim sayıları bireyler arasında farklılık gösterebilmektedir.

Genom içerisindeki mikrosatellitler oligonükleotit primerler aracılığıyla PCR ile çoğaltılabilir. Böylece bir populasyonda mikrosatellit lokuslarının çoğaltılıp jel elektroforezi sonucu görüntülenmesi ile heterozigot ve homozigot bireylere ait bantlar elde edilebilir. PCR sonucu elde edilen ürünlerde homozigot bireylere ait tek bant, heterozigot bireylere ait iki bant ortaya çıkacaktır.

SSR markörleri; genetik haritalama, babalık testleri, filogenetik çalışmalar, gen kaynaklarının korunması ve genetik çeşitlilik araştırmaları gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Bu belirteçlerin bir tür içerisinde polimorfik olması ve bireyden bireye farklılık göstermesi, güvenilir olması ve kısa sürede sonuç alınması gibi özellikleri moleküler genetik alanında kullanımlarını ve tercih edilmelerini artırmıştır.

Bu markörlerin en önemli avantajları arasında, nispeten daha düşük miktarda DNA ihtiyacı, kodominant bir markör sistemi olması, genomda çok ve dağınık olması, tekrarlanabilirliğinin yüksek ve otomasyona uygun olması, yüksek polimorfizm oranı gibi özellikler de sayılabilir. Bunun yanında, SSR bölgelerinin mutasyon oranlarının yüksek olmasından dolayı primer bağlanma bölgelerinde değişmelerin olması ve böylece anlamsız allellerin oluşmasına imkân sağlaması da önemli bir dezavantajdır.

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

ISSR, ökaryotik organizmaların genomlarda tekrar eden 2, 3, 4, 5 gibi nükleotid birimlerinin lokustan bağımsız bir şekilde genomda rastgele dağılımlarını esas alan bir yöntemdir (Zietkiewicz ve ark., 1994). Diğer moleküler belirteçlerin aksine, ISSR primerlerinin hedef dizileri ökaryotik genom boyunca fazla miktarda bulunur ve bu durum sonuç olarak RAPD gibi diğer baskın belirteçlerden çok daha fazla sayıda polimorfik lokusun ortaya

çıkarılmasına yardımcı olur (Ansari ve ark., 2012). Bu özellik, moleküler sistematik ve diğer moleküler temelli çalışmalarda genetik açıdan henüz incelenmemiş türler söz konusu olduğunda ISSR belirteçlerinin tercih edilmesini sağlamaktadır.

ISSR belirteçleri, başlangıçta yakın ilişkili bitki çeşitlerinin ayırt edilmesi için tasarlanmıştır ancak günümüzde bitkinin yanı sıra, mantar, böcek ve omurgalıların doğal popülasyonlarının incelenmesi için de son derece yararlı olduğu bilinmektedir. Maliyet olarak nispeten ucuz olması, büyük miktarda veri sağlaması, aşırı değişken doğası, minimum ekipman gereksinimleri ve kullanım kolaylığı, ekolojik ve sistematik araştırmalar için son derece kullanışlı moleküler belirteçler olarak ISSR'ları avantajlı hale getirmiştir. Bunun yanında, tekrarlanabilirlik özelliğinin düşük olması ve benzer büyüklükteki parçacıkların homolog olmaması gibi dezavantajları da vardır.

SNP:(Tek Nükleotid Polimorfizmi/ Single Nucleotide Polymorphism)

Canlıların genomu üzerinde meydana gelen tek nükleotid değişimleri olarak bilinen SNP (Single Nucleotide Polymorphism, Tek Nükleotid Polimorfizmi), pek çok canlı türünde karşılaşılan bir varyasyondur. SNP'ler, kromozom dizileri arasında baz çifti farklılıkları üreten mutasyonların sonucu oluşmaktadır. Yüksek oranda ve genom çapında dağılımları onları popülasyon genetiği ve evrimsel çalışmalar için değerli bir genetik çeşitlilik kaynağı haline getirmiştir (Brumfield ve ark., 2003). Gen haritalamada, moleküler ıslah ve harita temelli klonlama çalışmalarında, filogenetik ve filoğrafik çalışmalarda da etkili bir araç olarak kullanılmaktadır.

Karşılaştırmalı genomik verilerin toplanmasına yönelik ekonomik çözümler, moleküler sistematikte her zaman önceliklidir ve bu bakımdan SNP verileri, zaman ve maliyet açısından alternatif yöntemlerle karşılaştırıldığında son derece pratik ve avantajlı bir seçimdir. SNP'ler genellikle kodlama yapmayan DNA dizilerinde görülmektedir. Kodlamaya katılan bölgelerde meydana geldiğinde aminoasit dizisinin değişimine neden olabileceği gibi herhangi bir değişikliğe neden olmayabilir ve böylece gen ürününde bir farklılık meydana gelmez (Sunyaev ve ark., 1999).

Tek nükleotid polimorfizmi yaygın görülen bir DNA polimorfizm tipidir ve yüksek sıklıkla meydana gelirler. SNP analizleri jele dayalı değildir ve

otomasyona uygundur. Dolayısıyla analiz için elektroforeze gerek yoktur. Bu özellikler SNP'lerin avantajları arasında sayılabilir (Sönmezoğlu ve ark., 2010).

PCR temelli birçok markör sisteminde bahsettikten sonra PCR tekniğinin özelliklerinden de bahsetmek yerinde olacaktır.

PCR:(Polymerase Chain Reaction/Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR, 1980'li yılında Dr. Kary B. Mullis tarafından keşfedilmiş ve bu keşif 1993 yılında Kimya alanında Nobel Ödülü almaya hak kazanmıştır (Mullis ve ark., 1986). PCR, yöntemin adından da anlaşılacağı üzere bir DNA zincirinin özel bir dizisinin in-vitro çoğaltıldığı bir tekniktir. Bu teknik sayesinde küçük bir DNA fragmentinin milyonlarca kopyasının üretilmesini mümkün hale gelmiştir. Moleküler biyoloji ve biyoteknoloji başta olmak üzere günümüzde pek çok alanda yaygın olarak kullanılan bir tekniktir.

PCR, hücre içinde (in-vivo) DNA'nın kendini eşleme mekanizmasının bir benzeri olarak in-vitro DNA amplifikasyonunun gerçekleştirildiği bir tekniktir. PCR'de, primerler vasıtasıyla, enzimler kullanılarak hedef DNA dizileri çoğaltılabilir. DNA polimeraz, kalıp DNA'ya komplementer yeni bir DNA dizisini sentezler. DNA polimeraz, yalnızca önceden var olan 3'-OH grubuna bir nükleotid ekleyebilir. Bu nedenle bir primer gereklidir.

Teknik denatürasyon, bağlanma ve uzama olmak üzere üç aşamadan oluşur. Denatürasyon aşamasında, çift sarmal DNA yüksek sıcaklıkta çözülerek tek sarmal haline gelir. Bağlanma aşamasında, primer hedef DNA'ya bağlanır ve son olarak uzama aşamasında DNA polimeraz ile primerlere nükleotid eklenir ve DNA zinciri uzar. Denatürasyon, bağlanma ve uzama PCR'da bir döngüyü oluşturur (Bonin ve ark., 2003).

Denatürasyon sırasında, iki komplementer zincir artan sıcaklık ile birbirinden ayrılır ve böylece çift sarmal açılır. DNA denatürasyonunu sağlamak için sıcaklık yaklaşık 93-96°C 'ye çıkarılır. Yüksek sıcaklık etkisi ile kuvvetli hidrojen bağları kırılır ortamdaki tüm çift sarmal (ds) DNA, tek sarmal (ss) DNA formuna dönüştüğünde reaksiyon tamamlanmış olur.

DNA zincirlerinin eşleşmesi daha düşük sıcaklıklarda gerçekleşir (genellikle 55-65°C). Sıcaklığın düşmesiyle, birbirine eş iki ssDNA zinciri

yeniden bağlanarak dsDNA oluşturabilir. Döngünün bu aşamasında, tek zincir primerler ile tek zincir hedef DNA arasında hidrojen bağları oluşur.

Uzama aşamasında genellikle Taq DNA Polimeraz adı verilen sıcaklığa dayanıklı bir DNA polimeraz kullanılır ve dNTP'lerin varlığında primerler hedef zincir boyunca uzatılmış olur. Böylece başlangıçtaki hedef DNA materyali iki katına çıkmış olur. Bu döngünün süresi çoğaltılacak DNA fragmanının boyutuna bağlı olarak değişmektedir.

PCR reaksiyon bileşenleri içerisinde; hedef DNA, primer, DNA polimeraz, dNTP'ler, reaksiyon tampon ve $MgCl_2$ gibi bileşenler yer almaktadır.

RFLP:(Restriction Fragment Length Polymorphism-Sınırlı Parça Uzunluk Polimorfizmi)

Bahsi geçen diğer markör sistemlerinden farklı olarak PCR temelli olmayan ve hibridizasyon temelli kullanılan en yaygın moleküler markör tekniğidir. Teknik, DNA polimorfizminin tespitinde, restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilen DNA parçalarının jel elektoroforezinde yürütüldükten sonra nitroselüloz membran üzerine transfer edilerek kimyasal etiketli problemlerle hibridize edilmesi ve farklı DNA parçalarının ortaya çıkarılması prensibine dayanmaktadır. PCR esaslı olmayan geliştirilmiş ilk markör sistemi olan RFLP kodominant (eşbaskın) özelliktedir. Kodominant özellik bu markör sistemi sayesinde heterozigot bireylerin de karakterize edilmesini mümkün kılmaktadır (Bark ve Havey, 1995). RFLP, yüksek polimorfizme sahip, kodominant ve tekrarlanabilirliği yüksek bir tekniktir. Bunun yanı sıra, nispeten pahalı ve fazla zaman alıcı olması, fazla iş gücü gerektirmesi, yüksek miktar ve kalitede DNA ihtiyacı, yaygın olarak radyoaktif etiketleme yöntemi kullanılması gibi özellikler dezavantajları olarak sıralanabilir.

RFLP analizleri, klonal popülasyonları, heterozigotluğu, akrabalığı, coğrafi çeşitliliği, hibridizasyonu, tür sınırlarını ve 50 milyon yıl öncesine kadar değişen filogenileri analiz etmek için etkili ve nispeten ekonomik olarak kullanılabilir. RFLP analizi ile DNA dizilemeye göre birey başına daha fazla lokusun analiz edilmesi mümkündür. Bununla birlikte yüksek düzeydeki sistematik çalışmalarda nadiren tercih edilen bir yöntemdir (Dowling ve ark., 1996).

DNA Dizi Analizi:

DNA dizi analizi ya da sekanslama; bir DNA zinciri boyunca nükleotid bazlarının sırasını belirleme işlemi olarak tanımlanmaktadır. Nükleik asitler, canlıların genetik bilgisini taşıdığı için yaşamın devamlılığı için çok önemlidir. DNA dizi analizi sayesinde birçok organizmanın gen yapıları ve organizasyonu hakkında bilgi sahibi olunmuş, birçok canlı türünün de genom haritaları çıkarılmıştır. Şüphesiz moleküler sistematik alanında, türlerin moleküler karakterizasyonunda DNA dizi analizi yöntemi sayesinde büyük aşamalar kaydedilmiştir.

Kloroplast, mitokondriyal ve nüklear genom bölgeleri hedef canlının özelliğine bağlı olarak seçilerek dizi analizine tabi tutulur ve yapılan karşılaştırmalar sonucunda türlerin moleküler karakterizasyonunu mümkün hale gelir. Öncelikli olarak organizmadan uygun bir yöntemle DNA izolasyonu yapılır ve seçilen hedef gen bölgesi daha önce anlatıldığı şekilde PCR yöntemi ile çoğaltılır. Son aşamada DNA dizi analizine tabi tutulur ve çalışma sonuçlandırılmış olur. Geleneksel olarak, Sanger dideoksi yöntemi ile Maxam-Gillbert kimyasal degradasyon yöntemleri dizi analizinde kullanılmaktadır. Her iki yöntemde de DNA'nın hazırlanması, reaksiyonlar ve yüksek voltajlı jel elektroforezi olmak üzere üç temel aşama vardır.

Maxam-Gillbert dizileme yöntemi, DNA' yı kesmek için kimyasalların (Hidrazin, dimetil sülfat ya da formik asit) kullanıldığı farklı uzunluktaki DNA parçalarının oluşumu ile sonlanan bir yöntemdir. Sanger dizileme yöntemi ise enzimatik DNA sentezine dayanmaktadır.

Günümüzde otomatik dizi analizlerinin yapıldığı otomasyon kaçınılmaz olmuştur. Zira yüksek iş gücü ve zaman problemi otomasyonu zorunlu hale getirmiştir. Geliştirilmiş Sanger dizileme ekipmanının en büyük dezavantajı, maliyet ve fazla zaman tüketimiydi ve İnsan Genomu Projesi, 3 milyar dolarlık maliyeti ve 13 yıllık süresi ile bunun başlıca örneğini oluşturmuştur (Lander ve ark., 2001). Otomatik dizi analizinde de Sanger'in enzimatik DNA sentezine dayalı zincir sonlanma yöntemi kullanılmaktadır (Luckey ve ark., 1990). PCR reaksiyonunun kullanılması, DNA dizilemeyi sistematik çalışmalar için daha az zaman alıcı ve pahalı hale getirmiştir.

DNA dizi analizleri günümüzde, temel biyolojik araştırmalar, DNA genom projeleri, tıbbi teşhis, biyoteknoloji, adli biyoloji, viroloji, moleküler sistematığın de dahil olduğu birçok uygulamalı alanda vazgeçilmez hale

gelmiştir. Modern DNA dizileme teknolojisiyle elde edilen hızlı dizileme sayesinde, insan genomu, birçok hayvan, bitki ve mikrobiyal organizma gibi çok sayıda yaşam türünün tam DNA dizileri ortaya çıkarılmıştır.

İlk DNA dizileri 1970'lerin başında iki boyutlu kromatografiye dayalı yöntemler kullanılarak elde edilmiştir. Ancak floresans bazlı dizileme yöntemlerinin geliştirilmesinin ardından DNA dizilimi daha kolay ve hızlı hale gelmiştir (Pettersson ve ark., 2009). Bir genomdaki bazların sırasını bilmek, bilim adamlarının yeni araştırma alanları keşfetmesine ve genetik hastalıkların tanı ve tedavisine yönelik yeni yollar keşfetmesine, bilinmeyen canlıların keşfedilmesine ve filogenetik ilişkilerin aydınlatılmasına olanak sağlamaktadır. Moleküler sistematik çalışmalarda, belirli genlerin veya gen ailelerinin evrimini değerlendirmede, tür içindeki evrimsel değişiklikleri değerlendirmede, farklı türlerin filogenilerini oluşturmada kullanılmaktadır. Tek kopya genler, mitokondriyal (mt) DNA ve ribozomal DNA için DNA dizileri elde edilebilir. Diziler, tür içi değişkenlikten tüm organizmaların filogenisine kadar çoğu sistematik problemi incelemek için kullanılabilmektedir. Bununla birlikte, DNA dizi analizleri hala nispeten pahalı ve zaman alıcı olmayı sürdürmektedir ve çok sayıda bireyin analiz edilmesi gerekiyorsa kullanımı sınırlı olabilmektedir. Nükleer veya mt DNA dizilerinin analizi, çok büyük miktarda ayrıntılı veri sağlamaktadır. Teorik olarak incelenebilecek potansiyel karakterlerin sayısı yalnızca organizmanın DNA'sındaki nükleotid sayısı ile sınırlıdır. DNA dizileme maliyetlerinin azalması, gelecekte dizilemenin daha yaygın olarak kullanılmasına imkan sağlayacaktır.

Sonuç

Moleküler verilerin karşılaştırmalı ve evrimsel analizleri, araştırmacıların uzun zamandır çözümsüz kalan biyolojik soruların üstesinden gelmesine olanak tanımıştır. DNA ve amino asit dizilerinden faydalınarak evrimsel ilişkiler artık yeterince doğru bir şekilde modellenebilmekte ve aktarılan bilgiler geçmişi yeniden yapılandırmak için kullanılabilmektedir. Genel olarak moleküler sistematik, taksonlar arasındaki ilişkiler ve evrimsel süreçlerin tahmini için güçlü bir istatistiksel veri sağlamaktadır. Moleküler sistematik, canlı organizmaların filogenetik ilişkilerini incelemek için bir araç olarak filogenetik analizlere ihtiyaç duymaktadır. Sistematik sorulara

dayanarak uygun moleküler markörler seçilir ve analizler gerçekleştirilir. Yanlış markör seçimi filogenetik ilişkilerin yanlış yorumlanmasına yol açacaktır. Dolayısıyla problem doğru tanımlanmalı ve amaçla en uygun yöntem seçilerek çalışmalara başlanmalıdır. Özellikle spesifik gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılıp dizi analizine tabi tutulduğu ve filogenetik ağaçların oluşturulduğu çalışmalar titizlik gerektirir. Filogenetik ağaçların oluşturulması ve yorumlanmasının temeli olan uygun genetik markörlerin seçilmesi bu anlamda önemli bir kriter olarak karşımıza çıkmaktadır.

Son yıllarda moleküler sistematik alanı, biyolojik organizasyonun farklı düzeylerinde evrimsel kalıpların ve süreçlerin incelenmesi, filogenetik ilişkilerin aydınlatılması, tür içi ve türler arası polimorfizmlerin ortaya konulması, kriptik türlerin aydınlatılması, coğrafik çeşitlilik gibi konularda önemli bir araç haline gelmiştir. Bu derlemede, moleküler sistematığa ilişkin daha ileri bir bakış açısına rehberlik edebilmesi adına günümüzde moleküler sistematik alanında en yaygın olarak kullanılan yaklaşım ve metodolojilerin kısa bir özeti sunulmuştur.

KAYNAKLAR

- Ansari, S.A., Narayanan, C., Wali, S.A., Kumar, R., Shukla, N., Rahangdale, S.K. (2012). ISSR markers for analysis of molecular diversity and genetic structure of Indian teak (*Tectona grandis* Lf) populations. *Ann. For. Res.*, 55 (1): 11-23.
- Bark, O.H., Havey, M.J. (1995). Similarities and relationship among population of the bulb onion as estimated by RFLPs. *Theor. Appl. Genetics*, 90:407-414.
- Bonin, S., Petrera, F., Niccolini, B., Stanta, G. (2003). PCR analysis in archival postmortem tissues. *Journal of Clinical Pathology-Molecular Pathology*, 56(3), 184-186.
- Brumfield, R.T., Beerli, P., Nickerson, D.A., Edwards, S.V. (2003). The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends Ecol. Evol.*, 18:249-56.
- Fang, J., Zhu, X., Wang, C., Jinggui, L.S. (2016). Applications of DNA Technologies in Agriculture. *Curr. Genomics.*, 17 (4): 379-386.
- Gomez, A. (1998). Allozyme electrophoresis: its application to rotifers. *Hydrobiologia*, 387/388: 385-393.
- Hadrys, H., Balick, M., Schierwater, B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol Ecol.*, 1(1):55-63.
- Hillis, D.M., Wiens, J.J. (2000). Molecules versus morphology in systematics: conflicts, artifacts, and misconceptions. in: *Phylogenetic analysis of morphological data* (Wiens, J.J., Ed.), Smithsonian Institution Press, Washington, DC, 1-19.
- Jain, S. K., Neekhara, B., Pandey, D., Jain, K. (2010). RAPD marker system in insect study: A review. *Indian J. Biotechnol.*, 9: 7-12.
- Lander E.S., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409:860-921.
- Lewontin, R. C., J. Hubby (1966). A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amounts of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 54: 595-609.

- Liu, B.H. (1997). Statistical genomics: Linkage, mapping, and QTL analysis. CRC Press LLC, Boca Raton New York, USA, 648 s.
- Luckey J.A., Drossman H, Kostichka A.J., Mead D.A., D'Cunha J., Norris T.B., Smith L.M. (1990) High speed DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Nucleic Acids Res.*, 18:4417-4421.
- May, B. (1992). Starch gel electrophoresis of allozymes, pp. 1–27. In: *Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach*. A. R. Hoelzel, Ed. IRL Press, Oxford, UK.
- Maxon, L.R., Maxon R.D. (1990). Proteins II: Immunological techniques, pp. 127–155. In: *Molecular Systematics*. D. M. Hillis, and C. Moritz, Eds. Sinauer Assoc., Sunderland, MA.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51, 263-273.
- Page, R.D.M., Holmes, E.C. (1998). *Molecular evolution: a phylogenetic approach*, Blackwell Science, Oxford.
- Paun, O., Schönswetter, P. (2012). Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) - an invaluable fingerprinting technique for genomic, transcriptomic and epigenetic studies, *Methods Mol. Biol.*, 862: 75–87.
- Pettersson E., Lundeberg, J., Ahmadian, A. (2009). Generations of sequencing technologies. *Genomics*, 93 (2): 105-11.
- Sönmezoğlu, Ö.A., Yıldırım, A., Güleç, T.E. (2010). Tek Nükleotid Farklılıkları (Snp) ve Buğdayda Kullanımı, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 3(2): 55-66.
- Sunyaev S., Hanke, J., Aydin, A., Wirkner, U., Zastrow, I., Reich, J., Bork, P. (1999). Prediction of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in human disease-associated genes. *J. Mol. Med.*, 77, 754-760.
- Thangaraj, M., Vishruth, P., Ramesh, T., Lipton, A.P. (2011). RAPD fingerprinting and demonstration of genetic variation in three pathogens isolated from mangrove environment. *Asian J. Biotechnol.*, 3(3):269–274.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., et al. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23:4407-4414.

- Yorgancılar, M., Yakışır, E., Erkoyuncu, M.T. (2015). Moleküler Markörlerin Bitki Islahında Kullanımı, *Journal of Bahri Dagdas Crop Research*, 4 (2):1-12.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, J.A., Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176–183.
- White, M. J. D. (1973). *Animal Cytology and Evolution*. 3rd ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.