



**T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GENOM SEKANSLAMA YÖNTEMİ İLE TÜRKİYE
DENİZLERİNDE DAĞILIM GÖSTEREN İSTAVRİT
TÜRLERİNE ÖZGÜ (*Trachurus mediterraneus*, *Trachurus
trachurus*, *Trachurus picturatus*, Perciformes: Carangidae) SNP
MARKER GELİŞTİRİLMESİ**

(Doktora Tezi)

Zehra Duygu DÜZGÜNEŞ

**Danışman
Prof. Dr. Serkan GÜL
İkinci Danışman
Prof. Dr. Yusuf BEKTAŞ**

**RİZE
2025**

KABUL VE ONAY

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında, Prof. Dr. Serkan GÜL danışmanlığında, Zehra Duygu DÜZGÜNEŞ tarafından hazırlanan *Genom Sekanslama Yöntemi ile Türkiye Denizlerinde Dağılım Gösteren İstavrit Türlerine Özgü (Trachurus mediterraneus, Trachurus trachurus, Trachurus picturatus, Perciformes: Carangidae) SNP Marker Geliştirilmesi* adlı bu tez çalışması, 27/06/2025 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda oy birliğiyle/~~oy çokluğuyla~~ başarılı bulunarak jürimiz tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Ünvanı, Adı SOYADI

İmza

Başkan : Prof. Dr. Yılmaz ÇİFTÇİ

Üye : Prof. Dr. Serkan GÜL

Üye : Prof. Dr. Davut TURAN

Üye : Prof. Dr. Fatih Şaban BERİŞ

Üye : Prof. Dr. Nurhayat ÖZDEMİR

ETİK BEYAN

Biyoloji Doktora Programından mezun olmak üzere teslim ettiğim “Genom Sekanslama Yöntemi ile Türkiye Denizlerinde Dağılım Gösteren İstavrit Türlerine Özgü (*Trachurus mediterraneus*, *Trachurus trachurus*, *Trachurus picturatus*, Perciformes: Carangidae) SNP Marker Geliştirilmesi” adlı tezim, bilim ve araştırma etiği prensiplerine riayet edilerek tarafımdan yazılmıştır.

Tez çalışmamda, başka kaynaklardan aktarılan bütün bilgi ve alıntılar, Enstitünüz Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak açıkça gösterilmiştir. Kaynağı gösterilenler dışında kalan bütün bilgiler uygun araştırma yöntemi kullanılarak tarafımdan edinilmiş ve esere bu şekilde yansıtılmıştır. Şahsıma ait olmayan hiçbir bilgi, kasıt veya kusurlar, şahsıma aitmiş gibi gösterilmemiştir. İnternet kaynakları dâhil, sahibine/kaynağına atıf yapılmaksızın hiçbir bilgi kullanılmamıştır. Aksinin ortaya çıkması halinde doğacak bütün hukuki, idari, akademik ve etik sorumluluk tarafıma ait olacaktır. Eserin tesliminden sonra herhangi bir zamanda, bilim etiğine aykırılık tespit edilmesi ve / veya eserimle ilgili intihal veya intihal şeklinde anlaşılabilecek bir durumun ortaya çıkması halinde; Üniversiteniz ve eğitim kadronuzun hiçbir şekilde sorumlu tutulmayacağını hür irademle kabul, beyan ve taahhüt ederim.

27/06/2025

Zehra Duygu DÜZGÜNEŞ

ÖN SÖZ

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak hazırlanan bu çalışmada; yeni nesil sekanslama ve tek nükleotid polimorfizmi gibi yenilikçi moleküler yöntemlerle, ekonomik değere sahip olan istavrit balığı türlerine ait tür içi ve türler arası SNP markırlar geliştirilmiştir.

Tez çalışmamın başlangıcından itibaren bilgi, tecrübe ve desteğiyle bana rehberlik eden ve süreç içerisinde kurum değişikliği nedeniyle eş danışmanım olarak katkılarını sürdüren Sayın Prof. Dr. Yusuf BEKTAŞ'a ve tez danışmanlığımı devralarak çalışmamın tamamlanmasında önemli katkılar sağlayan, Sayın Prof. Dr. Serkan GÜL 'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca doktora eğitimim süresince değerli katkılarda bulunan Sayın Prof. Dr. Davut TURAN ve Sayın Prof. Dr. Fatih Şaban BERİŞ'e de teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez sürecimde akademik birikimi ve deneyimiyle bana rehberlik eden Sayın Doç. Dr. Nazlı KASAPOĞLU'na en içten teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarında gösterdiği özverili yardımlar, yol göstericiliği ve her zaman yanımda hissettirdiği manevi desteği için sevgili çalışma arkadaşım Sayın Dr. Osman Tolga ÖZEL'e, arazi çalışmalarında ve tez yazım aşamasında bilgi ve deneyimiyle bana yol gösteren değerli çalışma arkadaşım Sayın Eyüp ÇAKMAK'a ve materyal temini için desteğini esirgemeyen Sayın Dr. Merve KARAKUŞ'a gönülden teşekkür ederim. Tez çalışmasının her aşamasında bilimsel bakış açısı, yapıcı yönlendirmeleri ve karşılıksız desteği ile bir yol gösterici olan Sayın Dr. Yahya TAYHAN'a teşekkürü borç bilirim.

Her anımda yanımda olan, koşulsuz sevgileri ve sabırlarıyla bana güç veren canım aileme, bu süreçte her daim desteğini hissettiren sevgili eşime ve varlığıyla bana ilham veren biricik oğluma en derin teşekkürlerimi sunarım.

Bu doktora çalışması “Ulusal Su Ürünleri Genetik Veri Tabanı (TAGEM/HAYSÜD/Ü/23/A6/P3/6022)” projesi kapsamında Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenmiştir, teşekkürlerimi sunarım.

Zehra Duygu DÜZGÜNEŞ
RİZE/2025

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	I
ETİK BEYAN.....	II
ÖN SÖZ	III
ÖZET	VII
ABSTRACT.....	VIII
KISALTMALAR.....	IX
TABLolar LİSTESİ.....	XI
ŞEKİLLER LİSTESİ	XII
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	6
1.1. <i>Trachurus trachurus</i> (Linnaeus, 1758)	6
1.1.1. Sınıflandırılması	6
1.1.2. Morfolojisi Morfometrisi.....	7
1.1.3. Biyolojisi	8
1.1.4. Dağılımı.....	8
1.1.5. Tehdit ve Koruma Yöntemleri.....	9
1.2. <i>Trachurus mediterraneus</i> (Steindachner, 1868)	10
1.2.1. Sınıflandırılması	10
1.2.2. Morfolojisi Morfometrisi.....	10
1.2.3. Biyolojisi	11
1.2.4. Dağılımı.....	11
1.2.5. Tehdit ve Koruma Yöntemleri.....	12
1.3. <i>Trachurus picturatus</i> (Bowdich, 1825).....	12
1.3.1. Sınıflandırılması	12
1.3.2. Morfolojisi Morfometrisi.....	13
1.3.3. Biyolojisi	14
1.3.4. Dağılımı.....	14
1.3.5. Tehdit ve Koruma Yöntemleri.....	15
1.4. İstavrit Türlerinin Avcılığı ve Ekonomik Önemi.....	15
1.5. Moleküler Markırlar.....	16

1.5.1. Birinci Nesil DNA Markırlar.....	17
1.5.2. İkinci Nesil DNA Markırlar	17
1.5.3. Yeni Nesil DNA Markırlar	18
1.6. Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP) ve SNP'lerin Keşfi.....	21
1.6.1. SNP'ler ve Nokta Mutasyonları	22
1.6.2. SNP Genotipleme	23
1.6.2.1. Yüksek Verimli Sekanslama ile Genotipleme	24
1.6.2.2. Hibridizasyon Tabanlı Genotipleme	25
1.6.2.3. Enzim Tabanlı Yöntemler ile Genotipleme	26
1.6.2.4. Ligasyon Yaklaşımlı Genotipleme	28
1.6.3. SNP Genotipleme Platformları.....	29
1.7. Yeni Nesil Sekanslama (Next Generation Sequencing, NGS).....	30
1.7.1. Yeni Nesil Sekanslama Aşamaları	32
1.7.1.1. Kütüphanenin Hazırlanması	32
1.7.1.2. Çoğaltma (Amplifikasyon)	33
1.7.1.3. Sekanslama	34
1.7.1.4. Biyoinformatik Analiz	35
1.7.2. Yeni Nesil Sekanslama Yöntemleri (2. Nesil)	36
1.7.2.1. Pirosekanslama; Roche 454	36
1.7.2.2. Dönüştürülebilir Terminatör Aracılığı ile Sekanslama; Illumina	37
1.7.2.3. İyon Yarı-İletken Sekanslama; Ion Torrent	38
1.7.2.4. Parçalanabilir Ligasyon Aracılığı ile Sekanslama; ABI SOLID	39
1.7.2.5. Prob-Çapa Ligasyonu (cPAL) Sekanslaması; MGISEQ	40
1.7.3. Yeni Nesil Sekanslama Yöntemleri (3. Nesil)	41
1.7.3.1. Dönüştürülebilir Terminatör Aracılığı ile Sekanslama; HeliScope... ..	41
1.7.3.2. Real Time SMRT Metodu ile Sekanslama; Pasific Biosciences	42
1.7.3.3. Nanopore DNA Sekanslama; Oxford Nanopore	44
1.7.4. Yeni Nesil Sekanslama Yöntemlerinin Kullanım Alanları	45
1.7.4.1. Tüm Genom Sekanslama (Whole Genome Sequencing, WGS).....	46
1.7.4.2. Transkriptomik.....	47
1.7.4.3. Metagenomik	48
1.7.4.4. Tüm Ekzom Sekanslama (Whole Exome Sequencing, WES).....	49

1.7.4.5. Epigenomik.....	49
1.7.4.6. Amplikon Sekanslama	50
1.8. Çalışmanın Amacı.....	51
2. MATERYAL VE METOT	53
2.1. Örnekleme Çalışmaları.....	53
2.2. Genetik Çalışmalar.....	54
2.2.1. Toplam DNA İzolasyonu ve DNA Kütüphanesinin Oluşturulması	55
2.2.2. Nanopore Tüm Genom Sekanslama	56
2.2.3. Illumina Tüm Genom Sekanslama	59
2.3. Biyoinformatik Çalışmalar	60
2.4. SNP Tespiti ve Filtreleme	60
2.5. SNP Markır Geliştirilmesi.....	61
2.5.1. Tür İçi SNP Markır Geliştirme.....	61
2.5.2. Türler Arası SNP Markır Geliştirme	64
2.6. QPCR ile Türlerin Tespiti	64
3. BULGULAR.....	66
3.1. DNA Kütüphanesinin Oluşturulması	66
3.2. Genom Sekanslama	67
3.3. Genom Birleştirme	69
3.4. SNP tespiti.....	73
3.5. Tür İçi SNP Markır İzolasyonu ve Karakterizasyonu.....	78
3.6. Türe Özgü SNP Markır ve QPCR Tespiti.....	86
3.6.1. SYBR Green Metoduyla Tür Ayrımı	86
3.6.2. UPIP-qPCR ile Tür Ayrımı	88
4. TARTIŞMA	93
4.1. Yeni Nesil Sekanslama ve Nanopore	95
4.2. Tek Nükleotid Polimorfizmleri ve SNP Markır Geliştirilmesi	99
4.3. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) ve Tür Ayrımı	104
5. SONUÇ.....	108
KAYNAKÇA.....	109

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Anabilim Dalı : Biyoloji
Tez Türü : Doktora Tezi
Danışman : Prof. Dr. Serkan GÜL
Hazırlayan : Zehra Duygu DÜZGÜNEŞ
Yıl : 2025
Sayfa Sayısı : 126

ÖZET

GENOM SEKANSLAMA YÖNTEMİ İLE TÜRKİYE DENİZLERİNDE DAĞILIM GÖSTEREN İSTAVRIT TÜRLERİNE ÖZGÜ (*Trachurus mediterraneus*, *Trachurus trachurus*, *Trachurus picturatus*, Perciformes: Carangidae) SNP MARKER GELİŞTİRİLMESİ

Türkiye denizlerinde dağılım gösteren *Trachurus* türlerinin (*Trachurus mediterraneus*, *Trachurus trachurus* ve *Trachurus picturatus*) morfolojik olarak birbirinden ayırt edilmesindeki güçlük, türlerin karıştırılmasına ve hatalı tür adlarının kullanılmasına neden olmuştur. Bu durum tür tanımının yetersiz yapılmasından ve denizlerimizdeki bu türlerin karışık stok oluşturdıklarına ilişkin yeterli bilimsel verinin olmayışından kaynaklanmaktadır. Tür düzeyindeki bu belirsizlik, balık stoklarının yanlış yönetim stratejileriyle ele alınmasına yol açmakta ve türlerin uzun vadeli sürdürülebilirliğini tehdit etmektedir. Bu bağlamda, söz konusu *Trachurus* türlerinin doğru şekilde tanımlanmasını sağlayacak, türe özgü SNP'lerin belirlenmesi ve bu SNP'lere yönelik moleküler markır geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Çalışmamızda *Trachurus* türlerinin ayrımı için üç türün tüm genom dizi verisi alınmış ve spesifik SNP lokuslar içeren gen bölgelerine göre tür içi primerler ve türler arası primer ve probler tasarlanmıştır. Tasarlanan primer-problarla tür ayrımı başarılı bir şekilde sağlanmıştır. Bu çalışmada, evrensel problara dayalı ve ara primer tetiklemeli qPCR (UPIP-qPCR) yaklaşımı kullanılarak geliştirilen primer-prob tasarımları, stok değerlendirme çalışmalarında üç istavrit türünün karışık halde bulunduğu bölgelerin ve stokların karışım oranlarının tespitinde kullanılabilecek yeni bir analitik yöntem olarak potansiyel taşımaktadır. Sonuç olarak, balık türlerinin güvenilir şekilde tanımlanması ve potansiyel hibridizasyon durumlarının saptanmasına yönelik genetik markır geliştirilmesi, ülkemizde sürdürülebilir balıkçılık yönetimi kapsamında oluşturulmuş yasal düzenlemeler için giderek daha fazla önem arz etmektedir. Bu çalışma, yalnızca *Trachurus* türleri için değil, benzer sorunların yaşandığı diğer türler için de referans niteliğinde olacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Trachurus*, Tüm genom sekanslama, SNP, UPIP-qPCR

Recep Tayyip Erdogan University Institute of Graduate Studies

Department : Department of Biology

Thesis Type : Doctorate Thesis

Supervisor : Prof. Dr. Serkan GÜL

Author : Zehra Duygu DÜZGÜNEŞ

Year : 2025

Pages : 126

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF SNP MARKERS WITH GENOME SEQUENCING METHOD FOR *TRACHURUS* SPECIES (*Trachurus mediterraneus*, *Trachurus trachurus*, *Trachurus picturatus*, Perciformes: Carangidae) DISTRIBUTED IN TURKISH SEAS

The difficulty in morphologically distinguishing between *Trachurus* species (*Trachurus mediterraneus*, *Trachurus trachurus*, and *Trachurus picturatus*) found in Turkish seas has led to confusion between species and the use of incorrect species names. This situation stems from the inadequate definition of species and the lack of sufficient scientific data on the mixed stocks of these species in our seas. In this context, it is of great importance to identify species-specific SNPs and develop molecular markers for these SNPs, which will enable the correct identification of the *Trachurus* species in question.

In our study, whole genome sequence data of three species were taken for the differentiation of *Trachurus* species and intraspecific primers and interspecific primers and probes were designed according to gene regions containing specific SNP loci. Species discrimination was successfully achieved with the designed primers and probes. The primer-probe designs developed in this study, based on universal probes and using the intermediate primer triggered qPCR (UPIP-qPCR) approach, have potential as a new analytical method that can be used in stock assessment studies to determine the regions where three mackerel species are mixed and the mixing ratios of the stocks. In conclusion, the development of genetic markers for the reliable identification of fish species and the detection of potential hybridization states is increasingly important for legal regulations established within the scope of sustainable fisheries management in our country. This study will serve as a reference not only for *Trachurus* species but also for other species with similar problems.

Keywords: *Trachurus*, Whole genome sequencing, SNP, UPIP-qPCR

KISALTMALAR

AFLP	: Amplifiye edilmiş parça uzunluk polimorfizmi
APS	: Adenozin fosfosülfat
ASAP	: Alele özgü ilişkili primerler
ASO	: Allel özgü oligonükleotit
AS-PCR	: Allele özgü polimeraz zincir reaksiyonu
ATP	: Adenozin trifosfat
AUDP	: Tamamlayıcı DNA
CAPS	: Bölünmüş amplifiye polimorfik sekans
cDNA	: Komplementer DNA
CFET	: Kombinatorial floresan enerji transferi
CFLP	: Bölünebilir fragman uzunluk polimorfizmi
CNV	: Kopya sayısı varyasyonları
DAMD-PCR	: Yönlendirilmiş amplifikasyon mini uydu DNA-PCR
dATP	: Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	: Deoksisitozin trifosfat
dGTP	: Deoksiguanozin trifosfat
DEHA	: Dokosaheksaenoik asit
DMAS-qPCR	: Çift primerli allele-spesifik qPCR
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
DNA	: Deoksiriboz nükleik asit
DOP-PCR	: Dejenere oligonükleotid primer PCR
dsDNA	: Çift iplikli DNA
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Asit Tetrasodyum
em-PCR	: Emülsiyon PCR
EPA	: Eikosapentaenoik asit
EST	: İfade edilmiş dizi etiketi
FRET	: Floresan rezonans enerji transferi
Gb	: Giga Baz
GBS	: Sekanslama ile genotipleme
GDO	: Genetiği değiştirilmiş organizmalar
GSİ	: Genetik temelli stok tanımlama
GWAS	: Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları
HRM	: Yüksek çözünürlüklü erime analizi
IMP	: Inter-Mite polimorfizmi
IRAP	: Inter-Retrotranspozon amplifiye polimorfizmi
ISSR	: Basit diziler arası tekrarlar
ISTR	: Ters dizi etiketli tekrarlar
ITS	: Internal transkript dizileri
iFRET	: İndüklenmiş floresan rezonans enerji transferi
kb	: Kilo baz
MAAP	: Çoklu rastgele ampikon profili oluşturma
Mb	: Mega baz
MITE	: Minyatür ters-yineleme tek kullanımlık element
MSAP	: Metilasyona duyarlı amplifikasyon polimorfizm
NCBI	: Ulusal biyoteknoloji bilgi merkezi

NFW	: Nükleazsız su
NGS	: Yeni nesil sekanslama
ONT	: Oxford Nanopore teknolojisi
OP	: Oligonükleotid polimorfizmi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PPI	: Pirofosfat
QPCR	: Kantitatif PCR
QRT-PCR	: Ters transkripsiyon gerçek zamanlı PCR
QTL	: Nicel özellikli lokuslar
RAD-Seq	: Restriksiyon enzimi tabanlı sekanslama
RBIP	: Retrotranspozon tabanlı ekleme polimorfizmi
REMAP	: Retrotranspozon- Mikrosatellit amp. polimorfizmi
RFLP	: Restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmi
rhPCR	: Rnaz H-bağımlı PCR
RLGS	: Kesim işaretli genom taraması
RNA	: Ribonükleik asit
RNASeq	: RNA sekanslama
rRNA	: Ribozomal RNA
SAMPL	: Seçici amplifikasyon mikro uydu polimorfik lokuslar
SCAR	: Sekans karakterizasyonlu amplifiye bölge
SGS	: İkinci nesil DNA sekanslama
SMRT	: Tek moleküllü gerçek zamanlı
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
SNV	: Tek nükleotid varyantları
SRAP	: Sekans ile bağlantılı amplifiye polimorfizmi
S-SAP	: Sekansa özgü amplifiye polimorfizm
SSCP	: Tek iplikli konformasyonel polimorfizm
SSR	: Basit dizi tekrarları
STMS	: Dizi etiketli mikrosatellite lokusları
STS	: Dizi etiketli lokuslar
TE-AFLP	: Üç endonükleaz AFLP
TGS	: Üçüncü nesil DNA sekanslama
Tm	: Erime sıcaklığı
TM	: <i>Trachurus mediterraneus</i>
TP	: <i>Trachurus picturatus</i>
TT	: <i>Trachurus trachurus</i>
UPIP-qPCR	: Evrensel prob tabanlı ara primer tetiklemeli qPCR
VNTR	: Değişken sayılı tandem tekrarları
WES	: Tam ekzom sekanslama
WGS	: Tüm genom sekanslamasına
WT	: Vahşi tip
ZMW	: Sıfır modlu dalga kılavuzu

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. DNA onarım hazırlığı	57
Tablo 2. Barkod ligasyon karışımı	57
Tablo 3. Adaptör ligasyon karışımı.....	58
Tablo 4. Kütüphane yükleme karışımı	58
Tablo 5. Sembollerin baz karşılıkları	62
Tablo 6. Sekanslama verilerinin istatistikleri.....	67
Tablo 7. <i>T. picturatus</i> için genom birleştirme istatistikleri.....	70
Tablo 8. <i>T. trachurus</i> için genom birleştirme istatistikleri.....	71
Tablo 9. <i>T. mediterraneus</i> için genom birleştirme istatistikleri	72
Tablo 10. <i>T. mediterraneus</i> için kromozomal seviyede transisyon ve transversiyon SNP'lerin miktarları.....	74
Tablo 11. <i>T. picturatus</i> için kromozomal seviyede transisyon ve transversiyon SNP'lerin miktarları.....	75
Tablo 12. <i>T. trachurus</i> için kromozomal seviyede transisyon ve transversiyon SNP'lerin miktarları.....	76
Tablo 13. <i>T. mediterraneus</i> için tür içi SNP markır.....	79
Tablo 14. <i>T. trachurus</i> için tür içi SNP markır	80
Tablo 15. <i>T. picturatus</i> için tür içi SNP markır.....	81
Tablo 16. <i>T. mediterraneus</i> (TM), <i>T. trachurus</i> (TT), <i>T. picturatus</i> (TP) türlerindeki SNP markır özeti.....	85
Tablo 17. Türe özgü geliştirilen ve SYBR Green metoduyla tür ayrımı yapan primer dizileri	86
Tablo 18. 1. PCR primerleri.....	89
Tablo 19. 2. PCR primerleri ve problemleri	89
Tablo 20. <i>Trachurus</i> türleri için Endpoint floresan değerleri	91
Tablo 21. Temel Koordinat Analizi (PCoA)'ne göre ilk üç eksen tarafından açıklanan özdeğerleri ve varyasyon yüzdeleri	92

ŞEKİLLER LİSTESİ

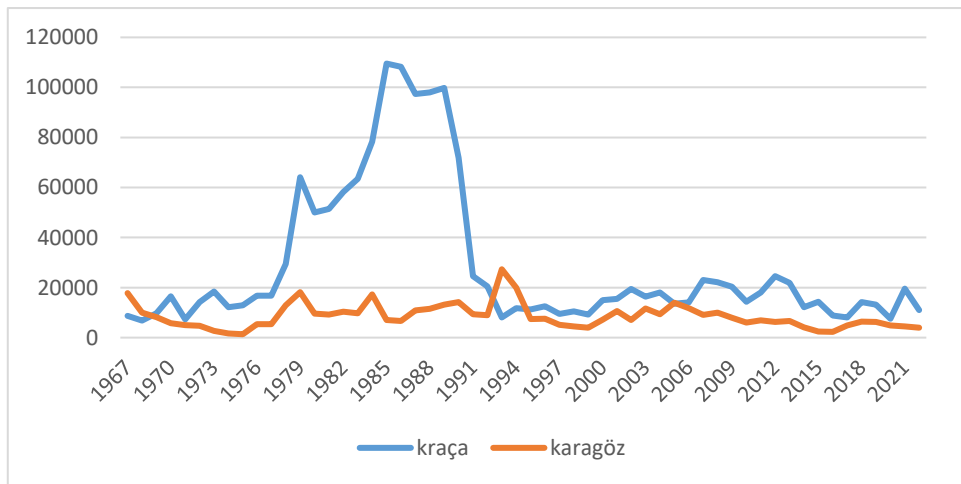
Şekil 1. Yıllara göre istavrit av miktarları	1
Şekil 2. Gemi sayısı ve av miktarı ilişkisi	2
Şekil 3. TÜİK 2019 avcılık verileri	4
Şekil 4. <i>T. trachurus</i> örnekleri.....	7
Şekil 5. <i>T. trachurus</i> 'un dağılımı.....	9
Şekil 6. <i>T. mediterraneus</i> örnekleri	10
Şekil 7. <i>T. mediterraneus</i> 'un dağılımı	12
Şekil 8. <i>T. picturatus</i> örnekleri	13
Şekil 9. <i>T. picturatus</i> 'un dağılımı	14
Şekil 10. DNA fragmanlarının adaptörlere bağlanması	33
Şekil 11. Emülsiyon PCR ve köprü PCR	33
Şekil 12. Pirosekanslama	37
Şekil 13. Illumina platformunda kullanılan katı faz amplifikasyonu	38
Şekil 14. Yarı iletken sekanslama kuyusunun ve sensörün şematik gösterimi	39
Şekil 15. Parçalanabilir ligasyon aracılığı ile sekanslama.....	40
Şekil 16. Real Time SMRT metodu ile sekanslama	43
Şekil 17. Nanopore teknolojisi kullanılarak DNA sekanslamasının şematik gösterimi	45
Şekil 18. Türlerinin ayrımı için kullanılan yanal çizgi ve pul yapıları	53
Şekil 19. Türlerin tanımlanması ve doku alımı	54
Şekil 20. Qubit ölçüm çalışmaları	55
Şekil 21. Akış hücresi yükleme çalışmaları.....	59
Şekil 22. Sekanslama metodolojisinin ve SNP tespitinin şematik diyagramı	61
Şekil 24. Geneious Prime programında örtüşme hizalaması	62
Şekil 25. Tür içi gen bölgelerinin BIOEDIT programında gösterimi.....	63
Şekil 26. Tür içi SNP markır geliştirilen gen bölgelerinin Geneious Prime (v.2024.0) programında gösterimi	63
Şekil 27. Üç tür için farklı bazların olduğu SNP bölgeleri.....	64
Şekil 28. DNA kütüphanesinin jel görüntüsü	66

Şekil 29. <i>T. mediterraneus</i> DNA kütüphanesi için Agilent 2100 boyut dağılımı parça analizörü sonucu	66
Şekil 30. <i>T. trachurus</i> için N50 değerinin hesaplandığı okuma uzunluğu histogramı	67
Şekil 31. <i>Trachurus tarachurus</i> için Oxford Nanaopore Q skor histogramı.....	68
Şekil 32. Illumina Novaseq GC içeriğinin dağılımı ve Q skor histogram.....	69
Şekil 33. İnsersiyon ve delesyon miktarları.....	73
Şekil 34. SNP sayısı ile kromozom uzunluğu arasındaki ilişki a) <i>T. trachurus</i> , b) <i>T. picturatus</i> , c) <i>T. mediterraneus</i>	77
Şekil 35. <i>T. trachurus</i> SNP bölgelerinin PCR jel görüntüleri	82
Şekil 36. <i>T. mediterraneus</i> SNP bölgelerinin PCR jel görüntüleri.....	83
Şekil 37. <i>T. picturatus</i> SNP bölgelerinin PCR jel görüntüleri.....	84
Şekil 38. SYBR Green metodu ile <i>T. mediterraneus</i> için amplifikasyon eğrisi.....	87
Şekil 39. SYBR Green metodu ile <i>T. trachurus</i> için amplifikasyon eğrisi	87
Şekil 40. SYBR Green metodu ile <i>T. picturatus</i> için amplifikasyon eğrisi.....	88
Şekil 41. 1. PCR jel görüntüsü	88
Şekil 42. <i>T. mediterraneus</i> için floresan eğrisi.....	90
Şekil 43. <i>T. picturatus</i> için floresan eğrisi.....	90
Şekil 44. <i>T. trachurus</i> için floresan eğrisi	91
Şekil 45. Endpoint değerlerinin Temel Koordinat Analizi (PCoA)	92

GİRİŞ

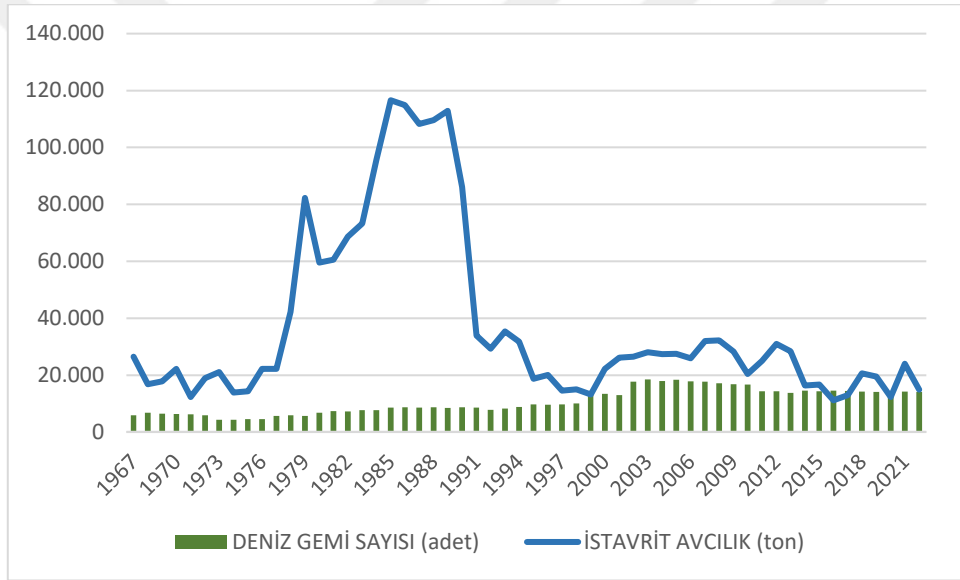
Carangidae (Perciformes) familyasına ait küçük pelajik göçmen bir balık türü olan istavrit, ılıman, tropikal ve subtropikal denizlerin kıyı ve okyanus sularında geniş bir şekilde dağılım göstermektedir (Eschmeyer, 2003). Pasifik, Atlantik, Hint okyanusu ve Akdeniz sularında yaygın bulunan istavrit türleri yüksek besin değeri ve omega-3 çoklu doymamış yağ asitleri içeriği sayesinde ekonomik olarak değerlidir ve küresel pazar talebi yıllar geçtikçe artmaktadır (Secchi vd., 2017). Artan küresel talep doğrultusunda küçük pelajik türler içinde %3'lük av oranına sahip Atlantik istavritinin (*T. trachurus*) av miktarı giderek azalma eğilimi göstermiş (Şekil 1) ve 2021 yılında 79.000 ton olarak kayıtlara geçmiştir (FAO, 2022).

Türkiye denizlerinde avcılığı yaygın olarak yapılan istavrit tüm dünyada olduğu gibi ülkemiz için de ekonomik bir türdür ve av miktarı bakımından ülkemiz avlanan deniz ürünlerinin yaklaşık %5,2'sini oluşturmakta olup, 2023 yılında toplam istavrit avcılığı 19.505 ton olarak gerçekleşmiştir. Bu miktarın 13.180 tonu kırıya (*T. mediterraneus*), 6.325 tonu ise karagöz (*T. trachurus*) olarak kaydedilmiştir (TÜİK; Türkiye İstatistik Kurumu, 2023). Diğer ekonomik pelajik türlerle (Hamsi, palamut, sardalya, lüfer) karşılaştırıldığında, istavrit yıl boyunca avlanabilir olması nedeniyle ekonomimize yıllık katkısı oldukça yüksektir ve 2023 yılı itibarıyla bu katkı (585.150.000 TL) olarak hesaplanmıştır (TÜİK, 2023).



Şekil 1. Yıllara göre istavrit av miktarları

Karadeniz, istavrit balıkçılığı açısından ülkemizdeki en önemli üretim alanlarından biri olup (Bektaş ve Belduz, 2009), Türkiye genelindeki istavrit av miktarının %70-80'i bu bölgeden sağlanmaktadır (TÜİK, 2023). Karadeniz'de en yüksek istavrit avı denizanası istilasının hemen öncesinde (1989-1990) gerçekleşmiştir. Bu durum balıkçı limanlarının sayısal artışı, balıkçılara sağlanan hibeler ve ithalat vergisi muafiyetleri ile 1970'lerin ortasından itibaren artan balıkçılık kapasitesiyle ilişkilendirilmiştir (Ulman vd., 2013). TÜİK balıkçı gemisi istatistiklerine bakıldığında o yıllarda bu artışın sebebini gemi kapasitesine bağlamak yanlış olur. Bu tabloyu gittikçe azalan stoklarımızın bir göstergesi olduğunu söyleyebiliriz (Şekil 2).



Şekil 2. Gemi sayısı ve av miktarı ilişkisi

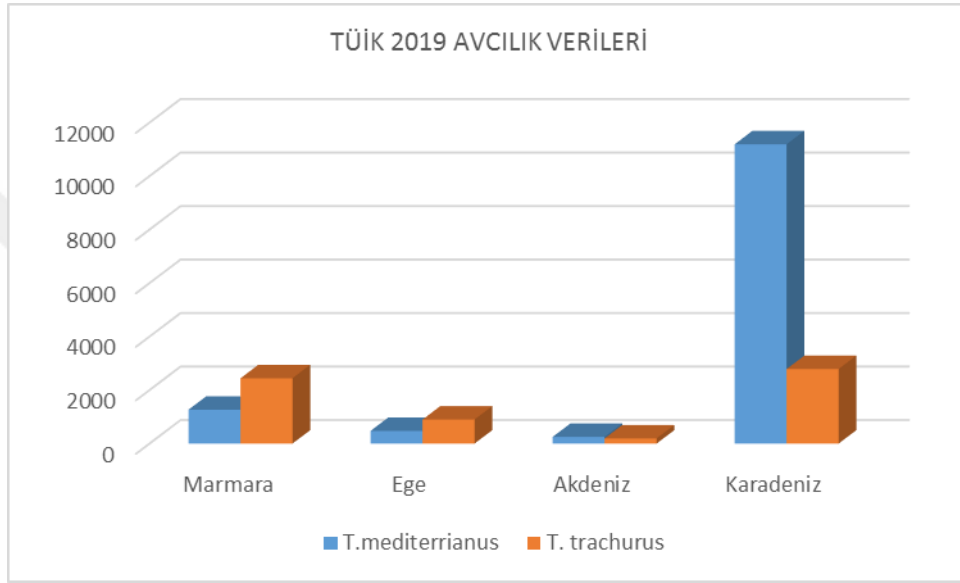
Türkiye denizlerinde *Trachurus* cinsi, Karagöz istavrit (*T. trachurus*), sarıkuyruk istavrit (*T. mediterraneus*) ve derin su istavriti (*T. picturatus*) olmak üzere üç tür ile temsil edilmektedir (Bostancı, 2009; Keskin, 2015). Bu türlerden *T. trachurus* ve *T. mediterraneus* Karadeniz ve Kuzeydoğu Akdeniz'de ticari olarak önemli iki türdür (Bektaş ve Belduz 2008, Bilecenoğlu vd., 2014, Melnikova ve Kuz'minova 2018). 1967-2023 yılları arasında elde edilen istatistiksel verilere bakıldığında Türkiye kıyısal sularında üç *Trachurus* türü bulunmasına rağmen en çok avcılığı yapılan iki tür küçük (kraça) ve büyük boy (karagöz) şeklinde kayıt altına

alınmıştır. Bu durum, karaya çıkış noktalarında türlerin morfolojik benzerlikler nedeniyle “boy” esasına göre sınıflandırıldığını ve bu türlerin aynı stok içinde değerlendirildiğini göstermektedir. Ancak bu iki tür farklı üreme boylarına sahiptir ve *T. trachurus* IUCN (Uluslararası Doğa Koruma Birliği) kırmızı listede “Hassas” (Vulnerable) kategorisinde yer almaktadır. Dolayısıyla, bu türler için sürdürülebilir balıkçılık yönetimi stratejilerinin yeniden gözden geçirilmesini gen kaynaklarının korunması noktasında büyük önem taşımaktadır.

Türkiye sularında dağılım gösteren istavrit türlerine (*T. trachurus*, *T. mediterraneus* ve *T. picturatus*) yönelik çeşitli biyoekolojik ve avcılıkla ilgili çalışma mevcuttur. Ancak bu çalışmaların sonuçları karşılaştırıldığında, istavrit türlerinin dağılım alanları ile ilgili çelişkili ifadelerin olduğu görülmektedir. Bu çelişkili ifadelerin temelinde, *Trachurus* türlerini morfolojik özelliklere göre ayırt etmenin zorluğu (Karaïskou vd., 2003) nedeniyle tür ayrımının doğru şekilde yapılamaması yatmaktadır. Demir (1961), CIESM (Akdeniz Bilim Komisyonu)’in 1960 kongre raporuna dayanarak Karadeniz’de sadece *T. mediterraneus*’un bulunduğunu, Marmara Denizi’nde ise *T. trachurus* ve *T. mediterraneus*’un birlikte görüldüğü rapor etmiştir. Benzer şekilde, Stoyanov vd. (1963), Smith-Vaniz (1986) ve Yankova vd. (2010) tarafından yapılan çalışmalar Karadeniz kıyısall sularında sadece *T. mediterraneus*’un dağılım gösterdiğini, Marmara Bölgesinde dağılım gösteren *T. trachurus*’un Karadeniz’e girişinin oldukça nadir olduğunu bildirilmiştir. Kara ve Akyol (2003) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, Türkiye sularındaki *Trachurus* türlerinin Ege, Marmara ve Karadeniz’deki dağılımını incelemiş ve *T. trachurus*’a Bandırma ile Tekirdağ sınırının batısına kadar olan sahada rastlandığını, İstanbul Boğazı kıyıları dâhil Karadeniz’de hiç rastlanmadığını bildirmişlerdir. Stoyanov (1963) ve Yankova (2008), Bulgaristan sularındaki istavriti *Trachurus m. ponticus* olarak değerlendirirken *T. trachurus*’un Karadeniz’e geçişini istisnai bir durum olarak bildirmişlerdir.

Öte yandan, *T. trachurus*’un Karadeniz’de varlığını bildiren çalışmalar da mevcuttur. Kalayci (2010), Karadeniz kıyılarında farklı av araçlarına yakalanan *T. trachurus*’un biyolojik özelliklerini incelemiştir. Durmuş (2019), Karadeniz’de dağılım gösteren *T. trachurus* bireylerinde ağır metal birikimini analiz etmiştir. Aydın ve Karadurmuş (2012) tarafından yürütölmüş olan çalışmada Orta Karadeniz’de *T. trachurus*’un büyüme, yaş ve üreme özelliklerini incelemiştir. Bilecenoğlu (2002,

2014), yayınladığı Türkiye deniz balıkları kontrol listesinde Karadeniz’de *T. trachurus* varlığına yer vermiştir. Benzer şekilde, Bat vd. (2013) tarafından Sinop ve Samsun kıyılarında yürütülen balık faunası çalışmasında da *T. trachurus*’a yer verilmiştir. TÜİK verilerine göre, Karadeniz’de 2019 yılında 2.789 ton *T. trachurus* avlanıldığı kayıtlara geçmiştir (Şekil 3). Bu miktar, önceki yıllara ve diğer bölgelere nazaran oldukça yüksek olup literatürdeki dağılım raporları ile çelişkilidir.



Şekil 3. TÜİK 2019 avcılık verileri

İstavrit av verileri, TÜİK ve Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından yapılmış olan araştırma verileri kullanılarak hazırlanmaktadır. Avcılık verileri, balıkçı beyanlarına dayalı olarak hazırlandığından ve türler net şekile ayrıştırılmadan kaydedildiğinden, ortaya konulan verilerin güvenilirliği tartışmaya açık hale gelmektedir. Ayrıca, istavrit türlerinin üreme boylarına ilişkin çalışmalar arasında fikir birliği olmaması nedeniyle su ürünleri sirkülerde yer alan yasal avlanma boyu da türler arasında belirsizlik yaratmaktadır. Akdeniz Genel Balıkçılık Komisyonu (GFCM)’nun 2019 raporuna göre *T. trachurus* için ilk üreme boyu 16 cm olarak belirlenmişken Türkiye’de *T. mediterraneus* için olduğu gibi yasal av boyu 13 cm olarak uygulanmaktadır. Bu durum, *T. trachurus*’un üreme yaşından önce stoklardan çekildiği ve popülasyonun geleceğinin tehlikeye girdiğini göstermektedir. GFCM (2018) ve FAO (2022) raporlarında, hem *T. trachurus* hem de *T. mediterraneus*’un da

aşırı av baskısı altında olduğunu ve stoklarının tükenme riskini taşıdığını vurgulamıştır.

Öte yandan, *T. picturatus*'un Türkiye denizlerindeki stok yapısı, dağılımı ve av miktarı hakkında hemen hiç çalışma bulunmamaktadır. Bu durum, özellikle stok karışım oranlarının ve av verilerinin güvenilirliğini azaltmaktadır. Bu bağlamda cevaplanması gereken bazı sorular vardır;

- Karadeniz'de *T. trachurus* dağılım göstermekte midir?
- TÜİK istavrit verilerinde, aynı üreme boy yasağı uygulanan *T. trachurus* ve *T. mediterraneus*'un ayrımı neye göre yapılmaktadır?
- Daha çok Akdeniz'de dağılım gösteren *T. picturatus* istavrit avcılık verilerinde *Trachurus trachurus* altında mı değerlendirilmektedir?
- Türkiye kıyı sularında 3 istavrit türünün dağılım alanlarının çakıştığı bölgelerde karışık stok yapısı mevcut mu? Varsa karışım oranı nedir?

Tüm bu sorular göz önünde bulundurulduğunda, sürdürülebilir balıkçılık yönetimi için ön koşul, biyolojik süreçlerin ve yönetim stratejilerinin eşgüdüm içinde olmasıdır. Bunun için popülasyonların ayrı ayrı değerlendirilmesi ve yönetilmesi gerekmektedir (Hilborn vd., 2003; Schindler vd., 2010). Genetik veriler, tür içi çeşitliliğin ve popülasyon yapısının anlaşılmasına katkı sağlayarak etkili tür tanımı ve stok yönetimi stratejilerinin geliştirilmesine katkıda bulunmaktadır (Carlsson vd., 1999; Shaklee vd., 1999; Beacham vd., 2002, 2004). Dolayısıyla, bu çalışma kapsamında genetik yaklaşımlara dayalı analizlerle istavrit türlerinin stok yapılarının belirlenmesi ve tür temelli sürdürülebilir av stratejilerinin oluşturulması amaçlanmaktadır.

1. GENEL BİLGİLER

Carangidae ailesi, dünya genelinde 31 cins ve 148 tür ile temsil edilmektedir. Bu aile üyeleri çoğunlukla ılıman ve tropikal denizlerde yayılım gösterirken; bir çok türü ticari değere sahip olup, genellikle insan tüketimi amacıyla avlanmakta ve sofralık balık olarak değerlendirilmektedir (Smith-Vaniz, 1986). Bu aile içinde yer alan *Trachurus* cinsi, dünya genelinde toplam 14 türle temsil edilirken (*T. capensis*, *T. declivis*, *T. delagoa*, *T. indicus*, *T. japonicus*, *T. lathami*, *T. longimanus*, *T. mediterraneus*, *T. murphyi*, *T. novaezelandiae*, *T. picturatus*, *T. symmetricus*, *T. trachurus* ve *T. trecae*) Türkiye denizlerinde sadece 3 tür *T. trachurus* (Linnaeus, 1758), *T. mediterraneus* (Steindachner, 1868), *T. picturatus* (Bowdich, 1825), dağılım göstermektedir.

1.1. *Trachurus trachurus* (Linnaeus, 1758)

1.1.1. Sınıflandırılması

Alem: Animalia (Hayvanlar), Şube: Chordata (Kordalılar), Alt şube: Vertebrata (Omurgalılar), İnfra Şube: Gnathostomata (Çeneli omurgalılar), Parvphylum: Osteichthyes (Kemikli balıklar), Giga sınıf: Actinopterygii (Işınsal yüzgeçli blıklar), Super sınıf: Actinopteri (Modern ışın yüzgeçli balıklar), Sınıf: Teleostei (Modern kemikli balıklar), Takım: Carangiformes (Hızlı yüzen pelajik balıklar), Aile: Carangidae (Uskumrugiller), Cins: *Trachurus*, Species: *trachurus* (IUCN, 2023).



Şekil 4. *T. trachurus* örnekleri

1.1.2. Morfolojisi | Morfometrisi

T. trachurus, hafifçe yanlardan basık ve uzamış bir vücut formuna sahiptir (Şekil 4). Gözler büyük ve adipoz (yağlı) göz kapaklarına sahiptir. Üst çene orta derecede geniştir ve gözün ön kenarının altına kadar uzanır. Dişler küçüktür ve her iki çenede de tek sıra halinde dizilmiştir. Sırt yüzgeçleri iki ayrı kısımdan oluşur: birinci sırt yüzgeci 8 sert diken, ikinci sırt yüzgeci ise bir sert diken ve bunu takip eden 29-33 yumuşak ışıktan meydana gelir. Anal yüzgeçte, esas yüzgeç ışınlardan ayrı duran iki diken bulunur; bunları bir diken ve ardından bir diken ve 24-29 yumuşak ışın izler. Dorsal ve anal ışınları bir zarla yüzgece bağlanır. Ancak sondan bir önceki ışınlardan arasındaki mesafe, bu ışınlardan uzunluğunun 1,5 katından fazla değildir. Vücut, göğüs kafesinin arkasında kalan küçük bir alan dışında genellikle sikloid (dokunulduğunda pürüzsüz) pullarla kaplıdır. Pullar orta derecede küçük olup yanal çizginin ön kısmındaki pullar genişlemiş ve arka kısımdakilere benzer yapıdadır. Bu geniş pulların maksimum yüksekliği, standart vücut uzunluğunun %6,3-8,2'si arasındadır. Yanal çizgi boyunca toplam pul sayısı 66-75 iken, bunların 31-36'sı doğrusal kısımda bulunur ve yanal çizgideki 19 ila 31. dorsal yumuşak ışınlardan altında biter. Omurga sayısı 10-14 arasında değişmektedir. Vücudun ve başın üst kısmı koyu gri, neredeyse siyah ya da mavimsi yeşil renktedir. Vücudun ve başın alt kısmın üçte ikisi genellikle

daha soluk, beyazımsı ila gümüşü renktedir. Ayırt edici olarak operkulumun üst köşesine yakın kenarında küçük siyah bir nokta bulunmaktadır (Fisher, 1987).

1.1.3. Biyolojisi

T. trachurus'un ergin bireyleri, kumlu alt tabaka ile kıyı bölgelerinde büyük sürüler oluşturur. Sürü halinde yaşayan bu tür, genellikle 100 ila 200 m derinlikteki kumlu dip bölgelerinde bulunur, ancak 500 m'ye kadar olan daha derin sularda da görülebilir. Aynı zamanda pelajiktir ve zaman zaman yüzeye yakın sularda da görülebilir. Yavru bireyler çoğunlukla yavru ringa (*Clupea harengus*) sürüleriyle birlikte görülür. Hem yavrular hem de erginler, beslenme açısından oldukça çeşitli bir diyetle sahip olup çok çeşitli pelajik ve bentik balıkların yanı sıra kabuklular ve kalamarlarla beslenir. Dişi bireyler, yaklaşık 5 mm uzunluğunda larvalara dönüşen 140.000 yumurta bırakabilir (Muus ve Nilsen, 1999) ve yumurtalar pelajiktir (Smith-Vaniz, 1986). Bu tür, Batı stoğu ve Kuzey Denizi stoğu olmak üzere iki stoğa ayrılmıştır. Batı stoğu, ilkbaharın başlarında Biskay Körfezi'nden İrlanda kıyılarına kadar uzanan kuşakta yumurtlar, kuzeye ve doğuya doğru göç ederek Güney Norveç'e ve Kuzey Denizi'nin kuzey kesimlerine ulaşır. Kuzey Denizi stoğu ise yaz aylarında güney Kuzey Denizi'nde yumurtlamakta, sonrasında Orta Kuzey Denizi, Skagerrak ve Kattegat bölgesine göç etmektedir (IUCN, 2023).

1.1.4. Dağılımı

T. trachurus, Norveç'ten Güney Afrika'nın Maputo kıyılarına kadar Kuzey ve Doğu Atlantik boyunca, Akdeniz ve Marmara Denizi ve Karadeniz dâhil olmak üzere Türkiye denizlerinde de dağılım gösterir (Şekil 5). Türün bolluğu bölgesel farklılık göstermektedir. Akdeniz'de *T. trachurus* avcılığı, Atlantik sularındaki stoklara oranla çok daha düşük seviyededir (Smith-Vaniz, 1986). En yoğun ticari avcılığı Kuzey Afrika'nın Atlantik kıyılarında gerçekleştirilmektedir (FAO, 1994). IUCN Kırmızı Listesi'nde "Hassas" (vulnerable) olarak sınıflandırılmaktadır (IUCN, 2023).



Şekil 5. *T. trachurus*'un dağılımı

1.1.5. Tehdit ve Koruma Yöntemleri

T. trachurus, yüksek ticari değeri nedeniyle trol ve gırgır gibi endüstriyel av araçlarıyla avlanmaktadır. Akdeniz'de özellikle gırgır ve dip trolü ile ve aynı zamanda el oltasıyla da avlanmaktadır. Bu tür aynı zamanda rekreasyonel balıkçılık tarafından da hedef alınmaktadır. ICES (2003), Alboran Denizi'nin güney kesiminde *T. trachurus*'un stok durumunun tamamen kullanıldığını bildirilmiştir. ICES (2005) tarafından yapılan bir değerlendirmeye göre, bu tür Akdeniz'de aşırı düzeyde, Karadeniz'de ise yoğun bir şekilde sömürülmektedir. Akdeniz'de uygulanan stok yönetiminin yetersiz kaldığı ve bu nedenle av baskısının etkin bir şekilde sınırlandırılmadığı belirtilmektedir. Bu çerçevede, tür için küresel olmayan bölgesel ölçekli sınırlı uygulanan avcılık yönetiminin etkili olmadığı ve avlanma sınırlarının net bir şekilde belirlenmesinin daha etkili bir koruma sağlayacağı önerilmektedir. Avcılık düzenlemeleri kapsamında Avrupa Birliği, *T. trachurus* için minimum yasal avlanma boyunu 16 cm olarak belirlemiştir. Türkiye'de ise bu tür için nisan ayı sonundan eylül başına kadar süren kapalı sezon ve 13 cm'lik minimum av boyu sınırı uygulanmaktadır (STECF, 2014). Ancak bu sınırın, *T. trachurus*'un biyolojik özellikleriyle tam olarak örtüşmediği, özellikle türün ilk eşeyssel olgunluk boyuna ulaşmadan avlandığı göz önüne alındığında, bu düzenlemenin popülasyonun sürdürülebilirliği açısından yetersiz olduğu değerlendirilmektedir.

1.2. *Trachurus mediterraneus* (Steindachner, 1868)

1.2.1. Sınıflandırılması

Alem: Animalia (Hayvanlar), Şube: Chordata (Kordalılar), Alt şube: Vertebrata (Omurgalılar), İnfra Şube: Gnathostomata (Çeneli omurgalılar), Parvphylum: Osteichthyes (Kemikli balıklar), Giga sınıf: Actinopterygii (Işınsal yüzgeçli blıklar), Super sınıf: Actinopteri (Modern ışın yüzgeçli balıklar), Sınıf: Teleostei (Modern kemikli balıklar), Takım: Carangiformes (Hızlı yüzen pelajik balıklar), Aile: Carangidae (Uskumrugiller), Cins: *Trachurus*, Species: *mediterraneus* (IUCN, 2023).



Şekil 6. *T. mediterraneus* örnekleri

1.2.2. Morfolojisi | Morfometrisi

T. mediterraneus, uzun, hafifçe yanlardan basık bir vücut yapısına sahiptir (Şekil 6). Büyük gözleri iyi gelişmiş adipoz göz kapakları ile çevrilidir. Üst çene, gözün ön kenarının altına kadar uzanmakta olup orta genişliktedir. Her iki çenede tek sıra halinde küçük dişler bulunmaktadır. İki sırt yüzgecinin ilki 8 diken ikincisi bir diken ve 29-35 yumuşak ışın taşırken; anal yüzgeçte, yüzgeçten ayrı duran 2 dikenin

ardından bir diken ve 26-39 arasında değişen sayıda yumuşak ışın yer alır. Sırt ve anal yüzgeçlerin son yumuşak ışınları, yüzgecin geri kalanına bir zarla bağlıdır. Ancak bu bağlantı, sondan bir önceki ışını öncekilerden ayıran mesafenin en fazla 1,5 katı uzaklıktadır. Göğüs yüzgeçlerinin uzunluğu başın uzunluğuna eşitir. Pullar orta derecede küçük, sikloid yapıdadır ve göğüs yüzgeçlerinin arkasındaki küçük bir alan hariç tüm vücutta bulunmaktadır. Yanal çizginin ön kısmındaki pullar büyüktür ve arka kısımdaki pullara benzer. Bu pulların maksimum yüksekliği, standart uzunluğun %3,3-4,3'üne eşitir. Yanal çizgideki pul sayısı 75-89 arasında değişirken, aksesuar yanalları sekizinci omurga ile üçüncü yumuşak dorsal ışın arasında sonlanır. Omur sayısı 10 ± 14 'tür. Vücudun ve başın üst kısmı koyu ila siyah veya gri ila mavimsi yeşil olup vücudun ve başın alt üçte ikisi genellikle koyu ila siyah veya gri ila mavimsi yeşil renktedir. Vücudun ve başın alt üçte ikisi genellikle daha soluk, beyazımsı ila gümüşü renktedir. Operkulumun üst köşesine yakın kenarında küçük siyah bir nokta ayırt edici morfolojik özelliğidir (Fisher, 1987).

1.2.3. Biyolojisi

T. mediterraneus'un ergin bireyleri genellikle dip sularda, bazen de yüzey sularında büyük sürüler oluşturan pelajik ve göçmen bir türdür. Sardalya, hamsi vb. balıklar ve küçük kabuklularla beslenirler. Yumurtalar pelajik olan (Smith-Vaniz, 1986) *T. mediterraneus* gonokoriktir (ayrı eşeysel) ve eşeysel dimorfizm göstermezler. Üreme ilkbahar ve yaz başında gerçekteşir (Meléndez-Vallejo vd., 2017); larvalar ise yaz sonu ve sonbahar başlarında pelajik ortamda bulunurlar (Mir-Arguimbau vd., 2019).

1.2.4. Dağılımı

T. mediterraneus Doğu Atlantik'te, Biskay Körfezi'nden Moritanya'ya kadar uzanan bölgede ve Akdeniz'de dağılım gösterir. Ayrıca Marmara, Karadeniz ve Azak Denizi'nin güney ve batı bölgelerinde de bulunur (şekil 7). IUCN Kırmızı listesi'nde "Düşük Riskli" (Least Concern) olarak sınıflandırılmaktadır (IUCN, 2023).



Şekil 7. *T. mediterraneus*'un dağılımı

1.2.5. Tehdit ve Koruma Yöntemleri

T. mediterraneus'un yerel balıkçılığa katkısı bölgeler arasında farklılık göstermektedir. Türkiye'deki toplam avın %54'ü (2.919 t) Karadeniz'de, %39'u (562 t) Marmara Denizi'nde, %4'ü (247 t) Ege Denizi'nde ve %3'ü (272 t) Kuzeydoğu Akdeniz'de gerçekleşmektedir. Aşırı avlanma nedeniyle 1988 yılında *T. mediterraneus*'un Karadeniz ve Marmara Denizi'nde toplam av miktarı neredeyse sıfıra düşmüştür (Di Natale, 2007). Doğu Orta Atlantik'te ise avcılık çoğunlukla gırgır tekneleri ve olta balıkçılığı ile gerçekleştirilmekte olup, tür temelli değil, genel Carangid grubu içinde raporlanmaktadır.

1.3. *Trachurus picturatus* (Bowdich, 1825)

1.3.1. Sınıflandırılması

Alem: Animalia (Hayvanlar), Şube: Chordata (Kordalılar), Alt şube: Vertebrata (Omurgalılar), İnfra Şube: Gnathostomata (Çeneli omurgalılar), Parvphylum: Osteichthyes (Kemikli balıklar), Giga sınıf: Actinopterygii (Işınsal yüzgeçli balıklar), Super sınıf: Actinopteri (Modern ışın yüzgeçli balıklar), Sınıf: Teleostei (Modern kemikli balıklar), Takım: Carangiformes (Hızlı yüzen pelajik balıklar), Aile: Carangidae (Uskumrugiller), Cins: *Trachurus*, Species: *picturatus* (IUCN, 2023).



Şekil 8. *T. picturatus* örnekleri

1.3.2. Morfolojisi | Morfometrisi

T. picturatus'un vücudu uzun, hafifçe yanlardan basıktır (Şekil 8). Büyük gözleri iyi gelişmiş adipoz göz kapaklarına sahip olup üst çene gözün ön kenarının altına kadar uzanmakta olup orta genişliktedir. Her iki çenede de tek sıra halinde küçük dişler bulunmaktadır. İki sırt yüzgecinin ilki 8 dikenli, ikincisi bir dikenli olup 30-35 arasında değişen sayıda yumuşak ışın içerir. Anal yüzgeç, yüzgeçten ayrı duran 2 diken, ardından bir dikenli ve 27-30 arasında yumuşak ışın taşır. Sırt ve anal yüzgeçlerin son yumuşak ışınları, yüzgecin geri kalanına bir zarla bağlı olmakla birlikte, sondan bir önceki ışını öncekilerden ayıran mesafenin 1,7 katından daha büyük bir mesafe ile ayrılmıştır. Göğüs yüzgeçlerinin uzunluğu yaklaşık olarak başın uzunluğuna eşittir. Pullar orta derecede küçük ve sikloiddir (pürüzsüz). Yanal çizginin ön kısmındaki pullar genişlemiş olup arka kısımdaki pullarla benzerlik gösterir. Bu pulların maksimum yükseklikleri, standart boy uzunluğunun %3,6-5,1'i arasındadır. Yanal çizgi boyunca toplam pul sayısı 93-100 arasında değişmekte, aksesuar yan al çizgi ise 6. ila 10. yumuşak sırt ışınlarının arasına ulaşacak şekilde sonlanmaktadır. Omur sayısı 10 + 14'tür. Vücudun ve başın üst kısmı koyu ile neredeyse siyah veya gri ile mavimsi yeşil; vücudun ve başın alt üçte ikisi koyu ile neredeyse siyah veya gri

ila mavimsi yeşil renktedir. Vücudun ve başın alt üçte ikisi genellikle daha soluk, beyazımsı ila gümüşü renktedir. Operkulumun üst köşesine yakın kenarında yer alan küçük siyah nokta dışında ayırt edici bir morfolojik işareti yoktur (Fisher, 1987).

1.3.3. Biyolojisi

T. picturatus'un ergin bireyleri, genellikle 305 ila 368 m arasında değişen derinliklerde gözlenmektedir (Mytilineou vd., 2005). Bu bireyler adalara ait şelf alanları da, kıyı ve deniz dağlarının neritik bölgelerinde sürüler oluşturarak yaşarlar. Türün Sahra kıyısı ile açık denizdeki deniz dağları arasında göç ettiği ve muhtemelen Yeşil Burun Adaları'na ulaştığı bilinmektedir (FAO 1994). Esas olarak kabuklularla beslenmektedirler ve yumurtalar pelajiktir (Smith-Vaniz, 1986)

1.3.4. Dağılımı

Bu tür, Doğu Atlantik'te Güney Biskay Körfezi'nden Güney Fas'a Azorlar, Madeira, Kanarya Adaları, Tristan de Cunha ve Gough Adaları ve Akdeniz'in batı kısmında da dağılım göstermektedir (Şekil 9). Ayrıca Akdeniz'in doğu ve batı bölgeleri ile Moritanya açıklarında da dağılım gösterdiği bildirilmiştir. IUCN Kırmızı Listesi'nde "Düşük Riskli" (Least Concern) olarak sınıflandırılmaktadır (IUCN, 2023).



Şekil 9. *T. picturatus*'un dağılımı

1.3.5. Tehdit ve Koruma Yöntemleri

T. picturatus, çoğunlukla derin sularda dip trolleri ile avlanan ticari öneme sahip bir türdür. Yavrular balık toplama cihazları (FAD) ile yakalanmaktadır. Doğu Orta Atlantik'te, bu tür için av istatistikleri ayrı olarak rapor edilmemekte; genellikle gırgır avcılığı yapılan Carangidae ailesi içinde ki diğer türlerle değerlendirilmekte ve kıyı balıkçılığı başta olmak üzere hem endüstriyel hem de olta balıkçılığı ile yakalanmaktadır. Avrupa Birliği, 2007 yılında bu türün avcılığı için minimum 15 cm uzunluk şartı getirmiştir (IUCN, 2023).

1.4. İstavrit Türlerinin Avcılığı ve Ekonomik Önemi

İstavrit türleri, besin maddeleri ve çeşitli doymamış yağ asitleri bakımından zengin, yenilebilir balık türlerinden olup dünya deniz balıkları avcılığında son derece önemli bir konuma sahiptir (Karoui vd., 2017). Küçük pelajik balıklar grubuna dahil olan istavrit türlerinin, besin zincirinin orta düzey seviyelerinde bulunmaları ve yüksek biyokütleleri nedeniyle hem ekolojik hem de ekonomik açıdan büyük öneme sahip oldukları bilinmektedir (Plounevez ve Champalbert, 2000).

Sığ sahillerden açık denizlerin 200 m derinliklerine kadar dağılım gösterebilen istavrit türlerinin (Akşiray, 1987) avcılığında ticari olarak gırgır, ortasu ve dip trolü, uzatma ağları, sade ağlar ve oltalar kullanılmaktadır (Çetin vd., 2010). Ayrıca, amatör balıkçılar tarafından da sıklıkla tercih edilmekte olup, çaparilerle kıydan veya küçük teknelerle avcılığı yapılmaktadır (Aydın vd., 2018). İstavrit türleri ekonomik ve sosyal nedenlerden dolayı nüfusun geçim kaynağı olarak doğal dağılım alanındaki ülkelerin balıkçılığı için kilit öneme sahiptir (Yankova vd., 2009). Bulgaristan'ın yaz pelajik avlarının yaklaşık %50'sini ve toplam avlarının önemli bir yüzdesini temsil eder (Yankova vd., 2009). Bu durum, istavrit türlerinin doğal dağılım alanındaki diğer ülkeler için de benzerdir. Romanya'da toplam avın yaklaşık %10'unu (Radu vd., 2013), Ukrayna balık av miktarının yine %10'unu oluşturmaktadır (Santa vd., 2015). Türkiye'de ise amatör ve profesyonel balıkçıların av sezonu süresince peşinde koştuğu istavrite halk arasında "denizin kuru fasulyesi" olarak anılmaktadır.

Düşük yağ (<1 g/100 g kas) ve yüksek PUFA ω 3 (yaklaşık %57), özellikle EPA ve DHA (yaklaşık %52) içeriği ile dikkat çeker. Lezzetli eti ve farklı tüketim biçimleri nedeniyle tüketiciler tarafından en çok tercih edilen türler arasındadır (Secci vd.,

2017). Türkiye’de 2013 yılında 28.424 ton ile en yüksek av miktarına ulaşılmışken, en düşük av miktarı 2016 yılında 11.148 ton olmuştur. 2022 yılı verilerine göre, istavrit türleri Türkiye’de avlanan deniz balıkları arasında dördüncü sırada yer almış ve toplam avın %5,86’sını oluşturmuştur (TÜİK, 2023). Bölgesel dağılıma göre en fazla avcılık Batı Karadeniz’de (6.783 ton), ardından Doğu Karadeniz (4.634 ton), Ege (1.682 ton), Marmara Denizi (1.260 ton) ve Akdeniz (570 ton) bölgelerinde gerçekleşmiştir. 2022 yılında avlanan istavritlerin tamamı karaya çıkarılmış olup, 14.905 ton insan tüketimine, 21,6 ton ise endüstriyel kullanıma yönlendirilmiştir. Balık hallerinde toptan satış fiyatları 100–167 TL arasında değişmektedir (İBB, 2023). Yoğun avlanma dönemlerinde, fiyat istikrarı amacıyla şoklama ve muhafaza tesislerinde de değerlendirilmektedir.

2000’li yıllardan günümüze dek balıkçılık üzerine yapılan araştırmalar, istavrit türlerinin dahil olduğu birçok ticari stoğun sürdürülebilir şekilde yönetilemediğini ve zaman zaman ani popülasyon düşüşlerin ve stokların çökmesinin önüne geçilemediğini vurgulamaktadırlar (Pauly, 2009). Bu nedenle istavrit türlerinin sürdürülebilirliği için biyoekolojik özelliklerinin belirlenmesi, doğal stokların izlenmesi ve moleküler temelli stok yönetimi yaklaşımlarının geliştirilmesi gerekmektedir. Türün besin zincirindeki konumu ve yıl boyu avlanabilir olması, onu hem amatör hem de profesyonel balıkçılar için stratejik önemde kılmaktadır.

1.5. Moleküler Markırlar

Moleküler markırlar, kromozom üzerinde bilinen bir konuma sahip olan genotipik veya fenotipik olarak kolayca ayırt edilebilen DNA dizileridir (Kumar, 1999). Bu markırlar, bir gen veya lokusu tanımlamak üzere bir prob olarak kullanılmakta ve genetik farklılıkların izlenmesini sağlamaktadır (King ve Stansfield 1990; Schulmann 2007).

Markırlar, genomdaki lokuslarda meydana gelen nükleotid değişikliği veya mutasyon nedeniyle ortaya çıkabilen polimorfizmi göstermektedir (Hartl ve Clark 1997) ve bireyler veya türler arasındaki genetik farklılıkları belirlemede kullanılmaktadır (Collard vd., 2005). Moleküler markırlar; genetik haritalama, ebeveyn tayini, kalıtsal hastalıklarla bağlantılı mutant genlerin tespiti, markır destekli ürün ıslahı, epidemiyolojik izleme, gıda güvenliği ve popülasyon genetik analizleri

gibi birçok farklı alanda kullanılmaktadır (Hartl ve Jones, 2005). Collard vd. (2005), genetik markırların bireyler, türler veya organizmalar arasındaki genetik varyasyonu tanımlamak için kullanıldığını belirtmektedir. Schhulmann (2007), genetik markırların kromozomal bağlantı haritalarını oluşturmak için de kullanıldığını belirtmiştir.

1.5.1. Birinci Nesil DNA Markırlar

DNA düzeyindeki varyasyonların genetik markır olarak kullanılması yönelik ilk yaklaşım, kesilmiş fragman uzunluk polimorfizmi (RFLP) tekniği ile başlamıştır (Botstein vd.,1980). Bu yaklaşım, restriksiyon enzimleriyle kesim sonucu oluşan DNA parçalarının boyutlarındaki farklılıkların, etiketli prob yardımıyla Southern Blot hibridizasyonu yoluyla görselleştirilmesine dayanır (Southern, 1975). Polimorfizmler, nükleotid dizisindeki mutasyonlar, delesyonlar, inversiyonlar ve translokasyonlardan kaynaklanmaktadır. RFLP tekniğini takiben, Değişken Sayılı Tandem Tekrarları (VNTR), Allel Spesifik Oligonükleotit (ASO), Allele Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (AS-pCR), Oligonükleotid Polimorfizmi (OP), Tek iplikli Konformasyonel Polimorfizm (SSCP) ve Dizi Etiketli locuslar (STS) gibi moleküler markırlar geliştirilmiştir. Bu markırların çoğu hibridizasyon temelli olup, PZR keşfiyle ile değişerek DNA seviyesindeki varyasyonları tespit etmek için önemli bir araç haline gelmiştir.

1.5.2. İkinci Nesil DNA Markırlar

Moleküler genetikte devrim niteliği taşıyan ikinci nesil moleküler markırlar, şimdiye kadar incelenmiş olan tüm ökaryotik organizmaların genomları boyunca dağılmış durumda olan, birbirini izleyen di-, tri-, tetra- ve penta-nükleotit tekrarlanan DNA dizileridir. Bu diziler, mikrosatellitler, Dizi Etiketli mikrosatellite lokusları (STMS) veya Basit Dizi Tekrarları (SSR) olarak adlandırılır. SSR'ler, uzunca süre genom haritalama topluluğu tarafından tercih edilen moleküler markırlar arasında kabul görmüş ve popülasyon genetiği çalışan araştırmacılar tarafından da hızlıca benimsenmiştir (Litt ve Luty 1989; Tautz 1989; Weber ve May 1989). SSR'ler, mükemmel tandem tekrarlar, kesintili tekrarlar veya başka tekrar motifleri ile bulunabilen, 1 ila 5 baz çiftinden oluşan motiflerin yaklaşık 10-50 kopyasından oluşmaktadır. Bu tekrarlanan motifler, PCR yoluyla spesifik olarak çoğaltılabilecek

şekilde uygun promotor veya tek kopya dizileri ile çevrilidir. Bu benzersiz tekrar bölgelerine özgü primerler, tek kopya ürünlerin çoğaltılması için tasarlanabilmektedir. Bu dönemde geliştirilen diğer markır sistemleri arasında, Restriksiyon İşaretli Genom Taraması (RLGS), Kesilmiş Amplifiye Polimorfik Sekans (CAPS), Dejenere Oligonükleotid Primer PCR (DOP-PCR), Tek İplik Konformasyon Polimorfizmi (SSCP), Çoklu Rastgele Amplikon Profili (MAAP) ve Sekans Karakterize Edilmiş Amplifiye Bölge (SCAR) sayılabilir (Tanaka vd., 2006; Michhelmore vd., 1991).

1.5.3. Yeni Nesil DNA Markırlar

Moleküler biyolojideki gelişmeler, çeşitli organizmalarda genomik varyasyonları tanımlamak ve kullanmak için çok sayıda moleküler aracın geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Günümüzde sıkça kullanılan yeni nesil DNA markırları; ISSR (Basit Diziler Arası Tekrarlar), SAMPL (Seçici Amplifikasyon Mikrosatellit Polimorfik Lokuslar), SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmler), AFLP (Amplifiye Edilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi), ASAP (Alele Özgü İlişkili Primerler), CFLP (Kırılabilir Fragman Uzunluk Polimorfizmi), ISTR (Ters Dizi Etiketli Tekrarlar), DAMD-PCR (Yönlendirilmiş Amplifikasyon Minisatellit DNA-PCR), S-SAP (Sekansa özgü Amplifiye Polimorfizm), RBIP (Retrotranspozon Tabanlı Ekleme Polimorfizmi), IRAP (Inter-retrotranspozon Amplifiye Polimorfizm), REMAP (Retrotranspozon- Mikrosatellit Amplifikasyonu Polimorfizm), MSAP (Metilasyona Duyarlı Amplifikasyon Polimorfizm), MITE (Minyatür Ters-Yineleme Elemanları), TE-AFLP (Üç Endonükleaz AFLP), IMP (Inter-MITE Polimorfizmler), SRAP (Sekans ile bağlantılı Amplifiye Polimorfizm) şeklinde sıralanabilir. Bu markırların uygulama teknikleri kısaca şöyledir;

ISSR markır sistemi, SSR bölgeleri arasındaki dizilerin PCR ile çoğaltılması esasına dayanan bir yöntemdir. ISSR analizi, genomik veri gerektirmez ve çok lokuslu analiz sağlar (Pradeep Reddy vd., 2002).

AFLP, restriksiyon parçalarının bir alt kümesinin, her bir ucuna bağlanmış adaptör dizilere tamamlayıcı olan oligonükleotit primerleri kullanılarak seçici olarak amplifiye edildiği multipleks PCR tabanlı bir yöntemdir. AFLP analizi, tek bir reaksiyonda 50'den fazla lokusun güvenilir şekilde tanımlanmasına olanak tanımaktadır. Bu teknik, RFLP'nin güvenilirliğini ve PCR'nin kolaylığını birleştirerek,

herhangi bir köken veya karmaşıklıkta DNA için yeni bir tiplendirme yöntemi olarak kullanılmaktadır (Mueller ve Wolfenbarger 1999).

SAMPL, bireyler arasındaki genetik polimorfizmleri tespit etmek için bileşik mikrosatellit primerlerinin kullanıldığı PCR tabanlı multipleks DNA markör sistemidir. AFLP yöntemi ile benzer, ancak nadir kesici restriksiyon enzimi kesimi ile elde edilen dizilerin yerine (CA), (TA) veya (GT), (AT) gibi mikrosatellit dizileri kullanılmaktadır (Kantety vd., 2002; Chen vd., 2006).

SNP'ler, tek bir nükleotidin değişmesi nedeniyle bireyler arasındaki polimorfizmi çözen bi-allelilik markırlardır. Bu tek nükleotid varyasyonları, nokta mutasyonları nedeniyle ortaya çıkmaktadır. SNP'lerin tespiti, yalnızca bir artı/eksi analizine ihtiyaç duymaktadır. Bu polimorfizmleri tespit etmek için hem jel temelli hem de jel temelli olmayan yöntemler kullanılmaktadır.

ASAP, RAPD'den türetilmiş, alel özgü PCR ürünleri üretmek üzere optimize edilmiş (yüksek annealing sıcaklığının muhafaza edildiği) bir PCR yöntemidir (Gu vd., 1995).

CFLP analizi, DNA'nın denatürasyonuna dayanır. Tek iplikli DNA, nükleotid dizisine özgü katlanmış saç tokası benzeri yapılar haline almaktadır. Endonükleaz Cleavase-I, tek iplikli ve çift iplikli bölgeler arasındaki bağlantıyı spesifik olarak ayırmaktadır. Parçalar 5' etiketli, elektroforetik olarak ayrılır ve görselleştirilir. Her polimorfik fragman bir mutasyonu gösterir ve bu fragmanların uzunlukları mutasyona uğramış bölge için önemli bir göstergedir (Maheswaran, 2004).

ISTR, transpozonlar gibi genomda dağılmış yüksek kopya dizilerine homolog olan oligonükleotid primerleri kullanan PCR bazlı çok lokuslu markır sistemidir. Çok lokuslu polimorfik amplifikasyon ürünleri, iki primer ile elde edilmekte ve esneyen DNA zincirinin amplifikasyonuna izin vermektedir (Maheswaran, 2004).

DAMD-PCR, minisatellit dizilerinin PCR amplifikasyonu için primer olarak kullanıldığı başka bir yaklaşımdır. Çeşitli derecelerde polimorfizm ortaya çıkardığı, tür farklılaşması ve kültür tanımlaması için kullanılabilecek DNA parmak izleri üretmektedir (Bebeli vd., 1997).

S-SAP, retro-transpozonları çevreleyen DNA'daki varyasyonun tespiti için baskın, multipleks bir işaret sistemidir. Fragmanlar, LTR'nin korunmuş terminalinden tasarlanan bir primer ve yakındaki bir restriksiyon endonükleaz bölgesinin varlığına

dayanan bir primer kullanılarak amplifiye edilmektedir. Deneysel prosedürler AFLP analizi için kullanılanlara benzemektedir. AFLP'lerle karşılaştırıldığında, S-SAP genellikle daha az fragman verir, ancak daha yüksek seviyelerde polimorfizm içermektedir (Maheswaran, 2004).

RBIP, bireysel retrotranspozonlar dışında polimorfizmlerini incelemek için Retro transpozondan ve onun yan DNA'sından tasarlanmış PCR primerlerini kullanan ortak baskın bir markırtir. İnsersiyonun varlığı veya yokluğu iki PCR ile araştırılmaktadır; birincisi retrotranspozondan bir primer ve biri komşu DNA'dan, ikincisi ise her iki komşu bölgeden tasarlanmış primerler kullanılmaktadır. Polimorfizmler, basit agaroz jel elektroforezi veya nokta hibridizasyon deneyleri ile tespit edilmektedir. Yöntemin dezavantajı, primer tasarımı için yan bölgelerin dizi verilerinin gerekli olmasıdır. Başlıca avantajı, RBIP'nin mutlaka jel bazlı bir algılama sistemi gerektirmemesi, ancak numune verimini artırmak için TaqMan veya DNA çip teknolojisi gibi jel içermeyen prosedürlere kolayca otomatikleştirilebilmesidir (Maheswaran, 2004).

IRAP, retrotranspozon yerleştirme bölgelerindeki varyasyonu inceleyen baskın, multipleks bir markırdır. İki retro transpozon arasındaki IRAP fragmanları, LTR hedef dizilerine bağlanan ve invers primerler kullanılarak PCR ile üretilmektedir. Fragmanlar, yüksek çözünürlüklü agaroz jel elektroforezi ile ayrılmaktadır (Kalendar vd., 1999).

MSAP, bir çift izo-şizomer sitozin metilasyonuna karşı diferansiyel duyarlılığını kullanan, Amplifiye Parça Uzunluğu Polimorfizmi (AFLP) yönteminin metilasyona duyarlı bir modifikasyonudur (Maheswaran, 2004).

REMAP, retrotranspozon yerleştirme bölgelerindeki varyasyonu inceleyen bir başka baskın, multipleks işaretçi sistemidir. Retrotranspozonlar ve mikrosatellit arasındaki REMAP fragmanları, bir uzun okuma tekrarı (LTR) içeren hedef dizisine dayalı bir primer ve bir basit dizi tekrar motifine dayalı bir primer kullanılarak PCR tarafından üretilir. Fragmanlar, yüksek çözünürlüklü agaroz jel elektroforezi ile ayrılır (Kalendar vd., 1999).

MITE, PCR ürünlerinin iki restriksiyon bölgesi yerine bir restriksiyon bölgesini ve sabitlenmiş primerlerden türetildiği AFLP prosedürünün bir modifikasyonu olan Transpozon Gösterimini (TD) içermektedir (Casa vd., 2000).

TE-AFLP, sadece primer uzatma ile değil, aynı zamanda seçici ligasyon ile amplifiye fragmanların sayısını azaltmasıyla geleneksel AFLP'den ayrılan bir yöntemdir. Sadece iki adaptör seti ile üç endonükleaz, tek bir reaksiyona eklenmektedir. Sonuç olarak, fragman sayısı artışı, karmaşık genomların iki aşamalı amplifikasyon ihtiyacını ortadan kaldırmaktadır (Maheswaran, 2004).

IMP, birbirine bitişik MITE'lerin Terminal Ters Çevirilmiş Tekrarlarından (TIR) tasarlanan primerlerle polimorfizmlerin ortaya çıkarıldığı yeni bir PCR tabanlı yaklaşımdır. MITE'lerin dağılımı, bilgisayar destekli veri tabanı araştırmaları ve genomik dizilerin yapısal analizi ile oluşturulabilmektedir (Chang vd., 2001).

SRAP, açık okuma çerçevelerinin (ORF'ler) amplifikasyonunu hedeflemekte ve iki primer amplifikasyonuna dayanmaktadır. 13 ila 14 baz uzunluğunda olan ve 5'-ucunda ilk 10 veya 11 bazın spesifik olmadığı bir yapıya sahip çekirdek diziler ("dolgu" dizileri), CCGG ve AATT ileri ve reverse primerler tarafından amplifiye edilmektedir (Li ve Quiros 2001).

1.6. Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP) ve SNP'lerin Keşfi

Tek nükleotid polimorfizmler (Single nucleotide polymorphism, SNP), bir türün üyeleri arasında tek bir nükleotid (A, T, G veya C) farklılık göstermesiyle ortaya çıkan bir DNA dizisi varyasyonudur. SNP'ler, hem hayvan hem de bitki genomlarında en yaygın görülen markır sistemidir ve son zamanlarda çeşitli uygulamalar için yeni nesil moleküler markırlar olarak ortaya çıkmıştır. İkili veya eş baskın statüde olduklarından, homozigot ve heterozigot aleller arasında etkili bir ayırım yapabilirler. Ayrıca, mikrosatellitlerin aksine, güçleri alel sayısından değil, değerlendirilebilecek çok sayıda lokustan gelmektedir (Foster vd., 2010). SNP'ler, genom boyunca eşit olarak dağılmamıştır, kodlamayan bölgelerde kodlayan bölgelere göre daha sıktır (Li ve Sadler, 1991). Kodlamayan bölgelerdeki SNP'ler, evrimsel çalışmalarda moleküler markırlar olarak kullanılabilir. Genomun kodlama bölgelerindeki SNP'ler ise gen fonksiyonlarını, protein yapısını veya ekspresyonunu etkileyebilir ve bu nedenle genetik hastalık çalışmalarında markır olarak kullanılırlar (Kim ve Mishra, 2007). Yeni nesil sekanslama teknolojilerindeki son gelişmeler, SNP tespitini daha rahat ve ucuz hale getirmiştir.

Daha önce, model olmayan türlerde SNP'leri tanımlamak için çok sayıda ifade edilmiş dizi etiketi (EST) madenciliği yapılmaktaydı. Benzer şekilde, EST'lerden türetilen genle ilişkili SNP'ler, bazı su ürünleri türleri de dâhil olmak üzere çeşitli balık türlerinde tanımlanmıştır. Yayın balığı (He vd., 2003), somon (Hayes vd., 2007; Campbell ve Narum, 2011; Everett vd., 2011), Atlantik morinası (Hubert vd., 2010) ve kalkan balığı (Vera vd., 2013) gibi türler için ifade edilmiş dizi etiketi (EST) veri tabanından çok sayıda SNP incelenmektedir.

Günümüzde, NGS platformu kullanılarak yapılan transkriptom analizi ve yeniden sekanslamanın, çeşitli balık türlerinde SNP'lerin belirlenmesi için etkili bir yol olduğu ortaya çıkmıştır. İlk olarak, Roche 454 sekanslama, Göl mersin balığı, *Acipenser fulvescens* (Hale vd., 2009) ve Mercan, *Acropora millepora* (Meyer vd., 2009) gibi türlerde SNP'lerin tespiti için kullanılmıştır. Transkriptom sekanslama yoluyla ise Atlantik somonu (Moen vd., 2008), Atlantik morinası (Hubert vd., 2010), Atlantik ringası (Helyar vd., 2012), sazan (Xu vd., 2012) ve kedi balığında (Liu vd., 2012) büyük miktarda SNP bildirilmiştir. Günümüzde Illumina/Solexa platformu, kalitesi ve hızı nedeniyle sekanslama için değerli bir platform olarak kabul edilmektedir (Surget-Groba ve Montoya-Burgos, 2010). Illumina'da, daha uzun okumalar ile eşleştirilmiş uçlu sekanslama yöntemi kısa transkript okumaları ile kontigleri bir araya getirme potansiyeli yaratmıştır. Transkriptom veya ekzom yeniden taraması ile büyük ölçekli SNP keşfine rağmen, genotip-fenotip ilişkilerini bulmak için esas olarak genomun kodlama bölgelerinde bulunan SNP'lere odaklanılmıştır. Bu bağlamda, genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), tanımlanan varyantları veya SNP'leri ilgilenilen özellikler/üretim veya performans özellikleri ile ilişkilendirmek için önemlidir (Korte ve Farlow, 2013).

1.6.1. SNP'ler ve Nokta Mutasyonları

Hem SNP'ler hem de nokta mutasyonları tek bir nükleotid düzeyinde genetik değişikliklerle ilgileniyor olsa da bazı temel farklılıklar vardır (Karki vd., 2015). İlk olarak, nokta mutasyonları çok daha geniş bir tanıma sahiptir. Genellikle hem kalıtsal olan hem de olmayan tek nükleotid değişiklikleri anlamına gelirken, SNP'ler özellikle kalıtsal olan nokta mutasyonlarına atıfta bulunur. Mutasyonlar zaman içinde meydana gelir, ancak anomalileri dizilerden etkili bir şekilde ortadan kaldıran kendi kendini

onarım mekanizmaları tarafından sürekli olarak izlenir ve düzeltilirler. Yalnızca gözetimden gizlenen tek mutasyonlar korunacak ve SNP'lere dönüşerek üreme hücrelerine aktarılır.

İkinci olarak, mutasyonların aksine, SNP'lerin çoğu çift alleliktir. Bu, belirli bir mutasyon bölgesinde yalnızca iki olasılık olacağı anlamına gelir; örneğin, 500. pozisyondaki mutasyona uğramış bir lokus, dizinin yalnızca A veya G olmasına izin verir. Bir olasılık, dizilerde daha az lezyon olması nedeniyle transisyonların (bi-alelik olan) transversiyonlardan (çok alelik olan) daha fazla korunması, dolayısıyla tespit edilmeme ve sonuç olarak kendi kendini düzeltmelerden kurtulma olasılıklarının daha yüksek olmasıdır. Aslında, SNP'lerin yaklaşık 2/3'ü transisyonudur (Collins ve Jukes 1994).

Üçüncü olarak, SNP'ler daha güçlü istatistiksel öneme sahiptir. SNP'ler, bir popülasyonda $>1\%$ tespit oranına sahip tek nükleotid varyasyonları olarak tanımlanmaktadır. 1% 'den daha az görülen varyasyonlar ise sadece mutasyon olarak tanımlanabilir. Popülasyonun yaklaşık 1% 'inin aynı genetik varyasyonu taşıdığı düşünüldüğünde, SNP'leri sadece genetik değil demografik çalışmalarda da önemli bir markır olarak kabul etmek yanlış olmayacaktır. SNP, fenotipik varyasyonlar ve ırklar arasındaki evrimsel farklılıklar da dâhil olmak üzere tüm popülasyonun tarihsel genetik değişimini doğru bir şekilde özetleyebilir (Norrgard ve Schultz 2008).

1.6.2. SNP Genotipleme

Genotipleme, tipik olarak, ilgilenilen SNP'ler için alel-spesifik ürünlerin üretilmesini ve ardından bunların genotip tayini için saptanmasını içerir. Sadece birkaç istisna dışında mevcut tüm genotipleme teknolojileri PCR amplifikasyon adımı gerektirir. Çoğu teknolojiye, başlangıçta özgüllük kazandırmak ve alel ayrımını takiben tespit için molekül sayısını artırmak amacıyla istenen SNP içeren bir bölgenin PCR amplifikasyonu gerçekleştirilir (Kim ve Misra, 2007).

SNP tespiti için tipik yaklaşımlar oldukça gelenekseldir. Alel ayrımı, alele özgü biyokimyasal reaksiyonlara göre değişiklik gösterir ve şu şekilde sıralanır; Yüksek verimli sekanslama ile genotipleme (Van Tassell vd., 2008), hibridizasyon tabanlı genotipleme (Howell vd., 1999), enzim tabanlı yöntemler ile genotipleme (Shi, 2018) ve ligasyon yaklaşımı ile genotipleme (Kim ve Misra, 2007).

1.6.2.1. Yüksek Verimli Sekanslama ile Genotipleme

Sekanslama, genetik varyasyonların belirlenmesi için her zaman güçlü bir araç olmuştur ve olmaya devam etmektedir. Yaygın olarak kullanılan sentez yoluyla sekanslama teknolojileri, belirli konumlardaki genetik kodların doğrudan ve yüksek verimlilikle elde edilmesini sağlar. Üç ana nesil sekanslama yaklaşımı arasında, ikinci nesil sekanslama (454 pirosekanslama, Illumina se, SOLiD sequencing vb.) ve 3. nesil sekanslama yöntemleri günümüzde en sık kullanılan yöntemlerdir. İkinci nesil sekanslama teknolojileri, yüksek okuma sayısı sayesinde küçük bir bölgede birden fazla SNP panelini tanımlayabilmekte veya daha derin sekanslama derinliği ile okuma doğruluğunu artırabilmektedir. Yüksek verimli dizi karakterizasyonuna izin veren bu yaklaşım, SNP keşfi için tercih edilen bir yöntem olmuştur. DNA sekanslamasına dayalı SNP tespiti için kullanılan başlıca yöntemlere tüm genom sekanslama, ekzom sekanslama, RNA sekanslama, metillenmiş DNA sekanslama ve restriksiyon enzimi tabanlı sekanslama (RAD-Seq) yöntemleri örnek olarak verilebilir (Beissinger vd., 2013). Bu bağlamda, Sekanslama ile Genotipleme (Genotyping by Sequencing - GBS) yöntemi, özellikle model olmayan organizmalarda genomik bilginin ortaya çıkarılması için güçlü ve ekonomik yaklaşımlardan birisidir (Kumar vd., 2016). GBS sıralaması kullanılarak, popülasyon genetiği çalışmaları, ekolojik ve koruma genetiğini kolaylaştıran etkili bir yaklaşımı temsil eden çok sayıda SNP belirteci elde edilebilir (Elshire vd., 2011; Glaubitz vd., 2014; Narum vd., 2013). GBS metodunda kullanılan enzimler, metilasyon duyarlı enzimlerdir. Böylece, metillenmiş yüksek tekrarlı genomik bölgelerdeki sekans yoğunluğu azaltılabilirken, düşük tekrarlı gen bölgelerindeki sekans yoğunluğu ise yüksek tutulabilmektedir (Gore vd., 2007). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda en yaygın kullanılan restriksiyon enzimi *ApeKI* enzimidir. *ApeKI*, retrotranspozonları seyrek sıklıkla keser ve metilasyon duyarlı bir enzimdir (Elshire vd., 2011). Restriksiyon enzimleri ile kesilen bölgelere adaptör ve barkod bağlanarak sekanslanma yapılmaktadır. Ayrıca özel barkodlama sebebiyle biyoinformatik analizlerinde hizalama (alignment) problemleri de ortadan kalkmaktadır (Gore vd., 2007). Barkod dizileri, enzimin oluşturduğu yapışkan uçlu bölgenin komplementlerini içermelidir. Barkod diziler sekanslama sırasındaki karışıklığı önlemek için birbirlerinden farklı olmalıdır. Barkodlar arasında en az 3 bp uzunlukta farklılık olmalıdır. Sekanslama sırasında belirlenmiş olan barkodlara göre

dizilerin gruplandırılması yapılarak aynı lokusta olup olmama durumuna göre “var” ya da “yok” şeklinde skorlanabilmektedir (Elshire vd., 2011).

1.6.2.2. Hibridizasyon Tabanlı Genotipleme

DNA çift sarmalları, kararlılıklarını mükemmel şekilde eşleşen baz çiftlerinden ve baz istifleme kuvvetlerinden gelen hidrojen bağlarına dayandırır. Bir uyumsuzluğun ortaya çıkması, baz istifleme ve diğer hidrojen bağlarından gelen ortak kuvvetlerin tutarlılığını kısmen zayıflatacak ve bu da erime sıcaklıkları gibi çift sarmalın termal kararlılığını bozacaktır.

Hibridizasyon yaklaşımları, allel ayrımını sağlamak için mükemmel eşleşen ve eşleşmeyen hedef-prob çiftlerini ayırt etmek için çift sarmallı DNA'nın termal kararlılığındaki farklılıkları kullanır. Bu nedenle, hibridizasyonun yalnızca mükemmel şekilde tamamlayıcı olan prob ve hedef arasında gerçekleştiği koşullar altında testler gerçekleştirmek kritik önem taşır. Genel olarak, allel ayrımındaki etkinlik probun uzunluğuna ve dizisine, SNP'nin probdaki konumuna ve hibridizasyon koşullarına bağlıdır (Kim ve Misra, 2007)

Erime sıcaklığını kullanan spesifik tekniklerden biri, PCR'dan sonra boncuklar üzerindeki örneklerin biyotinle zenginleştirilmesini içerir. Ekstra örneklerden kurtulmak için gerekli yıkama adımlarından sonra boncuklara tutturulan DNA'lar, mükemmel şekilde eşleneceği tasarlanmış oligonükleotidlerle bağlanmaya zorlanır. Bağlanmadan sonra, sıcaklık, potansiyel bölge boyunca taranır ve bir erime sıcaklığı eğrisi oluşturulur. Belirli sıcaklık noktalarındaki dikey farklılıklar analiz edilerek, her bir genotip kolayca seçilebilir ve kategorize edilebilir. Genellikle, SNP içeren bir numune normalden daha düşük erime sıcaklıklarıyla sonuçlanacaktır. Diğer bir yöntem, her bir ucunda bir florofor ve bir söndürücü bulunan önceden belirlenmiş bir probu içerir. Başlangıçta, probun her iki tarafında eşleşen dizilerden oluşan bir yığın vardır, böylece bir kök döngü oluşumuna kendi kendine hibridize olabilir. Bu konfigürasyonda, söndürücü ve florofor birbirine yakın olduğundan floresan yayılmaz. Hedef örneklerle tavlandıktan sonra, ortadaki tamamlayıcı diziler prob ile dubleks yapılar oluşturacak ve probu doğrusal bir konfigürasyona "uzatacaktır". Bu durumda, söndürücü florofordan uzakta olur ve floresan emisyonunu engelleyemez. Hedeflenen sıcaklık aralığındaki emisyon yoğunluğu farklılıkları ölçülerek SNP'ler kolayca

tanımlanabilir (Howell vd.,1999). Genel olarak, hibridizasyona dayalı yöntemler nispeten doğrudur ancak hassasiyetleri düşüktür. Bunun nedeni, belirli bir sıcaklık noktasında iki farklı genotip arasındaki dikey eğri mesafesinin sınırlı olmasıdır.

1.6.2.3. Enzim Tabanlı Yöntemler ile Genotipleme

Enzim temelli yöntemler genellikle bir enzim kullanımını içeren herhangi bir SNP tanımlama tekniğini ifade eder. Dolayısıyla, PCR'ler ve RFLP'ler gibi evrensel yöntemler bu kategoride sayılabilir (Kim ve Misra, 2007).

RFLP: Bazı SNP dizileri belirli bir tip II restriksiyon enzimi tarafından tanınabilen ve bölünebilen bir konumda bulunabilir. Bu restriksiyon parçaları genellikle jel üzerinde ayırt edici bir bant deseni oluşturur (Botstein vd.,1980). Restriksiyon enzimleri tarafından oluşturulan spesifik desenler analiz edilerek, SNP içeren aleller yüksek doğrulukla keşfedilebilir. Bununla birlikte, bu yöntem sadece SNP tanınabilir bir dizide olduğunda uygulanabilir ve bu da uygulama alanını sınırlar. Ayrıca, kesim ve jel elektroforezi için ekstra işçilik gerekmekte, bu da yüksek verimli analizi engellemektedir (Kim ve Misra, 2007).

PCR ve qPCR (Gerçek Zamanlı PCR) : Southern blotting kullanılarak yapılan klasik restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmi (RFLP) analizi dışında, büyük SNP genotipleme yöntemlerinin çoğu, SNP içeren genomik bölgenin PCR ile ön amplifikasyonuna dayanmaktadır. PCR tekniklerinin geliştirilmesi, belirli bir genomik bölgeyi doğrudan biyokimyasal tespit için uygun hale getirerek genotipleme de dâhil olmak üzere genomik analizlerde gerçekten devrim yaratmıştır (Tsuchihashi ve Dracopoli, 2002). Bu yöntemin esası, başarılı uzamalar için primerlerin 3' ucunda mükemmel bir eşleşme ihtiyacını kullanmaktır. Bu mekanizmaya dayanarak, primer çiftlerinden biri vahşi tip (WT) dizilerini, diğeri ise SNP içeren alleli hedefleyecek şekilde iki çift primer tasarlanır. Her primerin potansiyel SNP bölgelerine tam olarak hizalanan bir 3' ucu vardır. Örnekler yalnızca SNP içeren dizilerden oluşuyorsa, PCR ürünleri yalnızca mükemmel eşleşmeye sahip primer çiftinden elde edilecektir. Örnek bir WT/SNP ise, her iki primer çifti de uzayacak ve PCR ürünlerini oluşturacaktır. PCR ile SNP tespiti, bilinen belirli SNP'lerin sorgulanmasında nispeten etkilidir.

qPCR, PCR amplifikasyonunun her döngüde floresan ile izlenmesini sağlayan yüksek hassasiyetli bir tekniktir (Higuchi vd., 1993). Prosedür, polimeraz zincir

reaksiyonunun genel prensibini takip eder; anahtar özelliği, amplifiye edilmiş DNA'nın, her amplifikasyon döngüsünden sonra, gerçek zamanlı olarak reaksiyonda biriktikçe miktarının belirlenmesidir (Higuchi vd., 1993). qPCR yönteminde her reaksiyon döngüsünde floresan etiketli problemlerle ampikon birikimini saptayarak SNP bölgelerin nicelendirilmesi yapılır. DNA bağlayıcı boyalar olarak (Higuchi vd., 1993, Wittwer vd., 1997), FRET problemleri (Wittwer vd., 1997), TaqMan problemleri (Holland vd., 1991), moleküler beacon (Kostrikis vd., 1998) ve türevleri (Amplifluor, Sunrise, Amplisensor ve scorpion primerleri) (Thelwell vd., 2000) çift sarmallı problemler (Li vd., 2002), bitişik problemler (Lay ve Wittwer, 1997), iFRET (Howell vd., 2002), ile Attached Universal Duplex Probes (AUDP), evrensel template probu (Zhang vd., 2003) ve QRT-PCR (Li vd., 2006) gibi birkaç floresan sinyal reaktifli SNP analizlerinde geliştirilmiş ve uygulanmıştır.

qPCR, nükleik asitlerin tespiti ve nicelendirilmesinde en yaygın kullanılan moleküler tekniklerden biridir. Son yirmi yılda, yüksek duyarlılığı, özgüllüğü ve hızlı sonuç verme süresi nedeniyle SNP genotiplendirme uygulamalarında giderek daha popüler hale gelmiştir. Doğru SNP tespiti için çeşitli qPCR tabanlı yöntemler geliştirilmiş olup, bu yöntemler popülasyon genetiği, hastalık tanısı, ıslah programları ve su ürünleri biyolojisi gibi birçok alanda geniş uygulama olanağı sunmaktadır. qPCR tabanlı bazı yenilikçi SNP genotiplendirme yöntemleri şöyledir;

1. Evrensel Prob Tabanlı Ara Primer Tetiklemeli qPCR (UPIP-qPCR): UPIP-qPCR, SNP genotiplendirmesini evrensel bir floresan prob kullanarak basitleştirmek amacıyla geliştirilmiş yeni bir yöntemdir. Allel-spesifik primerlerin evrensel bir prob sistemiyle kombinasyonu, düşük maliyet ve esnek SNP tespiti sağlar. Bu yöntemde, ara primerler PCR ürününün 5' ucuna ortak bir dizi ekleyecek şekilde tasarlanır ve bu sekans qPCR sırasında evrensel prob tarafından tanınır. Böylece her SNP için özel prob tasarlanmasına gerek kalmaz; bu da yöntemi büyük ölçekli genotiplendirme projeleri için uygun hale getirir. UPIP-qPCR, bitki ve hayvan ıslahında başarıyla uygulanmış olup, su ürünleri genetiğinde popülasyon takibi için uyarlanabilir bir tekniktir (Li vd.,2020).

2. Çift Primerli Allel-Spesifik qPCR (DMAS-qPCR): DMAS-qPCR, her bir SNP bölgesi için iki allel-spesifik primer kullanarak SNP genotiplendirmede özgüllük ve duyarlılığı artırır. Bu primerlerden biri bir alele özgü 3' uç nükleotid içerirken,

diğeri alternatif alleli tanır. Her iki primerde de 3' uca yakın kasıtlı bir uyumsuzluk yer alır; bu durum allellerin ayrımını güçlendirir. qPCR sinyali yalnızca primer hedef DNA'ya tam olarak bağlandığında oluşur, bu da yüksek doğrulukta SNP genotiplendirme sağlar. Bu teknik, karışık popülasyonlarda birbirine çok benzeyen allellerin ayrımında özellikle kullanışlıdır ve balık ıslah programları ile genetik çeşitlilik çalışmalarında uygulanmaktadır (Lefever vd.,2019).

3. *RNaz H-bağımlı PCR (rhPCR)*: rhPCR, özgüllüğü artırmak amacıyla, ribonükleotid kalıntısı ve 3' ucunda bloke edici grup içeren modifiye primerler kullanan yenilikçi bir yöntemdir. Bu primer, yalnızca hedef DNA'ya özgül olarak bağlandığında ve *RNaz HII* enzimi tarafından ribonükleotid parçası kesildiğinde aktif hale gelir. Böylece özgül olmayan amplifikasyon önlenir ve arka plan gürültüsü önemli ölçüde azaltılır. rhPCR, karmaşık genomlarda ve çoklu genotiplendirme (multiplex) analizlerinde SNP tespiti için etkili bulunmuştur ve balık popülasyonlarında genetik varyasyon ile adaptif özelliklerin araştırılmasında güçlü bir araçtır (Beltz vd., 2018).

1.6.2.4. Ligasyon Yaklaşımlı Genotipleme

Ligasyon yaklaşımları, alel ayrımını sağlamak için ligaz enzimlerini kullanır. İki oligonükleotid tek sarmallı şablon DNA'ya mükemmel tamamlayıcılıkla hibridize olduğunda, birbirlerine bitişik olarak, ligaz enzimleri tek bir oligonükleotid oluşturmak üzere birleşir. Geleneksel ligasyon deneylerinde üç oligonükleotid probu kullanılır; bunlardan ikisi alele özgüdür ve SNP bölgesindeki şablona bağlanır (Landegren vd., 1988). Üçüncü prob ortaktır ve alele özgü probun hemen yanındaki SNP'ne bitişik şablona bağlanır. Alele özgü prob SNP bölgesine mükemmel tamamlayıcılıkla bağlanırsa, DNA ligaz onu ortak proba birleştirir. Ligasyon ürünleri daha sonra SNP pozisyonundaki baz içeriğini ortaya çıkarmak için çeşitli yollarla tespit edilir. Ligazlar 3. uçtaki uyumsuzluklara karşı daha hassas olduğundan çoğu ligasyon yönteminde 3. uçları SNP bölgelerinde olan alele özgü problemler kullanılır.

CFET (kombinatoryal floresan enerji transferi) etiketleri SNP genotiplemesi için ligasyonla birlikte kullanılmıştır. CFET etiketleri, yakın olduklarında enerji aktarabilen floresan boyalardan oluşur (Tong vd., 2001). Farklı floresan imzalarına sahip etiketler, kullanılan boyaların sayısı ve boyalar arasındaki boşluk değiştirilerek sınırlı sayıda boya kullanılarak oluşturulabilir. CFET boyaları ve ligasyon kullanan

SNP genotiplemesi için, farklı CFET etiketleriyle etiketlenmiş iki alele özgü prob kullanılır. Ortak prob, bağlanan ürünün diğer reaksiyon bileşenlerinden ayrılması için biyotinlenir. Ligasyon reaksiyonundan sonra, ürün biotin-streptavidin etkileşimi kullanılarak izole edilir ve etiket floresanına dayalı SNP genotipini belirlemek için kapiler dizi elektroforezi ile analiz edilir.

1.6.3. SNP Genotipleme Platformları

SNP genotiplemesi, genetik varyasyonları tanımlamak için SNP keşfinin aşağı yönlü uygulamasıdır. SNP uygulamaları arasında filogenik analiz, işaretleyici destekli seçim, nicel özellik lokuslarının (Quantitative trait locus, QTL) genetik haritalanması, toplu segregant analizi, genom seçimi ve genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (Genome-wide association study, GWAS) bulunur. Testin ve/veya ekipmanın maliyeti ve doğruluk düzeyi de önemli hususlar olsa da, bir SNP genotipleme testinin seçiminde SNP'lerin ve taranacak bireylerin sayısı birincil öneme sahiptir (Kumar vd., 2012).

Illumina Goldengate, 96 ila 3.072 SNP lokusunu aynı anda sorgulamadaki esnekliği nedeniyle yaygın olarak kullanılan bir genotipleme platformudur (<http://www.illumina.com/>). *HRM analizi*, birkaç ila orta sayıda SNP için uygundur ve tipik bir laboratuvar ortamında gerçekleştirilebilir. *KASPar* ve *SNPline* genotipleme sistemleri (<http://www.lgcgenomics.com/>) laboratuvar ortamında birkaç ila binlerce SNP'nin genotiplenmesi için kullanılabilir. SNPline sistemi, numune sayısı ve SNP testlerinde esneklik sağlamak için SNP-lite veya SNPline XL versiyonlarında mevcuttur (Kumar vd., 2012). Sequenom (<http://www.sequenom.com/>) tarafından geliştirilen *iPLEX Gold* teknolojisi, genotipleme için primer uzatma kimyası ve matris destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon (MALDITOF) kütle spektrometrisini kullanan MassARRAY sistemine dayanmaktadır (Griffin 1997). *iPLEX Gold* sistemi, yüksek hassasiyeti ve uygun maliyetli uygulaması nedeniyle kabul görmüştür. *Affymetrix GeneChip* dizileri ve *Illumina BeadChips* gibi yüksek verimli çip tabanlı genotipleme deneyleri, tüm genom boyunca reaksiyon başına bir milyona kadar SNP'i doğrulama yeteneğine sahiptir (Kumar vd., 2012). *SNPlex* ve *BeadARRAY*, floresan temelli genotipleme kullanan orta ila yüksek verimli teknolojilerdir. *BeadARRAY* aynı anda 96 örnekte 1500'den fazla SNP'nin multipleks analizi için kullanılabildiği gibi birkaç örnekte daha az sayıda SNP'nin analizi için de kullanılabilir. Her iki teknoloji de

genom çapında çalışmalar veya aday genlerdeki SNP'lerin incelenmesi için özelleştirilebilir (Kim ve Misra, 2007).

Infinium ve *Goldengate* gibi dizi tabanlı teknolojiler, SNP genotipleme verimliliğini önemli ölçüde geliştirmiştir. Ancak bunlar türe özgüdür, tasarımı pahalıdır ve özel ekipman ve kimyasal gerektirir. *KASPar* ve *Taqman* gibi PCR ve primer uzatma teknolojileri, düşük SNP verimleri ile sınırlıdır, ancak birkaç SNP'li çok sayıda genotipi test etmek için faydalı olmaktadır. NGS teknolojileri, genotipleme çalışmaları için uygun hale gelmiştir ve maliyet ve verimlilik açısından diğerk genotipleme yöntemlerine göre avantajlar sunabilmektedir.

Balıklar söz konusu olduğunda, bugüne kadar az sayıda SNP ip dizisi geliştirilmiştir. Bu SNP dizileri, varyantları veya SNP'leri, duplikasyon veya delesyonları tanımlama kapasitesine sahiptir. Son zamanlarda, hibridizasyon prensibine dayanan Illumina, Affymetrix, vb. tarafından iSelect veya Bead array gibi SNPs array platformları ile Atlantik somonunda, *Salmo salar*, çiftlik balıkları ve vahşı balıklar arasındaki genetik farklılıkları elde etmek için 7 bin SNP belirtecinden oluşan SNP dizisi geliştirilmiştir (Karlsson vd., 2011). Hayvanlarda, Bovine3K BeadChip (3K), SNP BovineHD BeadChip ve SNP Axiom Genome-Wide BOS Array (Affymetrix) mevcuttur ve bunlar çiftlik hayvanlarında genomik araştırmalara bir örnek oluşurmaktadır (Dassonneville vd., 2011). Kanal kedi balığında, genom çapında ilişkilendirme çalışmaları için Affymetrix Axiom genotipleme platformu kullanılarak 250k SNP dizisi veya çipi geliştirilmiştir (Liu vd., 2014). Son zamanlarda, genomik seleksiyon programı için yabani ve çiftlik balıkları arasında Affymetrix Axiom dizi platformu kullanılarak yüksek yoğunluklu SNP genotipleme dizisi geliştirilmiştir (Houston vd., 2014; Yanez vd., 2016).

1.7. Yeni Nesil Sekanslama (Next Generation Sequencing, NGS)

İlk insan genom projesi sonrasında maliyetleri düşük ve hızlı, NGS teknolojilerine olan talep büyük ölçüde artmıştır. Bu talep, ikinci nesil sekanslama yöntemlerinin veya yeni nesil sekanslamanın (NGS) geliştirilmesine yol açmıştır. NGS platformları, tek bir numuneden milyonlarca DNA molekülünü aynı anda sıralandığı büyük ölçekli paralel sekanslama sağlar.

Yeni nesil sekanslama (NGS) teknolojilerindeki son gelişmeler, ekoloji, koruma, balıkçılık genetiği ve benzeri dahil olmak üzere birçok araştırma alanında genomik yaklaşımların uygulanmasını kolaylaştırarak genom sekanslama hızını büyük ölçüde geliştirmiştir (Hudson, 2008; Harismendy vd., 2009; Allendorf vd., 2010; Ekblom ve Galindo, 2011; Dudgeon vd., 2012). NGS'deki yüksek verimli sekanslama yöntemleri, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) gibi yüksek çözünürlüklü bir genetik analiz için çok sayıda hassas belirtecin tanımlanmasını sağlayan son derece büyük veri koleksiyonlarıyla sonuçlanabilir (Ekblom ve Galindo, 2011).

NGS, genom, transkriptom, epigenom, varyasyon gibi çeşitli özellikleri sorgulamak için geliştirilmiştir. Illumina ABI, 454 Pacific bio. gibi NGS teknolojileri herhangi bir organizmanın yüksek verimli genom sekanslaması için büyük umutlar vadetmeye devam etmektedir. Su ürünleri için genom düzeneklerinin mevcudiyeti ve yeni nesil sekanslama cihazlarından büyük miktarda dizi verisi elde etme yeteneği, çoğu genetik markırların, özellikle SNP'lerin ve küçük indellerin verimli bir şekilde tanımlanmasına olanak sağlamaktadır (Baird vd., 2008).

Birinci ve ikinci nesil DNA sekanslama (Second generation sequencing, SGS) teknolojileri genomik alanında devrim yaratan bir yol açmıştır. Bununla birlikte üçüncü nesil DNA sekanslama (Third generation sequencing, TGS) teknolojileri, mevcut sekanslama teknolojilerine yenilikçi, verimli ve daha az maliyet gerektiren bir zemin oluşturarak genom sekanslama çalışmaları için yeni fırsatlar sunmuştur. Üçüncü nesil tek zincir molekül sekanslama teknolojisi, daha uzun sekanslama ve okuma için potansiyel oluştururken, aynı zamanda maliyeti düşürmekte ve bütün bunlar mevcut sekanslama için harcanan vakti fazlasıyla azaltmaktadır. Küçük bir DNA parçasından çok sayıda DNA'nın üretilmesi tekniği olan PCR metoduna dayalı ya da PCR tekniklerinden köken almış 2. nesil DNA sekanslama teknolojilerinden farklı olarak, 3. nesil DNA dizilime teknolojileri, sekansı yapılacak olan DNA parçasının ya da komple bir DNA şablonunun, katı bir yüzeye tutturularak ya da sabitlenerek veya bir gözenek hattı boyunca hareketi sağlanarak, sentez safhasında çeşitli teknolojiler sayesinde görüntülenmesi, tanınması, tekrardan okunarak uzama zincirlerine eklenmesi esasına göre çalışmaktadır (Quail vd., 2012). Böylece PCR metodlarında karşılaşılan pek çok sorunun üstesinden gelindiği görülmüştür. Daha da önemlisi üçüncü nesil sekanslama teknolojisi yüksek DNA polimeraz işlevi ile yüksek katalitik

oranlarda çalışma potansiyeline sahip olmasıyla DNA sekanslama esnasında, okuma oranını on bazdan on binlerce baza yükseltirken harcanan zamanı günlerden saatlere hatta dakikalara indirmektedir (Rajesh ve Jaya 2017).

Üçüncü nesil sekanslama teknolojilerinin avantajları;

- Daha yüksek verim,
- Daha hızlı geri dönüş süresi
- Uzun okuma oranları (hatta tüm kromozom),
- Küçük miktarlarda başlangıç materyali
- Düşük maliyetli olmasıdır.

Üçüncü nesil sekanslama teknolojisi 3 farklı kategoride ele alınır.

- Dönüştürülebilir Terminatör Aracılığı İle Sekanslama; HeliScope
- Real Time SMRT Metodu ile Sekanslama; Pasific Biosciences
- Nanopore DNA Sekanslama; Oxford Nanopore

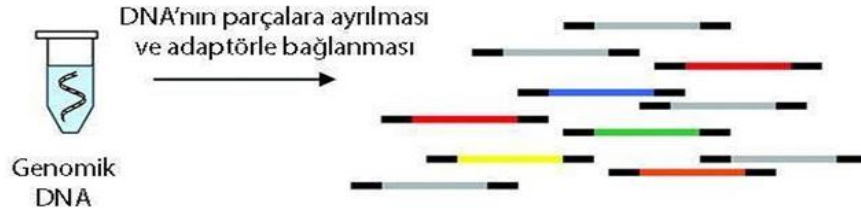
1.7.1. Yeni Nesil Sekanslama Aşamaları

1.7.1.1. Kütüphanenin Hazırlanması

Dizilenecek DNA'nın boyu uzadıkça bazların okuma hassasiyeti düşmekte ve sekanslamadaki hata payı artmaktadır. Bu nedenle DNA kütüphaneleri için uygun boyutta kalıp hazırlanmalıdır. Sekanslama kütüphaneleri, DNA (veya cDNA) örneğinin parçalanması ve adaptör dizilerinin (bilinen bir dizinin sentetik oligonükleotidleri) DNA parçalarının uçlarına bağlanmasıyla oluşturulur (Grada ve Weinbreccht 2013).

DNA, kullanılacak teknolojinin izin verdiği boyutlara küçültmek için fiziksel (akustik kesme ve sonikasyon), enzimatik (spesifik olmayan endonükleaz *DNase I* veya transposaz etiketleme reaksiyonları) ve kimyasal yöntemlerden hangisi uygunsa o yöntemle küçük parçalara ayrılır.

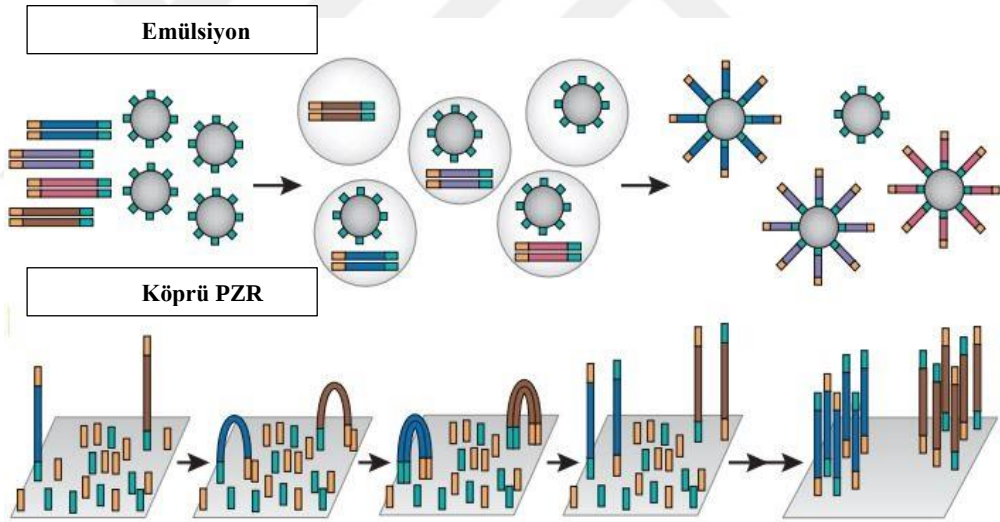
Platforma özgün kısa adaptörler uygun boyuttaki fragmanların uçlarına bağlanır. Bu adaptörler, kütüphane fragmanların hem amplifikasyonu hem de dizilenmesi için başlangıç dizilerini sağlamaktadır (Şekil 10).



Şekil 10. DNA fragmanlarının adaptörlere bağlanması

1.7.1.2. Çoğaltma (Amplifikasyon)

Zincire eklenen her bir yeni nükleotidin güvenilir olarak belirlenebilmesi için yeterli amplifikasyon ve ışık sinyal yoğunluğuna sahip olması gerekmektedir. Bu işlem emülsiyon PCR (em-PCR) veya köprü PCR (Bridge PCR) ile yapılmaktadır (Şekil 11).



Şekil 11. Emülsiyon PCR ve köprü PCR

Emülsiyon PZR (em-PCR):

Emülsiyon PCR, NGS tabanlı sekanslama platformlarında amplifikasyon için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. EmPCR'nin temel prensibi, yağ içinde su emülsiyonu oluşturarak her su damlacığının tek bir DNA molekülü içermesini

sağlamak ve bu damlacıkları bir mikro-PCR reaktörü olarak kullanmaktır (Shao vd., 2011).

DNA fragmanları, manyetik streptavidin kaplı mikroküreciklere adaptör dizileri yardımıyla bağlanır. PCR bileşenleri (DNA polimeraz, primerler ve dNTP'ler) bu mikroreaktörlerde yer alır ve 35 ile 55 döngü boyunca amplifikasyon gerçekleşir. Sonrasında, izopropil alkol ve deterjan kullanılarak boncukları çevreleyen kürelerin yapısı parçalanır (emülsiyon bozulur). DNA kopyaları, santrifüjleme yapılarak boncuklardan ayrılır ve sekanslama işleminin gerçekleştirileceği platforma (mikro kuyucuklara veya bağlanacakları cam yüzeye) aktarılır (Shendure ve Ji, 2008).

Köprü PCR (Bridge PCR);

Köprü PCR, katı bir yüzeye bağlı adaptör oligonükleotidlerin kullanıldığı lokalize amplifikasyon tekniğidir. Kalıp DNA, adaptör oligonükleotid dizilere bağlandıktan sonra çift sarmallı DNA denatüre edilir ve çift halde adaptör ve tamamlayıcı oligolar ile kaplanmış akış hücresine DNA fragmanı eklendiğinde, hücre yüzeyindeki oligolardan birine hibritleşir. Akış hücresindeki oligonükleotidler sentez için başlangıç dizisini oluştururken DNA polimeraz, tamamlayıcı DNA ipliğini, yani ters ipliği sentezleyerek iplik boyunca hareket eder, geri kalan ters iplik daha sonra katlanır ve adaptör bölgesi akış hücresi üzerindeki tamamlayıcı oligo ile hibritleşir. Polimeraz, bu sefer ters ipliğe bağlanır ve tamamlayıcı ipi oluşturur ve böylece işlem polimeraz ile uzatma ve formamid ile denatürasyon döngülerinin dönüşümlü olarak yapılmasıyla milyonlarca lokalize amplifikasyonla sonuçlanır (Shendure ve Ji, 2008).

1.7.1.3. Sekanslama

Yeni Nesil DNA Sekanslama Yöntemleri biyokimyasal temele dayalı olarak 2'ye ayrılır.

1. Sentez Aracılığıyla Sekanslama (2. Nesil)
 - Pirosekanslama; Roche 454
 - Dönüştürülebilir Terminatör Aracılığı ile Sekanslama; Illumina
 - İyon Yarı-İletken Sekanslama; İon Torrent
2. Ligasyon Aracılığı ile Sekanslama (2. Nesil)
 - Parçalanabilir Ligasyon Aracılığı ile Sekanslama; ABI SOLID

- Prob-Çapa Ligasyonu (cPAL) Sekanslama; MGISEQ
3. Tek Zincir Sekanslama (3. Nesil)
- Dönüştürülebilir Terminatör Aracılığı ile Sekanslama; HeliScope
 - Real Time SMRT Metodu ile Sekanslama; Pasific Biosciences
 - Nanopore DNA Sekanslama; Oxford Nanopore

1.7.1.4. Biyoinformatik Analiz

DNA sekanslama teknolojileri ile %100 doğru sekanslama sonucuna varmak olasılığı oldukça düşüktür. Bu yüzden, DNA diziliminde olası hataları telafi etmek için genomdaki her baz aynı anda tekrar tekrar dizilenmektedir. Sekanslama tamamlandıktan sonra, ham dizi verileri birkaç analiz adımından geçmelidir. NGS verileri için genelleştirilmiş bir veri analizi, adaptör dizilerini ve düşük kaliteli okumalarının kaldırılmasını, verilerin bir referans genomla eşleştirilmesini veya dizi okumalarının *de novo* hizalanmasını içermektedir. Hizalama işleminde, DNA dizilimleri karşılaştırılarak aradaki benzerliklere ya da uyumsuzlıklara bakılmakta ve buna göre düzenleme yapılmaktadır. Birleştirme işleminde, çok sayıda DNA okuması alınarak birbirleri ile uyuşan alanlar (çakışan kısımları üst üste getirilerek) belirlenmektedir. Bu okumalar birbirleriyle karşılaştırılarak aynı DNA dizilimini paylaşan gruplar birleştirilir ve zincirin tamamı tespit edilir.

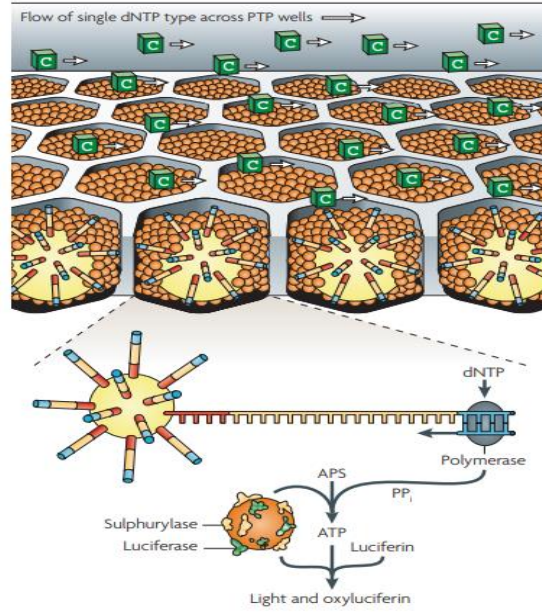
Dizinin analizi, SNP'lerin veya indellerin (bazların eklenmesi veya silinmesi) tespiti, yeni genlerin veya düzenleyici elemanların tespiti ve transkript ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi dahil olmak üzere çok çeşitli biyoinformatik değerlendirmeleri içerebilmektedir. Elde edilen verilerin hızlı ve hassas bir şekilde değerlendirilmesi için her platformun kendine ait yazılımının kullanılarak hizalama ve birleştirme işlemlerin yapılması gerekmektedir. Aynı zamanda dizi verilerini başarılı bir şekilde analiz etmek için gerekli biyoinformatik araçlar ücretsiz çevrimiçi ve yazılım paketi halinde de mevcuttur (Gogol-Döring ve Chen, 2012).

1.7.2. Yeni Nesil Sekanslama Yöntemleri (2. Nesil)

1.7.2.1. Pirosekanslama; Roche 454

Pirosekanslama tekniği sentez yoluyla sekanslama prensibine (Hyman, 1988; Melamede, 1985) ve DNA sentezi sırasında açığa çıkan pirofosfatın (PPi) tespitine dayanmaktadır (Ronaghi, 2001). Pirosekanslama olarak adlandırılan DNA sekanslama teknolojisi yöntemi 454 Life Sciences tarafından geliştirilmiş ve daha sonra Roche Diagnostics tarafından ticarileştirilmiş ve yaygın olarak “454 pyrosequencing” olarak tanınmıştır (Margulies vd., 2005). Sentez sırasında nükleik asit dizilerini doğru bir şekilde tespit etmek için dört enzim serisi kullanır (Şekil 12). Bu yöntemde 4 enzim; DNA Polimeraz I'in Klenow fragmanı (Klenow vd., 1970), ATP sülfürlaz (Segel vd., 1987), Lusiferaz (Deluca, 1976) ve Apiraz (Komoszynski vd., 1996) yer almaktadır. Reaksiyon karışımı ayrıca enzim substratları adenosin fosfosülfat (APS), d-lusiferin ve DNA polimeraz için başlangıç materyali olarak kullanılacak bağlanmış bir primer içeren sekanslama şablonu içerir. Pirosekanslamada sekanslama primeri, tek sarmallı DNA biyotin etiketli şablona hibridize edilir ve enzimlerle karıştırılır; Dört deoksiniükleotid trifosfat (dNTP), reaksiyon karışımına yinelemeli olarak ayrı ayrı eklenir. Reaksiyon, polimeraz tarafından nükleotid birleşmesinin bir sonucu olarak inorganik PPi'nin salındığı bir nükleik asit polimerizasyon ile başlar. Her nükleotid birleştirme olayını, birleştirilen nükleotid miktarına eşit miktarda inorganik pirofosfat (PPi) salınımı takip eder (Nyren ve Skarpnack, 2001).

Daha sonra salınan PPi, APS varlığında ATP sülfürlaz tarafından kantitatif olarak ATP'ye dönüştürülür. Üretilen ATP, lusiferaz aracılı lusiferinin oksilusiferine dönüşümünü sağlar ve ATP miktarıyla orantılı miktarlarda görünür ışık üretir. Lusiferaz katalizli reaksiyonda maksimum ışık 560 nanometre dalga boyunda bir foton oluşur. Daha sonra bu foton kamera gibi bir foton algılama cihazı tarafından algılanır. Apiraz, reaksiyon karışımındaki ATP ve reaksiyona girmeyen dNTP'leri sürekli olarak parçalayan bir nükleotid parçalayıcı enzimdir. Bozunmanın tamamlanması için her nükleotid dağıtımı arasında belirli bir zaman aralığı (genellikle 65 saniye) vardır. Bu nedenle dNTP eklemesi teker teker yapılır (Gharizadeh vd., 2007). Dahil edilen her bir dNTP'nin sinyalleri, her bir oyuktaki kalıp fragman dizisini belirler ve elde edilen sinyallerin birleşik verileri, tüm fragmanların dizi okumasını üretir (Ronaghi, 2001).



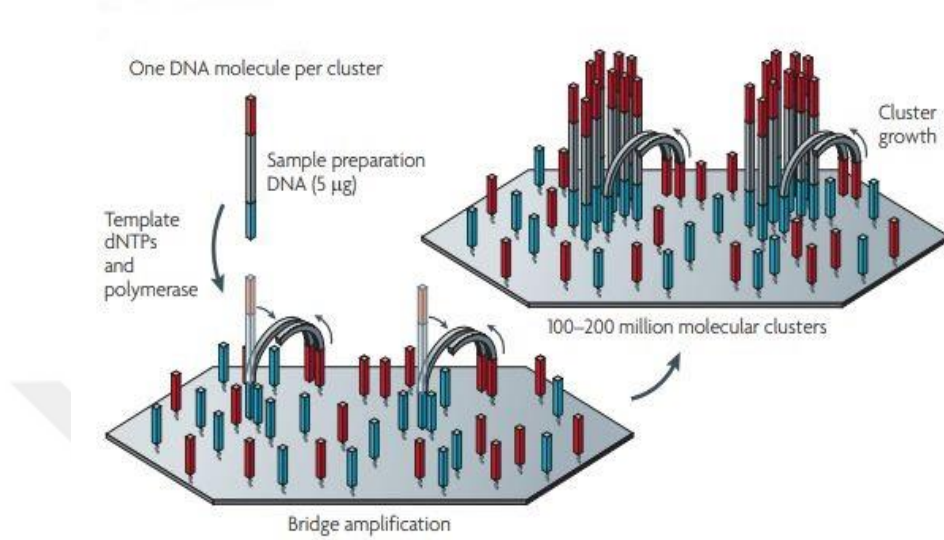
Şekil 12. Pirosekanslama

1.7.2.2. Dönüştürülebilir Terminatör Aracılığı ile Sekanslama; Illuminia

Dönüştürülebilir terminasyon sekanslama teknolojisi ilk olarak Colombia Üniversitesi'nden Dr. Jingyue Ju tarafından rapor edilmiştir (Li, vd., 2003). Bu yaklaşım ile geleneksel Sanger sekanslama yöntemi arasındaki temel farklar, birincisinin primer uzantısını tersine çevrilebilir şekilde sonlandırmak için modifiye nükleotid analogu kullanması, ikincisinin ise primer uzantısını tersine çevrilemez şekilde sonlandırmak için dideoksinükleotid kullanmasıdır (Guo vd.,2010)

Dönüştürülebilir terminasyon sekanslama teknolojisi, bir şablonun dizisini kademeli primer uzamasıyla ortaya çıkaran bir sentez yoluyla sekanslama yaklaşımıdır (Shendure, 2008; Guo vd., 2010). Illumina platformunda ikinci nesil sekanslama teknolojisi olarak popüler hale gelmiştir. Genel tersinir sonlandırma sekanslama süreci (i) sekanslama şablonlarının ve primerlerin katı bir destek üzerinde hareketsiz hale getirilmesini; (ii) primerin bir nükleotid uzatılmasını ve sonlandırılmasını; (iii) birleştirilmemiş nükleotidlerin yıkanmasından sonra birleştirilen nükleotidi tanımlamak için uzatılmış nükleotid tarafından taşınan floroforun renginin tanınmasını; (iv) floresan etiketin ve 3'-O bloklama grubunun çıkarılmasını; (v) tekrar

yıkama ve yukarıda belirtilen adımların (ii- iv) tekrarlanmasını içerir. Tüm süreç uzatma-sonlandırma-koparma-uzatma döngüsü olarak özetlenebilir (Şekil 13).



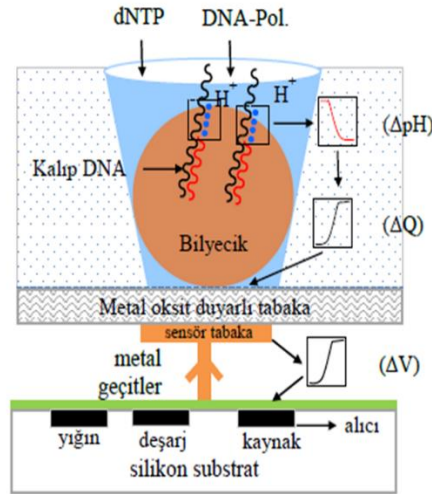
Şekil 13. Illumina platformunda kullanılan katı faz amplifikasyonu

1.7.2.3. İyon Yarı-İletken Sekanslama; Ion Torrent

2010 yılında Rothberg ve arkadaşları, Pourmand vd. (2002) çalışmasına dayanan ve sekans verilerini elde etmek için floresan sinyallerden ziyade elektrik sinyallerine dayanan yeni bir sekanslama platformu olan Ion Torrent'i geliştirmiştir.

İyon yarı iletken DNA sekanslama metodu, DNA zinciri polimerizasyonu esnasında açığa çıkan H^+ iyonlarının belirlenmesi temeline dayanmaktadır (Şekil 14). Metot Emülsiyon PCR kullanılarak boncuklar üzerinde klonal olarak çoğaltılan adaptör bağlanmış bir fragman kütüphanesi ile aynı kütüphane hazırlama adımlarının kullanılmasını içerir. Önceden belirlenmiş bir nükleotid akışı ile astarlanmış bir DNA kalıbı üzerinde nükleotidleri birleştirmek için bir DNA polimeraz kullanılır. Ancak odak noktası PPI'den nükleotid birleşmesinin diğer yan ürünü olan hidrojen iyonuna kaydırılmasıdır. Emülsiyon PCR'den elde edilen zenginleştirilmiş boncuklar bir iyon çipi üzerindeki küçük kuyucuklarda (her biri serbest protonları tespit edebilen bir sensörle donatılmıştır) biriktirilir. DNA polimeraz, DNA şablonuna nükleotid ekledikçe hidrojen iyonları serbest kalır ve ortaya çıkan serbest proton kayması sensör

tarafından algılanarak bir elektrik sinyaline dönüştürülür (Stranneheim ve Lundeberg 2012). Eşleşmemiş dNTP molekülleri bir sonraki döngü başlamadan önce reaksiyondan uzaklaştırılır. Eklenen dNTP uzayan zincirin kalıp DNA'daki karşılığı değil ise nükleotid eklenmeyecek ve biyokimyasal reaksiyon gerçekleşmediğinden pH değişimi olmayacaktır (Rusk, 2011).



Şekil 14. Yarı iletken sekanslama kuyusunun ve sensörün şematik gösterimi

1.7.2.4. Parçalanabilir Ligasyon Aracılığı ile Sekanslama; ABI SOLID

Bu teknikte DNA kaplı boncuklar rastgele bir şekilde bir cam lam üzerine bırakılır ve boncukları kaplayan hedeflere eklenen bir 3' modifikasyonu ile lam yüzeyine tutturulur. Zincirleme ligasyon ile sonraki sekanslamada, tek nükleotidler yerine sekiz nükleotidden oluşan oligomerler ve oktamerler tespit problemleri olarak kullanılır. Her oktamer, 3' ucunda bilinen iki baz ve ardından üç dejenere nükleotid ve evrensel nükleotidler olarak adlandırılan diğer herhangi bir nükleotide hibridize olabilen üç nükleotid içerir. Her biri dört oktamer tarafından taşınan ve bilinen iki bazın tüm olası kombinasyonlarını kapsayan toplam 16 oktamerden oluşan bir prob seti dört spektral boya kullanılarak işaretlenir. Boya her bir oktamerin 5' ucuna bağlanır (Şekil 15). İlk sekanslama döngüsünü başlatmak için DNA kaplı boncuklar bir sekanslama primeri, 16 oktamer probu ve ligaz ile inkübe edilir. Sadece mükemmel şekilde hibridize olmuş bir prob ligaz tarafından sekanslama primerine birleştirilir. Problar ilk iki bazın kodunu çözmek için görüntülenir ve ardından son üç 5' bazını

Probes

Cleavage site Fluorescent dye

probe
3' GG nnn zzz 5'

probe
3' GA nnn zzz 5'

probe
3' AT nnn zzz 5'

probe
3' TC nnn zzz 5'

Universal bases
Degenerate bases
Template 2nd base
Template 1st base

Di-base Probes

3' nnn zzz 5'

3' nnn zzz 5'

3' nnn zzz 5'

3' nnn zzz 5'

Cleavage Site

TEMPLATE
2nd Base

A C G T

A C G T

1st Base

		Ligasyon Problemleri						
Dizileme Primerleri 3' -5'		1	2	3	4	5	6	7
p1	#G-C-C-A-T-A-G-T	1,2	6,7	11,12	16,17	21,22	26,27	31,32
p1-1	#G-C-C-A-T-A-G	-1,1	5,6	10,11	15,16	20,21	25,26	30,31
p1-2	#G-C-C-A-T-A		4,5	9,10	14,15	19,20	24,25	34,35
p1-3	#G-C-C-A-T		3,4	8,9	3,14	18,19	23,24	33,34
p1-4	#G-C-C-A		2,3	7,8	12,13	17,18	22,23	32,33

1.7.2.5. Prob-Çapa Ligasyonu (cPAL) Sekanslaması; MGISEQ

Yöntem, dönen daire replikasyonunu kullanarak genomik DNA'nın küçük parçalarını DNA nanotopları haline çoğaltmak ve daha sonra nükleotid dizisini

belirlemek için ligasyon yoluyla zincirsiz sekanslamaya dayanmaktadır. Bu yöntem bir defada çok sayıda DNA nanotoplarının dizilenmesini sağlar.

Dizilenecek DNA 500 baza kadar parçalanır ve her genomik parçaya restriksiyon enzimleriyle tekrarlanan kesme ve molekül içi ligasyon yoluyla dört adaptör eklenir. Elde edilen halkalar daha sonra çözelti içinde, orijinal halkaların tekrarlanan kopyalarından oluşan ve DNA nanoball adı verilen tek iplikli DNA sarmallarına yükseltilir (Fire ve Xu,1995). DNA nano topları daha sonra düzlemsel bir yüzey üzerindeki sıralı noktalara rastgele bağlanır. Her nokta yalnızca bir DNA nano topu içerecek kadar küçüktür. Zincirsiz ligasyon yoluyla sekanslama yaklaşımı, adaptör bölgelerini bulmak için çapa problemleri ve dokuz baz (nonamer) ve dört boyadan oluşan tespit problemleri kullanır. Çapa probu ve saptama probu, her döngüde bir bazın kodunu çözmek için hibridizasyon ve ligasyon yoluyla birleştirilir. Nano toplar, her bir adaptör bölgesinin her iki tarafında, her seferinde bir nükleotid olmak üzere deşifre edilebilir. Kısaca, bir çapa oligonükleotid dört adaptörden birine hibridize edilir ve her biri spektral olarak farklı bir boya taşıyan dört prob, adaptöre bitişik bir baz konumunu sorgulamak için kullanılır. Boya, nonamer probda belirli bir pozisyonda bilinen bir baza bağlanırken, pozisyonların geri kalanı dejenere nükleotidler tarafından doldurulur. Probdaki bilinen bazın pozisyonunun değiştirilmesi, adaptöre bitişik DNA şablonundaki 1-5 pozisyonlarının okunmasını sağlar. İki çapa probunun bağlanmasıyla genişletilmiş bir çapa probunun oluşturulması, adaptöre bitişik 6-10 pozisyonlarının kodunun çözülmesini sağlar. Çapa prob kompleksi, her hibridizasyon ve ligasyon reaksiyonunun floresan tespitinden sonra çıkarılır. Bu, sistemi sıfırlar. Dolayısıyla, her baz çağrısı zincirden ayrılır, böylece dizi kalitesi artar çünkü kodu çözülen her baz önceki döngülerin eksiksizliğinden bağımsızdır. Tüm prosedür daha sonra her adaptör bölgesinin her iki tarafı için tekrarlanır ve elde edilen 10-mer, 35 baz çift uçlu okumalar halinde birleştirilir (Drmanac vd., 2010).

1.7.3. Yeni Nesil Sekanslama Yöntemleri (3. Nesil)

1.7.3.1. Dönüştürülebilir Terminatör Aracılığı ile Sekanslama; HeliScope

Helicos Biosciences 2008 yılında ilk tek moleküllü DNA dizileyicisi olan Heliscope dizileyici sistemini tanıtmıştır (Efcaivitch ve Thompson, 2010) ve 2009'da

bir insan genomunun ilk tek molekülle sekanslamasında kullanılmıştır (Pushkarev vd., 2009). Sistem, düzlemsel bir yüzey üzerinde immobilize edilmiş DNA ile bir SBS yaklaşımında etiketli tersinir zincir sonlandırıcı nükleotidler kullanır (Bowers, vd., 2009)

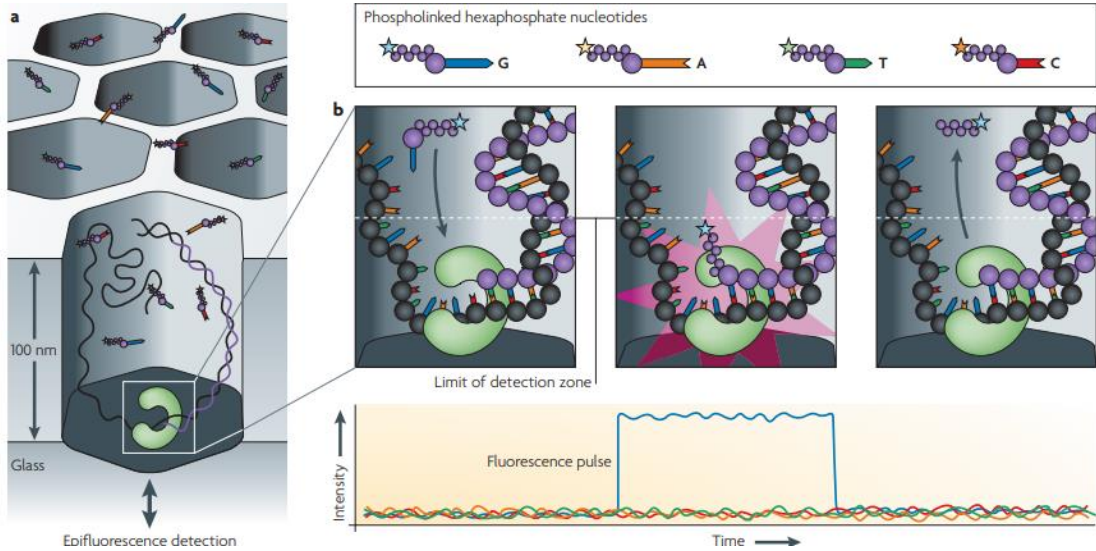
Bu teknik, denatüre DNA örneklerinin katı bir yüzeye yapıştırılan oligonükleotid primerlerin hibridizasyonu ile sabitlenmesine ardından evrensel primer ile astarlanan denature DNA fragmanların floresan işaretli nükleotidle sentezlenmesine ve sentez yoluyla dizilenmesine dayanan bir tekniktir. DNA, 100-200 baz çiftli parçalara bölünür ve ardından poli-A kuyrukları (adaptör) DNA fragmanlarının uçlarına eklenir. Sekanslama için hedeflenen DNA molekülleri tek kullanımlık oligo-dT-50 oligo nükleotidlerle kaplanmış cam akış hücreleri üzerinde doldurularak hibridize edilir. Bu DNA molekülleri cam akış yüzeyinde ayrı ayrı DNA iplikleri olarak yakalanır. Sentez ve sekanslama için gerekli reaktifler (Bir sonraki nükleotid eklenmesini sonlandırıcı floresan nükleotidler ve polimeraz karışımı) ile akış hücrelerine yüklenir. Doldurmanın ardından nükleik asit kalıpları, floresan etiketli dCTP, dGTP ve dATP Terminator nükleotidlerinin eklenmesiyle yerine sıkışarak kilitlenir. Nükleotid birleşmesi, bir DNA polimeraz kullanılarak, tek tek büyüyen DNA ipliklerinde tamamlayıcı konumda gerçekleşir. Birleşmemiş nükleotidler akış hücresi aracılığıyla uzaklaştırılır. Akış hücresi yüzeyi daha sonra bir lazerle aydınlatılır ve flüoresan ışık emisyonu ile birleşme tespit edilir. Görüntüler yakalandıktan sonra, sonlandırıcı parça, bir sonraki tamamlayıcı nükleotidin müteakip eklenmesine izin verecek şekilde dâhil edilmiş nükleotidden ayrılır. Bu adım, her kalıbın sentez yoluyla sekanslama reaksiyonu için kullanılabilir olmasını sağlar. Floresan molekül daha sonra kesilir ve işlem, parçalar tamamen dizilenene kadar tekrarlanır (Thompson ve Steinmann, 2010).

1.7.3.2. Real Time SMRT Metodu ile Sekanslama; Pasific Biosciences

Platform, DNA yerine DNA polimerazın immobilizasyonu, sentez sürecinin gerçek zamanlı izlenmesi ve birkaç kilobaz DNA'nın potansiyel okuma uzunlukları dahil olmak üzere birçok ilginç yeni özellik sunmuştur (Eld vd.,2009)

Tek molekülle gerçek zamanlı (Single molecule realtime, SMRT) sekanslama, sıfır modlu dalga kılavuzu (zero mode waveguide, ZMW) adı verilen bir nanoyapının

altındaki bir biyotin-streptavidin bağlantısı yoluyla immobilize edilmiş prosesif bir DNA polimeraza dayanır (Korlach vd., 2010). Bu yapı kritiktir çünkü ~100 zeptolitrelilik (100×10^{-21} L) sınırlı bir optik gözlem alanı sağlayarak arka plan karmaşasının en aza indirilmesini, paralelleştirmeyi ve tek molekül DNA polimerizasyonunun izlenmesini mümkün kılar. DNA şablonunun, fosfat zincirine bağlı floresan etiketlere sahip primer ve nükleotidlerin varlığında ZMV'ye yayılmasına izin verilir (Şekil 16). DNA polimeraz DNA şablonuna kilitlenir ve belirgin şekilde etiketlenmiş nükleotidleri birleştirmeye başlar. DNA dizisi, DNA şablonu tarafından dikte edilen her nükleotid birleştirme olayının kaydedilmesiyle belirlenir. Birleştirilen nükleotidler, optik algılama hacminde serbestçe yayılan nükleotidlerden daha uzun süre kalır ve yüksek konsantrasyondaki etiketli nükleotidlerin oluşturduğu arka plan gürültüsünün gerçek nükleotid birleştirme olaylarından ayrılmasını kolaylaştırır. Fosfat zincirine bağlı etiket uzama süreci sırasında ayrılır. Polimerazlar ZMW'ler arasında rastgele sabitlenir, bu da sadece üçte birinin tek bir polimeraz tarafından işgal edilmesine yol açar. ZMW'lerin geri kalanı ya boştur ya da iki veya daha fazla polimeraz içerir, bu da ZMW dizisinin potansiyel kapasitesini önemli ölçüde azaltır. SMRT sekanslama, esas olarak indellere yol açan tüm birleşmelerin tespit edilememesi nedeniyle yüksek hata oranlarına sahiptir (Eld vd., 2009, Schadt vd., 2010).



Şekil 16. Real Time SMRT metodu ile sekanslama

SMRT sekanslama yaklaşımı, benzersiz özellikleri ve hızlı sekanslama reaksiyonu çalışmaları ile büyük bir potansiyele sahiptir, ancak büyük ölçüde indeller nedeniyle %10'u aşan ham hata oranlarından ve birçok uygulamada kullanımını engelleyen mütevazı çıktılardan (SMRT hücresi başına $2 \times 75\ 000$ ZMW, yaklaşık üçte bir okuma sağlar) muzdariptir (Stranneheim ve Lundeberg, 2012).

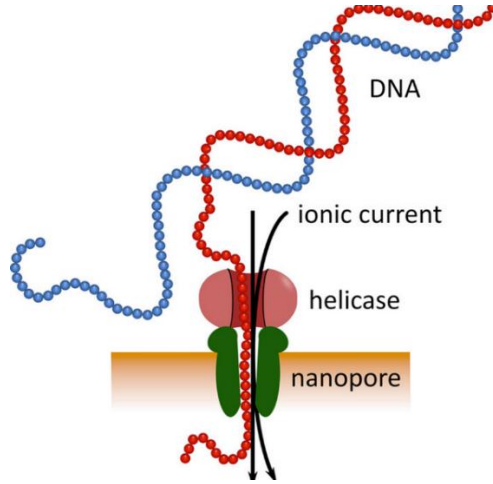
1.7.3.3. Nanopore DNA Sekanslama; Oxford Nanopore

Nanogözenekler, genel olarak, nanometre ölçeğinde çaplara sahip gözenekleri ifade etmektedir. Biyolojik (α -HL, aerolizin ve MspA gibi proteinler), yapay (katı hal silikon nitrid veya grafen) ve hibrit olabilirler. Çoğunlukla α -hemolizin (α -HL olarak kısaltılır) olarak adlandırılan biyolojik nanoporelar, ilk olarak *Staphylococcus aureus* tarafından salgılanan ekzotoksinler olarak keşfedilmiştir (Dekker, 2007).

Genel olarak, lipid çift tabakası boyunca kanallar oluşturan ve biyomoleküller (örn. RNA, DNA ve proteinler) ve iyonlar (örn. Na^+ , K^+ ve Cl^-) gibi nano ölçekli ve angstrom ölçekli partiküllere izin veren çapraz zar proteinleri olarak tasvir edilirler (Şekil 17).

1990'lara kadar bilim adamları bu proteinlerin biyosensörler gibi davranan potansiyellerini keşfetmemişti (Dekker, 2007). Daha sonra ise α -HL'deki benzersiz nanometre genişliğindeki kanal, iyonların yüksek tuz koşulu ve voltaj gradyanı altında bir piko ölçekli akım üretmek gibi özelliklerinden dolayı (Kasianowicz vd., 1996) yüklü molekülleri kanallardan çekmek veya itmek için gözeneğe bitişik bir elektrostatik alan oluşturulduğu görülmüştür. Bu işlem sırasında iyon kanaldan geçen akımın spesifik ve ölçülebilir şekilde modüle edilmesi, bilim adamlarının kanal içindeki blokajların varlığını ve konumunu ortaya çıkarmasını sağlamıştır. Kalma süresi ve engelleme seviyesi gibi parametreleri ölçerek, belirli moleküller hızla kategorize edilebilir ve tanımlanabilir hale gelmiştir.

Bu tür özellikler, özellikle ultra hızlı DNA dizilimi için farklı boyutlardaki parçacıkları tespit etme kabiliyetini garanti etmiştir. Yüksek translokasyon hızı (saniyede tahmini 1000-10.000 nükleotid) nedeniyle, nano gözenek sekanslama şu anda diğer tüm DNA sekanslama stratejilerinden daha iyi performans göstermektedir (Deamer ve Akeson, 2000).



Şekil 17. Nanopore teknolojisi kullanılarak DNA sekanslamasının şematik gösterimi

Nanopore teknolojisi membran üzerinde α -HL proteinlerinin oluşturduğu porlardan tek zincir DNA'nın taşınabilmesine ve taşıma esnasında akım seviyesinin nükleotid varlığına bağlı olarak değişebilmesine dayanmaktadır. Bu değişimler por etrafında bulunan sensörler tarafından okunup eş zamanlı olarak kaydedilebilmektedir.

Nanopore sekanslama ile uzun zincir okumasının başarılması geleneksel kısa zincir okumaları ile karşılaştırıldığında teknolojik avantajlar sağlamaktadır. Uzun zincir okumaları, insersiyon delesyon ve gen tekrarları gibi kısa okumalar ile belirlenmesi zor olan dizilerin belirlenmesinde avantaj sağlarken tek bir pordan pahalı floresan işaretli moleküller olmadan birden fazla sekanslama yapılabilir.

Oxford nanopore teknolojisi, sekanslama maliyetin düşürülmesi ve enzime minimum miktarda bağlı olması avantajlarını sağlamaktadır. Teknik DNA polimeraz enzimi kullanımını sınırlandırmakta ve ligaz enzimi gerekliliğini ortadan kaldırmaktadır.

1.7.4. Yeni Nesil Sekanslama Yöntemlerinin Kullanım Alanları

Yaygın NGS uygulamaları arasında DNA-seq, RNA-seq, ChIP-seq ve methyl-seq bulunmaktadır. DNA-seq, tüm genom sekanslamasına (WGS), WES'e veya genomun hedeflenen belirli bir bölgesine uygulanabilir. Genel olarak DNA sekanslamasının amacı, tek nükleotid varyantları (SNV'ler), küçük DNA eklemeleri veya silinmeleri (indeller), kopya sayısı varyasyonları (CNV'ler) veya diğer yapısal varyantlar (SV'ler) şeklindeki genomik varyasyonları keşfetmektir. Gen ifadesi

değişikliklerini ölçen RNA-seq, kodlamayan RNA'lar dâhil olmak üzere yeni transkriptleri keşfetmek ve transkript ekleme veya gen füzyon olaylarını tespit etmek için kullanılmaktadır. ChIP-seq, genom çapında transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerini ve kromatinle ilişkili modifikasyonları tespit eder. Metil-seq, ise 5-metilsitozin ve 5-hidroksim-etilsitozin gibi çeşitli DNA metilasyon türlerini tek nükleotid çözünürlüğünde profillemek için kullanılmaktadır (Bao vd.,2014). Bu uygulamaların yaygın olarak kullanıldığı alanlar aşağıda daha detaylı açıklanmaktadır.

1.7.4.1. Tüm Genom Sekanslama (Whole Genome Sequencing, WGS)

Tüm genom dizilimi (WGS), bir organizmanın genomunun tüm DNA dizisini bir kerede belirleyen bir laboratuvar işlemidir. Muazzam biyolojik dizi verilerini bir araya getirmek için otomatik DNA sekanslama yöntemleri ve bilgisayar teknikleriyle desteklenen bir organizmanın eksiksiz bir genomundaki bazların sırasını ortaya çıkarmayı içermektedir (Saraswathy ve Ramalingam, 2011). Tüm genom shotgun dizilimi, 1979'da 4000 ila 7000 baz çifti arasında değişen küçük genomlar için zaten kullanılıyordu (Staden, 1979). İlk kez 1995 yılında, *Haemophilus influenzae*'nin tüm genomu dizilindi (Fleischmann vd., 1995). Daha sonra, neredeyse tüm insan genomunun dizilenmesi 2000 yılında tamamlandı (Es, 2001). Yeni nesil sekanslama (NGS) tekniklerinin ortaya çıkışı ve yaygın kullanımı, tüm genom analizinin kullanılabilirliğini büyük ölçüde sağladı ve verimli ve düşük maliyetli WGS gerçekleştirme kapasitesini önemli ölçüde artırdı

Bir genomdaki genler genellikle bağımsız olarak çalışmazlar ve işlevleri doğrudan promotör tarafından kontrol edilmez, daha çok yanıt elemanları, enhancer ve silencerlar gibi diğer birçok düzenleyici unsur tarafından kontrol edilmektedir. Bu nedenle, WGS'nin uygulanması, yalnızca hücredeki tüm genlerin işlevinin daha iyi anlaşılmasını sağlamakla kalmaz, aynı zamanda gen ekspresyonunda yer alan ilgili DNA bilgilerini de karakterize edebilmektedir. Ek olarak, tam ekzom sekanslama (WES) ile karşılaştırıldığında, WGS, genomun %98-99'unu yakalayan kodlamayan DNA'yı dizileyerek genler hakkında çok daha kapsamlı bilgi sağlamaktadır (Saraswathy ve Ramalingam, 2011).

1.7.4.2. Transkriptomik

Transkriptom, hücredeki spesifik gelişim aşamaları veya fizyolojik durumu incelemek için gerekli olan tam transkript seti ve miktarıdır. Transkriptom, genomun işlevsel öğelerini yorumlamak, hücre ve dokuların moleküler bileşenlerini ortaya çıkarmak ve ayrıca organizmaların gelişimini ve hastalıkları anlamak için önemli bir araç haline gelmiştir. Transkriptomiklerin temel amaçları şunlardır: mRNA'lar, kodlamayan RNA'lar ve küçük RNA'lar dahil tüm transkript türlerini kataloglamak; genlerin transkripsiyonel yapısını, başlangıç bölgelerini, 5' ve 3' uçlarını, transkripsiyon sonrası modifikasyonları belirlemek ve farklı koşullar altında her bir transkriptin değişen ifade seviyelerini ölçmektir (Sarıman vd., 2015)

Hibridizasyon veya dizi bazlı yaklaşımlar dâhil olmak üzere transkriptomu belirlemek ve ölçmek için çeşitli teknolojiler geliştirilmiştir. Hibridizasyona dayalı yaklaşımlar tipik olarak floresanla etiketlenmiş cDNA'nın özel yapım mikroyarray veya ticari yüksek yoğunluklu oligo mikroyarray ile inkübe edilmesini içerir. Bu yöntemde ekzon bağlantılarını kapsayan problemlere sahip diziler, farklı eklenmiş izoformları algılamak ve ölçmek için özel mikroyarrayler tasarlanmıştır (Clark vd., 2002). Hibridizasyona dayalı yaklaşımlar, büyük genomları sorgulayan yüksek çözünürlüklü mikroyarrayler dışında, yüksek verimlidir ve nispeten ucuzdur. Bununla birlikte, bu yöntemlerin genom dizisi hakkında mevcut bilgilere bağlı kalması ve farklı deneyler arasında ifade düzeylerini karşılaştırmanın karmaşık olması gibi sınırlamaları mevcuttur (Okoniewski ve Miller, 2006).

Mikrosekans yöntemlerinin aksine, diziye dayalı yaklaşımlar doğrudan cDNA dizisini belirler. Başlangıçta, cDNA veya EST kütüphaneleri için (Boguski vd., 1994, Gerhard vd., 2004) sanger dizilimi kullanılmıştı, ancak bu yaklaşım nispeten düşük verimli ve pahalı bir yaklaşım olduğundan bu sınırlamaların üstesinden gelmek için, gen ekspresyonunun seri analizi, gen ekspresyonunun kap analizi ve büyük ölçüde paralel imza dizilimi dâhil olmak üzere etiket tabanlı yöntemler geliştirilmiştir. Bu etiket tabanlı sekanslama yaklaşımları yüksek verimli ve kesin, "dijital" gen ekspresyon seviyeleri sağlayabilmektedir. Ancak bu yöntemlerin çoğu pahalı Sanger sekanslama teknolojisine dayanmaktadır ve kısa etiketlerin önemli bir kısmı, referans genomla benzersiz bir şekilde eşleştirilememekteydi. Ayrıca, transkriptin sadece bir kısmı analiz edilirken izoformlar genellikle birbirinden ayırt edilemezdi. Bu

dezavantajlar, transkriptomların yapısını açıklamada geleneksel sekanslama teknolojisinin kullanımını sınırlamaktadır (Wang vd., 2009).

Yeni yüksek verimli DNA sekanslama yöntemlerinin geliştirilmesi, transkriptomların hem haritalanması hem de nicelenmesi için yeni bir yöntem sağlamaktadır. RNASeq (RNA dizilimi) olarak adlandırılan bu yöntem, mevcut yaklaşımlara göre açık avantajlara sahiptir ve ökaryotik transkriptomların analiz edilme biçiminde devrim yaratmıştır. Genel olarak, bir RNA popülasyonu, bir veya her iki uca bağlanan adaptörler ile bir cDNA kütüphanesine dönüştürülür. Amplifikasyonlu veya amplifikasyonsuz her molekül daha sonra bir uçtan (tek uçlu sekanslama) veya her iki uçtan (çift uçlu dizilim) kısa diziler elde etmek için yüksek verimli bir şekilde dizilenir. Sekanslamanın ardından, elde edilen okumalar ya bir referans genoma ya da referans transkriptlerine hizalanır ya da her bir gen için hem transkripsiyonel yapıdan hem ekspresyon seviyesinden oluşan bir genom-ölçekli transkripsiyon haritası üretmek için genomik dizi olmadan de novo birleştirilir (Wang vd., 2009).

1.7.4.3. Metagenomik

Çeşitli ortamlarda yaşayan mikropların klonlanmasını ve kültürlenmesini gerektiren geleneksel genomik tabanlı yaklaşımlar, herhangi bir ortamda yaşayan tüm mikrobiyal toplulukların incelenmesini kısıtlamaktadır. Bu durum, genom sekanslama verimliliğindeki gelişmelerin bir sonucu olarak mikrobiyom araştırmalarının da bu yönde hızla gelişimine katkı sağlamıştır. Metagenomik yaklaşımının ortaya çıkışı, araştırmacıların belirli filogenetik markır genlerinin veya mikrobiyal toplulukların tüm genomik içeriğinin doğrudan çıkarılmasını, sıralanmasını ve analizini kolaylaştırarak bu sınırlamayı aşmalarını sağlamıştır (Tyson vd., 2004). Metagenomik analizde önemli bir ön adım, içinde bulunan çeşitli mikroorganizmaları kategorize ederek ve tür zenginliği açısından çeşitliliklerini ölçerek verilen ortamın mikrobiyal topluluk yapısını deşifre etmektir. Metagenomların taksonomik çeşitliliğini karakterize etmek için genellikle iki yaklaşım benimsenmektedir Shotgun sekanslama tabanlı yaklaşım olarak adlandırılan ilk yaklaşımda, bir mikrobiyomu oluşturan organizmaların genomlarından kaynaklanan genomik parçalar çıkarılır ve dizilenir (Tyson vd.,2004). İkinci yaklaşım, filogenetik markır genlerinin tamamına (veya belirli kısımlarına) veya

ITS (Internal transcribed spacer) bölgeleri gibi belirli genomik bölgelere karşılık gelen ampikonların izolasyonu, ekstraksiyonu ve sekanslanmasına odaklanmaktadır (Clarridge, 2004; Santamaria vd., 2012). Genellikle ribozomal RNA (rRNA) geninin taksonlar arasında yüksek oranda korunan bölgeleri olan işaret genlerinin dizilenmesi Metataksonomi olarak adlandırılır (Marchesi ve Ravel, 2015) ve hem metataksonomi hem de metagenomik, bir mikrobiyomun tür kompozisyonu hakkında bilgi sağlar. Bir başka strateji olan metatranskriptomik, bir örnekteki tüm RNA'yı yakalamaya ve sekanslamaya çalışır, bu da aktif olarak kopyalanan tüm genlerin bir profilini oluşturmaya yardımcı olabilmekte ve ayrıca bu genlerin göreceli bolluğunun bir profilini sağlayabilmektedir (Moran vd., 2013).

1.7.4.4. Tüm Ekzom Sekanslama (Whole Exome Sequencing, WES)

Tüm-ekzom sekanslama (WES), özellikle insan genetiği alanında önemli bir atılımı temsil etmektedir. WES, 20.000'den fazla genin kodlama bölgelerinin aynı anda analiz edilmesine olanak tanıyan uygun fiyatlı, yüksek verimli bir teknolojidir (Tetreault vd., 2015). WES, insan genomunun yalnızca %1-1,5'ini kapsamaktadır, ancak genomun bu kısmı hastalığa neden olan varyantların yaklaşık %85'ini barındırmaktadır (Bao vd., 2014). Tipik bir WES analizi birkaç adım içerir: baz arama, kalite kontrol, haritalama ve varyant tanımlama, açıklama, filtreleme ve önceliklendirmedir. Bireysel bir dizinin normal bir referansla karşılaştırılması, bir bireyin DNA'sında potansiyel olarak bir hastalıkla ilişkilendirilebilecek varyasyonların tanımlanmasını sağlar. Son 5 yılda WES, araştırma ortamında hastalığa neden olan genlerin tanımlanmasını hızlandırmıştır ve bu teknoloji artık hızla klinik laboratuvarlara girmekte ve klinik test ve teşhis ortamını değiştirmektedir.

1.7.4.5. Epigenomik

Epigenetik, DNA dizisinde herhangi bir değişim olmaksızın, genetik ifadenin çevresel etkenlerle modüle edildiği kalıtsal düzenlemeleri ifade etmektedir. Bu düzenlemeler, mitotik ve hatta bazen mayotik olarak aktarılırken, epigenetik özellikler genellikle esneklik gösterir (Mensaert vd., 2014). Mitotik kalıtım genellikle tutarlı kabul edilebilmesine karşın, dış uyaranlar tarafından tetiklenen modifikasyonlar (epimutasyonlar) epigenetik profilin dinamik doğasını yansıtır. DNA metilasyonu,

hidroksimetilasyon, kodlamayan RNA'nın ifadesini, histon modifikasyonları ve nükleozom konumlandırması gibi epigenetik mekanizmaları değerlendirmek için yeni nesil sekanslama (NGS) yöntemlerinin kullanımı hızla yaygınlaşmaktadır. 2005 öncesinde, genom çapında epigenetik (epigenomik) çalışmalar, daha çok DNA mikrodizi teknolojilerine ve ChIP-chip (immünopresipite edilmiş DNA parçalarının mikrodizi hibridizasyonuna dayanan kromatin immünopresipitasyonu) yöntemlerine dayanıyordu. Ancak NGS'nin gelişimiyle birlikte epigenetik regülasyonları yüksek çözünürlükte analiz eden yenilikçi sekanslama tabanlı yöntem geliştirilmiştir (Horner, 2010). Örneğin, ChIP-Seq yöntemi, histon modifikasyonlarını analiz etmek için mikroarray deneylerinin yerini almış; bisülfıt dönüşümüne dayalı DNA metilasyon analizleri ise genom düzeyinde uygulanır hale gelmiş ve önceden seçilmiş CpG bölgelerini hedefleyen mikroarraylerin yerini almıştır (Laird, 2010). NGS temelli bu yaklaşımlar, özellikle insan epigenomunu çok daha ayrıntılı inceleme imkânı sunmuştur (Suzuki ve Bird, 2008). Henüz genomları dizilenmemiş türler için epigenomik analizlerde bazı teknik zorluklar bulunsa da, SMRT gibi üçüncü nesil sekanslama teknolojileri, bisülfıt dönüşümüne gerek kamadan metillenmiş bazların doğrudan dizilenmesine olanak tanıyarak bu zorlukların üstesinden gelmek için yeni fırsatlar sunmaktadır (Flusberg vd., 2010).

1.7.4.6. Amplikon Sekanslama

Amplikon sekanslama, mikrobiyal toplulukların taksonomik yapısını belirlemek için yaygın olarak kullanılan hassasiyeti yüksek ve maliyeti düşük bir yöntemdir. Bu yöntemle, genellikle 100-500 bp uzunluğundaki hedef bölgeler yüksek verimli sekanslama platformlarında analiz edilir. Son yıllarda PacBio ve Oxford Nanopore gibi uzun okuma teknolojileri, on binlerce nükleotidi kapsayabilen uzun sekanslama okumaları üreten yeni teknolojiler geliştirmiştir (Godwin vd., 2016, Levy ve Myers, 2016). Bununla birlikte, Amplikon sekanslama PCR ve sekanslama hatalarından kaynaklanan sahte varyantlara karşı duyarlıdır. Kısa okuma dizileri genellikle yaklaşık %0,5 hata oranına sahipken, uzun okuma teknolojileri çok daha yüksek bir hata oranına (yaklaşık% 10) kadar çıkabilmektedir. Yine de Oxford Nanopore sekanslama teknolojisi, uzun okuma kapasitesi (10-100 Kb), taşınabilirlik ve hızlı veri üretimi ile büyük avantajlar sunar (Callahan vd., 2019).

1.8. Çalışmanın Amacı

Genetik markırlar, biyoçeşitliliğin belgelenmesi ve doğal popülasyonların yönetilmesi amacıyla altmış yıldan fazla bir süredir kullanılmaktadır (Utter, 2004; Waples vd., 2008). Yeni nesil teknolojilerin gelişmesiyle birlikte, genetik olarak farklılaşan stokların belirlenmesi ve karışım oranlarının tahmini çok daha kolay gerçekleştirilebilmektedir (Dann vd., 2013).

Günümüzde genetik olarak stok tanımlamak için tercih edilen genetik markırlardan biri olan SNP'ler, hızlı bir şekilde gelişme göstermiş ve allozimlerin ve mikrosatellitlerin yerini alarak oldukça popüler hale gelmiştir (Schlötterer, 2004; Hauser ve Seeb, 2008). Mikrosatellitlerle karşılaştırıldığında, SNP'ler daha hızlı geliştirilmesi, kolaylıkla belirlenebilmesi ve ortaya çıkan genotiplerin, laboratuvarlar arasında kolayca aktarılabilmesi nedeniyle kullanım alanları hızlıca artış göstermiştir (Seeb vd., 2011).

Yeni nesil dizileme teknolojilerindeki son gelişmeler, SNP tespitini daha ekonomik ve uygulanabilir hale getirmiştir. Bu bağlamda tüm genom dizileme (WGS), model olmayan organizmalarda dahi etkili şekilde genetik varyantların belirlenmesine olanak tanımaktadır. WGS ile, popülasyon genetiği, ekolojik ve koruma genetiği çalışmaları için geniş kapsamlı SNP verileri elde edilebilmektedir (Elshire vd., 2011; Glaubitz, vd.,2014; Narum, vd., 2013).

RealTime PCR (qPCR), gen ekspresyonu analizi, SNP genotiplenmesi ve allel ayırımı, viral yükün belirlenmesi, genetiği değiştirilmiş organizmaların tespiti (GDO) gibi çok çeşitli analizler için son derece uygun bir yöntemdir (Michael, vd., 2009). qPCR ile SNP belirteçlerin nükleotit içerikleri ayırt edilebilmekte ve kolaylıkla genotiplenebilmektedir. qPCR çalışmalarını daha ucuz hale getirmek için geliştirilen primer-prob tasarımları oldukça geniş avantajlar sağlamaktadır. Bu oligonükleotidler, primer-dimerlerin ve spesifik olmayan PCR amplifikasyon ürünlerinin oluşumunu engeller ve bu tür yapıların intramoleküler bağlanmasını kinetik olarak olumlu hale getirir (Nazarenko, vd., 2002).

Bu tez çalışmasıyla, yeni nesil sekanslama (NGS) ve tek nükleotid polimorfizmi (SNP) gibi yenilikçi yöntemlerle, istavritte karşılaşılan tüm sorunların çözümüne katkı sağlayacak, popülasyon ve karışık stok yapısının tespitine yönelik çalışmalara temel oluşturacak bir yaklaşım benimseyerek ülkemiz balıkçılığı açısından

yüksek ekonomik değeri sahip olan istavrit türlerine ait stokların genetik olarak tanımlanması, tür içi ve türler arası SNP markırlarının geliştirilmesi, avlanan stoklardaki tür oranlarının doğru şekilde tahmin edilmesi ve popülasyon genetik yapılarının ortaya konulması amaçlanmıştır.

Genetik çeşitliliğin anlaşılması ve türlerin doğru şekilde ayrılması yoluyla sürdürülebilir balıkçılığa katkı sağlamak amacıyla çalışma şu temel hedefler etrafında şekillendirilmiştir:

1. *İstavrit türlerinin genetik olarak tanımlanması:*
 - *T. trachurus* için tür içi genomik çeşitliliği temsil eden bir pangenomun inşa edilmesi.
 - *T. mediterraneus* ve *T. picturatus* türleri için referans genomların oluşturulması.
2. *Tür içi ve türler arası SNP markırlarının geliştirilmesi:*
 - Tür içi genetik çeşitliliği ve popülasyon yapısını ortaya koymak amacıyla yüksek çözünürlüklü SNP belirteçlerinin tanımlanması.
 - Türler arası ayırıcı SNP lokuslarının seçilmesi ve bu lokuslara dayalı genotipleme markırlarının geliştirilmesi.
3. *Florojenik prob bazlı PCR testi geliştirilmesi:*
 - Tür tayini, hibrit tespiti ve stok analizlerinde kullanılabilecek hızlı, güvenilir ve uygulanabilir bir moleküler testin geliştirilmesi.

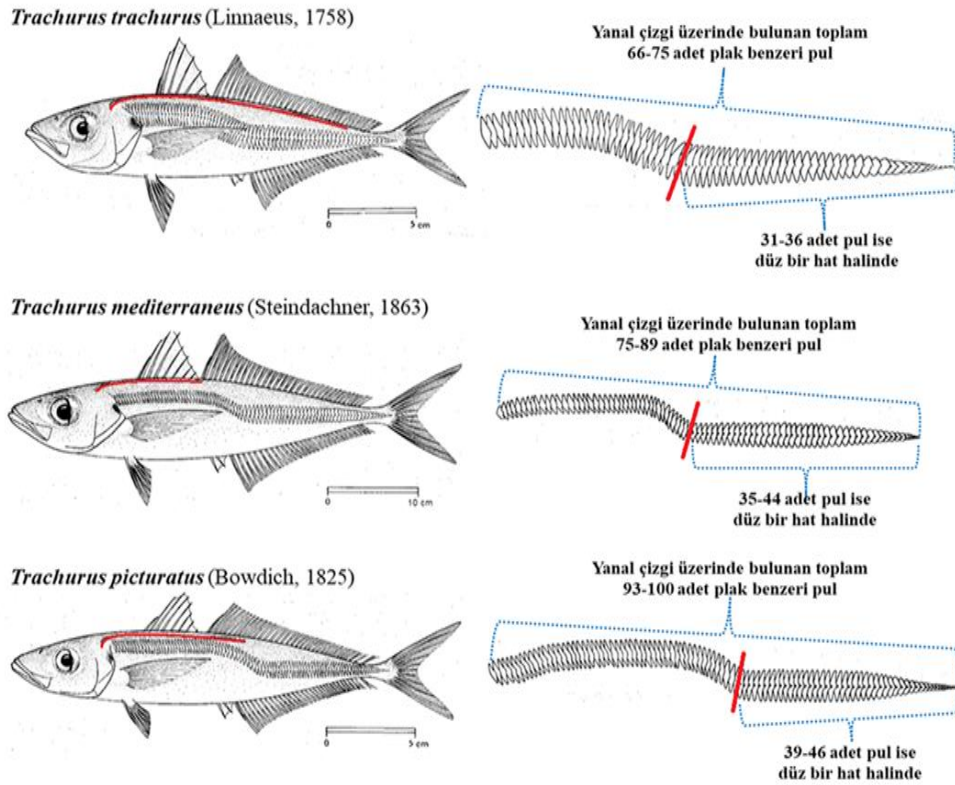
Geliştirilen türe özgü SNP markırlar ile karışık stokların tür bileşimi belirlenebilecek üç istavrit türünün karışık halde bulunduğu bölgelerin ve stokların karışım oranlarının tespit edilebilmesi için önemli bir adım atılmış olacaktır. Türe özgü geliştirilen SNP bölgelerine uygun probalar ile karışık stoklardaki türlerin tespiti kolaylaşacak. Böylece belirleyeceğimiz karışım oranları ile stokun ne kadarının hangi türe ait bireylerden oluştuğu belirlenebilecektir. Bu çalışma istavrit popülasyonlarının daha iyi anlaşılabilmesi için yapılacak sonraki çalışmalar için rehber olacaktır.

2. MATERYAL VE METOT

Bu tez kapsamında, tür ayrımı ve stok yapısının belirlenmesine yönelik olarak örnekleme, moleküler genetik analizler ve biyoinformatik değerlendirmeleri içeren çok aşamalı bir çalışma yürütülmüştür. Bu çalışmaların ayrıntıları aşağıda sunulmaktadır.

2.1. Örnekleme Çalışmaları

Yeni nesil sekanslama (NGS) yöntemiyle türe özgü genom dizileneceği için öncelikle 3 türe ait referans örnekler (her tür için 30 örnek), belirlenen istasyonlardan av döneminde avcılık yapan gırgır teknelerinden toplandı (*T. mediterraneus*/ Trabzon; *T. trachurus*/ Antalya körfezi; *T. picturatus* /Antalya körfezi) ve yanal çizgi ve pul yapılarına bakılarak türün doğruluğu netleştirildi (Şekil 18).



Şekil 18. Türlerinin ayrımı için kullanılan yanar çizgi ve pul yapıları

Tür ayrımı yapılan 3 istavrit türüne ait 30'ar bireyin kuyruk yüzgeçlerinden alınan yaklaşık 1–1,5 cm² doku örneği, içerisinde %98'lik etanol bulunan 1,5–2,0 ml'lik tüplerde -20 °C'de derin dondurucuda kullanılabilecek kadar muhafaza edildi (Şekil 19).



Şekil 19. Türlerin tanımlanması ve doku alımı

2.2. Genetik Çalışmalar

Genetik çalışmalar kapsamında, doku örneklerinden DNA izolasyonunu gerçekleştirerek DNA kütüphanesini oluşturduk. Oxford Nanopore ve Illumina Novaseq tabanlı yeni nesil sekanslama (NGS) teknolojilerini kullanarak üç istavrit türüne ait genomları diziledik. Elde ettiğimiz DNA dizilerini analiz ederek türe özgü/tür içi tek nükleotid polimorfizmi (SNP) lokuslarını belirledik ve bu lokuslara dayalı moleküler markırlar geliştirdik. Geliştirdiğimiz SNP primerlerinin optimizasyonunu sağladık ve hedef bölgelerin PCR amplifikasyonlarını gerçekleştirdik. Yapılan analizler sonucunda, polimorfik ve tür spesifik SNP lokuslarını belirledik ve bu lokuslara yönelik üç türe özgü florojenik qPCR problemlerini tasarladık. Bu çalışmaların ayrıntıları aşağıda sunulmaktadır.

2.2.1. Toplam DNA İzolasyonu ve DNA Kütüphanesinin Oluşturulması

DNA izolasyonu %98'lik etanolde saklanan kuyruk yüzgeçlerinden yapıldı. Yaklaşık olarak 2 mm³ büyüklüğünde 15–20 mg doku örneği kullanılarak gerçekleştirildi. Küçük parçalara bölünmüş doku örneği 1,5–2,0 ml'lik Eppendorf tüpe konulmadan önce kâğıt mendil üzerinde 1–2 dakika bekletilerek alkolün uçması sağlandı ve daha sonra Eppendorf tüpe Lysis solüsyonu (Qiagen), proteinaz K ve RNaz A (100 mg/mL) eklenerek 55°C'de en az 3 saat sarsaklı inkübatörde homojenizasyon işlemi yapıldı.

Homojenize olmuş doku örneklerinden DNA elde edilmesi ticari kitler (DNeasy Blood & Tissue Kit ,Qiagen) kullanılarak gerçekleştirildi. İzolasyon sonrası elde edilen total DNA içerisindeki çift iplikli DNA (dsDNA) kalitesi Thermo NanoDrop Spectrophotometre ile konsantrasyonu Qubit dsDNA BR assay kit kullanılarak Qubit fluorometer (Life Technology) belirlendi (Şekil 20). Uygun kalite ve miktarda elde edilemeyen örnekler için izolasyon aşaması tekrarlandı. Ölçüm sonuçlarına göre uygun kalitedeki (OD 260/280 = 1.8, OD 260/230 = 2.0) dsDNA örnekler kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.



Şekil 20. Qubit ölçüm çalışmaları

2.2.2. Nanopore Tüm Genom Sekanslama

Nanopore sekanslaması için Oxford Nanopore Technologies, PromethION sekanslama cihazı ve cihaza ait kontrol yazılımları kullanıldı. İzole edilen dsDNA, Oxford Nanopore SQK-NBD114.24 kiti ile firmanın önerdiği protokole uygun şekilde sekanslamaya hazırlandı. DNA hasar ve kırıklarının onarılmasında NEBNext Ultra II End Repair/dA-Tailing, NEBNext FFPE DNA Repair Mix kitleri kullanıldı. Kütüphane hazırlık işlemleri sırasında DNA saflaştırılması Agencourt AMPure XP boncukları (A63880, Beckman Coulter) ile gerçekleştirildi. Native barkod ligasyonu ve Adaptör ligasyonu işlemlerinden sonra tekrar DNA saflaştırılması yapıldı. Üç istavrit türü için 5'er örnekten oluşan gen havuzları PromethION cihazına takılan FLO-PRO114M akış hücresi (flow cell) kullanılarak 48 saat boyunca nanopore sekanslaması yapıldı. Sekanslama cihazının kontrol yazılımı olan MinKNOW programı üzerinden DNA okumaları FASTA formatında metin dosyalarına çevrilerek biyoinformatik analizler için hazır hale getirildi.

Nanopore tüm genom sekanslamanın ilk aşaması olan Sekanslama Kütüphanesi Hazırlığı; DNA repair ve end-prep, Barkod Ligasyonu, Purifikasyon, Adaptör Ligasyonu ve Purifikasyonu Priming ve PromethION Akış Hücresinin Yüklenmesi basamaklarından oluşmaktadır. Tüm basamaklar aşağıda daha ayrıntılı verilmiştir.

DNA repair ve end-prep; bu aşamada bir akış küvetinde en fazla 2 tür için okuma gerçekleştirileceği için Qubit ölçümleriyle 11µl NFW'da 1000 ng DNA olan örnekler belirlendi. Dna repair ve end- prep aşamaları için NEBNext Ultra II End Repair/dA Tailing kiti (E7546S, NEB) NEBNext FFPE DNA Repair Mix kiti 1000 ng kesilmiş genomik DNA hazırlamak için kullanıldı. Hazırlanan karışım miktarları Tablo 1'de verilmiştir. Sonrasında karışım 20 °C'de 5 dakika inkübe edildi ve 65 °C 5 dakika reaksiyon inaktif edildi.

Tablo 1. DNA onarım hazırlığı

Karışım	Hacim
DNA sample	11 µl
Diluted DNA Control Sample (DCS)	1 µl
NEBNext FFPE DNA Repair Buffer	0,87 µl
Ultra II End-prep Reaction Buffer	0,87 µl
Ultra II End-prep Enzyme Mix	0,75 µl
NEBNext FFPE DNA Repair Mix	0,5 µl
Toplam	15 µl

Barkod Ligasyonu; Bu aşamada Oxford Nanopore SQK-NBD114.24 kiti içinde bulunan barkodlar kullanılarak (NB01-24) Blunt/TA Ligaz Master mix (M0367S, NEB) protokolü uygulandı. Hazırlanan karışım miktarları Tablo 2’de verilmiştir. Barkodların DNA’ya bağlanması için karışım oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi ve sonrasında reaksiyon 2 µl EDTA ile durduruldu.

Tablo 2. Barkod ligasyon karışımı

Karışım	Hacim
End-prepped DNA	7,5 µl
Native Barcode (NB01-24)	2,5 µl
Blunt/TA Ligase Master Mix	10 µl
Toplam	20 µl

Purifikasyon; her biri farklı barkodlarla işaretlenmiş DNA havuzu hacminin 0,4 katı kadar AMPure XP boncukları eklenerek oda sıcaklığında hula mixer ile 10 dakika inkübe edildi. Tüm örnek tüpleri manyetik rack üzerine konuldu. Renksiz bir süpernatant elde edilene kadar (yaklaşık 5 dakika) beklendi. Süpernatant atılarak 700 µl taze hazırlanmış %80’lik ethanol ile yıkama yapıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı. Daha sonra 37 µl NFW eklenerek 37°C’de 10 dakika inkübe edildi. Sonrasında tekrar örnek tüpleri manyetik rack üzerine konuldu ve süpernatant 1.5 ml’lik Eppendorf tüplere alındı.

Adaptör Ligasyonu ve Purifikasyonu; bu aşamada Oxford Nanopore SQK-NBD114.24 kiti içinde bulunan Native Adaptör (NA) kullanıldı. Mobiomix Rapid T4

DNA Ligaz enzimi protokolü uygulandı. Protokole uygun hazırlanan karışım miktarları Tablo 3'te verilmiştir. Karışım 30° C'de 10 dakika inkübe edildi. Karışım 40 µL AMPure XP boncukları eklenerek oda sıcaklığında hula mixer ile 10 dakika inkübe edildi. Tüm örnek tüpleri manyetik rack üzerine konuldu. Renksiz bir süpernatant elde edilene kadar beklendi (yaklaşık 5 dakika) Süpernatant atılarak 125 µl Short Fragment Buffer (SFB) ile yıkama yapıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı. Daha sonra 25 µl Elution Buffer (EB) eklenerek 37°C'de 10 dakika inkübe edildi. Sonrasında tekrar örnek tüpleri manyetik rack üzerine konuldu ve süpernatant 1.5 ml'lik eppendorf tüplere alındı ve üzerine 7 µl daha Elution Buffer (EB) eklendi.

Tablo 3. Adaptör ligasyon karışımı

Karışım	Hacim
Pooled barcoded sample	35 µl
Native Adapter (NA)	5 µl
Mobiomix Ligation Reaction Buffer (2X)	50 µl
Quick T4 DNA Ligase	10 µl
Toplam	100 µl

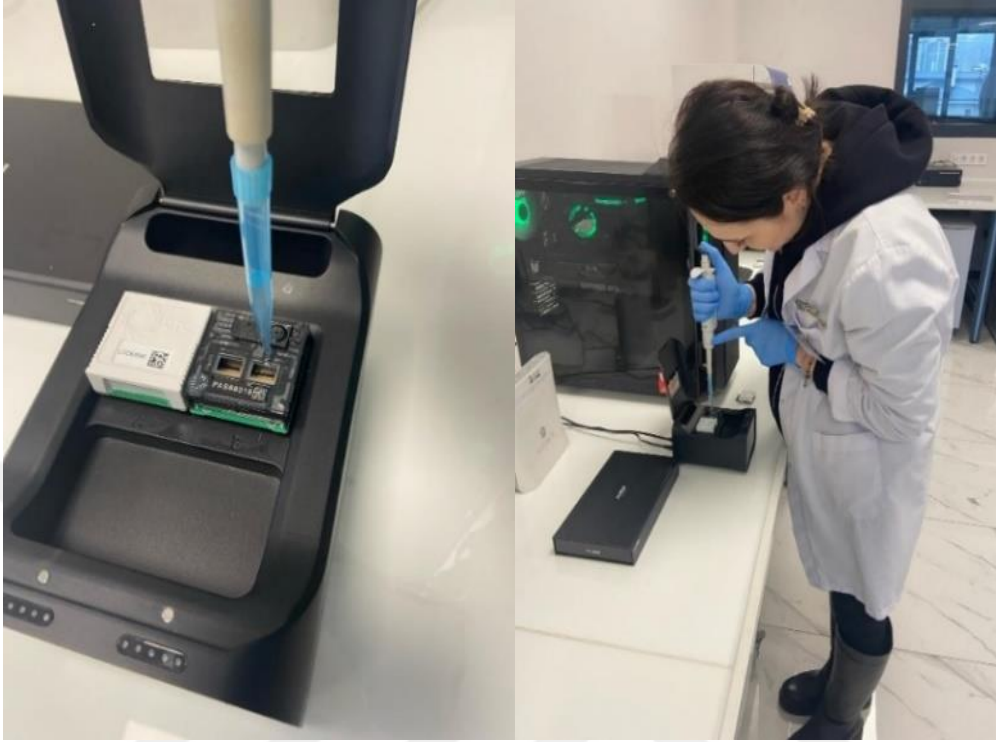
Priming ve PromethION Akış Hücresinin Yüklenmesi; PromethION akış hücreğine DNA kütüphanemizi yüklemeyi önce priming karışımı hazırlanır. Karışım için 1.170 µl Flow Cell Tether (FCT) ve 30 µl Flow Cell Flush (FCF) kullanılır. DNA kütüphanesinin yükleme karışımı ise Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Kütüphane yükleme karışımı

Karışım	Hacim
Sequencing Buffer (SB)	100 µl
Library Beads (LIB)	68 µl
DNA library	32 µl
Toplam	200 µl

1200 hacimlik priming karışımından pipet yardımıyla 500 µl alınarak PromethION FLO-PRO114M akış hücreesindeki (flow cell) inlet porta hava kabarcığı yapmadan yavaşça yüklendi. 5 dakika sonra bu işlem tekrarlandı. Sonrasında hazırlana DNA kütüphanesi karışımı porta yüklendi. Sekanslama cihazının kontrol yazılımı olan

MinKNOW programı üzerinden DNA okumaları 48 saat boyunca sürmüştür (Şekil 21).



Şekil 21. Akış hücresi yükleme çalışmaları

2.2.3. Illumina Tüm Genom Sekanslama

T. mediterraneus için Nanopore sekanslama yöntemiyle yeterli veri alınamaması sebebiyle Novogene Co. Ltd. firmasından hizmet alımı sağlanmıştır. Illumina NovaSeq PE150 platformu kullanılarak tür için tüm genom sekanslaması gerçekleştirilmiştir. Illumina sekanslama kütüphanesi için, genomik DNA rastgele daha kısa parçalara (2x150 bp) ayrıldı. Parçaların uç onarımı, polyA-kuyruk eklenmesi ve sırasıyla Illumina adaptörleri ile bağlanmasıyla yapıldı. Sekanslama Kütüphanesi Qubit ve qPCR ile kantifize edildi ve boyut dağılımı parça analizörü ile tespit edildi. Kantifize edilen kütüphaneler bir araya getirildi ve Illumina platformları NovaSeq PE150 üzerinde dizilendi. Illumina platformundan gelen orijinal ham veriler Novogene Co. Ltd. tarafından dizi okumalarına dönüştürüldü ve sekanslama okumalarını içeren bir FASTQ dosyası olarak tarafımıza gönderildi.

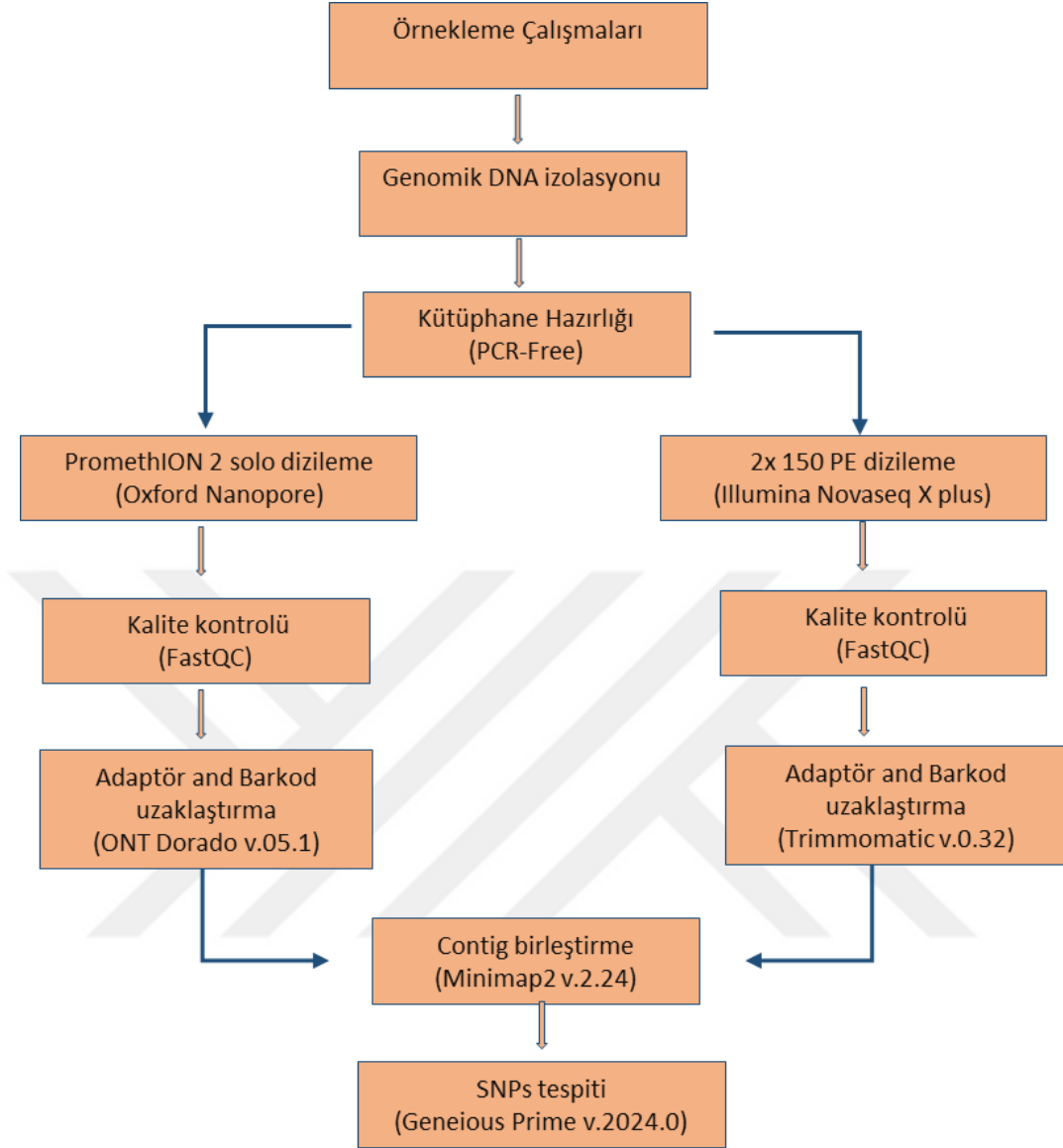
2.3. Biyoinformatik Çalışmalar

Oxford Nanopore okumaları, cihazın kontrol yazılımı olan MinKNOW programı aracılığıyla, Oxford Nanopore tarafından geliştirilen ve eski .fast5 formatının yerini alan bir dosya formatı olan pod5 formatında elde edildi. Barkod ve adaptör dizileri ONT dorado (v.0.5.1) yazılımıyla kırıldı. Basecalling sonuçları, en son ONT Dorado yazılımı (v.0.5.1, Oxford Nanopore Technologies) sürümüyle yüksek doğruluklu model kullanılarak BAM ve FASTQ dosya formatına dönüştürüldü. Ham veriler, düşük kaliteli okumaları kaldırmak için FastQC kullanılarak filtrelendi

Illumina okumaları öncelikle düşük kaliteli okumaları çıkarmak için FastQC kullanılarak filtrelendi. Barkod ve adaptör dizileri Trimmomatic V0.32 ile kesildi. Kısa okumalar için, sam dosyaları Minimap2 (v.2.24) ile bam dosyalarına dönüştürüldü ve Nanopore ve Illumina sekanslama verileri *T. mediterraneus* için birleştirildi. Yapılan tüm biyoinformatik çalışmalar Şekil 22’de şematik olarak gösterilmiştir.

2.4. SNP Tespiti ve Filtreleme

Tüm okumalar, Minimap2 (v.2.24) kullanılarak NCBI veritabanından indirilen *T. trachurus* referans genomuna (Genome assembly fTraTra1.2, Genbank ID: GCA_905171665.1) hizalandı ve birleştirildi. Tüm birleştirilmiş okumalar, daha fazla analiz için Geneious Prime'a (v.2024.0) aktarıldı. Varyantlar Geneious Prime (v.2024.0)'da “Varyasyonları / SNP'leri Bul” komutuyla tespit edildi. Bu komut çalıştırılırken, varyantları bulmak için minimum kapsam değeri 5 ve minimum varyant frekansı 0,70 olarak alındı.



Şekil 22. Sekanslama metodolojisinin ve SNP tespiti şematik diyagramı

2.5. SNP Markır Geliştirilmesi

2.5.1. Tür İçi SNP Markır Geliştirme

Her bir tür için Geneious Prime (v.2024.0) programında örtüşme hizalaması yapılarak SNP varyant kapsam değerleri ve gen havuzundaki farklı baz değişimleri belirlendi (Şekil 23). Her bir türün gen havuzundaki baz değişimleri farklı bazlar içeriyorsa oluşturulan konsensus dizilerinde her bir baz değişimi farklı sembollerle

gösterilmiştir (Tablo 5). SNP markırlar geliştirmek amacıyla bu sembollerin bulunduğu bölgeler seçildi (Şekil 24 ve Şekil 25).



Şekil 23. Geneious Prime programında örtüşme hizalaması

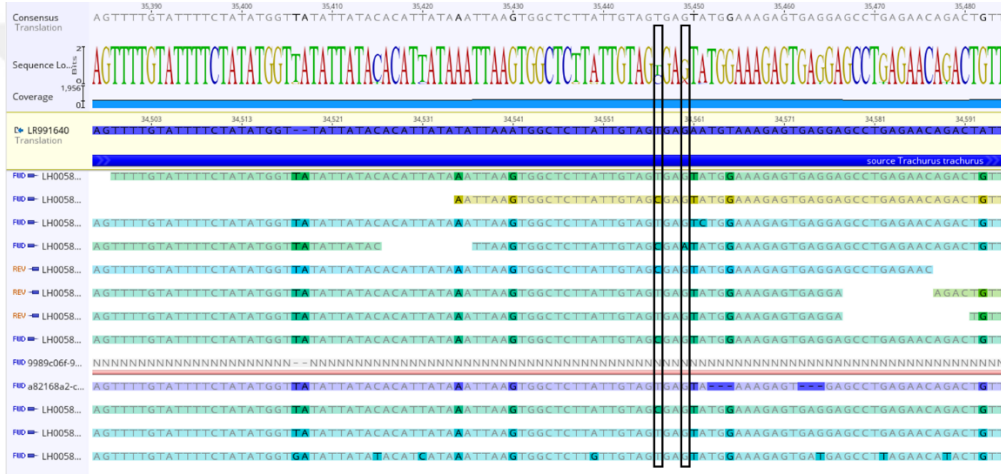
Tablo 5. Sembollerin baz karşılıkları

Baz Sembolü	Sembolize Ettiği Bazlar
R	Guanine / Adenine (purine)
Y	Cytosine / Thymine (pyrimidine)
K	Guanine / Thymine
M	Adenine / Cytosine
S	Guanine / Cytosine
W	Adenine / Thymine

Her bir türde bu baz değişimlerin olduğu bölgeler için Integrated DNA Technologies PrimerQuest webtools (<https://www.idtdna.com/page>) aracılığıyla ürün boyu ~300bp olacak şekilde SNP bölgelerini içeren primerler tasarlandı. Primerler daha sonra OligoAnalyzer™ Tool aracılığıyla analiz edilerek GC% oranı Tm sıcaklığı, ΔG değerleri, µg/OD, nmol/OD verileri ve dimer yapılarının varlığı tespit edildi.



Şekil 24. Tür içi gen bölgelerinin BIOEDIT programında gösterimi



Şekil 25. Tür içi SNP markır geliştirilen gen bölgelerinin Geneious Prime programında gösterimi

SNP içeren gen bölgelerinin amplifikasyonu için tasarlanan (içlerinden 10 primer seti seçilerek) primer setleri (ileri ve geri yönlü) kullanılarak PCR reaksiyonu toplam hacim 25µl olacak şekilde; 10 µl of 2X Master mix (Qiagen), 10 µM primer (F ve R), 90–150 ng DNA ve NFW'den hazırlandı. PCR uygulaması için hazırlanan örnekler Thermal Cyclers (ABI Veriti)'a yerleştirilerek ilk olarak; 95°C de 5 dk.'lık bir ön denatürasyon ikinci adım 95°C de 1 dk.'lık denatürasyon, 50-64°C arasında 1,30 sn hibridizasyon, ve 72°C de 1,5 dk. polimerizasyon işlemi 30-34 döngü yapılarak sonrasında 72°C de 5 dk son polimerizasyon ve son adımda 4°C de örneklerin tutulması şeklinde oluşturulan döngü programı kullanıldı. PCR döngüsü primerlerin bağlanma sıcaklığına göre optimize edildi ve kaliteli ürün alınana kadar optimize

çalışmaları devam etti. Tüm gen bölgelerinin sekansı için örnekler pürifiye edilerek BigDye v.3.1 Terminator Cycle Sequencing Kit Kullanılarak ABI 3500 Genetic Analyser (ThermoFisher) cihazında sekanslaması gerçekleştirildi.

2.5.2. Türler Arası SNP Markır Geliştirme

Üç istavrit türüne ait konsensuslar kromozomal seviyede Geneious Prime (v.2024.0) programında hizalandı. Hizalanmış diziler BIOEDIT sequence alignment editör programı aracılığıyla görüntülendi (Şekil 26).



Şekil 26. Üç tür için farklı bazların olduğu SNP bölgeleri

Integrated DNA Technologies PrimerQuest webtools (<https://www.idtdna.com/page>) aracılığıyla ürün boyu ~300 bp olacak şekilde SNP bölgelerini içeren primerler tasarlandı. Primerler daha sonra OligoAnalyzer™ Tool aracılığıyla analiz edilerek % GC oranı Tm sıcaklığı, ΔG değerleri, $\mu g/OD$, nmol/OD verileri ve dimer yapılarının varlığı tespit edildi.

2.6. QPCR ile Türlerin Tespiti

SYBR Green metodu; Üç türün farklı dizilendiği gen bölgesi belirlenerek o bölgeye özgü her üç tür için de birer primer tasarlandı. Bu markırlar için primerler Roche LightCycler® 480 cihazında dsDNA'ya özgü boya olan SYBR Green ile amplifiye edildi. Tür ayrımını sağlayacak gen bölgelerinin amplifikasyonu için tasarlanan primer setleri (ileri ve geri yönlü) kullanılarak PCR reaksiyonu toplam hacim 25 μl olacak şekilde; 12,5 μl 2X Master mix (Qiagen), 10 μM primer (F and R),

90–150 ng DNA, 1,5 µl SYBR ® Green I ve NFW'den oluşmaktadır. PCR uygulaması için hazırlanan örnekler Roche LightCycler® 480'a yerleştirilerek ilk olarak; 95°C de 5 dk.'lık bir ön denatürasyon, ikinci adım 95°C'de 30 sn'lık denatürasyon, 65°C' de 20 sn hibridizasyon, ve 72°C de 10 sn polimerizasyon işlemi 30 döngü yapılacak şekilde PCR basamakları optimize edildi. Ardından melting curve aşaması (10 sn. 95°C, 5 sn. 65-95°C - 0.5°C artışla ve 5 sn. 95°C) uygulandı.

Evrensel Prob Tabanlı Ara Primer Tetiklemeli qPCR (UPIP-qPCR) metodu;

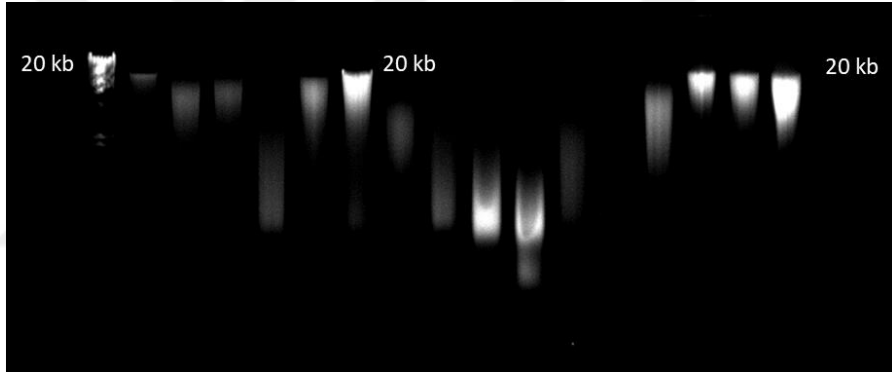
1. PCR işlemi reaksiyonu toplam hacim 25µl olacak şekilde; 12,5 µl 2X Master mix (Qiagen), 10 µM primer (F ve R), 90–150 ng DNA ve NFW'den oluşmaktadır. PCR uygulaması için; 95°C de 5 dk.'lık bir denatürasyon ikinci adım 95°C de 1 dk.'lık denatürasyon, 65°C'de 1,30 sn hibridizasyon, ve 72°C de 1 dk. polimerizasyon işlemi 35 döngü yapılarak sonrasında 72°C de 10 dk son polimerizasyon ve son adımda 4 °C de örneklerin tutulması şeklinde oluşturulan program kullanıldı. Reaksiyon Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsünde bulunan Thermal Cycler (ABI Veriti) PCR cihazında gerçekleştirildi.

Primerler ve probler tasarlandıktan sonra 2. PCR işlemi reaksiyonu toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlandı. PCR reaksiyon karışımı; 12,5 µl Roche LightCycler® 480 master mix, 10µM primer (her üç tür için; F ve R), 2 µl 1/50 1.PCR ürünü, Prob1, Prob2, Prob3 ve NFW şeklinde hazırlandı ve reaksiyon Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsünde bulunan Roche LightCycler® 480 Real Time PCR cihazında gerçekleştirildi. Standart döngü koşulları: 5 dakika boyunca 95 °C, ardından 95 °C'de 10 s, 60 °C'de 30s'lik 30 döngü olacak şekilde uygulandı ve sonuçlar (standart eğrileri ve CT değerleri vb.) kaydedildi.

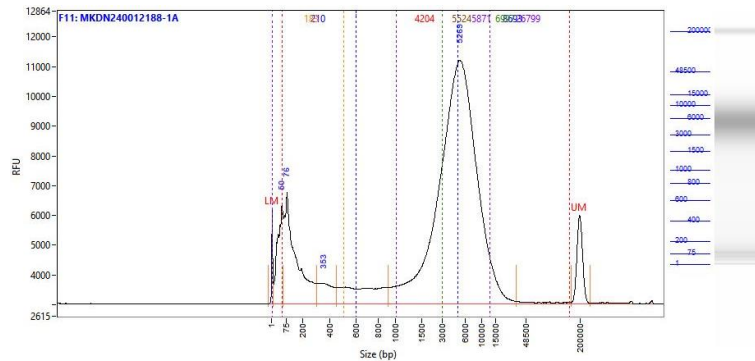
3. BULGULAR

3.1. DNA Kütüphanesinin Oluşturulması

İzolasyon sonrası elde edilen total DNA'nın kalitesi ve miktarları ölçülerek uygun kalite ve miktardaki örnekler belirlendi. Özellikle nanopore sekanslama için DNA'lar jelde yürütülerek 20.000 bp uzunluğunda DNA içeren örnekler seçildi ve her bir tür için 5'er örneklik DNA havuzu oluşturuldu (Şekil 27). Illumina sekanslama için DNA havuzu NanoDrop Spectrophotometre ve Qubit fluorometer ölçümlerine göre oluşturulurken, firma tarafından örneğin uygunluğu boyut dağılımı parça analizörü ile tekrar test edildi ve sekanslama için kullanıldı (Şekil 28). Tüm genom sekanslama için her bir türden 5'er örneklik DNA kütüphanesi uygun kalite miktarlarda hazır hale getirildi.



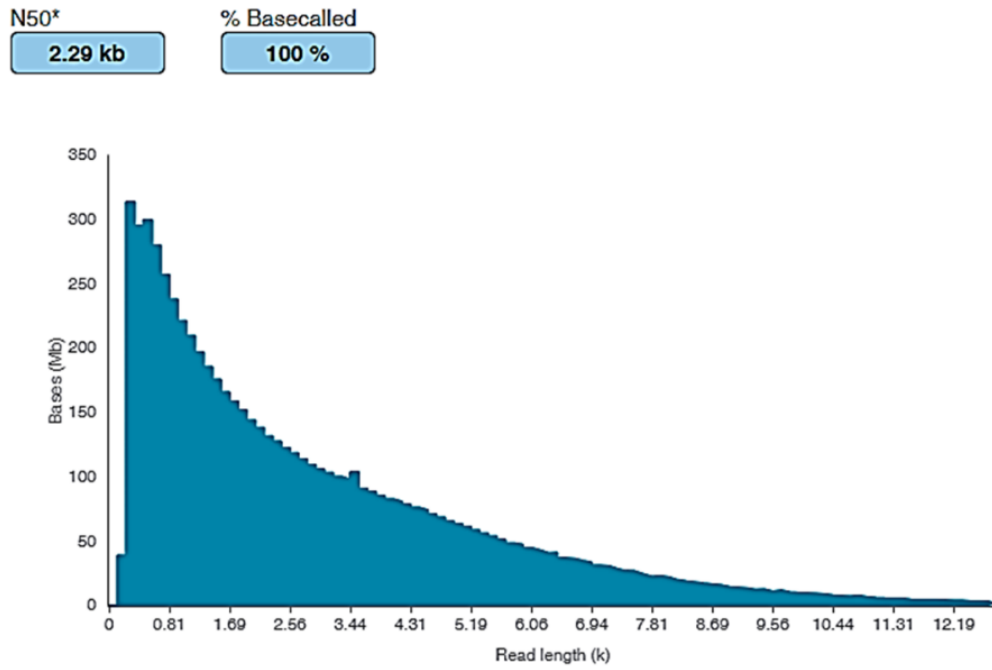
Şekil 27. DNA kütüphanesinin jel görüntüsü



Şekil 28. *T. mediterraneus* DNA kütüphanesi için Agilent 2100 boyut dağılımı parça analizörü sonucu

3.2. Genom Sekanslama

T. trachurus, *T. picturatus* ve *T. mediterraneus*'un genomu Oxford Nanopore sekanslaması kullanılarak dizilendi. Toplamda üç akış hücresi kullanılarak toplam 26,91 Gb veri elde edildi. Bu veriler filtrelendikten sonra toplamda 18,6 Gb veri toplandı. Her bir *Trachurus* türü N50 uzunlukları sırasıyla 2,29 kb, 2,33 kb ve 1,24 kb idi. (Tablo 6 ve Şekil 29).

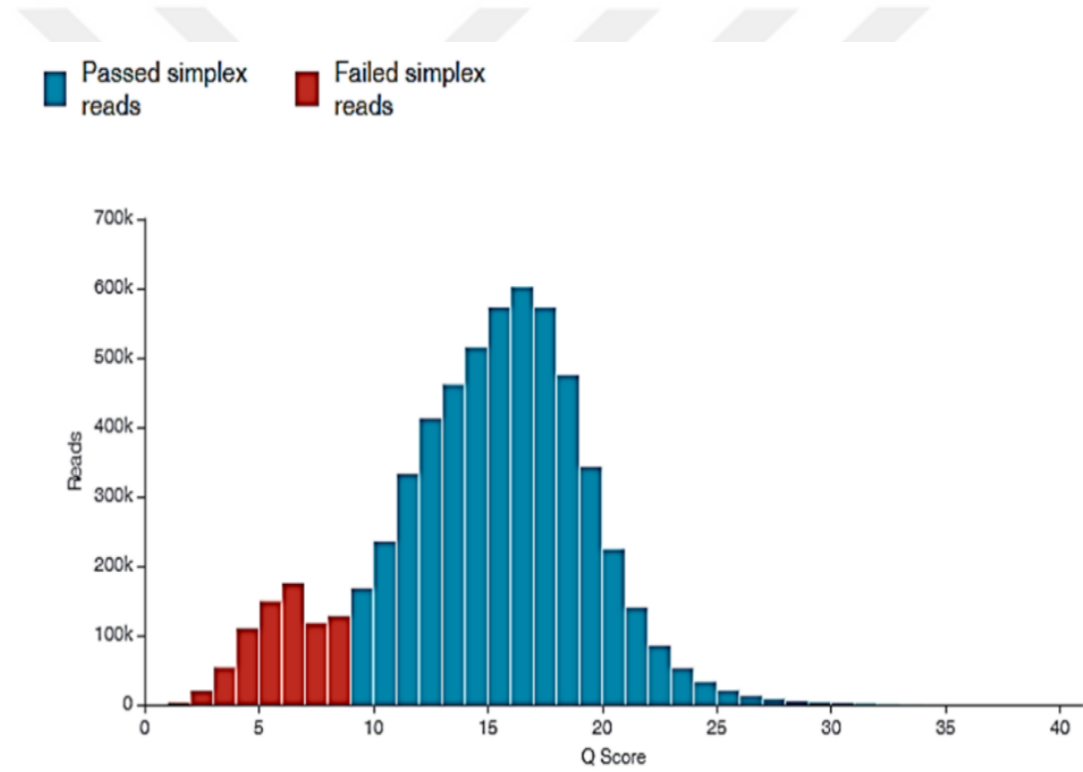


Şekil 29. *T. trachurus* için N50 değerinin hesaplandığı okuma uzunluğu histogramı

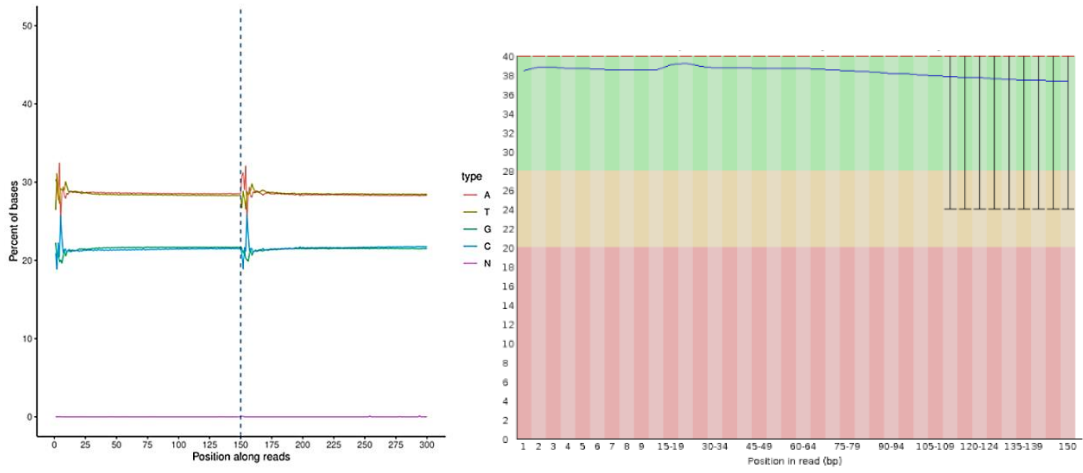
Tablo 6. Sekanslama verilerinin istatistikleri

Species	Method	Sequencing Platform	Library Size bp	Clean data Gb	Total Read kb	Passed Read%	N50 kb
<i>Trachurus trachurus</i>	Nanopore	PromethION	20000	8,9	6.564,03	92,1%	2,29
<i>Trachurus picturatus</i>	Nanopore	PromethION	20000	8,9	6.892,35	93,2%	2,33
<i>Trachurus mediterraneus</i>	Nanopore	PromethION	1000	0,8	796,18	76%	1,24
<i>Trachurus mediterraneus</i>	Illumina	NovaSeq X Plus Series (PE150)	150	8,2	54.834,60	98,37%	-

Oxford Nanopore sekanslamasından elde edilen okumaların kalite Q puanı minimum 9 değeri olarak alındı. 9 değerinin altına düşen okumalar başarısız okumalar olarak sınıflandırıldı (Şekil 30). Okumaların çoğu kalite Q puanı Q15 ve Q20 arasındaydı. Oxford Nanopore Teknolojisi'nden por tıkanmaları neticesinde yeterli veri alamadığımız *T. mediterraneus* için Illumina NovaSeq X Plus teknolojisi kullanılarak sekanslama hizmet alımı gerçekleştirildi. Novogene firması tarafından tarafımıza gönderilen okumalar %90,6 Q30 ve %43 GC içeriğine sahipti. FASTAQ formatında elimize ulaşan toplam ham veri 8,2 Gb idi. (Şekil 31). Her iki teknolojiye toplam 26,8 Gb filtrelenmiş sekans verisi elde edildi.



Şekil 30. *Trachurus tarachurus* için Oxford Nanaopore Q skor histogramı



Şekil 31. Illumina Novaseq GC içeriğinin dağılımı ve Q skor histogram

3.3. Genom Birleştirme

Okumalar, ham okumaların kalite kontrolünden sonra Minimap2 (v.2.24) kullanılarak *T. trachurus* referans genomuna (Genome assembly fTraTra1.2, Genbank ID: GCA_905171665.1) hizalandı. Son birleştirmeden sonra, *T. trachurus*'un toplam dizi uzunluğunun 1051,7 Mb ve maksimum dizi uzunluğunun 230,8 kb olduğunu, *T. picturatus*'un toplam dizi uzunluğunun 1080,9 Mb ve maksimum dizi uzunluğunun 205,1 kb olduğunu ve ayrıca *T. mediterraneus*'un toplam dizi uzunluğunun 838,7 Mb ve maksimum dizi uzunluğunun 107,6 kb olduğunu belirledik. *T. trachurus* için dizilerin çoğunluğu, % 99,5'i 24 kromozoma birleştirildi ve konsensusları oluşturuldu. Dizilerin % 94,53'ü ve % 98,9'u *T. mediterraneus* ve *T. picturatus* için sırasıyla kromozomal seviyede birleştirildi ve konsensusları oluşturuldu. (Tablo 7,8,9). Oluşturulan konsensuslar hem FASTA hem de BAM dosyası formatında sonraki çalışmalar için saklanmaktadır.

Tablo 7. *T. picturatus* için genom birleştirme istatistikleri

INSDC accession	Kromozom	Sekans Uzunluk (Mb)	Ref. Sek. Uzunluk (Mb)	Sekans Sayısı	Özdeş alanlar %	GC %	Maks. Uzunluk (b)	Kontig. ref sek %
LR991628	1	55,14	40,75	1.019.316	43,7	41,9	109.319	98,7
LR991651	2	20,23	15,47	320.581	45,4	42,5	29.313	99,3
LR991630	3	53,43	40,66	975.618	46,5	41,6	53.307	99,1
LR991635	4	48,05	36,09	885.108	45,4	42	65.478	99
LR991633	5	48,11	36,89	787.770	47,2	41,8	141.559	99
LR991634	6	49,29	36,28	906.142	43,7	41,5	39.152	99,2
LR991638	7	46,56	35,45	803.564	46,5	42,1	59.082	99,2
LR991642	8	44,98	33,05	842.554	43,1	42,6	78.747	98,7
LR991632	9	50,43	37,4	940.463	44,3	41,9	32.113	99
LR991631	10	51,94	38,57	991.536	44,4	42	205.115	98,9
LR991641	11	45,67	33,39	888.229	42,7	42	85.709	99
LR991645	12	40,24	29,58	750.931	44,2	41,2	58.622	99,1
LR991629	13	55,78	40,7	1.140.342	42,9	42,4	205.115	98,4
LR991640	14	44,69	33,71	786.119	45,8	42,2	39.152	98,9
LR991643	15	40,82	31,05	701.423	46,9	41,6	48.830	99
LR991639	16	47,18	35,01	817.035	45,1	42,3	78.747	99,1
LR991637	17	48,29	35,71	927.885	43,4	42,2	141.559	99
LR991646	18	40,62	29,25	814.136	40,5	42,2	205.115	97,9
LR991650	19	32,99	25,33	502.960	47,1	42,2	59.369	99,4
LR991648	20	33,11	25,46	532.073	47,2	42,1	105.965	99,1
LR991636	21	47,98	35,83	859.881	45,1	42,1	79.365	98,8
LR991644	22	40,44	30,6	706.662	45,8	41,9	141.559	99,3
LR991649	23	33,61	25,35	567.125	44,9	41,9	93.394	99,3
LR991647	24	38,37	29,13	661.366	46,1	42	141.559	99,1
LR991652	MT	0,06	0,02	10.007	0,1	45,8	16.007	100
Unplaced Scaffold		22,91	10,5	896.708	37,35	41,7	29.556	84,6

Tablo 8. *T. trachurus* için genom birleştirme istatistikleri

INSDC accession	Kromozom	Sekans Uzunluk (Mb)	Ref. Sek. Uzunluk (Mb)	Sekans Sayısı	Özdeş alanlar%	GC %	Maks. Uzunluk (b)	Kontig ref sek %
LR991628	1	53,26	40,75	921.195	46,1	41,7	99.521	99,2
LR991651	2	20,16	15,47	321.297	46,4	42,0	35.084	99,9
LR991630	3	52,06	40,66	865.669	48,6	41,5	47.851	99,7
LR991635	4	46,64	36,09	768.057	47,7	41,9	88.028	99,7
LR991633	5	47,18	36,89	749.379	49,1	41,5	143.087	99,7
LR991634	6	47,27	36,28	781.194	46,9	41,9	83.631	99,5
LR991638	7	45,35	35,45	733.832	48,7	41,9	119.946	99,6
LR991642	8	43,31	33,05	740.707	45,8	42,2	67.816	99,4
LR991632	9	48,55	37,4	817.361	47,3	42,0	96.489	99,2
LR991631	10	50,32	38,57	892.395	46,8	41,8	119.946	99,7
LR991641	11	44,18	33,39	791.197	45,0	42,1	114.030	99,5
LR991645	12	38,54	29,58	611.200	46,9	41,6	58.248	99,6
LR991629	13	54,52	40,7	1.059.617	44,9	42,4	230.822	99,6
LR991640	14	43,24	33,71	713.956	48,2	41,9	65.960	99,7
LR991643	15	39,47	31,05	621.381	49,4	41,7	73.316	99,6
LR991639	16	45,11	35,01	735.336	48,0	41,8	82.455	99,6
LR991637	17	46,67	35,71	820.166	46,3	41,9	92.459	99,6
LR991646	18	39,44	29,25	712.212	42,5	41,9	106.863	98,5
LR991650	19	32,28	25,33	475.447	48,9	42,0	34.562	99,7
LR991648	20	32,28	25,46	482.274	49,1	42,0	52.225	99,5
LR991636	21	46,64	35,83	784.569	47,0	41,8	73.316	99,5
LR991644	22	39,47	30,6	629.546	47,8	42,2	49.480	99,8
LR991649	23	33,05	25,35	530.448	46,5	42,1	72.057	99,7
LR991647	24	37,62	29,13	603.123	47,7	41,9	69.035	99,5
LR991652	MT	0,06	0,02	12.113	0,05	45,4	13.714	100,0
Unplaced Scaffold		25,07	10,5	1.198.936	16,4	40,9	119.946	94,5

Tablo 9. *T. mediterraneus* için genom birleştirme istatistikleri

INSDC accession	Kromozom	Sekans Uzunluk (Mb)	Ref. Sek. Uzunluk (Mb)	Sekans Sayısı	Özdeş alanlar %	GC %	Maks. Uzunluk (b)	Kontig. ref sek %
LR991628	1	42,68	40,75	2.769.372	74,5	42,6	17.622	94
LR991651	2	16,19	15,47	1.016.390	76,2	43,3	14.662	94,7
LR991630	3	42,47	40,66	270.613	77	42,6	70.602	94,3
LR991635	4	37,79	36,09	2.512.607	75,5	42,9	107.589	94,4
LR991633	5	38,62	36,89	2.484.838	76,9	42,7	24.412	94,7
LR991634	6	37,97	36,28	2.415.113	75,4	42,7	16.382	94,9
LR991638	7	37,05	35,45	2.442.711	76,8	42,8	24.054	95,6
LR991642	8	34,66	33,05	2.397.923	74,3	43,5	17.571	94,1
LR991632	9	39,11	37,4	2.584.517	76,2	42,8	15.733	94,6
LR991631	10	40,38	38,57	2.518.092	74,5	42,6	23.456	93
LR991641	11	35,02	33,39	2.276.451	74,3	42,9	16.218	94,2
LR991645	12	30,99	29,58	1.916.434	76,2	42,4	24.412	94,4
LR991629	13	42,75	40,7	2.930.920	72,6	43,2	72.277	92,7
LR991640	14	35,22	33,71	2.295.867	76,3	42,8	70.602	94,3
LR991643	15	32,37	31,05	2.075.509	78,1	42,6	16.818	95,5
LR991639	16	36,54	35,01	2.333.739	76,9	42,7	49.471	94,8
LR991637	17	37,43	35,71	2.695.909	74,2	43,0	26.053	95
LR991646	18	30,71	29,25	2.011.255	71,5	43,1	107.589	92,3
LR991650	19	26,43	25,33	1.702.407	78,4	42,9	17.497	96,6
LR991648	20	25,58	25,46	1.710.090	78,2	42,9	26.053	95,8
LR991636	21	37,43	35,83	2.411.981	75,7	42,6	57.514	94,4
LR991644	22	31,97	30,6	1.986.952	77,1	43,0	67.436	94,2
LR991649	23	26,54	25,35	1.685.666	76,6	42,8	17.063	95,4
LR991647	24	30,52	29,13	1.942.529	76,6	42,8	18.016	94,9
LR991652	MT	0,02	0,02	33.619	6,1	46,7	7.424	100
Unplaced Scaffold		11,17	10,5	919.677	50,1	44,3	14.576	56,9

Sekans sayısı: Bir hizalamadaki veya dizi kümesindeki dizilerin sayısı

Özdeş alanlar: Hizalamada tüm dizilerin aynı olduğu sütunların yüzdesi

Kontig. ref sek : Bir veya daha fazla okuma tarafından kapsanan bir kontigdeki referans dizisinin yüzdesi

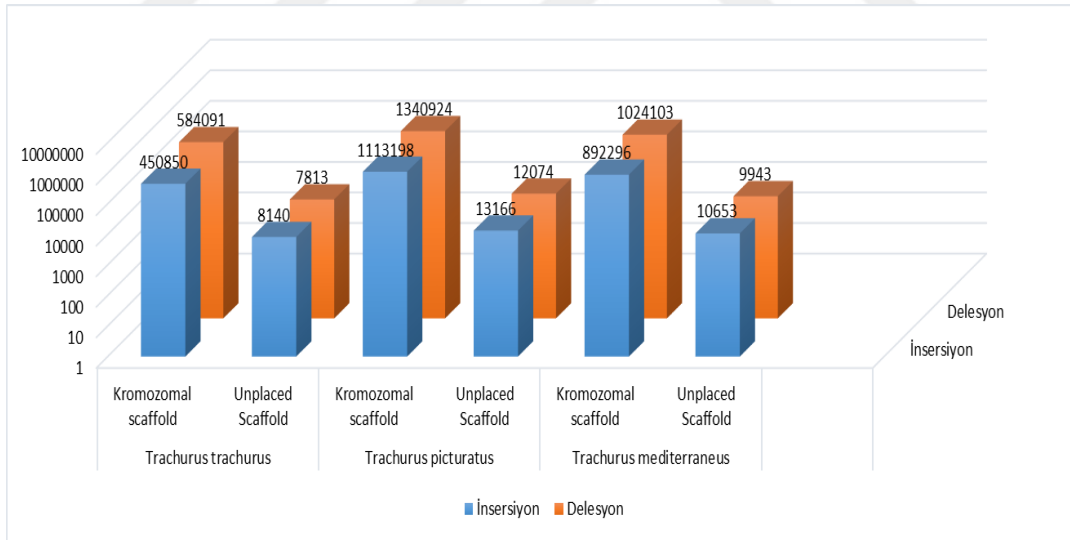
GC: A, C, G, T, U, S, W nükleotidlerinin (referans dizisi hariç) G, C veya S olan yüzdesi

Maks. Uzunluk: Bir dizi listesindeki veya hizalamadaki referans olmayan dizilerin maksimum uzunluğu

3.4. SNP tespiti

SNP'lerin dağılımını belirlemek için GeneBank fTraTra1.2 Genbank ID: GCA_905171665.1. *T. trachurus* türünün referans genomundan yararlandık. *T. trachurus* genomunda 1.313.612 transition ve 997.774 transversiyon olmak üzere toplam 2.311.386 SNP; *T. picturatus* genomunda 2.927.066 transition ve 2.172.700 transversiyon olmak üzere toplam 5.099.766 SNP; *T. mediterraneus* genomunda 2.940.560 transisyon ve 2.067.303 transversiyon olmak üzere toplam 5.007.863 SNP tespit ettik (Tablo 10, 11, 12). *T. trachurus*, *T. picturatus* ve *T. mediterraneus* için tespit edilen toplam insersiyon sayısı sırasıyla 458.990, 1.126.362, 905.097 ve toplam delesyon sayısı 591.904, 1.352.994 ve 1.040.946'dır (Şekil 32).

Kromozomlardaki SNP sayısı ile Mb cinsinden toplam kromozom büyüklüğü arasındaki ilişki Şekil 33'te gösterilmiştir. *T. mediterraneus*'ta SNP sayısı ile kromozom büyüklüğü arasındaki korelasyon katsayısı (r) 0,92'dir. *T. picturatus* ve *T. trachurus*'ta sırasıyla 0,91, 0,84'tür. Tespit edilen SNP'ler üç Trachurus türünün genom derlemesindeki kromozomlar arasında eşit bir dağılım göstermektedir.



Şekil 32. İnsersiyon ve delesyon miktarları

Tablo 10. *T. mediterraneus* için kromozomal seviyede transisyon ve transversiyon SNP'lerin miktarları

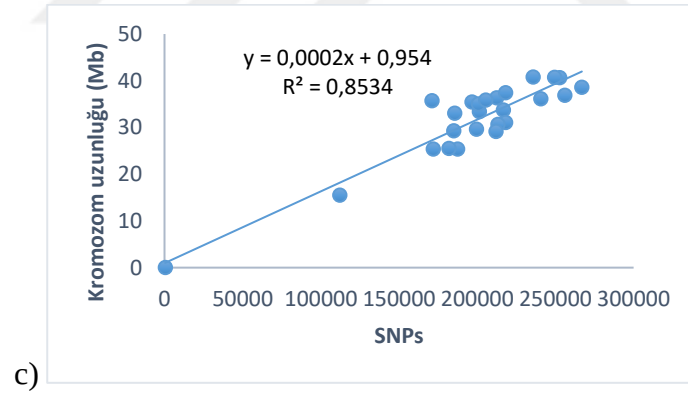
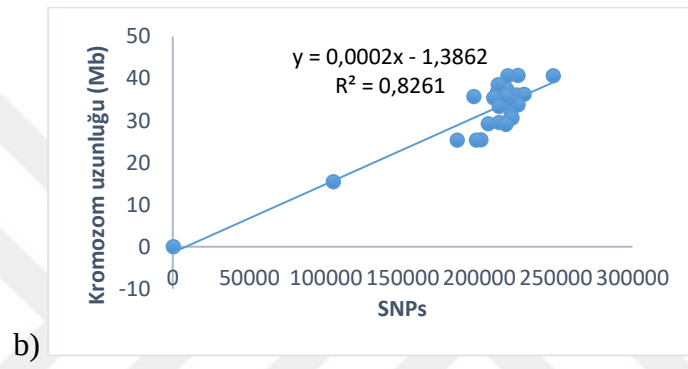
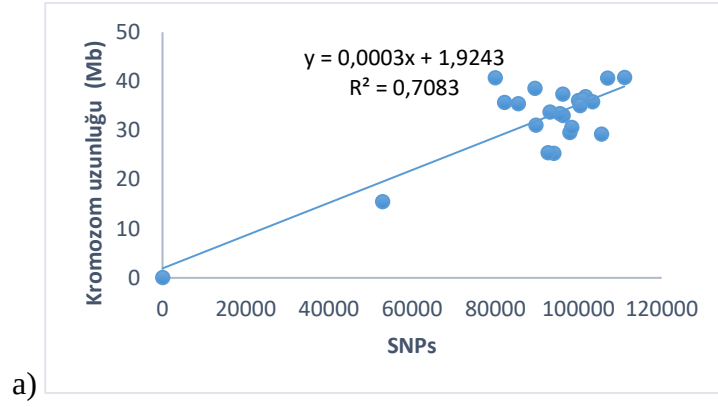
INSDC accession	Kromozom	SNP (Transisyon)				SNP (Transversiyon)								Toplam
		A -> G	C -> T	G -> A	T -> C	A -> C	A -> T	C -> A	C -> G	G -> C	G -> T	T -> A	T -> G	
LR991628	1	35094	34334	34188	34640	12879	13374	12729	9708	9693	12675	13391	12915	235620
LR991651	2	14961	17487	17669	14997	5719	6167	6190	5279	5240	6249	6412	5775	112145
LR991630	3	36662	37496	37681	36988	13479	14004	13584	10899	10771	13728	13990	13467	252749
LR991635	4	35439	35700	35593	35295	12527	13429	12738	10496	10439	12709	13514	12668	240547
LR991633	5	37685	37819	37716	37556	13500	14267	13514	11181	11041	13511	14370	13766	255926
LR991634	6	31129	30801	30401	31754	11720	12088	11200	9071	9184	11015	12175	11780	212318
LR991638	7	29550	28042	28023	29320	10852	11071	10445	8290	8232	10728	11081	10918	196552
LR991642	8	28223	26402	26322	27758	10098	10370	9896	7980	8081	9841	10361	10205	185537
LR991632	9	32540	31433	31697	32629	11939	12335	11568	9137	8891	11624	12337	11892	218022
LR991631	10	40240	38934	39383	39939	14294	14890	13751	10952	11005	13630	15335	14554	266907
LR991641	11	29152	29887	29439	29481	10607	11481	10687	8926	8791	10770	11368	10798	201387
LR991645	12	28767	29563	29268	28839	10571	11308	10878	8810	8670	10764	11419	10557	199414
LR991629	13	37545	36210	36366	37723	13571	14089	13251	10173	9940	13058	13958	13596	249480
LR991640	14	31977	31805	31840	32061	11534	12107	11443	9195	9380	11603	12329	11483	216757
LR991643	15	30735	32619	32833	30370	11440	12865	12260	9174	9078	12472	12839	11373	218058
LR991639	16	29849	29489	29351	29160	10864	11462	10671	8595	8731	10665	11222	10751	200810
LR991637	17	25480	24751	24665	24838	9525	9563	9632	7139	7020	9634	9441	9438	171126
LR991646	18	25784	27872	27750	25513	9512	11080	10191	8285	8227	10304	10856	9514	184888
LR991650	19	26120	28673	28495	25880	9875	10914	10068	8171	8083	10622	10793	9639	187333
LR991648	20	25133	27846	28280	24663	9121	10598	10091	8144	7991	10298	10725	8994	181884
LR991636	21	28850	30728	31013	29164	11107	12230	11148	8623	8365	11434	11863	10832	205357
LR991644	22	30210	32515	32820	30378	10961	11902	11466	9298	9253	11391	11912	11156	213262
LR991649	23	25072	27319	27352	25328	9386	10561	10020	8118	8109	10172	1055	9296	171788
LR991647	24	30530	31961	31900	30029	11262	11827	11304	9451	9293	11441	11939	11037	211974
LR991652	MT	83	94	73	98	10	9	11	6	14	4	11	6	419
Unplaced Scaffold		2434	2473	2487	2405	1051	1097	968	989	1014	951	1103	1050	18022

Tablo 11. *T. picturatus* için kromozomal seviyede transisyon ve transversiyon SNP'lerin miktarları

INSDC accession	Kromozom	SNP (Transisyon)				SNP (Transversiyon)								Toplam
		A -> G	C -> T	G -> A	T -> C	A -> C	A -> T	C -> A	C -> G	G -> C	G -> T	T -> A	T -> G	
LR991628	1	33701	31913	31665	33334	12891	13760	11928	8910	8753	12060	13552	12953	225420
LR991651	2	14971	15141	15016	14478	5704	6112	5704	5087	5184	5740	6031	5648	104816
LR991630	3	32549	30273	30193	32794	12753	13343	11473	8874	8928	11882	13161	12463	218686
LR991635	4	33551	31261	31511	33549	12536	13746	11761	9219	9133	12048	13612	12520	224447
LR991633	5	31451	29038	28858	31304	11981	13238	11349	8963	8971	11380	12943	12441	211917
LR991634	6	33744	32569	31994	33718	13027	13861	12233	9342	9262	12378	14059	13063	229250
LR991638	7	31030	29196	29006	31027	11880	12732	11237	8614	8537	11607	12553	12038	209457
LR991642	8	32587	31098	30618	32217	12336	13604	11807	9192	9234	11586	13397	12585	220261
LR991632	9	31787	30693	30573	32181	12319	13443	11791	8880	8724	11723	13531	12400	218045
LR991631	10	31446	29063	28937	31697	12588	13002	11570	8398	8343	11734	13006	12598	212382
LR991641	11	31302	29636	29179	31651	12136	13179	11223	8873	8879	11428	13234	12287	213007
LR991645	12	31140	29722	29348	31162	11994	13201	11376	8989	8927	11608	13461	12080	213008
LR991629	13	38128	33962	33923	37938	14304	15140	13018	9942	9909	12992	14722	14412	248390
LR991640	14	33349	31690	31516	33614	12838	13626	11836	9215	9346	12164	13522	12621	225337
LR991643	15	32439	30989	30906	32325	12319	13631	11852	9464	9467	11998	13379	11994	220763
LR991639	16	32585	31141	30849	32701	12210	13474	11499	9047	8965	11864	13333	12207	219875
LR991637	17	28920	27703	27399	28726	11376	11734	10846	7985	8049	10903	11626	11315	196582
LR991646	18	30333	28471	28589	30065	11414	12914	11105	8791	8746	11141	12748	11651	205968
LR991650	19	26669	26867	26149	26857	10324	11092	10101	7971	8089	10165	11189	10098	185571
LR991648	20	29039	28565	28335	28816	11167	12000	10765	9034	9021	10976	12392	10954	201064
LR991636	21	31999	30664	30227	32033	12284	13413	11867	8954	8838	11942	13435	12249	217905
LR991644	22	32272	31345	31229	31862	12279	13765	11854	9218	9394	12187	13703	12342	221450
LR991649	23	28834	28055	27929	28845	10761	12006	10499	8783	8675	10778	12084	10834	198083
LR991647	24	32061	30570	30166	31827	12189	13321	11463	9195	9171	11881	13448	12106	217398
LR991652	MT	82	105	77	86	12	14	12	7	10	3	7	10	425
Unplaced Scaffold		5905	5404	6253	5156	2275	2649	2361	1855	1811	2066	2509	2440	40684

Tablo 12. *T. trachurus* için kromozomal seviyede transisyon ve transversiyon SNP'lerin miktarları

INSDC accession	Kromozom	SNP (Transisyon)				SNP (Transversiyon)								Toplam
		A -> G	C -> T	G -> A	T -> C	A -> C	A -> T	C -> A	C -> G	G -> C	G -> T	T -> A	T -> G	
LR991628	1	17333	14575	14437	16996	6731	7071	5870	4294	4321	6014	6819	6592	111053
LR991651	2	8108	7077	7104	7928	2987	3204	2846	2421	2290	2869	3154	2944	52932
LR991630	3	16344	13880	13899	16789	6497	6615	5826	4236	4116	5925	6597	6308	107032
LR991635	4	15240	13252	12877	15329	5910	6343	5288	4008	3977	5428	6400	5986	100038
LR991633	5	15522	13096	13008	15552	6057	6498	5611	4090	4155	5645	6375	6102	101711
LR991634	6	15343	13337	13216	15216	6006	6298	5604	4078	3992	5497	6459	5956	101002
LR991638	7	12978	11153	11178	13084	5172	5194	4844	3392	3328	4786	5403	5020	85532
LR991642	8	14781	12571	12786	14751	5578	6055	5174	3797	3897	5209	5984	5705	96288
LR991632	9	14725	12626	12503	14766	5682	5959	5313	3831	3750	5265	6045	5768	96233
LR991631	10	13796	11471	11386	13748	5612	5608	4967	3404	3364	4900	5577	5732	89565
LR991641	11	14384	12326	12242	14910	5658	6108	5165	3836	3858	5242	5995	5802	95526
LR991645	12	14839	12851	12741	14918	5798	6205	5391	3927	3959	5320	6286	5666	97901
LR991629	13	12636	10215	10297	12469	4893	4788	4423	2945	3021	4477	4824	5023	80011
LR991640	14	14417	12213	12161	14189	5514	5854	5017	3715	3656	5227	5735	5497	93195
LR991643	15	13916	11747	11934	13616	5242	5584	4754	3726	3658	4853	5538	5207	89775
LR991639	16	15407	13253	13267	15436	5876	6166	5318	3984	3977	5448	6218	6025	100375
LR991637	17	12366	10987	10552	12537	4837	5001	4684	3294	3197	4695	5026	5031	82207
LR991646	18	16339	13840	13881	16040	6147	6719	5590	4257	4369	5647	6473	6234	105536
LR991650	19	14601	12666	12313	14725	5517	5656	4905	3832	3867	4896	5743	5341	94062
LR991648	20	14334	12292	12341	14044	5272	5696	4857	3974	3931	4974	5680	5287	92682
LR991636	21	15671	13580	13479	15931	6100	6486	5676	4125	4014	5720	6504	6119	103405
LR991644	22	15012	12988	12864	14786	5817	6286	5467	3918	3980	5199	6365	5719	98401
LR991649	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LR991647	24	32061	30570	30166	31827	12189	13321	11463	9195	9171	11881	13448	12106	217398
LR991652	MT	8	7	6	14	0	0	0	1	3	0	0	0	39
Unplaced Scaffold		2761	2623	2772	2518	1069	1289	1111	935	864	1075	1342	1167	19526



Şekil 33. SNP sayısı ile kromozom uzunluğu arasındaki ilişki a) *T. trachurus*, b) *T. picturatus*, c) *T. mediterraneus*

3.5. Tür İçi SNP Markır İzolasyonu ve Karakterizasyonu

SNP bölgelerini içeren primerler her tür için ayrı ayrı dizayn edildi ve 13. kromozomdan izole edildi. Primerler daha sonra Integrated DNA Technologies OligoAnalyzer™ Tool aracılığıyla analiz edilerek ve bazı önemli kriterleri sağlamasına dikkat edilerek seçildi (Tablo 13,14,15). Bu kriterler şöyledir;

- Optimum G/C içeriği: %45-55 olmalıdır.
- Optimum primer uzunluğu 18-24 bp olmalıdır.
- Tm 52-60 °C olmalı, Tm >65°C kaçınılmalıdır
- Primer çifti arasındaki istenen Tm farkı <5°C olmalıdır
- G/C kelepçesi: 3' ucundaki beş nükleotid 3'ten fazla G veya C bazlarından oluşmamalıdır.
- Maksimum 3' ucu kararlılığı 0,00-5,00 arasında olmalıdır (0 = en iyi); $\Delta G < -9$ 'dan kaçınılmalıdır.
- Amplikon uzunluğu optimum 50-150 bp'dir, >400 bp'den kaçınılmalıdır.
- Hairpin: 3' ucu için $\Delta G > -2$ kcal/mol; primer içi hairpin için $\Delta G > -3$ kcal/mol olmalıdır.
- Self dimer: 3' uç selfdimer için $\Delta G > -5$ kcal/mol; primer içi selfdimer için $\Delta G > -6$ kcal/mol olmalıdır.
- Heterodimer: 3' uç heterodimer için $\Delta G > -5$ kcal/mol; primer içi heterodimer için $\Delta G > -6$ kcal/mol olmalıdır.

Tablo 13. *T. mediterraneus* için tür içi SNP markırı

Lokus	Primer Dizisi	Uzunluk	Tm	%GC	Ürün	SNP
TM_3	F:GACGTGAGTTTACAGCTCTGAT R:TGTGTGCAAAGTCTACCAGTT	22 21	62,1 62,1	45,4 42,8	270	C/G
TM_6	F:GCTGTTGTGTGTTTGTGCTATG R:TCGACAAACTCACCTTCTTTCC	22 22	62,5 62,4	45,4 45,4	212	C/T
TM_21	F:ACTGTAAGTGAACACCACTGAA R:CAGAGCAAAGAGCAGGATGA	22 20	61,8 61,8	40,9 50	287	C/G
TM_22	F:TGTCCAGTTTGTTCCTTCA R:CGCCCAACGACTCTCTAAAC	21 20	62,1 62,3	42,8 55	252	C/G
TM_28	F:TCCACATTTCTGTCTCTCAAC R:TCTGGTTCCCGCCTTCTA	22 18	62,1 62,1	45,4 55,5	315	A/C-C/T
TM_35	F:CTGTTGTTCCGGCTCATTGTTG R:GTTTCCTCTTCAGACGTTCT	21 21	62,1 61,7	47,6 47,6	259	C/G
TM_36	F:TGACTCCACACTGTTGGTTAC R:CTTGAAGGTCTGCATGAGTACA	21 22	61,9 62,1	47,6 45,4	211	A/T
TM_44	F:TCTCATAGCGTGGTGAATGTG R:CAACTATAAACATCTGGACAAACAGAC	21 27	62,1 62,3	47,6 37,0	215	G/T
TM_45	F:GGAGTGAGTCACAGAGCAATAA R:ACCGCAGCCTGAATAAAGT	22 19	61,8 61,7	45,4 47,3	223	C/T
TM_52	F:CACTGTGTATTGCCACACTTTC R:ACTGTATGTTAGGTCCCTTTCAC	22 23	61,8 61,9	45,4 43,4	201	A/G
TM_53	F:GAGGTGTTTGTGTTGCTAACG R:CACTCAGAGATGACGATGTGAA	21 22	61,7 61,7	47,6 45,4	292	A/G
TM_56	F:CTAAGCGGTATGTGTGGAGAAA R:GCAGCACTCAAGGTTCTTAA	22 20	62,1 62,1	45,4 50	287	A/G-A/C
TM_60	F:CGCTAGAAACGCATCAAACAC R:CGGTACAACAGACACTACTGAAT	21 23	62 62	47,6 43,4	385	A/T
TM_63	F:TCTTTGAGGGAACCTCTGAATC R:GCAACAAGTGGCAGAGAAATAA	22 22	61,6 61,6	45,4 40,9	232	C/T
TM_76	F:TTATAGACAGGAGGAGGCTCAG R:CTGGAGATGTGCGTTAGGTTT	22 21	62,2 62,3	50 47,6	228	A/G
TM_83	F:GCCTGTTCCATATAGACGCT R:ACAGAGTTGCGGTGATTGT	20 19	61,4 61,9	50 47,3	245	A/G
TM_89	F:CTCTTGTCGGTCAAGGGTAAG R:GCCTGTATAAGTAGGAGTGGATTT	21 24	61,8 61,9	52,3 41,6	238	A/G
TM_90	F:ACGGCATTGACCATTCTCTT R:TTTGGAGTGAACGACTACTGATT	20 23	62,1 62	45 39,1	231	A/G
TM_93	F:GAGGAGAATGAGTGAAAGTCAGG R:CACTGTGATGGCAGATCCAATA	23 22	62,1 62,2	47,8 45,4	208	A/C
TM_97	F:GTGATTAACAGAGGAGAATGAGTGA R:TGGCAGATCCAATACATACGC	25 21	62,2 62,2	40 47,6	210	A/C
TM_104	F:AAATCATCAGAGTAGTAGCAAACC R:GATCACAATAACAGTACAGTAGCC	24 24	60,9 60,9	37,5 41,6	205	A/T
TM_110	F:GCCCATAGACGTTATTGACTGT R:CCTTGCTATCTGTTGTCTCTG	22 22	62,1 62,2	45,4 50	227	A/G
TM_121	F:ATTCACTCCATACAGCAAAGGA R:GTAGACAGACCAGGCAGAAAG	22 21	61,9 61,8	40,9 52,3	200	A/C
TM_128	F:GCTAACAACAGTGGTGGCTATAC R:CGAGGCTTCAAATGGGATGTT	23 21	62,9 63	47,8 47,6	207	A/T
TM_132	F:GCTAATCAAACATGTGAGTGTCC R:CTGTTCACTCTGGCTCTTCTT	23 21	61,7 61,7	43,4 47,6	246	A/C
TM_134	F:GGAGGCAGGTTGTCTCTAATC R:ATGGCACCAGAGCTCATATC	21 20	61,7 61,5	52,3 50	251	C/G
TM_137	F:CGGCGGCTCATTGAAGTAT R:AGAGGAGGAAGTCACTGGTT	19 20	62,2 62,3	52,6 50	248	C/A
TM_138	F:CAGTTTGGGAGGCAGGTT R:CCAGAGGTAACACTCACAGTTT	18 22	61,9 62	55,5 45,4	222	C/G
TM_136	F:CATGATACCCAGGGACCAGATA R:TGTCTAAGGAGGTGCAGAGG	22 20	62,6 62,7	50 55	215	C/G

Tablo 14. *T. trachurus* için tür içi SNP markırı

Lokus	Primer Dizisi	Uzunluk	Tm	%GC	Ürün	SNP
TT_1	GCTGTATTGACAGTGACTTGAGA	23	62,3	43,5	229	C/T-A/G
	ACAACGACAAGGAGCATGAG	20	62,3	50		
TT_7	CTGTGTCTTGTCTGTCAGGTT	21	61,9	47,6	256	C/T-A/G
	AGCGGGAGGTTTCAGACT	17	62,1	58,8		
TT_9	ACCCTAACCCTTAAAGCAGAAG	22	62,0	45,5	203	C/T
	CGTTCTCTCTCCTCATTGGATAAA	24	62,0	41,7		
TT_12	AGTTGTATCTTCCGACAGCAATC	23	62,7	43,5	206	C/T-C/G
	TCCCTACGTCACCACATTCA	20	62,8	50		
TT_15	CTTCCTGGCTAACTTTATGTCTTTAC	26	61,8	38,5	364	C/T
	TGCCGATGATGGTGGATTT	19	61,9	47,4		
TT_16	ACGGTCTAAATCCACCATCATC	22	62,0	45,5	225	A/T
	AACAGCAGAATTTACCACAAC	22	62,1	40,9		
TT_18	GAGCGTTCAGTTGTGGTGA	19	62,2	52,6	240	A/C-A/G
	GTTTCTTGTCTCTCTGCCTGT	21	62,0	47,6		
TT_23	ACAACCTCTCATTCAATGTGTTTCC	25	62,5	36	237	C/T
	GCAAAGCAGTAATCAGAGCAAAG	23	62,5	43,5		
TT_27	CGGGACAGATAACTGATACTGATAC	25	61,9	44	497	G/T
	CTGTAGCTCGACTGTGACAAA	21	61,9	47,6		
TT_34	CTCAAGACAGCACTATACACTACTT	25	62,0	40	452	A/T-C/T
	TCGGTCTGCTTTAGATTGACTC	21	62,1	47,6		
TT_36	CGACCCACCAAGAAATGAGAA	21	62,4	47,6	310	C/T-A/G
	ACAGGCATCAAACGTACTGAA	22	62,3	40,9		
TT_38	ACACACACCAACCACAGATT	20	62,2	45	274	C/T
	TCTGACTCTTCTGCTCCTCTT	21	62,3	47,6		
TT_42	CCGACAGGTCTGAAATTCTACA	22	61,8	45,5	302	A/T-G/T
	GCATACAAAGTTGGCTTGACTTC	22	62,0	45,5		
TT_57	GAAGACGATGACATGGTGAGAA	22	62,1	45,5	228	A/T
	CACCTATACCTTTAGCAGTGTAGT	25	62,1	40		
TT_61	ACCCGCACACAGTTTGAA	18	62,1	50	241	G/T
	CCTTTAGCAGTGTTAGTATCCAGT	24	62,0	41,7		
TT_63	ACACCAACACTGCTCACATAA	21	62,2	42,9	293	C/T-G/T
	CCGAATAGAACTCCTCGTTGT	22	62,1	45,5		
TT_67	TGTGTGATGGAGTTGACTAAGG	22	61,8	45,5	235	G/T-A/C-A/G
	GCTACCAACATGAGGGAAACTA	22	62,0	45,5		
TT_71	ACTTTGTTTGTTCGGGTCTTTG	22	62,0	40,9	208	G/T-A/G
	GAGTGAGCAGCCAACAGTAG	20	62,1	55		
TT_73	TCATTCCGATAATGTCCCGAAA	22	61,9	40,9	249	C/T-A/T
	ACCCAATTCCAGGTCAACTC	20	61,9	50		
TT_82	CAGGTCAGAGACAGACAGAAATG	23	62,4	47,8	259	A/G
	TGCTCCTCATTGACTCCAATAC	22	62,0	45,5		
TT_91	GGTTTATTCTGTGTTGATACTCCT	25	62,6	40	213	C/T
	ACATCAGAACAGCCCATCATTT	22	62,8	40,9		
TT_92	GCATCCATCCAGTACCCATAC	21	61,9	52,4	307	C/T-G/T-C/G
	ATCCTCTGACCCATACTCATCT	22	62,0	45,5		
TT_96	GATGTTCCAGGATCAGCGTAG	21	62,0	52,4	206	C/T-A/G
	CTGACCCATACTCATCTTCTAGTG	24	61,6	45,8		
TT_97	TTTAATCGGCTCGGCTCTG	19	61,9	52,6	200	C/T
	TTGGTCAGTGTCTCTGATCTTT	23	62,1	39,1		
TT_107	CAGACAAGTCTTGGCAGTCT	20	61,7	50	205	A/C
	CTCATTCAAATTACGTGCTGGTT	23	62,0	39,1		
TT_110	GCTGACAAATGATCCTCAAATTC	23	60,5	39,1	205	A/C
	TTTCTACCAGGAAGTAGCCT	20	60,1	45		
TT_120	GTTGCCGTGGTTACAAGTAT	20	60,4	45	200	A/G-A/C
	GTCAGCCCTTTACTATTTCATTG	22	59,1	40,9		
TT_128	CCACCTGCGGGCATAATA	18	61,5	55,6	202	A/G
	GTCGAGGTTGGTCTGAGTTG	20	62,0	55		
TT_127	GGCGTTGTACATCGTACATTCA	22	62,8	45,5	201	C/T
	GAAGGTTTGTGGCGAGGTC	19	62,7	57,9		

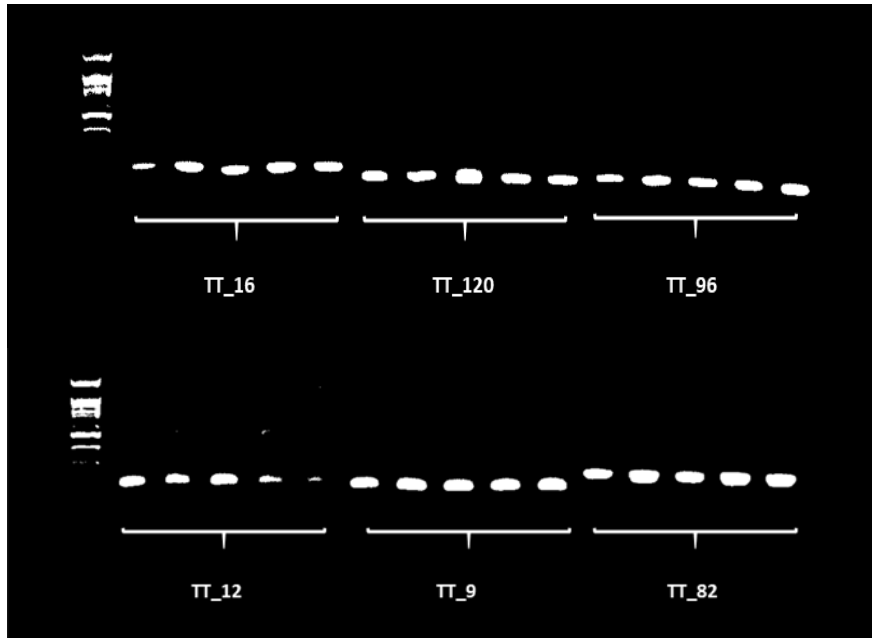
Tablo 15. *T. picturatus* için tür içi SNP markır

Lokus	Primer Dizisi	Uzunluk	Tm	%GC	Ürün	SNP
TP_1	AGGTCATCATCCTGAACCAC	20	61,4	50	220	G/C
	GAGAAGCTCTCCACACACAT	20	61,5	50		
TP_6	AGGTGAGTTCAATCACTCTGAC	22	61,8	45,5	214	A/C-A/G-
	CAGTGTTTGGTTTGTCCCTTC	21	61,6	47,6		G/T
TP_10	TTCTTCACCACTAGATGTCACCTG	23	61,8	43,5	218	C/G-C/T
	CCTTCAGGTTTCCAGCTTCT	20	61,9	50		
TP_17	AGAGAGATGAAACTCAGAGAGGA	23	62,1	43,5	204	A/G-A/C
	CTGAAACTTCTCACAGCCCTTA	22	62,1	45,5		
TP_22	GAGGAGGGAGCAGCAATG	18	61,9	61,1	202	A/C-C/T-
	GCCCAAAGCGGTAGTGT	17	61,9	58,8		A/G
TP_27	AGATGTGGACAACCTGGCT	18	60,8	50	214	A/G-C/T
	GTCTTGATGTAGTGATCCTGAATAC	25	60,8	40		
TP_33	ATGCTAGGTTTACTACCTCATGTT	24	61,8	37,5	202	G/T-A/G-
	GGAGTCTGTGAAGATTAGAACCA	23	61,7	43,5		C/G
TP_35	TGAAATCCTGTTGGAGTTGAGG	22	62,4	45,5	203	C/T
	CATCAGTTGCTGAACGAGGT	20	62,3	50		
TP_41	TGTGGCATGTCTCCCAAATC	20	62,5	50	259	C/T-C/G-
	CGGATCTGAAAGCCCGTTATC	21	62,5	52,4		G/T
TP_44	TCAAGTGGCAATCTGCTCAT	20	62,1	45	315	C/T-C/G-
	GTTTATGGTTTGGAGACTCGGA	22	62,1	45,5		G/T
TP_50	GGACTACCATATTACACACAGG	23	62,3	47,8	225	A/G-A/T
	GTACTTAATCTCAACACTTCCTCCA	25	62,2	40		
TP_52	TCAAGGTGGAAATATCCGTCTAC	23	61,7	43,5	225	A/T
	CTGGTTGTTGTGCTGTCATC	21	61,9	47,6		
TP_59	CTGTGAAATGTGAATGTGAAGTGA	25	62,0	36	288	A/T-C/T-
	CATGTGGATGGGCTCTTAGTT	21	62,0	47,6		C/G
TP_60	ACTGGAAACTACCATGAACATATCTC	26	62,6	38,5	228	C/T
	GTCTGCTAAACCGTCTGCTAAA	22	62,5	45,5		
TP_62	CCACACTGTGAAATGTGAATGT	22	61,6	40,9	276	A/T-C/T-
	AGTTTAAGAGCAGCTTCTTTCTTG	24	61,7	37,5		C/G
TP_66	TTCAATGGATCGGTGTGGAC	20	62,1	50	251	A/G-C/T
	ACTGTCATCATTTCTGGCTTTA	23	62,5	39,1		
TP_70	ACATGGCTGTCAGGAAGAATAA	22	61,9	40,9	269	A/C-G/T
	TTAAACCCAGGTGGACAATAGAG	23	62,0	43,5		
TP_72	TGTCAGGAAGAATAATGAGCTTCT	24	62,0	37,5	201	A/C-G/T
	GAGCCTACAGTACAGTGAGAATG	23	61,9	47,8		
TP_74	AAACAGGACGACGTGAACT	19	61,5	47,4	200	A/C-G/T
	GA CTCATATAGTGTCCAACAATGC	24	61,4	41,7		
TP_75	GTGTGTGTGAGAGCCATGTAA	21	62,3	47,6	287	C/G-A/G-
	GACAGGAATCTGATGGAGAGAAC	23	62,0	47,8		A/C-G/T
TP_77	CCAGGTCTGAGGAAGTGTAAG	21	61,4	52,4	201	C/G
	CTGTGTTTGTGTCGATTGTGAG	22	61,8	45,5		
TP_79	ACAGTGTGTGTGTGAGAGC	19	61,9	52,6	298	C/G-A/G-
	TGAGTTGACAGGAATCTGATGG	22	61,9	45,5		A/C-G/T
TP_81	GGTGTGGAAGTCTGTAGGATTTA	23	61,7	43,5	241	A/G
	CTGTATTGTGACGACCCTCTC	21	61,6	52,4		
TP_82	GCCAGGTTCACTAGTCCTTT	20	61,6	50	409	C/T-A/G
	GCAGCCAATTTAGGGTTGTC	20	61,5	50		
TP_87	TACTGTCCAGTCCGCTAACA	20	62,5	50	201	A/G
	AACAACAGAGGGTTCACAGAAG	22	62,5	45,5		
TP_88	TCCGCTAACACTGTGGTTTAC	21	62,2	47,6	320	A/G-C/T-
	GAAACACATGGCTGTCTCCT	20	62,1	50		A/C

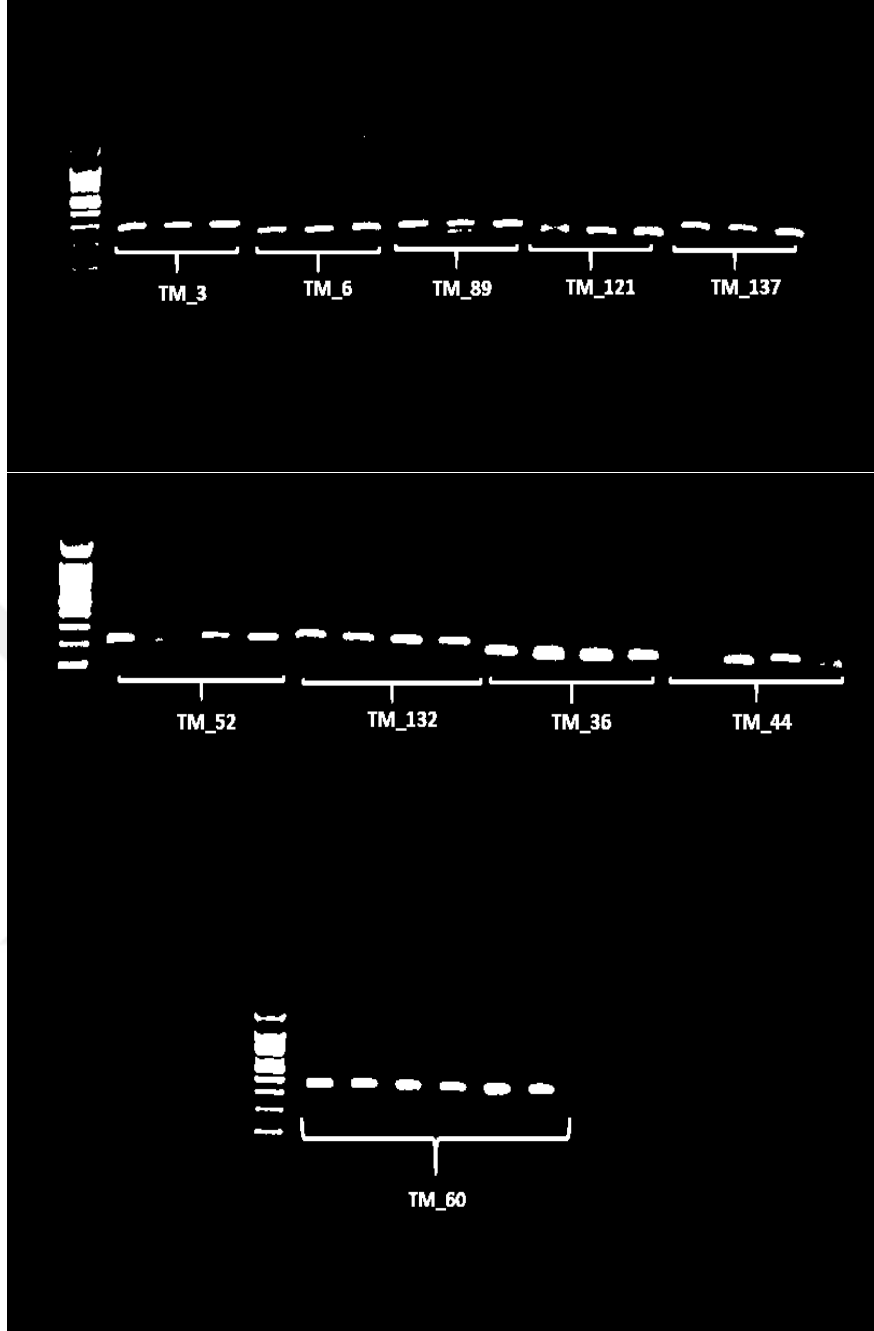
Tablo 15 (Devam). *T. picturatus* için tür içi SNP markır

TP_93	GGGCTGTGTTTGGGTCATA	19	61,9	52,6	210	C/G
	GTCATATTTGCTGAAACTGTCACT	24	61,8	37,5		
TP_96	ACAGCGTAAGCCAGAACC	18	61,8	55,6	244	A/G
	TCCAGAGGAGTCATCGTCAT	20	62,1	50		
TP_101	CGTTCATATACCCGTGAGTGTA	23	61,9	43,5	271	C/T
	CATCAGAACAGCCCATCCTT	20	62,0	50		
TP_105	GCGTCTCATATCACGTACCAA	21	61,8	47,6	228	C/G
	AGACTCTCTGGCTGGCT	17	61,8	58,8		
TP_107	GAGATGAGGAGAGGACAACAGA	22	62,6	50	201	A/G
	CCGAGTTCCTGAATGGAGAAAG	22	62,5	50		
TP_108	GAGGAGAGGACAACAGAAACATGG	24	64,5	50	201	A/T
	GCACGCCGAGTTCCTGAAT	19	64,7	57,9		

Her bir tür için tasarlanan primerler arasından farklı SNP bölgelerini (C/T, A/T, C/G, A/G, A/C gibi) amplifiye eden primerler seçilerek PCR yapıldı ve elektroforezde yürütülerek kalitatif tayini yapıldı. *T. trachurus* için TT_9, TT_12, TT_16, TT_27, TT_57, TT_61, TT_82, TT_96, TT_107, TT_120 gen bölgelerinin amplifikasyonu yapıldı ve 6 gen bölgesinden PCR ürünü alındı (Şekil 34). *T. mediterraneus* için TM_3, TM_6, TM_36, TM_44, TM_52, TM_60, TM_89, TM_121, TM_132, TM_137 gen bölgelerinin amplifikasyonu yapıldı ve tüm gen bölgelerinden PCR ürünü alındı (Şekil 35).

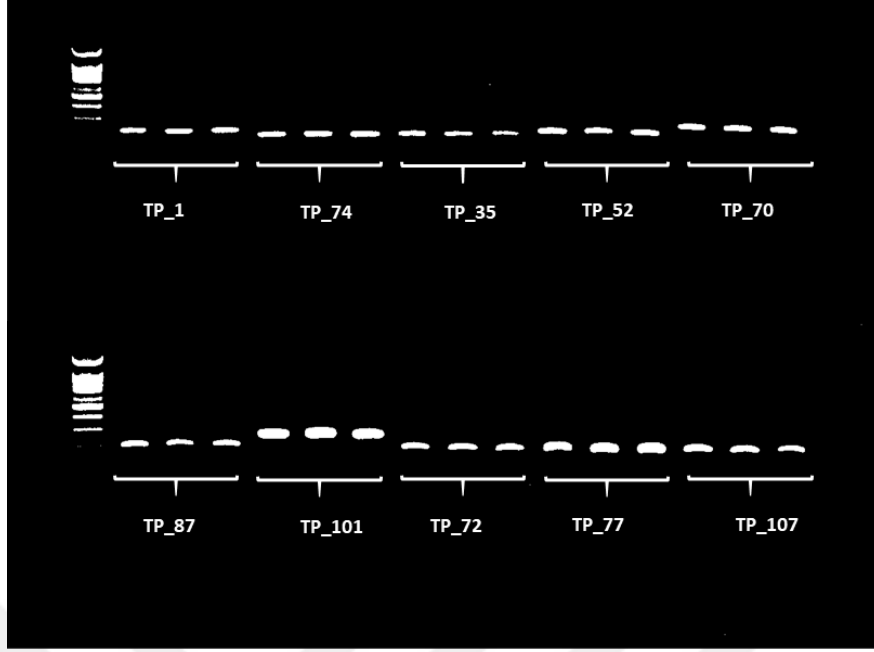


Şekil 34. *T. trachurus* SNP bölgelerinin PCR jel görüntüleri



Şekil 35. *T. mediterraneus* SNP bölgelerinin PCR jel görüntüleri

T. picturatus için TP_1, TP_35, TP_52, TP_70, TP_72, TP_74, TP_77, TP_87, TP_101, TP_107 gen bölgelerinin amplifikasyonu yapıldı ve tüm gen bölgelerinden PCR ürünü alındı (Şekil 36)



Şekil 36. *T. picturatus* SNP bölgelerinin PCR jel görüntüleri

Üç istavrit türü için 8'er örnekte amplifiye edilen gen bölgelerinin ham dizileri, BioEdit v.7.2.5'te ClustalW algoritması kullanılarak düzenlendi ve hizalandı. Daha sonra düzenlenmiş veriler ile gözlemlenen heterozigotluk (H_o), beklenen heterozigotluk (H_e) ve polimorfik bilgi içeriği (PIC) Cervus v3.0.7 yazılımı kullanılarak hesaplandı. Her lokusun Hardy-Weinberg dengesi (HWE), Arlequin v3.5.2.2 yazılımı kullanılarak test edildi. Toplam 26 polimorfik SNP lokusu karakterize edildi ve bu lokusların HWE'den anlamlı derecede sapma göstermediği test edildi ($P < 0,01$). SNP lokuslarının H_o , H_e ve PIC değerleri sırasıyla 0,000 ila 0,625, 0,325 ila 0,533 ve 0,258 ila 0,375 arasında değiştiği belirlendi. Sonuç olarak, bol miktarda potansiyel SNP belirlenmiş ve istavritlerin genetik araştırmaları için moleküler markır olarak kullanılabilecek lokuslar doğrulandı (Tablo 16).

Tablo 16. *T. mediterraneus* (TM), *T. trachurus* (TT), *T. picturatus* (TP) türlerindeki SNP markır özeti

Locus	Primer Dizisi (5'-3')	SNP	N	HObs	HExp	PIC	P _{HWE}
TM_3	F:GACGTGAGTTTACAGCTCTGAT R:TGTGTGCAAAGTCTACCAGTT	G/C	8	0,250	0,400	0,305	0,385
TM_6	F:GCTGTTGTGTGTTTGTGCTATG R:TCGACAAACTCACCTTCTTTCC	C/T	8	0,125	0,325	0,258	0,199
TM_36	F:TGACTCCACACTGTTGGTTAC R:CTTGAAGGTCTGCATGAGTACA	A/T	8	0,375	0,525	0,371	0,530
TM_44	F:TCTCATAGCGTGGTGAATGTG R:CAACTATAAACATCTGGACAAACAGAC	G/T	8	0,375	0,458	0,337	1.000
TM_52	F:CACTGTGTATTGCCACACTTTC R:ACTGTATGTTAGGTCCCTTTTCAC	A/G	8	0,125	0,458	0,337	0,076
TM_60	F:CGCTAGAAAACGCATCAAACAC R:CGGTACAACAGACACTACTGAAT	A/T	8	0,125	0,458	0,337	0,076
TM_89	F:CTCTTGTCGGTCAAGGGTAAG R:GCCTGTATAAGTAGGAGTGGATT	A/G	8	0,125	0,525	0,371	0,049
TM_121	F:ATTCACTCCATACAGCAAAGGA R:GTAGACAGACCAGGCAGAAAG	A/C	8	0,250	0,500	0,359	0,216
TM_132	F:GCTAATCAAACATGTGAGTGTCC R:CTGTTCACTCTGGCTCTTCTT	A/C	8	0,375	0,325	0,258	1.000
TM_137	F:CGGCGGCTCATTGAAGTAT R:AGAGGAGGAAGTCACTGGTT	C/A	8	0,625	0,458	0,337	0,486
TT_9	F:ACCCTAACCCCTTAAAGCAGAAG R:CGTTCTCTCTCCTCATTGGATAAA	C/T	8	0,000	0,400	0,305	0,015
TT_12	F:AGTTGTATCTTCCGACAGCAATC R:TCCCTACGTCACCACATTCA	C/G	8	0,125	0,458	0,337	0,076
TT_16	F:ACGGTCTAAATCCACCATCATC R:AACAGCAGAATTTACACACAAC	A/T	8	0,250	0,500	0,359	0,216
TT_82	F:CAGGTCAGAGACAGACAGAAATG R:TGCTCCTCATTGACTCCAATAC	A/G	8	0,500	0,533	0,375	1.000
TT_96	F:GATGTTCCAGGATCAGCGTAG R:CTGACCCATACTCATCTTCTAGTG	A/G	8	0,250	0,500	0,359	0,216
TT_120	F:GTTGCCGTGGTTACAAGTAT R:GTCAGCCCTTTACTATTTCATTG	A/C	8	0,125	0,458	0,337	0,076
TP_1	F:AGGTCATCATCCTGAACCAC R:GAGAAGCTCTCCACACACAT	G/C	8	0,250	0,400	0,305	0,385
TP_35	F:TGAAATCCTGTTGGAGTTGAGG R:CATCAGTTGCTGAACGAGGT	C/T	8	0,125	0,325	0,258	0,199
TP_52	F:TCAAGGTGGAATATCCGTCTAC R:CTGGTTGTTGTTGCTGTCATC	A/T	8	0,500	0,533	0,375	1.000
TP_70	F:ACATGGCTGTCAGGAAGAATAA R:TTAAACCCAGGTGGACAATAGAG	G/T	8	0,250	0,400	0,305	0,383
TP_72	F:TGTCAGGAAGAATAATGAGCTTCT R:GAGCCTACAGTACAGTGAGAATG	G/T	8	0,250	0,500	0,359	0,217
TP_74	F:AAACAGGACGACGTGAAC R:GACTCATATAGTGCCAACAATGC	A/C	8	0,500	0,400	0,305	1.000
TP_77	F:CCAGGTCTGAGGAAGTGTAAG R:CTGTGTTTGTGTCGATTGTGAG	C/G	8	0,375	0,458	0,337	1.000
TP_87	F:TACTGTCCAGTCCGCTAACA R:AACAACAGAGGGTTCACAGAAG	A/G	8	0,125	0,525	0,371	0,048
TP_101	F:CGTTCATATACCCGTGAGTGTA R:CATCAGAACAGCCCATCCTT	C/T	8	0,500	0,533	0,375	1.000
TP_107	F:GAGATGAGGAGAGGACAACAGA R:CCGAGTTCCTGAATGGAGAAAG	A/G	8	0,625	0,458	0,337	0,486

N: Örnek sayısı, PIC: Polimorfik bilgi içeriği, HObs: Gözlemlenen heterozigotluk, HExp: Beklenen heterozigotluk
P_{HWE}: Hardy-Weinberg dengesinin (HWE) kesin testinin P değeri

3.6. Türe Özgü SNP Markır ve QPCR Tespiti

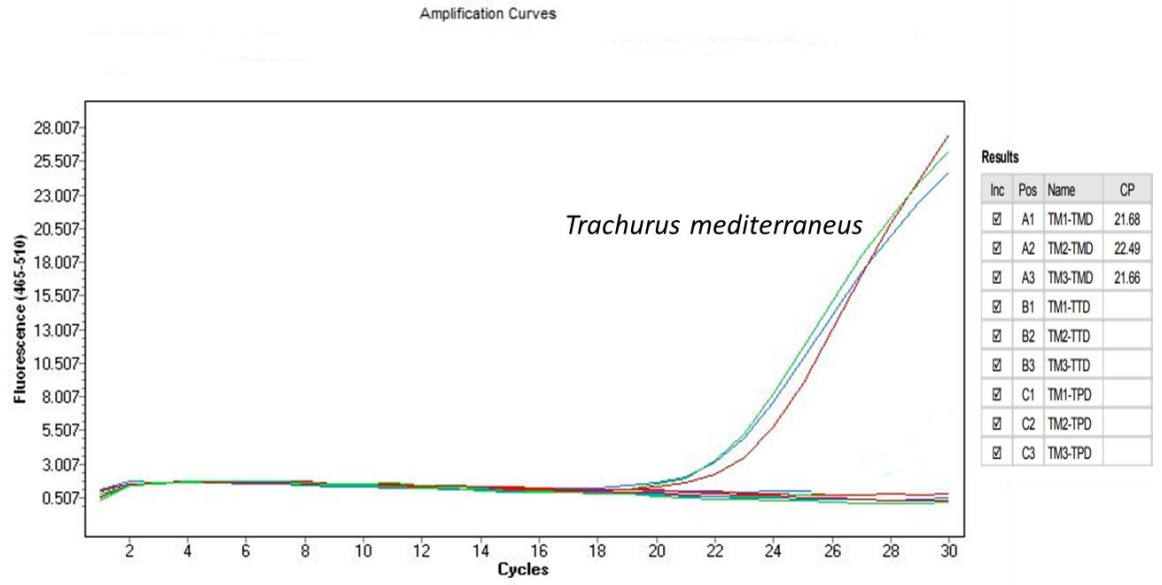
3.6.1. SYBR Green Metoduyla Tür Ayırımı

Türe özgü lokuslar belirlendikten sonra üç türün farklı dizilendiği gen bölgesi için her üç türe özgü primer tasarlandı (Tablo 17). Bu primerler öncelikle SYBR Green ile amplifiye edilerek sadece kendi türünde çalışması için optimizasyon çalışmaları yapıldı. Her bir amplifikasyonda çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için melting curve analizi yapıldı ve türe özgü primerler belirlendi.

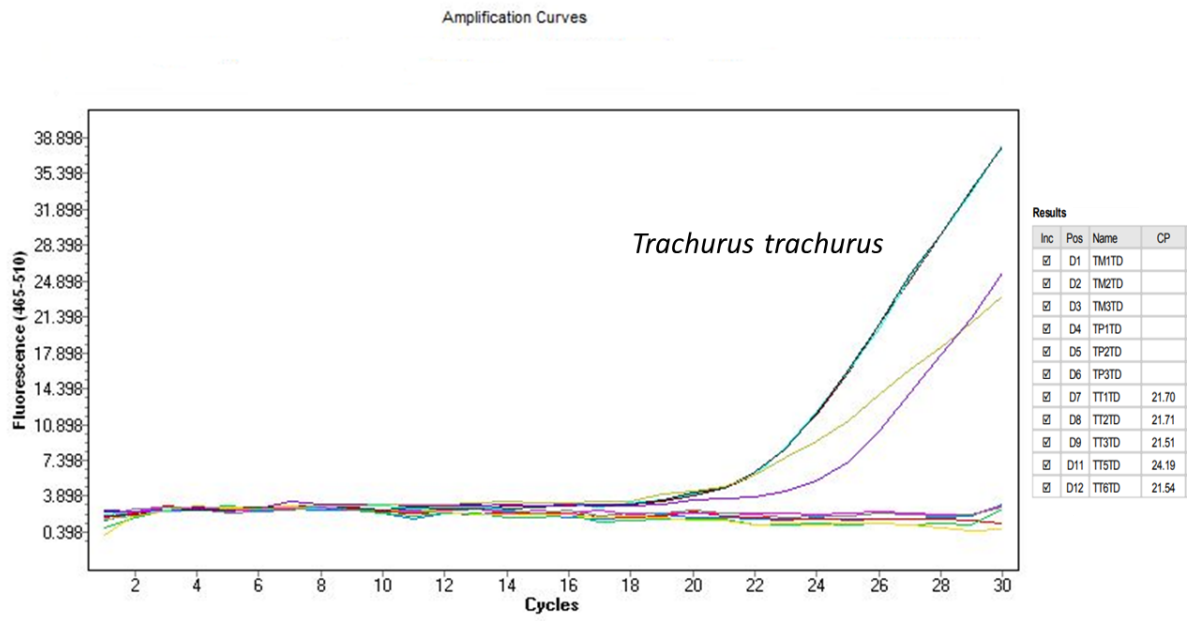
Tablo 17. Türe özgü geliştirilen ve SYBR Green metoduyla tür ayırımı yapan primer dizileri

Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')
TM-D-F	5'-TGACAGTACTAGCTTAGCACATTGG-3'
TP-D-F	5'-TTACAGTACTAGCTTGGCACATCGA-3'
TT-D-F	5'-TGACAGTACTAGCTGGGCACATCAG-3'
T-D-R	5'-TGATGTGTGACCCATTACAGCAAAGTG-3'

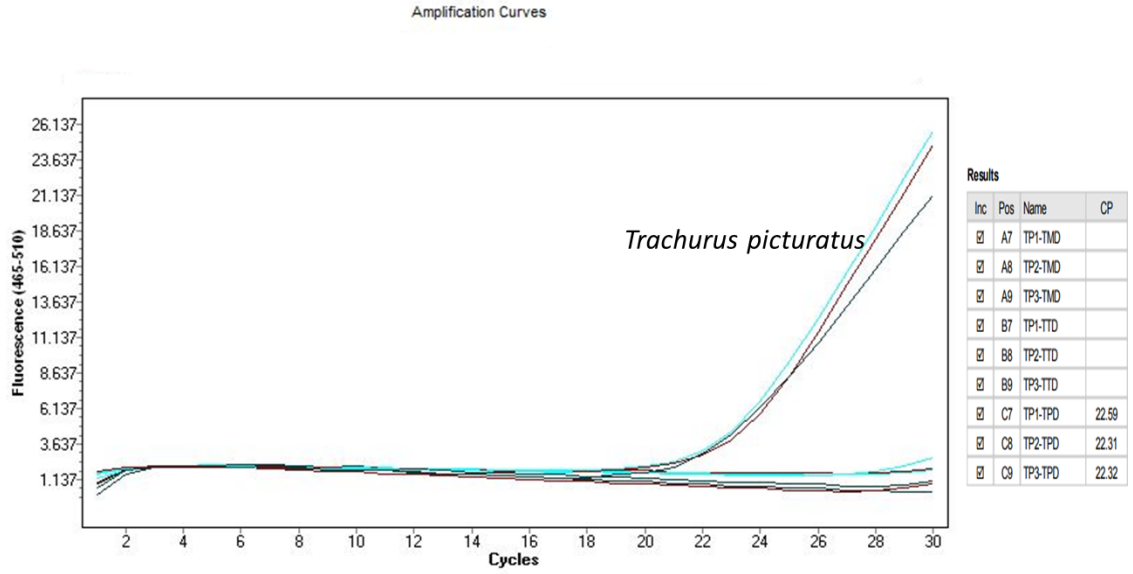
Realtime PCR'da SYBR Green metodu için uygulanan program; ilk adımda 95°C de 5 dk.'lık bir ön denatürasyon ikinci adım 95°C de 30 sn'lık denatürasyon, 60°C' de 20 sn bağlanma ve 72°C de 10 sn polimerizasyon işlemi 30 döngü şeklinde optimize edildi. Primerler her üç tür içinde denendi. TM-D-F primeri sadece *T. mediterraneus* için amplifikasyon eğrisi oluştururken diğer türlerde amplifiye olmadı. Cp değerleri 21,68; 22,49; 21,66 olarak belirlendi. Aynı şekilde TP-D-F ve TT-D-F primerleri sırasıyla *T. picturatus* ve *T. trachurus* için amplifikasyon eğrisi oluşturdu. Cp değerleri *T. picturatus* için 22,99; 22,32; 22,33 iken *T. trachurus* için 21,30; 21,31; 21,54; 24,19 olarak belirlendi. (Şekil 37,38,39). İzole edilen primerler ile 3 türün ayırımı başarılı bir şekilde sağlandı.



Şekil 37. SYBR Green metodu ile *T. mediterraneus* için amplifikasyon eğrisi



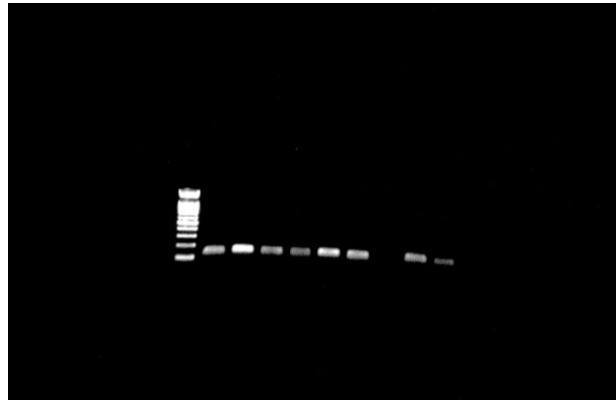
Şekil 38. SYBR Green metodu ile *T. trachurus* için amplifikasyon eğrisi



Şekil 39. SYBR Green metodu ile *T. picturatus* için amplifikasyon eğrisi

3.6.2. UPIP-qPCR ile Tür Ayrımı

Bu aşamada 2 farklı PCR yapılarak problemlerin spesifik bağlanması hedeflendi. Öncelikle her tür için farklı SNP içeren yaklaşık 200 bp'lik gen bölgesi için konvansiyonel PCR ile amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi. 1. PCR işlemi için primerler tasarlandı ve amplifikasyonu gerçekleştirildi. PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek nitel olarak belirlendi (Şekil 40). Çoğaltılan bu gen bölgeleri template olarak kullanıldı ve 2. PCR işleminde QPCR yapılarak her tür için özel tasarlanan primer ve probun spesifik bağlanması sağlandı (Tablo 18,19).



Şekil 40. 1. PCR jel görüntüsü

Tablo 18. 1. PCR primerleri

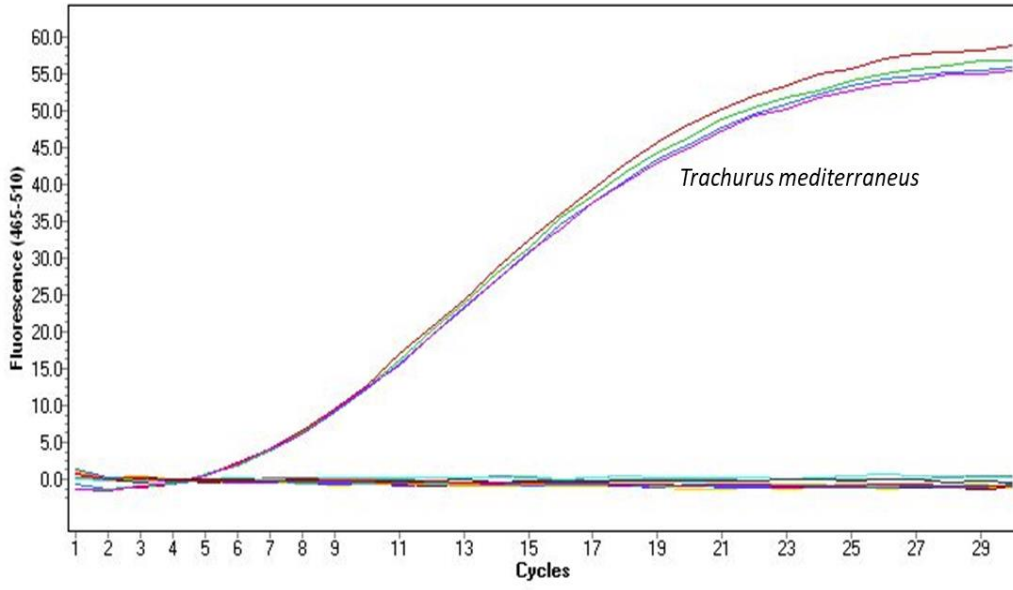
Primer adı	Primer Dizisi (5'-3')
PCR1-MED	F:TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTGCTGAAGCGCTGG GGGCAAATTGTTGACAGTACTAGCTTAGCACATTGG
PCR1-PIC	F:TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTGCGCGCAGAGCCT TCAGGTCAGAATTACAGTACTAGCTTGGCACATCGA
PCR1-TRAC	F:TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTGCCCATAACCTTTC CACATACCGCAGACGGTGACAGTACTAGCTGGGCACA TCAG
PCR1-R	R:TGATGTGTGACCCATTACAGCAAAGTG

Tablo 19. 2. PCR primerleri ve probları

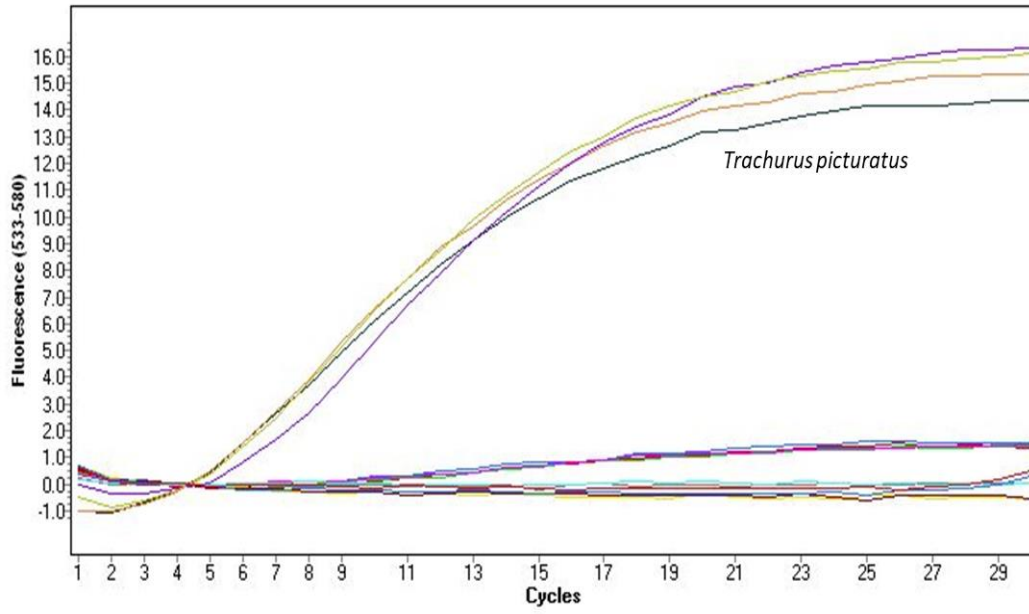
Primer adı	Primer Dizisi (5'-3')
PCR2-MED	F:ATGATTTTCAGTATTTGGGCCA
PCR2-PIC	F:ATGATTTTCAGTATTTGGGTCG
PCR2-TRAC	F:ATGATTTTCAGTATTTGGGCTG
PCR2-R	R:TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG
Prob 1-TRAC	/CY5/CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG/BHQ-2/
Prob 2-MED	/FAM/ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG/ BHQ-1/
Prob 3-PIC	/HEX/TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG/ BHQ-1/

MED: *T. mediterraneus*; PIC: *T. picturatus*; TRAC: *T. trachurus*

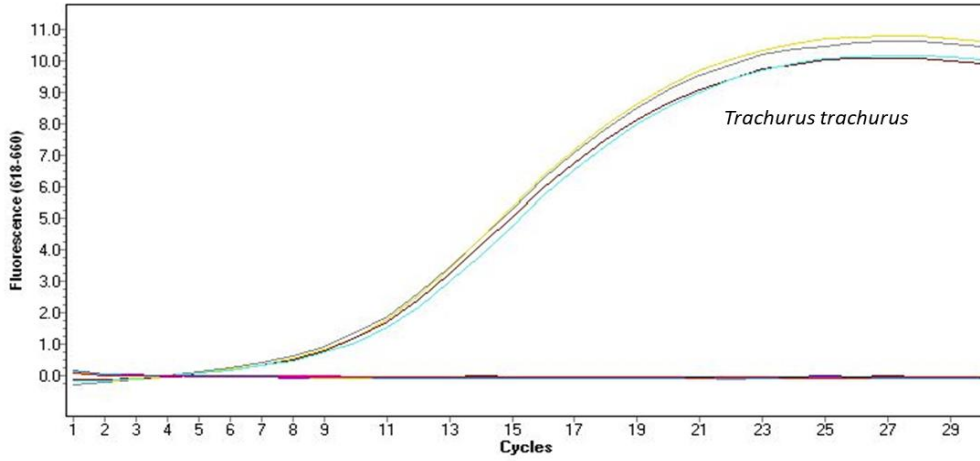
Roche LightCycler® 480 Real Time PCR cihazında Endpoint Genotyping yazılımı ile 3 türün ayrımının analizi yapıldı. Yazılım, PCR sonrasında iki boyanın yoğunluk dağılımını ölçerek genotipi belirlemektedir. Göreceli boya yoğunlukları bir dağılım grafiği üzerinde anlaşılır bir şekilde görselleştirildi. Bu analiz sonucunda *T. mediterraneus* sadece FAM işaretli Prob2-MED probu ile floresan sinyali verirken *T. trachurus* CY5 işaretli Prob1-TRAC ile, *T. picturatus* HEX işaretli Prob 3-PIC probu ile floresan sinyal verdi. Her bir boyanın floresan sinyal diyagramı Şekil 41, 42, 43'te verilmiştir.



Şekil 41. *T. mediterraneus* için floresan eğrisi



Şekil 42. *T. picturatus* için floresan eğrisi



Şekil 43. *T. trachurus* için floresan eğrisi

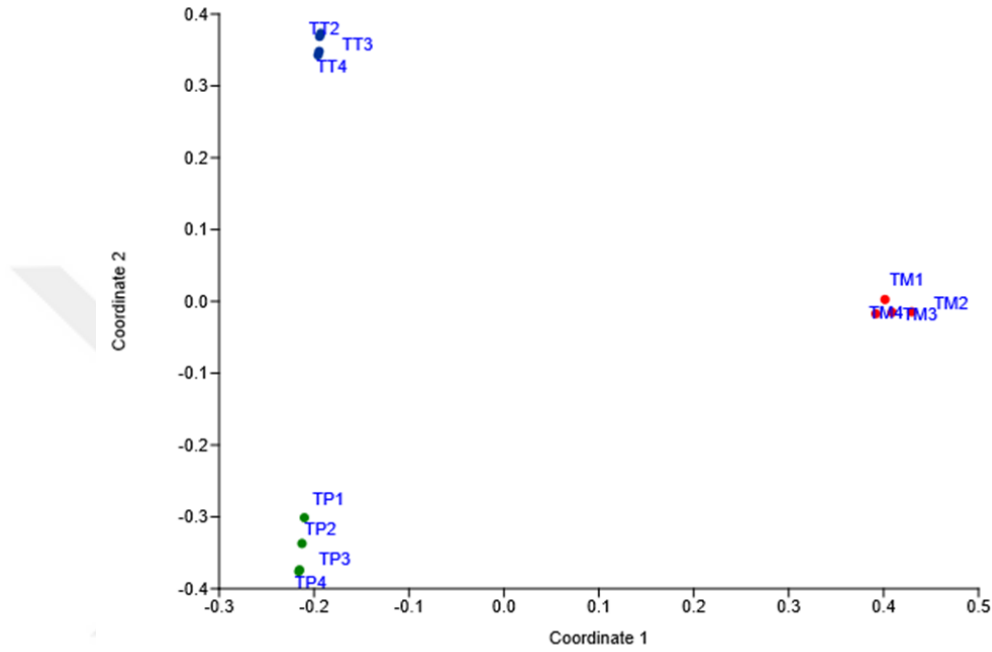
Her bir prob için endpoint floresan değerleri sadece amplifiye ettikleri türde elde edildi (Tablo 20). *T.mediterraneus* için FAM (465-510) kanalında 57,1; 59,98; 58,04; 56,47 endpoint floresan değerleri elde edilirken diğer kanallarda ışımada alınmadığı için negatif değerler gözlemlendi. *T. trachurus* için CY5 (618-660) kanalında 10,55; 10,71; 10,02; 10,13 endpoint floresan değerleri elde edilirken, *T.picturatus* için HEX (533-580) kanalında 14,92; 15,89; 16,89; 16,71 endpoint floresan değerleri elde edildi.

Tablo 20. *Trachurus* türleri için Endpoint floresan değerleri

Örnekler	Endpoint floresan		
	FAM (465-510)	HEX (533-580)	CY5 (618-660)
TM1	57,1	Negatif	Negatif
TM2	59,98	Negatif	Negatif
TM3	58,04	Negatif	Negatif
TM4	56,47	Negatif	Negatif
TT1	Negatif	Negatif	10,55
TT2	Negatif	Negatif	10,71
TT3	Negatif	Negatif	10,02
TT4	Negatif	Negatif	10,13
TP1	Negatif	14,92	Negatif
TP2	Negatif	15,89	Negatif
TP3	Negatif	16,89	Negatif
TP4	Negatif	16,71	Negatif

TM; *T. mediterraneus*, TT; *T. trachurus*, TP; *T. picturatus*

PAST 4.13 programı kullanılarak Temel Koordinat Analizi (PCoA) yapıldı ve çok boyutlu ölçekleme, benzerliklere veya farklılıklara dayalı ilişkiler kurmak için endpoint değerleri kullanıldı. Bu analizin sonucunda 3 türe ait floresan verilerinin farklılıkları görselleştirildi (Şekil 44).



Şekil 44. Endpoint değerlerinin Temel Koordinat Analizi (PCoA)

Temel Koordinat Analizi'nde (PCoA) ilk üç eksen, toplam genetik varyasyonun %100'ünü göstermektedir. Her eksenin açıkladığı varyasyon miktarı Koordinat 1 için %92,293, Koordinat 2 için ise %75,697'dur. En yüksek varyasyon değerleri ve öz değerler I. ekseninde bulundu (Tablo 21). Analiz sonuçlarına bakıldığında, üç tür için endpoint florasan değerleri farklı kümelenmiştir.

Tablo 21. Temel Koordinat Analizi (PCoA)'ne göre ilk üç aksis tarafından açıklanan özdeğerleri ve varyasyon yüzdeleri

Axis	Eigenvalue	Percent
1	9.293	%92,293
2	762,19	%75,697
3	12,764	%0,12676

4. TARTIŞMA

Carangidae ailesi içerisinde 12'den fazla tür içeren *Trachurus* cinsi (Nelson vd., 2016), Türkiye sularında Karagöz istavriti, *T. trachurus*, Sarıkuyruk istavriti, *T. mediterraneus* ve Derin su istavriti, *T. picturatus* olmak üzere üç türle temsil edilmektedir (Bostancı, 2009). Ülkemiz avlanan deniz ürünlerinin yaklaşık %5,2'sini oluşturan istavrit balığı ülkemiz için oldukça önemli ekonomik bir türdür. Ülkemiz denizlerinde avcılığı yapılan *Trachurus* türlerini morfolojik özelliklere göre ayırt etmenin zorluğundan dolayı (Smith vd., 2008), birçok çalışmada *Trachurus* türlerinin karıştırıldığı ve yanlış tür adları kullanıldığı görülmektedir (Kalayci, 2010; Durmuş, 2019; Aydın ve Karadurmuş, 2012). Bu çelişkili ifadelerin tür ayrımının tam olarak yapılamamasından ve bu türlerin denizlerimizde karışık stok oluşturup oluşturmadığına dair çalışmaların yapılmamasından kaynaklandığı anlaşılmaktadır. Bu veri eksikliği, balık stoklarının yanlış yönetim stratejileriyle yönetilmesine sebebiyet vermekte ve türlerin sürdürülebilirliğini tehlikeye atmaktadır.

Türkiye kıyusal sularında av veren *Trachurus* cinsine ait istavrit türleri, dünyada olduğu gibi toplam yıllık av miktarı bakımından ciddi düşüşler sergilerken, Kuzeydoğu Atlantik stoklarının aşırı sömürüldüğü rapor edilmektedir (ICES, 2003, 2005). Özellikle *T. mediterianus* GFCM (2018)'nin final raporuna göre aşırı avlanan stoklar arasına girerken *T. trachurus* IUCN'in kırmızı listesinde vulnerable (duyarlı) olarak yer almaktadır. Bu durum birçok araştırmacıyı istavrit stoklarının sürdürülebilirliğinin sağlanması amacıyla yönetim ve biyolojik birimlerini aynı açıdan değerlendirmeye odaklamıştır (Abaunza vd., 2008).

Trachurus türlerinin yüksek düzeyde göç davranışı sergilediği dolayısıyla popülasyonlarının genetik olarak homojen bir yapıya sahip olduğu öne sürülmüş (Cárdenas vd., 2009) ve özellikle Akdeniz ve Atlantik istavriti üzerine yapılan genetik çalışmalarda, düşük düzeyde genetik farklılaşmanın olduğu belirlenmiştir (Kasapidis ve Magoulas 2008, Karaïskou vd., 2004). Ayrıca istavrit türlerinin karışık bulunduğu ve hibridizasyon potansiyelinin olduğu da kanıtlar sunularak desteklenmiştir (Mackenzie vd., 2008). Bradbury vd. (2016) karışık stok yapısının bilinmediği durumlarda stokların aşırı sömürülmesiyle balık biyoçeşitliliğinin azalmasının kaçınılmazlığını vurgulamıştır. *Trachurus* türlerinin morfolojik olarak ayırt edilmesinin zorluğu (Cárdenas vd., 2009) göz önüne alındığında Türkiye'nin Doğu

Akdeniz ve Karadeniz istavrit stoklarındaki dramatik düşüşün sebebinin aşırı avlanmanın (Demirel, 2020) yanı sıra karışık stok yapısının etkisi olabileceği sonucu ortaya çıkmaktadır. Dahası Karadeniz balık faunasının, son on yılda hem nitel hem de nicel yapıda büyük değişikliklere uğramış olduğu düşünülünce, tüm türler için popülasyon parametrelerinin analiz edilmesi çok önemlidir (Nicolae vd., 2018).

Karagöz istavrit'in (*T. trachurus*) popülasyon yapısını belirlemek için yürütülmüş olan önceki çalışmalar da kullanılan genetik markırlar (allozimler, mitokondriyal DNA ve mikrosatellitler) stoklar arasında genetik farklılaşmanın olmadığını göstermiş (Karaïskou vd., 2004; Cimmaruta vd., 2008; Comesana vd., 2008; Kasapidis ve Magoulas 2008) ve dolayısıyla türün sürdürülebilir yönetimi için morfometri, parazit ve yaşam öyküsü özelliklerinin de çalışılması gerekliliği vurgulanmıştır (Abaunza vd., 2008).

Begg ve Waldman (1999), balık stoklarının güvenilir bir şekilde tanımlanmasında tek stok tanımlama yöntemlerinin dezavantajlarının üstesinden gelmek için balık stoğu tanımlamasına bütüncül (çoklu teknik) bir yaklaşım önermiştir. Bu yaklaşım, istavritin (*T. trachurus*) AB projesi HOMSIR (QLK5-Ct1999-01438) çerçevesinde stok yapısı analizinde izlenmiştir. Genetik stok tanımlama (Genetic Stock Identification, GSI) yaklaşımıyla, karma stok balıkçılığında farklı stokların katkısını izlemek, balıkçılık yönetimini bilgilendirmek ve gereksiz balıkçılık kapanmalarını önlemek hedeflenmektedir (Shaklee vd., 1999, Dann vd., 2013). Açık denizlerde stoka özgü bolluğu ölçme yeteneği, şu anda mevcut olmayan stok değerlendirme modelleri için önemli bilgiler sağlayabilir. Genetik verilerin balıkçılık yönetimine uygulanmasındaki en büyük zorluklardan biri, belirli avlanma alanlarında göçmen balık türlerinin farklı popülasyonlarının karıştırılmasıdır. Bu durum ancak genom boyunca dağılım gösteren SNP'ler gibi güçlü genetik belirtçeler kullanılarak çözüme ulaştırılabilir. Kanada sularında, belirli ringa balığı popülasyonlarına farklı popülasyonların karışmasına yanıt olarak, her mevsim ringa balığı popülasyonları araştırılıp değerlendirildikten sonra, balıkçılık kotaları buna göre belirlenmekte ve bu stoklar için sezon içi bir yönetim yaklaşımı benimsenmiştir (Stephenson, 1999; Smedbol ve Stephenson, 2001). Benzer bir yönetim modeli, sularımızda birlikte bulunan üç istavrit türü için de uygulanmalıdır.

Türkiye denizlerindeki *Trachurus* türlerinin farklı üreme boylarına sahip olması (GFCM, 2019), *T. trachurus*'un IUCN kırmızı listede hassas (Vulnerable) olarak sınıflandırılması (DiNatale vd., 2011) ve üç istavrit türünün aynı stok içerisinde değerlendirilmesi, sürdürülebilir balıkçılık yönetimi açısından stratejilerin yeniden gözden geçirilmesi gerektiğini ve gelecekte genetik kaynaklarının korunması noktasında sıkıntılar yaşanabileceğini göstermektedir (FAO, 2022). Bu nedenle, gelecekteki yönetim stratejileri kapsamında, söz konusu üç istavrit türünün ayrımının kolaylıkla yapılabilmesi için türlere özgü SNP'lerin belirlenmesi ve bu SNP'lere özgü markırlar geliştirilerek genetik temelli stok yönetim (GSI) çalışmalarının hız kazanması gerekmektedir.

4.1.Yeni Nesil Sekanslama ve Nanopore

Balıkçılık biliminde NGS teknolojileri, biyolojik süreçlerin genom çapında ve transkriptom çapında kontrolü, popülasyon yapısı için yeni markırların tanımlanması, izlenebilirlik, filogenetik, genetik haritalama ve lokusların seçilimden etkilenen özelliklerle ilişkisinin araştırılması hakkında daha fazla bilgi edinmek için kullanılmaktadır. NGS kullanımı, araştırmacıların geleneksel genetik markırları kullanımına kıyasla çok daha büyük miktarda veri elde etmelerini ve daha önce ulaşılamayan bilgilerin kilidini açmalarını sağlamıştır (Kumar vd., 2017). NGS teknolojilerinin gelişimi, genomik kaynakların hala sınırlı olduğu veya hiç bulunmadığı çeşitli model olmayan balık türlerinde mikrosatellitlerin ve tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP'ler) genom çapında veya transkriptom çapında tespit edilmesine ve karakterize edilmesine olanak sağlamıştır. NGS teknikleri kullanılarak çok sayıda deniz balığında polimorfik mikrosatellit markırlar geliştirilmiştir (Yu vd., 2014; Bayona-Vasquez vd., 2015; Santos vd., 2015; Rodriguez-Zarate vd., 2014). Benzer şekilde, birçok çalışma SNP keşfi için NGS'yi başarıyla kullanmıştır (Montes vd., 2013; Houston vd., 2014; Xiao vd.,2015; Yu, 2020; Yang, 2020). Son yıllarda, balık türlerine ait tüm genom sekanslama çalışmaları önemli ölçüde artış göstermiştir. NCBI veri tabanına göre (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) birçok balık türünün genomu tamamen dizilenmiş ve bir araya getirilmiştir.

Araştırmacılar, gelecekteki koruma ve ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere yüksek kalitede genomik veriye ulaşmak için yoğun çaba sarf etmektedir. Üçüncü nesil

sekanslama teknolojilerinin gelişmesiyle, sekanslama okumaları uzamakta ve bu tam ve doğru genomların üretimi için üstün bir platform sağlamaktadır (Quail vd., 2012). Nanopore yeni nesil sekanslama (NGS), ek DNA amplifikasyonuna veya modifiye nükleotidlerin enzimatik olarak birleştirilmesine gerek kalmadan uzun okuma uzunlukları ve hızlı genom sekanslama sağlama yeteneği nedeniyle balık türlerini incelemek için umut verici bir platform olarak ortaya çıkmıştır (Steinbock ve Radenovic, 2015). Bu platform, çeşitli balık türlerinde yüksek kaliteli genom düzenekleri oluşturmak ve önceki genom taslaklarını tamamlayabilmek için kullanılmıştır (Bian vd., 2020). Nanopore sekanslamanın, özellikle tür düzeyinde taksonomik çözünürlüğün tespiti, nadir taksonların araştırılması ve tür zenginliğinin doğru tahmin edilmesi noktasındaki potansiyelini göstermiştir (Szoboszlai vd., 2023; Angell vd., 2020). Yok olma tehlikesi altında olan ipeksi köpekbalığı (*Carcharhinus falciformis*)’nın korunmasına yönelik genomik bilgileri elde etmek amacıyla özellikle mitokondri genomları Nanopore sekanslamaya tabi tutularak hızlı bir şekilde elde edilmiş ve elde edilen bilgilerle uygun yönetim stratejileri geliştirilmiştir (Baeza ve León, 2022). Ayrıca, deniz omurgalıların çevresel DNA (eDNA) meta barkodlaması için, özellikle balık mitokondrilerinin 12S ve 16S rRNA genlerini kapsayan 2kb’lık bir bölgeyi hedefleyerek balık türlerinin tanımlanmasını iyileştirmeyi amaçlayan uzun okumalı bir Nanopore sekanslama yöntemi geliştirilmiştir (Doorenspleet vd., 2021). Benzer şekilde, Amerikan alabalığı (*Salvelinus fontinalis*) popülasyonunun genetik bütünlüğü üzerinde stoklamanın genetik sonuçlarını değerlendirmek için NGS teknolojileri kullanılmıştır. Atlantik somon (*Salmo salar*)’unun popülasyon genetik yapısının en kapsamlı değerlendirmesinde, Bourret vd. (2013) ifade edilen dizi etiketlerine (EST’ler) ve genomik sıralamaya dayalı SNP dizisi geliştirmiştir. Hint-Batı Pasifik Okyanusu’nda yaygın olarak bulunan *Thamnaconus septentrionalis*’in kromozom düzeyindeki ilk genomu Nanopore sekanslama ve Hi-C teknolojisi kullanılarak oluşturulmuştur. Bu yüksek kaliteli birleştirilmiş genom, *T. septentrionalis*’in gelecekteki bir dizi genomik, koruma ve ıslah çalışmaları için değerli bir kaynak olma özelliği taşımaktadır. *T. septentrionalis* popülasyonlarının keskin bir şekilde azalması ve genomik kaynaklarının eksik olması araştırmacıları bu tür üzerine yoğunlaştırmış ve kromozom düzeyindeki genomu oluşturulmuştur. Toplam 50,95 Gb nanopore dizileri elde edilmiş ve 474,31 Mb’lık bir genomda bir araya

getirilerek tür için referans genom oluşturulmuştur (Bian vd. 2020). Kahverengi mermer orfoz (*Epinephelus fuscoguttatus*) mercan resifi ekosisteminde ve deniz akuakültür endüstrisinde önemli bir balık türüdür. Oxford Nanopore teknolojisi ve Illumina Nova Seq teknolojisi kullanılarak toplamda 91,7 Gb nanopore, 107,86 Gb Illumina raw data elde edilmiştir. Kahverengi-mermer orfozun yüksek kaliteli kromozom düzeyinde genomu bir araya getirilerek toplam uzunluğu 1.047 Mb ve contig N50 değeri 13,8 Mb olan toplam 230 contig bir araya getirilmiş ve 228 contig (%99,13) 24 kromozoma sabitlenmiştir ve *de novo* referans genom elde edilmiştir (Yang vd. 2020). Ge vd. (2019) Çin, Japonya ve Güney Asya'da ekonomik öneme sahip kırmızı benekli orfozun cinsiyet dönüşümünü kontrol eden mekanizmaları ortaya çıkarmak, genom ölçeğinde patojen enfeksiyonuna direnç sağlayan genetik varyasyonu taramak ve gelecekte *E. akaara*'nın üretim özellikleriyle genetik korelasyonları araştırmak için cinsiyet belirleme ve farklılaşma ile ilgili genleri belirlemek için, Nanopore sekanslama teknolojisi (GridION) ve Hi-C tarafından üretilen uzun dizi okumalarının *de novo* montajı ile *E. akaara*'nın bitişik genomunu bir araya getirmiştir. *E. akaara*'nın genom boyutunu ve heterozigotluğunu tahmin etmek için Illumina cihazında 54,7 Gb temiz okuma elde edeken, Oxford Nanopore sekanslama ile on dokuz Akış Hücresi kullanılarak 111,05 Gb veri üretmişler ve toplamda 106,29 Gb filtrelemeden sonra toplanmıştır. Okuma uzunluğu ve N50 uzunluğu sırasıyla 18,35 kb ve 26 kb idi. Murray morinasının koruma ve yönetim araştırmalarını desteklemek için tüm genom sekanslama çalışması yapılmıştır. Toplam 70,6 Gb (47,4 Gb ve 23,2 Gb HiSeq ve MiSeq çalışmalarından, sırasıyla) nükleotit dizisi Illumina cihazından ve 804 Mb (N50: 4.438 bp, en uzun okuma: 129.945 bp) nükleotit dizisi, Oxford Nanopore MinION cihazında üretilmiştir (Austin, 2017).

Genner ve Collins (2022), *T. trachurus* türüne ait *de novo* genom sekanslamasını üç farklı yüksek verimli sekanslama platformunu kullanarak gerçekleştirmiştir. Elde edilen genom derlemesi (fTraTra1.2; GenBank erişim numarası: GCA_905171665.1) toplam genom dizisinin %98,68'inin 24 kromozomal psödomoleküle hizalanmasıyla sonuçlanmıştır. Bu kapsamlı genom montajı, yaklaşık 801 megabaz (Mb) uzunluğunda bir genom yapısının ortaya konulmasını sağlamıştır. Southampton Water (İngiltere) kıyılarından toplanan bir bireyden elde edilen bu genom, anotasyon analizi kullanılarak gerçekleştirilen gen tanımlamaları sonucunda

25.797 protein kodlayan gen ve 2.264 kodlamayan gen olmak üzere toplam 60.310 transkript tanımlanmıştır. Bu yüksek kaliteli genom derlemesini referans genom olarak diğer *Trachurus* türlerini (*T. mediterraneus* ve *T. picturatus*) ve denizlerimizde ki *T. trachurus* türünü diziledik. Çalışmalarımızda, üç *Trachurus* türü için Oxford Nanopore PromethION'da, filtrelemeden sonra 17,61 Gb ve *T. mediterraneus* için Illumina NovaSeq X Plus'ta toplam 8,2 Gb ham veri olmak üzere toplam 26,91 Gb veri toplanmıştır. Ham okumaların kalitesi kontrol edildikten sonra okumalar *T. trachurus* referans genomuna hizalanmıştır. *T. trachurus* için maksimum dizi uzunluğu 230 kb olan toplam dizi uzunluğu 1051 Mb, *T. mediterraneus* için maksimum dizi uzunluğu 107 kb olan toplam dizi uzunluğu 838 Mb ve *T. picturatus* için maksimum dizi uzunluğu 205 kb olan toplam dizi uzunluğu 1080 Mb veri elde edilmiştir. Montaj dizileri, *T. trachurus* için, % 99,5'i, *T. mediterraneus* için % 94,53'ü ve *T. picturatus* için % 98,9'u kromozomal seviyede yüksek güvenilirlikle birleştirilmiştir.

Aynı zamanda, Hirao vd. (2024) tarafından Japon takımadaları çevresindeki *T. japonicus* bireyleri üzerinde gerçekleştirilen kapsamlı çalışmada, *T. trachurus* 'a ait 24 kromozomal düzeydeki genom verilerini referans olarak kullanmış ve bu analizlerde 57 yerel grup tanımlanmıştır. Yeni oluşturulan genom montajı, 867,88 Mbp uzunluğunda olup, 37 Mbp'lik N50 contig uzunluğuna sahip 3.738 contig içermektedir. Montaj dizilerinin büyük çoğunluğu (%95,14), *T. trachurus* 'a ait 24 kromozomal düzeydeki genom iskelelerine yüksek güvenilirlikle sabitlenmiştir (Genner vd., 2022). Bu yüksek kaliteli genomik kaynak kullanılarak, Japon takımadaları çevresindeki *T. japonicus* popülasyonlarında genom çapında yüksek yoğunluklu SNP markırları geliştirilmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda üç türe ait referans genomlar elde edilmiştir. Bu genomlar daha sonra genbanka yüklenerek bu türler için veri seti oluşturulacaktır. Günümüzde tek bir referans genomunun, bir tür içerisindeki genetik çeşitliliğin tamamını temsil etmede yetersiz kaldığı geniş ölçüde kabul görmektedir, Bu bağlamda bir türün birden fazla bireyinden elde edilen ve genetik varyasyonu bütünleştiren kapsamlı bir genomik kaynak olan pangenomların inşası, tür içi ve türler arası genomik çeşitliliğin kapsamını, yapısını ve evrimsel dinamiklerini daha ayrıntılı şekilde ortaya koymak açısından büyük önem taşımaktadır (Hurgobin and Edwards, 2017). Bu

çalışmada, *T. mediterraneus* ve *T. picturatus* için referans genomlar oluşturulurken, *T. trachurus* içindeki genomik çeşitliliği yakalamak için bir pangenom inşa ettik. Nihai hedef; pangenomları rutin genotipleme, stok değerlendirme ve tür koruma programlarına entegre ederek hem temel bilimde hem de uygulamalı biyoteknoloji alanlarında daha yüksek çözünürlüklü ve yanlılıktan arındırılmış bir genomik gözleme ulaşmaktır. Bu yaklaşımla deniz ve içsu balıkçılığında stok yapılandırması, adaptif potansiyel ve türler arası melezlenme gibi sorunların çözümünde pangenom yaklaşımlarının değeri daha da artacaktır.

4.2. Tek Nükleotid Polimorfizmleri ve SNP Markır Geliştirilmesi

Yeni nesil sekanslama teknolojileri, genetik çeşitlilik analizi ve filogenetik analiz için gen düzeyindeki varyasyonların yanı sıra, tek nükleotid polimorfizmlerini de (SNP'ler) keşfetmeyi sağlamaktadır (Wenne, 2023). Tek nükleotid polimorfik (SNP) markırları tüm genomda dağılım göstermesi ve yüksek varyasyon oranına sahip olmasından dolayı popülasyon çalışmaları, ekolojik ve koruma genetiği gibi bir çok alanda kullanılmaktadır (Helyar vd., 2012; Vera vd., 2013; Mastrochirico-Filho vd., 2016; Saint-Pe vd., 2019). Bunların yanı sıra SNP'ler ıslah programları, gıda ürünlerinin korunması, kalite sertifikasyonu için türlerin tanımlanabilmesi, izlenebilirlik gibi birçok alanda kullanılarak genetik varyasyonun keşfedilmesine de yardımcı olmaktadır (Lamaze vd., 2012). *Salvelinus fontinalis* için balıklandırma çalışmalarındaki genetik sonuçları değerlendirmek için Kanada'nın Quebec eyaletindeki Portneuf Yaban Hayatı Koruma Alanı'ndaki dokuz gölden örneklenen 336 bireyin SNP (NGS RNA-seq'ten geliştirilmiştir) bölgeleri karşılaştırılarak, stoklama yoğunluğu ile genetik çeşitlilik arasında pozitif bir ilişki olduğu ve popülasyon farklılaşmasında bir azalma olduğu ortaya konulmuştur. Atlantik somonunun (*Salmo salar*) popülasyon genetik yapısının değerlendirmesinde, Bourret vd. (2013), genomik sekanslamaya dayalı SNP dizisi geliştirmiştir ve Avrupa ve Kuzey Amerika popülasyonları arasında güçlü bir genetik farklılaşma olduğunu ortaya koymuştur. Baltık Denizi ringa balığı (*Clupea harengus*) popülasyonları arasındaki genom çapında farklılık düzeylerini tahmin etmek için RAD sekanslama yaklaşımı kullanılarak toplam 5985 yeni SNP tanımlanmıştır (Corander vd., 2013). Genom ve transkriptom türevi SNP'ler kullanılarak Avrupa hamsisi (*Engraulis encrasicolus*)

bireylerinin genetik varyasyonları belirlenmiştir (Montes, 2014). Ayrıca, De Battisti vd. (2013), Clupeiformes ve Pleuronectiformes gruplarına ait 25 türünü ham ve işlenmiş balık ürünlerinde benzersiz bir şekilde tanımlamak için NGS teknolojisini kullanmıştır. Başka bir çalışmada, Mısır'daki yem örneklerinde kullanılan balık türlerinin nesli tükenmekte olan türlere ait olup olmadığını tespit etmek için NGS'ye dayalı DNA metabarkodlama yaklaşımı kullanılmıştır (Galal-Khallaf vd., 2016) ve tespit edilen tüm balık türlerinin %46'sının ya aşırı sömürüldüğü ya da güçlü bir azalma yaşadığı bulunmuştur. Ayrıca türe özgü geliştirilen SNP markır panelleri son yıllarda sıklıkla bireylerin atasal popülasyonlarına belirlemesinde kullanılmaktadır. Örneğin, transkriptom türevi SNP'ler kullanılarak Atlantik morinası (*Gadus morhua*), dil balığı (*Solea solea*) ve Avrupa berlam balığı (*Merluccius merluccius*) bireyleri yüksek hassasiyetle (%93-100) atasal popülasyonlarına atanmıştır (Nielsen vd., 2012).

Tenualosa ilisha stoklarının korunması ve sürdürülebilir avcılığı için genomik araçlar sağlamak amacıyla Mollah vd. (2019) yaptığı çalışmada *T. ilisha* genomunda toplam 792.939 SNP izole ettiler. Bunların 510.251'i transisyon ve 282.688'i transversiyondu. Buna karşılık, Louro vd. (2019) koruma ve balıkçılık yönetimi için Illumina HiSeq X platformunu kullanarak Avrupa sardalyasında toplam 2,3 milyon filtrelenmiş heterozigot SNP tanımladı. Yanez vd. (2020), 326 *Nil tilapia* bireylerinde Illumina Hiseq 2500 cihazıyla non redundant /filtresiz 29,9 million SNP tanımlamıştır. Başka bir çalışmada *Meretrix meretrix* türü için ilk kez tek nükleotid polimorfizmi (SNP) tanımlamaları yapılmış ve bunların genotiplendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Toplamda 3,129 EST dizisi ve 306 kontig ile 1,490 tekil EST elde edilmiştir. 51 kontigde toplam 228 potansiyel SNP tespit edilmiştir (ortalama 0.64 SNP/100 bp). En sık rastlanan SNP türleri: A/G (T/C) (%46.2) ve A/C (T/G) (%35.6) olarak belirlenmiştir (Li vd., 2010).

Çalışmamızda *T. trachurus* için 2.311.386 SNP izole edilmiş olup, bu SNP'lerden 2.291.860'ı 24 kromozom boyunca dağılım gösterirken 19.526'sı unplaced scaffold'larda yer almaktadır. *T. picturatus* için 5.099.766 SNP izole edilmiş olup, bu SNP'lerden 5.059.082'si 24 kromozom boyunca dağılım gösterirken 40.684'ü unplaced scaffold'larda yer almaktadır. *T. mediterraneus* için 5.007.863 SNP izole edilmiş olup bu SNP'lerden 4.989.841 24 kromozom boyunca dağılım gösterirken 18.022 unplaced scaffold'larda yer almaktadır. Ayrıca izole edilen SNP'lerin *T.*

trachurus, *T. picturatus*, *T. mediterraneus* için sırasıyla 1:1.3, 1:1.3, 1:1.4 transversiyon: transisyon oranına sahip olduğunu tespit ettik.

Tüm genom sekanslamasındaki ilerlemeler, SNP çağırma süreçlerinde giderek daha fazla sayıda referans genomunun kullanılmasına yol açmıştır. Bu da SNP keşfi için pangenomların kullanımına odaklanmaktadır (Hurgobin ve Edwards, 2017). Eğer çalışılacak organizmanın referans genomu mevcutsa, onun yardımıyla genom birleşimi çok daha kolaylaşır, daha hızlı olur ve nükleotid dizilerinin bir referans genomla karşılaştırılması daha doğru SNP markırları geliştirilmesine olanak sağlar. Artık tek bir referans genomunun, belirli bir türün tüm genetik çeşitliliğini tam olarak temsil etmek için yeterli olmadığı ve bir türde genomik varyasyonun ne ölçüde meydana geldiğini anlamak için, pangenomunun oluşturulması gerekliliği açıklığa kavuşmuştur (Hurgobin ve Edwards, 2017). Bu çalışmayla hem *T. trachurus* için pangenome hemde diğer türler için referans genome oluşturularak sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere bir veri seti sunulmuştur.

Yeni nesil sekanslama gibi genomik teknolojilerdeki son gelişmeler, çok sayıda SNP'nin tanımlanmasını ve çeşitli balık türleri için primerlerin tasarlanmasını sağlamıştır. Yeni Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP) işaretleyici primerler ile, popülasyon dinamiklerinin altında yatan genetik temeller hakkında önemli bilgiler sağlanmaktadır. Mikrosatelitler gibi geleneksel genetik markırlara kıyasla genomda çok sayıda bulunmaları, kararlılıkları ve yüksek verimli genotip belirlemeyi kolaylaştırma kapasiteleri ile birçok çalışmaya konu olmaktadır. Örneğin, Mastrochirico-Filho vd. (2016), SNP'lerin *Piaractus mesopotamicus*'ta üreme öncesi programlar için gerekli genetik çeşitliliği değerlendirmede uygulanabilirliğini göstermiş ve popülasyon yapısını ortaya çıkarmada mikrosatelitlere kıyasla daha etkili olduklarını vurgulamıştır. SNP markırların özgüllüğü, çeşitli çevresel bağlamlarda genetik farklılaşmanın daha kesin değerlendirilmesini sağlar. Avrupa pisi balığının (*Platichthys flesus*) genetik yapısını araştırmak için mikrosatelit markırlarının yanında SNP'ler kullanılarak, SNP'lerin çevresel baskılardan etkilenen ince popülasyon yapılarını ayırt etme yeteneği gösterilmiştir (Kuciński vd., 2023). Dahası, SNP'lerin mikrosatelitlere karşı potansiyeli kapsamlı bir şekilde belgelenmiştir. Mikrosatelitler gibi geleneksel markırlar hala değerli olsa da yapılan çalışmalar SNP'lerin, özellikle yeni nesil sekanslama yaklaşımlarından türetilen daha büyük sayılarda kullanıldığında,

popölasyon genetik yapısına dair daha fazla çözünürlük sağlayabileceğini göstermiştir (DeFaveri vd., 2013; Fischer vd., 2017). Bazı analizler, daha fazla miktarda SNP belirtecinin, özellikle ayrıntılı genetik stok tanımlamasında ve antropojenik faktörlerden etkilenen popölasyon yapısının dinamiklerini tanımlamada mikrosatellitlerden önemli ölçüde daha iyi performans gösterebileceğini göstermektedir (Hess vd., 2011). Ancak, araştırmalar ayrıca düşük çeşitliliğe sahip popölasyonlarda doğal sınırlamalar nedeniyle SNP'lerin popölasyon genetik çalışmalarında dikkatlice ele alınması gerektiğini göstermektedir (Hauser vd., 2021).

SNP markırları, günümüzde biyoçeşitlilik araştırmaları ve koruma genetiğı programlarında oldukça yaygın kullanılmaktadır. Çin'in güneyden kuzeye kıyı bölgelerinde yaygın olarak dağılım gösteren *Meretrix meretrix* türü için 32 SNP markır geliştirilmiş özel allel-spesifik PCR ve Tm-shift analizi kullanılarak genotiplendirme yapılmıştır. Bu markırlardan sadece 15'inin (%46.9) polimorfik olduğu ve bunların 12'sinin nükleer DNA, 3'ünün mitokondriyal DNA kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Li vd., 2010). Bir diğer çalışmada, birçok türü ve popölasyonu tehdit altında veya nesli tükenme tehlikesi altında olan *Salvelinus* cinsinin üyelerinin yüksek derecede fenotipik esneklik gösterdiği ve yaygın olarak melezleştiğı belirtilmiştir. Bu faktörler morfolojiye dayalı tür tanımlamasını ve melez tespitini zorlaştırmaktadır. Bundan dolayı *Salvelinus* cinslerinde tür tanımlaması için diğer genetik markır sınıflarına göre çeşitli avantajlar sunan SNP markırları geliştirilmiştir. Türler arasında sabit farklılıklar gösteren 16 SNP ve farklı türler içinde değişken olan 16 ek SNP tanımlamak için altı *Salvelinus* türünden DNA dizileri kullanılmış ve türlerin doğru tanımlanması sağlanmıştır (DeHaan vd., 2014).

Habitat tahribatı, aşırı avlanma ve yerli olmayan alabalık türleriyle melezleşme nedeniyle tehdit altındaki Lahontan keseli alabalığı ve yakın akrabalarının genetik yapısını incelemek ve korumak amacıyla 68 yeni SNP markırı geliştirilmiştir. Bu markırlar, alt türler arası ayrımı sağlamak, popölasyon genetiğini değerlendirmek ve koruma stratejilerine yön vermek için kullanılabilecek ve türün genetik çeşitliliğinin korunmasında kritik rol oynayacaktır (Pritchard, 2013).

SNP markırlar, aynı zamanda GenBank veritabanında veya yayımlanmış literatürde yer alan genom ya da genlerden tasarlanarak da kullanılmaktadır. *Oncorhynchus mykiss* (Çelikbaş alabalık) popölasyonlarında GenBank veritabanında

yer alan *O. mykiss*'e ait fonksiyonel genlerden 15 SNP primer tasarlanarak geliştirilmiştir. Bu SNP bölgeleri, popülasyon yapısının değerlendirilmesi, yerli ve kültür (hatchery) alabalıkları arasındaki introgresyonun tespiti ve üreme başarısının değerlendirilmesinde kullanılmıştır (Aguilar ve Garza, 2008).

İslah programlarında, SNP gibi moleküler markırların geliştirilmesi damızlık popülasyonların genetik yapısının belirlenmesi ve genetik seçim kararları için kritik rol oynamaktadır. Önemli tatlı su kültür balıklarından biri olan Gökkuşaağı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*), transkriptom sekanslaması ile 52 yeni SNP belirteci tanımlanmış ve doğrulanmıştır. Gözlenen heterozigotluk (H_o): 0,177 – 1,000 ve Beklenen heterozigotluk (H_e): 0,239 – 0,638 değerleri arasında olduğu tespit edilmiş ve SNP'lerden 22 tanesinde, Hardy–Weinberg dengesinden anlamlı sapma gösterilmiş ve anlamlı bağlantı dengesizliği (linkage disequilibrium) gözlemlenmiştir. (Nazari ve Pourkazmi, 2021). Genetik ıslah çalışmaları için geniş ağızlı levrek (*Micropterus salmoides*) balığında restriksiyon bölgesi ilişkili DNA sekanslaması (RAD-seq) yöntemiyle 49 bireyde 40 yeni SNP belirlenmiş ve karakterize edilmiştir. Toplamda 407.332 olası SNP tespit edilmiş, bunlardan 122 tanesi test edilmiş ve 40 tanesinin polimorfik olduğu doğrulanmıştır. SNP'lerin (N_e) değerleri 1,53–1,88, gözlenen heterozigotluk (H_o) 0,25–0,50 ve beklenen heterozigotluk (H_e) 0,36–0,48 arasında değişmektedir (Fan vd., 2020). Dahası, binlerce yıldır yetiştiriciliği yapılan ot sazanı (*Ctenopharyngodon idella*) gibi türlerde gen kaynaklarının belirlenmesi ve korunması için 25 yeni tek nükleotid polimorfizmi (SNP) markırı izole edilmiş ve karakterize edilmiştir. Gözlenen heterozigotluk (H_o): 0,0213–0,5532 ve Beklenen heterozigotluk (H_e): 0,0213–0,5059 değerleri arasında olduğu tespit edilmiş ve toplam altı lokus, Hardy–Weinberg dengesinden anlamlı şekilde sapmıştır ($P < 0,05$). Geliştirilen bu yeni EST-tabanlı SNP markırları, koruma stratejileri ve türlerin genetik iyileştirilmesi için yararlı olabilecek ve ekonomik verimlilik ile yönetimsel genetik çalışmalar için faydalı olacaktır.

Çalışmamızda popülasyon çalışmalarında kullanılmak üzere *T. mediterraneus*, *T. trachurus* ve *T. picturatus* için farklı SNP'ler (C/T, A/T, C/G, A/G, A/C gibi) içeren rastgele 10 gen bölgesi seçilmiş ve amplifikasyonu yapılmıştır. Amplifiye edilen bölgelerin hapotip çeşitliliğinin 0,643 ile 1,000 arasında değiştiği nükleotid çeşitliliğinin ise 0,00588 ile 0,53813 arasında değiştiği belirlenmiştir. Çalışılan

lokusların popülasyon çalışmalarında kullanılabilirliği test edilmiş ve polimorfik olduğu belirlenmiştir.

4.3. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) ve Tür Ayrımı

SNP'lerin doğru ve güvenilir bir şekilde genotiplendirilmesi, hem temel araştırmalar hem de uygulamalı alanlar açısından büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) tabanlı testlerin geliştirilmesi, SNP tespitine yönelik hızlı, duyarlı ve maliyet etkin analiz imkânları sunarak genetik analizlerde devrim niteliğinde bir ilerleme sağlamıştır (Heid vd., 1996; Freeman vd., 1999).

Balık türlerinin belirlenmesinde TaqMan qPCR (real-time PCR) uygulaması, su ürünlerinin izlenebilirliğinin sağlanması ve tür doğrulamasında güçlü ve güvenilir bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Bu yöntem, türlere özgü gen bölgelerine seçici olarak bağlanmak üzere tasarlanmış oligonükleotid problemlerin yüksek özgülüğünden yararlanarak, karmaşık matrislerde (örneğin balık dokuları ve işlenmiş yem maddeleri gibi) hızlı tespit ve kantifikasyon sağlamıştır. TaqMan gerçek zamanlı PCR'ın sucul tür tanımlamasındaki faydaları çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Örneğin, Bajzík vd. (2012), sazan balığı (*Cyprinus carpio*) türünün doğrulanması amacıyla özel bir TaqMan testi geliştirmiştir. *C. carpio*'ya özgü mitokondriyal bir bölgeyi hedef alan bu test, bu türü yakın akraba türlerden ayırt edebilmiştir. Taylor vd. (2002), Atlantik'te ekonomik öneme sahip üç Gadidae türünün (*Gadus morhua*, *Melanogrammus aeglefinus*, *Merlangius merlangus*), TaqMan real-time PCR yöntemi ile tanımlanmasına olanak tanıyan çoklu (multiplex) bir florojenik test geliştirmiştir. Özellikle yumurtaların morfolojik olarak ayırt edilemediği embriyonik evrelerde, bu moleküler testin stok değerlendirmeleri ve yumurtlama alanlarının haritalanması gibi balıkçılık biyolojisi çalışmalarında oldukça etkili olacağı vurgulanmıştır.

Son yıllarda, qPCR'nin SNP testleri için kullanımını daha da geliştirerek özgülüğü ve geçirimsizliği artıran, yanlış pozitif sonuçları ise azaltan çeşitli yenilikçi yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu yeniliklerden biri, Li ve arkadaşları (2021) tarafından geliştirilen evrensel problemlere dayalı, ara primer tetiklemeli qPCR (UPIP-qPCR) yöntemidir. Bu yöntem, geleneksel SNP genotiplendirme teknikleriyle ilişkilendirilen yüksek maliyet ve uzun tespit süresi gibi yaygın sınırlamaların üstesinden gelmek

amacıyla evrensel bir raporlama sistemi ile ara primer mimarisini birleştirmektedir. Allel-spesifik amplifikasyonu problara dayalı tespit mekanizmasıyla birleştirerek UPIP-qPCR, yüksek hassasiyet ve özgüllüğü korurken alleller arasında güçlü bir ayrım sağlar. Li vd. (2021), sistemin SNP varyasyonlarını güvenilir şekilde tespit ettiğini göstermiş ve qPCR'nin araştırma uygulamaları için faydalı bir platform olduğunu vurgulamışlardır. Bu qPCR tabanlı SNP testlerinin analitik olarak doğrulanması, güvenilirliklerinin belirlenmesinde büyük rol oynamıştır. Örneğin, qPCR tabanlı SNP genotiplendirme ile diğer moleküler tekniklerin performanslarının karşılaştırıldığı çalışmalar, bozulmuş DNA örnekleri kullanıldığında bile yüksek uyum oranları göstermiştir (Campbell ve Narum, 2009). Ayrıca, tekrarlanabilirliği, örnek kalitesinin değişkenlik gösterebileceği tür tanımlamadan genetik stok analizine kadar geniş uygulama alanlarında kullanılabileceğine dair güven vermektedir. Bu gelişmiş qPCR tabanlı SNP testlerinin uygulamaları oldukça çeşitlidir. Su ürünleri biyolojisinde, SNP assayler ile tür tanımlama, popülasyon genetiği ve koruma biyolojisi alanlarında çalışmalarına katkı sağlamıştır. Örneğin, DeHaan vd. (2014), *Salvelinus* cinsine ait türlerin doğru tanımlanması için yeni SNP genotiplendirme assayler kullanmış ve rekreasyonel balıkçılıkta türlerin yanlış tanımlanması sorununu çözmüşlerdir. Bir diğer çalışmada Kuzeydoğu Atlantik'te bulunan *Sebastes* cinsine ait türlerin genetik olarak ayırt edilmesi amacıyla 2800 SNP belirleyici geliştirmiştir. Bu SNP'lerden 56'sı, Norveç ve Grönland'dan toplanan 191 örnek üzerinde test edilmiş ve 49 SNP başarılı bir şekilde tür tanımlamasında kullanılmıştır. Özellikle, morfolojik olarak ayırt edilmesi zor olan *S. norvegicus* türlerinin genetik olarak ayrılması sağlanmıştır (Johansen vd.,2025). Qu vd. (2024), beş yüksek değerli orkinos türünün (*Thunnus alalunga*, *T. obesus*, *T. maccoyii*, *T. albacares* ve *T. thynnus*) tanımlanması için SNP tabanlı gerçek zamanlı PCR testleri geliştirmiştir. Bu testler, işlenmiş ve taze orkinos ürünlerinde türlerin doğru bir şekilde tanımlanmasını sağlamış ve yanlış etiketleme sorunlarını ortaya koymuştur.

Trachurus cinsine ait türlerin genetik olarak tanımlanması amacıyla çeşitli moleküler çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalardan biri olan Karaïskou vd. (2003), *T. trachurus*, *T. mediterraneus* ve *T. picturatus* türleri arasındaki filogenetik ilişkileri ve genetik farklılıkları belirlemek amacıyla mitokondriyal DNA (cytochrome b ve 16S rRNA) sekanslama yöntemlerini kullanmıştır. Söz konusu çalışmada bazı

türlere özgü nükleotid farklılıkları saptanmış olsa da analiz yalnızca mtDNA'ya dayanmakta olup bu yaklaşım sadece anneye ait genetik bilgiyi yansıtmaktadır. Bu durum, türler arası olası melezleşmeleri ve stok içi nükleer varyasyonları saptamada yetersiz kalmaktadır. Benzer şekilde, Apostolidis vd. (2008) tarafından geliştirilen yöntem, *Trachurus* ve *Mullus* cinsi türlerin ayrımını sağlamak amacıyla mtDNA üzerinde tanımlanan spesifik SNP bölgelerine yönelik olarak tasarlanmış tür özgül primerlerle gerçekleştirilen multiplex PCR yöntemine dayanmaktadır. Bu yöntem, yalnızca mitokondriyal varyasyonu kapsamı nedeniyle nükleer genomdaki tür düzeyindeki ayrımların veya hibridizasyon gibi olayların tespitinde sınırlıdır. Ayrıca, geliştirilen test sistemleri geleneksel PCR ve jel elektroforezi gibi nispeten düşük çözünürlüklü tekniklerle sınırlı kalmıştır.

Çalışmamızda 3 istavrit türüne ait genomların 13. kromozom bölgesindeki spesifik SNP lokuslar içeren gen bölgelerine göre primer ve probler tasarlanmış ve tür ayrımı başarılı bir şekilde sağlanmıştır. Evrensel problara dayalı, ara primer tetiklemeli qPCR (UIP-qPCR) yöntemi kullanımıyla elde edilen floresan verilerinin, Temel Koordinat Analizinde (PCoA) ayrı kümeler oluşturması üç *Trachurus* türünün net bir şekilde ayrılabilceğini göstermiştir. Bu durum sadece teorik doğrulamada değil aynı zamanda uygulamalı çalışmalarda da tür tanımlaması için kullanılabilecek tanı kitlerinin geliştirilmesine imkân sağlayabilecektir. Bu bağlamda, çalışmamızda geliştirilen test panelleri literatürdeki birçok çalışmadan (Apostolidis vd., 2008 Karaïskou vd., 2003) daha spesifik ve uyarlanabilir bir sistem sunma potansiyeline sahiptir. Geliştirdiğimiz primer ve probler nükleer genomda bulunduğundan dolayı türler arası olası melezleşmeleri kolay ve hızlı bir şekilde belirleyebilecektir. Yine tür içi geliştirdiğimiz primerler genetik varyasyonun belirlenmesi ve populasyon yapısının anlaşılmasına yönelik hassas genotipleme uygulamaları için güçlü bir temel oluşturacaktır. Primer-prob tasarımlarımız assay (test) kit haline getirilerek ticari sahtekârlığı tespit etmek ve ortadan kaldırmak için yanlış etiketlenmiş *Trachurus* türlerinin tanımlanmasında kullanılacak yeni analitik yöntem olarak kayıtlara geçecektir. Geliştirilen SYBR Green ve UIP-qPCR tabanlı tür tanımlama sistemleri türler arasında yüksek özgüllük ve duyarlılık göstermiştir. Bu sistemlerin türlere özgü SNP bölgelerine dayalı olması, yanlış etiketleme, yumurta/larval aşamada tanımlama zorluğu ve stok değerlendirmesi gibi sahada karşılaşılan birçok sorunun üstesinden

gelinmesine katkıda bulunabilir. Birçok çalışmada, benzer moleküler tanı sistemlerinin özellikle ticari türlerde yanlış etiketleme ve ticari sahtekarlığı önlemek için etkili bir şekilde kullanıldığı gösterilmiştir (Qu vd., 2024; Johansen vd., 2025; DeHaan vd., 2014).

Nihayi olarak, bu çalışmada elde edilen yüksek yoğunluklu SNP verileri ve türe özgü tanımlayıcı genetik markırlar hem filogenetik tür ayrımı hem popülasyon genetik yapı analizi hem de *Trachurus* türleri için kullanılabilecek olan tür tanımlama sistemleri oluşturma çalışmalarına önemli katkılarda bulunacaktır. Gelecekte, bu SNP verilerinin pangenomik analizler, uyarlanabilir genom taramaları, GWAS (genom çapında ilişki analizleri) ve çevresel değişkenlere karşı genetik uyum veya tepkilerin değerlendirilmesi gibi üst seviyede genetik ve evrimsel çalışmalarda kullanılabileceği öngörülmektedir. Ayrıca, ülkemiz balıkçılığı açısından önem taşıyan bu türlerin genetik stok yapılarının düzenli olarak izlenmesi, sürdürülebilir balıkçılık ve türlerin korunması açısından stratejik öneme sahiptir.

5. SONUÇ

Denizel kaynakların sürdürülebilir yönetimi, hedef türlerin biyolojik ve genetik yapılarına ilişkin doğru ve güvenilir verilere dayanmalıdır. Türkiye deniz balıkçılığı açısından ekonomik değeri yüksek olan istavrit türleri (*T. trachurus*, *T. mediterraneus* ve *T. picturatus*), morfolojik benzerlikleri ve genellikle karışık stoklar halinde bulunmaları ve avlanmaları, tür düzeyinde ayırım ve stok temelli yönetim açısından zorluklar oluşturmaktadır. Bu zorluklar hem bilimsel izleme çalışmalarında hem de türlere özgü avlanma kotalarının belirlenmesinde ciddi belirsizliklere yol açmaktadır. Dolayısıyla, türlerin aşırı avcılık tehdidi ile yüz yüze kalmasına neden olabilmektedir. Bu bağlamda temel motivasyonumuz, istavrit türleri arasında moleküler düzeyde güvenilir bir ayırım yapılabilmesini sağlamak, karışık stokların yapısını belirleyebilmek ve sürdürülebilirliğine katkı da bulunmaktadır. Bu amaçla, ilk kez türe özgü nükleer SNP markırları geliştirilmiş ve bu markırlar kullanılarak qPCR temelli genotipleme stratejileri uygulanmıştır.

Çalışmamızda söz konusu türlerin genetik düzeyde yüksek doğrulukla ayırımını sağlayan, nükleer genomdan elde edilen WGS verilerine dayalı olarak belirlenmiş türe özgü SNP lokusları kullanılmıştır. Bu SNP'ler, qPCR tabanlı genotipleme sistemleri ile entegre edilerek, hızlı, hassas ve yüksek özgüllüğe sahip bir tanı yöntemi sunmaktadır. Ayrıca, tasarlanan prob ve primerler, türe özgü varyasyonları doğrudan hedef aldığından, hibrid bireylerin tespiti gibi daha karmaşık stok yapılarını analiz etme imkânı da sağlamaktadır. Bu yönleriyle çalışmamız, yalnızca bir tanı yöntemi olmanın ötesinde; Türk denizlerindeki *Trachurus* türlerinin sürdürülebilir yönetimi, doğru tür bazlı stok değerlendirmesi, avcılık denetimi, eDNA uygulamaları, ve gıda güvenliği gibi çok çeşitli alanlarda kullanılabilecek yenilikçi bir biyoteknolojik araç sunmaktadır. Önceki çalışmaların aksine, nükleer düzeyde tür spesifik ayırım sağlayabilen bu yöntem, moleküler taksonomi, stok yapısının izlenmesi ve türlerin korunmasına yönelik stratejilerin geliştirilmesinde önemli bir bilimsel ve uygulamalı boşluğu doldurmaktadır.

KAYNAKÇA

- Abaunza, P., Murta, A. G., Campbell, N., Cimmaruta, R., Comesaña, A. S., Dahle, G., ...Zimmermann, C. (2008). Stock identity of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in the Northeast Atlantic and Mediterranean Sea: Integrating the results from different stock identification approaches. *Fisheries Research*, 89(2), 196-209.
- Aguilar, A., Garza, J. C. (2008). Isolation of 15 single nucleotide polymorphisms from coastal steelhead, *Oncorhynchus mykiss* (Salmonidae). *Molecular Ecology Resources*, 8(3), 659-662.
- Akşıray, F. (1987). Marine fishes of Turkey and a key to species. *İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Hidrobiyoloji Araştırma Enstitüsü Yayınları*, İstanbul, 227s.
- Angell, I.L., Nilsen, M., Carlsen, K.C.L., Carlsen, K.H., Hedlin, G., Jonassen, C. M., ...Rudi, K. (2020). *De novo* species identification using 16S rRNA gene nanopore sequencing. *PeerJ*, 8, e10029.
- Apostolidis, A. P., Georgiadis, A., Karaïskou, N., Sandaltzopoulos, R. (2008). Reliable and rapid discrimination of congeneric species by mtDNA SNP analysis by multiplex PCR: application on three *Trachurus* and two *Mullus* fish species as model cases. *Hydrobiologia*, 614, 401-404.
- Austin, C.M., Tan, M.H., Harrison, K.A., Lee, Y.P., Croft, L.J., Sunnucks, P., ... Gan, H. M. (2017). *De novo* genome assembly and annotation of Australia's largest freshwater fish, the Murray cod (*Maccullochella peelii*), from Illumina and Nanopore sequencing read. *GigaScience*, 6(8), gix063. <https://doi.org/10.1093/gigas-cienc e/gix063>.
- Aydın, M., Karadurmuş, U. (2012). Age, growth, length-weight relationship and reproduction of the Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus* Linnaeus, 1758) in Ordu (Black Sea). *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2(2), 68-77.
- Aydın, M., Karapınar, M., Balık, İ. (2018). Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki Amatör Balıkçılığın Sosyo Ekonomik Analizi. *Ecological Life Sciences*, 13(1), 1-14.
- Baeza, J.A., García-De León, F.J. (2022). Are we there yet? Benchmarking low-coverage nanopore long-read sequencing for the assembling of mitochondrial genomes using the vulnerable silky shark *Carcharhinus falciformis*. *BMC genomics*, 23(1), 320.
- Bajzik, P., Golian, J., Zidek, R., Krall, M., Walczycka, M., Tkaczewska, J. (2012). Identification of the Common Carp (*Cyprinus carpio*) species using Real-Time PCR methods. *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 19(5).

- Bao, R., Huang, L., Andrade, J., Tan, W., Kibbe, W. A., Jiang, H., Feng, G. (2014). Review of current methods, applications, and data management for the bioinformatics analysis of whole exome sequencing. *Cancer Informatics*, 13, CIN-S13779.
- Bat, L., Sezgin, M., Şahin, F., Özdemir, Z. B., Ürkmez, D. (2013). Sinop city fishery of the Black Sea.
- Bayona-Vásquez, N. J., Díaz-Jaimes, P., Uribe-Alcocer, M. (2015). Isolation and characterization of microsatellite loci in the common dolphinfish *Coryphaena hippurus* (Perciformes: Coryphaenidae) from next generation sequencing and cross amplification in pompano dolphinfish *Coryphaena equiselis*. *Conservation Genetics Resources*, 7, 373-375.
- Bebeli P.J., Zhou Z., Somers D.J. and Gustafson J.P. (1997) PCR primed with mini satellite core sequences yields DNA fingerprinting probes in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 95: 276-283.
- Begg, G. A., Waldman, J. R. (1999). An holistic approach to fish stock identification. *Fisheries research*, 43(1-3), 35-44.
- Beissinger, T. M., Hirsch, C. N., Sekhon, R. S., Foerster, J. M., Johnson, J. M., Muttoni, G., ...de Leon, N. (2013). Markir density and read depth for genotyping populations using genotyping-by-sequencing. *Genetics*, 193(4), 1073-1081.
- Bektas, Y., Belduz, A. O. (2008). Molecular phylogeny of Turkish *Trachurus* species (Perciformes: Carangidae) inferred from mitochondrial DNA analyses. *Journal of Fish Biology*, 73(5), 1228-1248.
- Beltz, K. R., Tsang, D. C., Wang, J., Rose, S. D., Bao, Y., Wang, Y., ...Chen, C. (2018). A high-performing and cost-effective snp genotyping method using rhpcr and universal reporters. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 09(09), 497-512. <https://doi.org/10.4236/abb.2018.99034>
- Bian, L., Li, F. H., Ge, J. L., Wang, P. F., Chang, Q., Zhang, S. N., ...Liu, X. T. (2020). Chromosome-level genome assembly of the greenfin horse-faced filefish (*Thamnaconus septentrionalis*) using Oxford Nanopore PromethION sequencing and Hi-C technology., 20. DOI: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13183>, 1069-1079.
- Bilecenoğlu, M., Kaya, M., Cihangir, B., Çiçek, E. (2014). An updated checklist of the marine fishes of Turkey. *Turkish Journal of Zoology*, 38(6), 901-929.
- Bostanci, D. (2009). Sarıkuyruk İstavrit, *Trachurus mediterraneus* (Steindachner, 1868)'un Otolit Özellikleri ve Bazı Populasyon Parametreleri. *Firat University Journal of Science*, 21(1).
- Bourret, V., Kent, M. P., Primmer, C. R., Vasemägi, A., Karlsson, S., Hindar, K., ...Lien, S. (2013). SNP-array reveals genome-wide patterns of geographical

- and potential adaptive divergence across the natural range of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Molecular ecology*, 22(3), 532-551.
- Bowers, J., Mitchell, J., Beer, E., Buzby, P. R., Causey, M., Efcavitch, J. W., ...Thompson, J. F. (2009). Virtual terminator nucleotides for next-generation DNA sequencing. *Nature Methods*, 6(8), 593-595.
- Bradbury, I. R., Hamilton, L. C., Sheehan, T. F., Chaput, G., Robertson, M. J., Dempson, J. B., ...Bernatchez, L. (2016). Genetic mixed-stock analysis disentangles spatial and temporal variation in composition of the West Greenland Atlantic Salmon fishery. *ICES Journal of Marine Science*, 73(9), 2311-2321.
- Callahan, B. J., Wong, J., Heiner, C., Oh, S., Theriot, C. M., Gulati, A. S., ...Dougherty, M. K. (2019). High-throughput amplicon sequencing of the full-length 16S rRNA gene with single-nucleotide resolution. *Nucleic Acids Research*, 47(18), e103-e103.
- Campbell, N. R., Narum, S. R. (2009). Quantitative PCR assessment of microsatellite and SNP genotyping with variable quality DNA extracts. *Conservation Genetics*, 10, 779-784.
- Campbell, N. R., Narum, S. R. (2011). Development of 54 novel single-nucleotide polymorphism (SNP) assays for sockeye and coho salmon and assessment of available SNPs to differentiate stocks within the Columbia River. *Molecular Ecology Resources*, 11, 20-30.
- Cárdenas, L., Silva, A. X., Magoulas, A., Cabezas, J., Poulin, E., Ojeda, F. P. (2009). Genetic population structure in the Chilean jack mackerel, *Trachurus murphyi* (Nichols) across the South-eastern Pacific Ocean. *Fisheries Research*, 100(2), 109-115.
- Casa, A. M., Brouwer, C., Nagel, A., Wang, L., Zhang, Q., Kresovich, S., Wessler, S. R. (2000). The MITE family Heartbreaker (Hbr): molecular markers in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(18), 10083-10089.
- Chang, R. Y., O'donoghue, L. S., Bureau, T. E. (2001). Inter-MITE polymorphisms (IMP): a high throughput transposon-based genome mapping and fingerprinting approach. *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 773-781.
- Chen, C., Zhou, P., Choi, Y. A., Huang, S., Gmitter, F. G. (2006). Mining and characterizing microsatellites from citrus ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, 112, 1248-1257.
- Cimmaruta, R., Bondanelli, P., Ruggi, A., Nascetti, G. (2008). Genetic structure and temporal stability in the horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *Fisheries Research*, 89(2), 114-121.

- Clark, T. A., Sugnet, C. W., Ares Jr, M. (2002). Genomewide analysis of mRNA processing in yeast using splicing-specific microarrays. *Science*, 296(5569), 907-910.
- Clarridge III, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), 840-862.
- Collins, D. W., Jukes, T. H. (1994). Rates of transition and transversion in coding sequences since the human-rodent divergence. *Genomics*, 20(3), 386-396.
- Comesaña, A. S., Martínez-Areal, M. T., Sanjuan, A. (2008). Genetic variation in the mitochondrial DNA control region among horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from the Atlantic and Mediterranean areas. *Fisheries Research*, 89(2), 122-131.
- Corander, J., Majander, K. K., Cheng, L., Merilä, J. (2013). High degree of cryptic population differentiation in the Baltic Sea herring *Clupea harengus*. *Molecular ecology*, 22(11), 2931-2940.
- Dann, T. H., Habicht, C., Baker, T. T., Seeb, J. E. (2013). Exploiting genetic diversity to balance conservation and harvest of migratory salmon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70(5), 785-793.
- De Battisti, C., Marciano, S., Magnabosco, C., Busato, S., Arcangeli, G., Cattoli, G. (2014). Pyrosequencing as a tool for rapid fish species identification and commercial fraud detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(1), 198-205.
- Deamer, D. W., Akeson, M. (2000). Nanopores and nucleic acids: prospects for ultrarapid sequencing. *Trends in biotechnology*, 18(4), 147-151.
- DeFaveri, J., Viitaniemi, H. M., Leder, E. H., Merilä, J. (2013). Characterizing genic and nongenic molecular markers: comparison of microsatellites and snps. *Molecular Ecology Resources*, 13(3), 377-392. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12071>
- DeHaan, P. W., Pascal, C. E., Seeb, J. E. (2014). Novel snp genotyping assays facilitate species identification of salvelinus collected in a recreational fishery. *Transactions of the American Fisheries Society*, 143(1), 164-172. <https://doi.org/10.1080/00028487.2013.833552>
- Dekker, C. (2007). Solid-state nanopores. *Nature nanotechnology*, 2(4), 209-215.
- Deluca, M. (1976). Firefly luciferase. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 44, 37-68.
- Demirel, N., Zengin, M., Ulman, A. (2020). First large-scale eastern Mediterranean and Black Sea stock assessment reveals a dramatic decline. *Frontiers in Marine Science*, 7, 103.

- Di Natale, A., Bariche, M., Bizsel, C., Massuti, E. (2011). *Trachurus trachurus* (Mediterranean assessment). *The IUCN Red List of Threatened Species*. 2011: e.T198647A9066421. Accessed on 16 October 2024.
- Doorenspleet, K., Jansen, L., Oosterbroek, S., Kamermans, P., Bos, O., Wurz, E., ...Nijland, R. (2021). The long and the short of it: Nanopore based eDNA metabarcoding of marine vertebrates works; sensitivity and specificity depend on amplicon lengths. *Biorxiv*, 2021-11.
- Drmanac, R., Sparks, A. B., Callow, M. J., Halpern, A. L., Burns, N. L., Kermani, B. G., ...Reid, C. A. (2010). Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. *Science*, 327(5961), 78-81.
- Durmuş, M. (2019). Evaluation of nutritional and mineral-heavy metal contents of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in the Middle Black Sea in terms of human health. *Biological Trace Element Research*, 190, 208-216.
- Efcavitch, J. W., Thompson, J. F. (2010). Single-molecule DNA analysis. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 3, 109-128.
- Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., ...Turner, S. (2009). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*, 323(5910), 133-138.
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., Mitchell, S. E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PloS one*, 6(5), e19379.
- Es, L. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860-921.
- Eschmeyer, W. N. (2003). Annotated Checklistsof Fishes.
- Everett, M. V., Grau, E. D., Seeb, J. E. (2011). Short reads and nonmodel species: exploring the complexities of next-generation sequence assembly and SNP discovery in the absence of a reference genome. *Molecular ecology resources*, 11, 93-108.
- Fan, J., Bai, J., Ma, D. (2020). Isolation and characterization of 40 SNP in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Conservation Genetics Resources*, 12, 57-60.
- FAO. (1994). World review of highly migratory species and straddling stocks. FAO Fish. Tech. Pap. No. 337. Rome, FAO. 70 p.
- FAO. (2022). Meeting summary of the FAO/CECAF Working Group on the Assessment of Small Pelagic Fish off Northwest Africa. Nouakchott, Mauritania, 5-9 December 2022. CECAF/SSCIX/2022/4a.
- Fire, A., Xu, S. Q. (1995). Rolling replication of short DNA circles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10), 4641-4645.

- Fischer, M. C., Rellstab, C., Leuzinger, M., Roumet, M., Gugerli, F., Shimizu, K. K., Widmer, A. (2017). Estimating genomic diversity and population differentiation – an empirical comparison of microsatellite and snp variation in *arabidopsis halleri*. *BMC Genomics*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3459-7>
- Fleischmann, R. D., Adams, M. D., White, O., Clayton, R. A., Kirkness, E. F., Kerlavage, A. R., ... Venter, J. C. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269(5223), 496-512.
- Flusberg, B. A., Webster, D. R., Lee, J. H., Travers, K. J., Olivares, E. C., Clark, T. A., ... Turner, S. W. (2010). Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nature methods*, 7(6), 461-465.
- Foster, J. T., Allan, G. J., Chan, A. P., Rabinowicz, P. D., Ravel, J., Jackson, P. J., Keim, P. (2010). Single nucleotide polymorphisms for assessing genetic diversity in castor bean (*Ricinus communis*). *BMC Plant Biology*, 10, 1-11.
- Freeman, W. M., Walker, S. J., Vrana, K. E. (1999). Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential. *Biotechniques*, 26(1), 112–125. <https://doi.org/10.2144/99261rv01>
- Galal-Khallaf, A., Osman, A. G., Carleos, C. E., Garcia-Vazquez, E., Borrell, Y. J. (2016). A case study for assessing fish traceability in Egyptian aquafeed formulations using pyrosequencing and metabarcoding. *Fisheries Research*, 174, 143-150.
- Ge, H., Lin, K., Shen, M., Wu, S., Wang, Y., Zhang, Z., Zheng, L. (2019). *De novo* assembly of a chromosome-level reference genome of red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*) using nanopore sequencing and Hi-C. *Molecular ecology resources*, 19(6), 1461-1469.
- General Fisheries Commission for the Mediterranean. Studies and Reviews; Rome Iss. 99, (2019). 1-3,5-17,19-83,85-151,153-259, I, IV, IX.
- Genner, M., Collins, R., of Life, W. S. I. T., Darwin Tree of Life Consortium. (2022). The genome sequence of the Atlantic horse mackerel, *Trachurus trachurus* (Linnaeus 1758). Wellcome Open Research, 7.
- Gharizadeh, B., Ghaderi, M., Nyrén, P. (2007). Pyrosequencing technology for short DNA sequencing and whole genome sequencing. *生物物理*, 47(2), 129-132.
- Glaubitz, J. C., Casstevens, T. M., Lu, F., Harriman, J., Elshire, R. J., Sun, Q., Buckler, E. S. (2014). TASSEL-GBS: a high capacity genotyping by sequencing analysis pipeline. *PloS one*, 9(2), e90346.
- Goodwin, S., McPherson, J. D., McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature reviews genetics*, 17(6), 333-351.

- Gore, M., Bradbury, P., Hogers, R., Kirst, M., Verstege, E., van Oeveren, J., ...van Eijk, M. (2007). Evaluation of target preparation methods for single-feature polymorphism detection in large complex plant genomes. *Crop Science*, 47, S-135.
- Griffin, T. J., Tang, W., Smith, L. M. (1997). Genetic analysis by peptide nucleic acid affinity MALDI-TOF mass spectrometry. *Nature biotechnology*, 15(13), 1368-1372.
- Gu, W. K., Weeden, N. F., Yu, J., Wallace, D. H. (1995). Large-scale, cost-effective screening of PCR products in marker-assisted selection applications. *Theoretical and Applied Genetics*, 91, 465-470.
- Guo, J., Yu, L., Turro, N. J., Ju, J. (2010). An integrated system for DNA sequencing by synthesis using novel nucleotide analogues. *Accounts of chemical research*, 43(4), 551-563.
- Hale, M. C., McCormick, C. R., Jackson, J. R., DeWoody, J. A. (2009). Next-generation pyrosequencing of gonad transcriptomes in the polyploid lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*): the relative merits of normalization and rarefaction in gene discovery. *BMC genomics*, 10, 1-11.
- Hauser, S., Athrey, G., Leberg, P. L. (2021). Waste not, want not: microsatellites remain an economical and informative technology for conservation genetics. *Ecology and Evolution*, 11(22), 15800-15814. <https://doi.org/10.1002/ece3.8250>
- Hayes, B., Laerdahl, J. K., Lien, S., Moen, T., Berg, P., Hindar, K., ...Høyheim, B. (2007). An extensive resource of single nucleotide polymorphism markers associated with Atlantic salmon (*Salmo salar*) expressed sequences. *Aquaculture*, 265(1-4), 82-90.
- He, C., Chen, L., Simmons, M., Li, P., Kim, S., Liu, Z. J. (2003). Putative SNP discovery in interspecific hybrids of catfish by comparative EST analysis. *Animal genetics*, 34(6), 445-448.
- Heid, C. A., Stephenson, M., Akers, R. A., Zhou, L. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986-994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Helyar, S. J., Limborg, M. T., Bekkevold, D., Babbucci, M., Van Houdt, J., Maes, G. E., ...Panitz, F. (2012). SNP discovery using next generation transcriptomic sequencing in Atlantic herring (*Clupea harengus*). *PLoS ONE*, 7, e42089
- Hess, J. E., Matala, A.P., Narum, S.R. (2011). Comparison of snps and microsatellites for fine-scale application of genetic stock identification of chinook salmon in the columbia river basin. *Molecular Ecology Resources*, 11(s1), 137-149. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02958.x>

- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/technology*, 11(9), 1026-1030.
- Hirao, A. S., Imoto, J., Fujiwara, A., Watanabe, C., Yoda, M., Matsuura, A., Akita, T. (2024). Genome-wide SNP analysis coupled with geographic and reproductive-phenological information reveals panmixia in a classical marine species, the Japanese jack mackerel (*Trachurus japonicus*). *Fisheries Research*, 279, 107146.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R., Gelfand, D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3'exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(16), 7276-7280.
- Horner, D. S., Pavesi, G., Castrignano, T., De Meo, P. D. O., Liuni, S., Sammeth, M., ...Pesole, G. (2010). Bioinformatics approaches for genomics and post genomics applications of next-generation sequencing. *Briefings in bioinformatics*, 11(2), 181-197.
- Houston, R. D., Taggart, J. B., Cézard, T., Bekaert, M., Lowe, N. R., Downing, A., ...Hamilton, A. (2014). Development and validation of a high density SNP genotyping array for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *BMC genomics*, 15, 1-13.
- Howell, W. M., Jobs, M., Brookes, A. J. (2002). iFRET: an improved fluorescence system for DNA-melting analysis. *Genome research*, 12(9), 1401-1407.
- Howell, W. M., Jobs, M., Gyllenstein, U., Brookes, A. J. (1999). Dynamic allele-specific hybridization. *Nature biotechnology*, 17(1), 87-88.
- Hubert, S., Higgins, B., Borza, T., Bowman, S. (2010). Development of a SNP resource and a genetic linkage map for Atlantic cod (*Gadus morhua*). *BMC genomics*, 11, 1-14.
- Hurgobin, B., Edwards, D. (2017). SNP discovery using a pangenome: has the single reference approach become obsolete? *Biology*, 6(1), 21.
- ICES, (2003). Report of the Working Group on the Assessment of Mackerel, Horse Mackerel, Sardine and Anchovy". ICES C.M. 2003/ACFM: 07.
- ICES, (2005). Report of the Working Group on the Assessment of Mackerel, Horse Mackerel, Sardine and Anchovy". ICES CM 2005/ACFM: 08.
- IUCN, (2023). International Union for Conservation of Nature annual report 21.05.2025
- Johansen, T., Hanebrekke, T., Besnier, F., Westgaard, J. I., Bruvold, I. M., Dahle, G., ...Saha, A. (2025). Development of SNP for Sebastes species identification

with special focus on the cryptic species complex of *Sebastes norvegicus*. *Ecology and Evolution*, 15(1), e70767.

- Kalaycı, F., Samsun, S., Şahin, C., Samsun, O., Gözler, A.M. (2010). Comparison of biological characteristics of the horse Mackerel (*Trachurus trachurus* L. 1758) which caught of different fishing gears in the Southern Black Sea (Türkiye).
- Kalendar, R, Grob T, Regina M, Suoniemi A and Schulman A (1999) IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theor. Appl. Genet.* 98: 704-711.
- Kantety, R. V., La Rota, M., Matthews, D. E., Sorrells, M. E. (2002). Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant molecular biology*, 48, 501-510.
- Kara, A., Akyol, O. (2003). Ege, Marmara ve Karadeniz’de *Trachurus trachurus* (Linnaeus, 1758) ve *Trachurus mediterraneus* (Steindachner, 1868) popülasyonlarının bazı morfolojik özellikleri üzerine bir ön çalışma. *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 20(3-4), 481-488.
- Karaïskou, N., Triantafyllidis, A., Triantaphyllidis, C. (2003). Discrimination of three *Trachurus* species using both mitochondrial-and nuclear-based DNA approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(17), 4935-4940.
- Karaïskou, N., Triantafyllidis, A., Triantaphyllidis, C. (2004). Shallow genetic structure of three species of the genus *Trachurus* in European waters. *Marine Ecology Progress Series*, 281, 193-205.
- Karoui, R., Hassoun, A. (2017). Efficiency of rosemary and basil essential oils on the shelf-life extension of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) fillets stored at 2 °C. *Journal of AOAC International*, 100(2), 335-344. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0410>.
- Kasapidis, P., Magoulas, A. (2008). Development and application of microsatellite markers to address the population structure of the horse mackerel *Trachurus trachurus*. *Fisheries Research*, 89(2), 132-135.
- Kasianowicz, J. J., Brandin, E., Branton, D., Deamer, D. W. (1996). Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13770-13773.
- Kim, S., Misra, A. (2007). SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 9, 289-320.
- Klenow, H., Overgaard-Hansen, K., Patkar, S. A. (1971). Proteolytic cleavage of native DNA polymerase into two different catalytic fragments: influence of assay conditions on the change of exonuclease activity and polymerase

- activity accompanying cleavage. *European Journal of Biochemistry*, 22(3), 371-381.
- Komoszynski, M., Wojtczak, A. (1996). Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6. 1.5): function and relationship to ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1310(2), 233-241.
- Korlach, J., Bjornson, K. P., Chaudhuri, B. P., Cicero, R. L., Flusberg, B. A., Gray, J. J., ...Turner, S. W. (2010). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. In *Methods in enzymology* (Vol. 472, pp. 431-455). Academic Press.
- Korte, A., Farlow, A. (2013). The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant methods*, 9, 1-9.
- Kuciński, M., Jakubowska, M., Góra, A., Mirny, Z., Nadolna-Ałtyn, K., Szlinder-Richert, J., ...Ocalewicz, K. (2023). Population genetic study on the european flounder (*platichthys flesus*) from the southern baltic sea using snps and microsatellite markers. *Animals*, 13(9), 1448. <https://doi.org/10.3390/ani13091448>
- Kumar, A., Sharma, D., Tiwari, A., Jaiswal, J. P., Singh, N. K., Sood, S. (2016). Genotyping-by-sequencing analysis for determining population structure of finger millet germplasm of diverse origins. *The plant genome*, 9(2), plantgenome2015-07.
- Kumar, G., Kocour, M. (2017). Applications of next-generation sequencing in fisheries research: A review. *Fisheries Research*, 186, 11-22.
- Laird, P. W. (2010). Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nature Reviews Genetics*, 11(3), 191-203.
- Lamaze, F. C., Sauvage, C., Marie, A., Garant, D., Bernatchez, L. (2012). Dynamics of introgressive hybridization assessed by SNP population genomics of coding genes in stocked brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Molecular Ecology*, 21(12), 2877-2895.
- Landegren, U., Kaiser, R., Sanders, J., Hood, L. (1988). A ligase-mediated gene detection technique. *Science*, 241(4869), 1077-1080.
- Lay, M. J., Wittwer, C. T. (1997). Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clinical Chemistry*, 43(12), 2262-2267.
- Lefever, S., Rihani, A., Meulen, J. V. d., Pattyn, F., Maerken, T. V., Dorpe, J. V., ...Vandesompele, J. (2019). Cost-effective and robust genotyping using double-mismatch allele-specific quantitative pcr. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38581-z>
- Levy, S.E., Myers, R.M. (2016). Advancements in next-generation sequencing. *Annual review of genomics and human genetics*, 17(1), 95-115.

- Li, B., Liu, Y., Hao, X., Dong, J., Chen, L., Li, H., ...Li, P. (2021). Universal probe-based intermediate primer-triggered qPCR (UIP-qPCR) for SNP genotyping. *BMCgenomics*, 22,1-11.
<https://doi.org/10.22541/au.159986851.12225805>
- Li, G., Quiros, C. F. (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theoretical and applied genetics*, 103, 455-461.
- Li, H., Zhu, D., Gao, X., Li, Y. F., Wang, J., He, C. (2010). Mining single nucleotide polymorphisms from EST data of hard clam *Meretrix meretrix*. *Conservation Genetics Resources*, 2, 69-72.
- Li, J., Wang, F., Mamon, H., Kulke, M. H., Harris, L., Maher, E., ...Makrigiorgos, G. M. (2006). Antiprimer quenching-based real-time PCR and its application to the analysis of clinical cancer samples. *Clinical chemistry*, 52(4), 624-633.
- Li, Q., Luan, G., Guo, Q., Liang, J. (2002). A new class of homogeneous nucleic acid probes based on specific displacement hybridization. *Nucleic acids research*, 30(2), e5-e5.
- Li, W. H., Sadler, L. A. (1991). Low nucleotide diversity in man. *Genetics*, 129(2), 513-523.
- Li, Z., Bai, X., Ruparel, H., Kim, S., Turro, N. J., Ju, J. (2003). A photocleavable fluorescent nucleotide for DNA sequencing and analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(2), 414-419.
- Lie, Y. S., Petropoulos, C. J. (1998). Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Current opinion in biotechnology*, 9(1), 43-48.
- Liu, S., Sun, L., Li, Y., Sun, F., Jiang, Y., Zhang, Y., ...Liu, Z. (2014). Development of the catfish 250K SNP array for genome-wide association studies. *BMC research notes*, 7, 1-12.
- Louro, B., De Moro, G., Garcia, C., Cox, C. J., Veríssimo, A., Sabatino, S. J., ...Canario, A. V. (2019). A haplotype-resolved draft genome of the European sardine (*Sardina pilchardus*). *GigaScience*, 8(5), giz059.
- MacKenzie, K., Campbell, N., Mattiucci, S., Ramos, P., Pinto, A. L., Abaunza, P. (2008). Parasites as biological tags for stock identification of Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus* L. *Fisheries Research*, 89(2), 136-145.
- Maheswaran, M. (2004). Molecular markers: history, features and applications. *Advanced Biotech*, 51, 373-378.
- Marchesi, J. R., Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3, 1-3.

- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., ...Rothberg, J. M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437(7057), 376-380.
- Mastrochirico-Filho, V.A., Hata, M.E., Sato, L.S., Jorge, P.H., Foresti, F., Rodriguez, M.V., Martínez, P., Porto-Foresti, F., Hashimoto, D.T. (2016). SNP discovery from liver transcriptome in the fish *Piaractus mesopotamicus*. *Conserv. Genet. Resour.* 8, 109–114.
- McKinney, G. J., Barry, P. D., Pascal, C., Seeb, J. E., Seeb, L. W., McPhee, M. V. (2022). A New Genotyping-in-Thousands-by-Sequencing Single Nucleotide Polymorphism Panel for Mixed-Stock Analysis of Chum Salmon from Coastal Western Alaska. *North American Journal of Fisheries Management*, 42(5), 1134-1143.
- Melamede, R. J. (1989). *Automatable process for sequencing nucleotide*. U.S. Patent 4863849.
- Melnikova, E. B., Kuz'minova, N. S. (2018). The connection of the intensity of the plankton community luminescence and the age distribution of horse mackerel in the coastal waters of the south-western Crimea. *Ecologica Montenegrina*, 19, 53-60.
- Mensaert, K., Denil, S., Trooskens, G., Van Crielinge, W., Thas, O., De Meyer, T. (2014). Next-generation technologies and data analytical approaches for epigenomics. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 55(3), 155-170.
- Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*, 11(1), 31-46.
- Meyer, E., Davies, S., Wang, S., Willis, B. L., Abrego, D., Juenger, T. E., Matz, M. V. (2009). Genetic variation in responses to a settlement cue and elevated temperature in the reef-building coral *Acropora millepora*. *Marine Ecology Progress Series*, 392, 81-92.
- Moen, T., Hayes, B., Baranski, M., Berg, P. R., Kjøglum, S., Koop, B. F., ...Lien, S. (2008). A linkage map of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) based on EST-derived SNP markers. *BMC genomics*, 9, 1-14.
- Mollah, M.B.R., Khan, M.G.Q., Islam, M.S., Alam, M.S. (2019). First draft genome assembly and identification of SNPs from hilsa shad (*Tenualosa ilisha*) of the Bay of Bengal. *F1000 Research*, 8.
- Montes, I., (2014). Population genetics of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*, L.) in the Bay of Biscay. In: PhD Thesis. University of the Basque Country, pp. 157.
- Montes, I., Conklin, D., Albaina, A., Creer, S., Carvalho, G. R., Santos, M., Estonba, A. (2013). SNP discovery in European anchovy (*Engraulis encrasicolus*, L.)

- by high-throughput transcriptome and genome sequencing. *PLoS One*, 8(8), e70051.
- Moran, M. A., Satinsky, B., Gifford, S. M., Luo, H., Rivers, A., Chan, L. K., ...Hopkinson, B. M. (2013). Sizing up metatranscriptomics. *The ISME journal*, 7(2), 237-243.
- Mueller, A., Fischer, K., Suluku, R., Hoenen, T. (2019). Sequencing of mRNA from whole blood using nanopore sequencing. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (148), e59377.
- Mueller, U. G., Wolfenbarger, L. L. (1999). AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in ecologyevolution*, 14(10), 389-394.
- Muus, B.J.J.G. Nielsen, (1999). Sea fish. Scandinavian Fishing Year Book, Hedehusene, Denmark. 340 p.
- Mytilineou, C., Politou, C., Papaconstantinou, C., Kavadas, S., D onghia, G., Sion, L. (2005). Deep-water fish fauna in the Eastern Ionian Sea. *Belgian journal of zoology*, 135(2), 229.
- Narum, S. R., Buerkle, C. A., Davey, J. W., Miller, M. R., Hohenlohe, P. A. (2013). Genotyping-by-sequencing in ecological and conservation genomics. *Molecular ecology*, 22(11), 2841.
- Nazari, S., Pourkazmi, M. (2021). Isolation and characterization of SNP markirs of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) from transcriptomic sequences. *Molecular biology reports*, 48(1), 989-995.
- Nicolae, F., Bucur, M., Cotorcea, A. (2018). Port performance evaluation. Case study: Ports in the Black Sea basin. In IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science* (Vol. 172, No. 1, p. 012004). IOP Publishing.
- Nielsen, E. E., Cariani, A., Aoidh, E. M., Maes, G. E., Milano, I., Ogden, R., ...Carvalho, G. R. (2012). Gene-associated markirs provide tools for tackling illegal fishing and false eco-certification. *Nature communications*, 3(1), 851.
- Norrgard, K., Schultz, J. (2008). Using SNP data to examine human phenotypic differences. *Nature Education*, 1(1), 85.
- Nyren, P., Skarpnack, S.E. (2001). Method of sequencing DNA based on the detection of the release of pyrophosphate and enzymatic nucleotide degradation.: U.S. Patent 6258568. <http://ip.com/patent/US6258568>.
- Okoniewski, M. J., Miller, C. J. (2006). Hybridization interactions between probesets in short oligo microarrays lead to spurious correlations. *BMC bioinformatics*, 7, 1-14.

- Plounevez, S., Champalbert, G. (2000). Diet, feeding behaviour and trophic activity of the anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) in the Gulf of Lions (Mediterranean Sea). *Oceanologica Acta*, 23(2), 175-192.
- Pourmand, N., Elahi, E., Davis, R. W., Ronaghi, M. (2002). Multiplex pyrosequencing. *Nucleic acids research*, 30(7), e31-e31.
- Pradeep Reddy, M., Sarla, N., Siddiq, E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128, 9-17.
- Pritchard, V. L., Campbell, N. R., Narum, S. R., Peacock, M. M., Garza, J. C. (2013). Discovery and characterization of novel genetic markers for use in the management of Lahontan cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii henshawi*). *Molecular Ecology Resources*, 13(2), 276-288.
- Pushkarev, D., Neff, N. F., Quake, S. R. (2009). Single-molecule sequencing of an individual human genome. *Nature biotechnology*, 27(9), 847-850.
- Qu, M., Jiang, Y., Li, N., Guo, Y., Zhu, W., Li, N., ...Wang, L. (2024). Development of Single-Nucleotide Polymorphism (SNP)-Based Species-Specific Real-Time PCR Assays for Authenticating Five Highly Priced Tuna. *Foods*, 13(22), 3692.
- Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., ...Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC genomics*, 13, 1-13.
- Radu, G., Maximov, V., Anton, E., Cristea, M., Țiganov, G., Țoțoiu, A., Spînu, A. D. (2013). State of the fishery resources in the Romanian marine area. *Cercetări Marine-Recherches Marines*, 43(1), 268-295.
- Rodriguez-Zarate, C. J., Carvalho, D. C., Hammer, M. P., Beheregaray, L. B. (2014). A set of microsatellite markers for the threatened Murray hardyhead, *Craterocephalus fluviatilis* (Pisces: Atherinidae) from the southern Murray–Darling Basin. *Conservation Genetics Resources*, 6, 473-475.
- Ronaghi, M. (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome research*, 11(1), 3-11.
- Saint-Pe, K., Leitwein, M., Tissot, L., Poulet, N., Guinand, B., Berrebi, P., Marselli, G., Lascaux, J.M., Gagnaire, P.A. (2019). Blanchet, S. Development of a large SNPs resource and a low-density SNP array for brown trout (*Salmo trutta*) population genetics. *BMC Genom.* 20, 582.
- Santamaria, M., Fosso, B., Consiglio, A., De Caro, G., Grillo, G., Licciulli, F., ...Pesole, G. (2012). Reference databases for taxonomic assignment in metagenomics. *Briefings in bioinformatics*, 13(6), 682-695.

- Santos, B. S., Romana-Eguia, M. R. R., Basiao, Z. U., Ikeda, M. (2015). Development and characterization of nine novel microsatellite markers for the milkfish *Chanos chanos*. *Conservation Genetics Resources*, 7, 451-453.
- Saraswathy, N., Ramalingam, P. (2011). *Concepts and techniques in genomics and proteomics*. Elsevier.
- Sarıman, M., Ekmekci, S. S., Abacı, N., Çakiris, A., Paçal, F., Emrence, Z., Öztürk, Ş. (2015). Yeni nesil sekanslama teknolojisi ile transkriptom analizi. *Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 5(10), 51-59.
- Schadt, E. E., Turner, S., Kasarskis, A. (2010). A window into third-generation sequencing. *Human molecular genetics*, 19(R2), R227-R240.
- Secci, G., Borgogno, M., Mancini, S., Paci, G., Parisi, G. (2017). Mechanical separation process for the value enhancement of Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*), a discard fish. *Innovative Food ScienceEmerging Technologies*, 39, 13-18.
- Segel, I. H., Renosto, F., Seubert, P. A. (1987). Sulfate-activating enzymes. In *Methods in enzymology* (Vol. 143, pp. 334-349). Academic Press.
- Shaklee, J. B., Beacham, T. D., Seeb, L., White, B. A. (1999). Managing fisheries using genetic data: case studies from four species of Pacific salmon. *Fisheries Research*, 43(1-3), 45-78.
- Shao, K., Ding, W., Wang, F., Li, H., Ma, D., Wang, H. (2011). Emulsion PCR: a high efficient way of PCR amplification of random DNA libraries in aptamer selection. *PloS one*, 6(9), e24910.
- Shendure J, Ji HL. Next-generation DNA sequencing. *l* 2008;26:1135–45.
- Shendure, J., Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*, 26(10), 1135-1145.
- Shi, R. (2018). Single nucleotide polymorphism (SNP) discriminations by nanopore sensing (Doctoral dissertation, University of Missouri--Columbia).
- Smedbol, R. K., Stephenson, R. (2001). The importance of managing within-species diversity in cod and herring fisheries of the north-western Atlantic. *Journal of Fish Biology*, 59, 109-128.
- Smith, C. T., Elfstrom, C. M., Seeb, L. W., Seeb, J. E. (2005). Use of sequence data from rainbow trout and Atlantic salmon for SNP detection in Pacific salmon. *Molecular Ecology*, 14(13), 4193-4203.
- Smith-Vaniz, W.F. (1986). Carangidae. In Whitehead, P.J.P., Bauchot, M.L., Hureau, J.C., Nielsen, J. and Tortonese, E. (eds) *Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean*. Volume 2. Paris: UNESCO, pp. 815–844.

- Staden, R. (1979). A strategy of DNA sequencing employing computer programs. *Nucleic acids research*, 6(7), 2601-2610.
- STECF, C. (2014). Scientific, technical and economic committee for fisheries (STECF): evaluation of fishing effort regimes in European waters. Part 1 (STECF-14-12).
- Steinbock, L.J., Radenovic, A. (2015). The emergence of nanopores in next-generation sequencing. *Nanotechnology*, 26(7), 074003.
- Stephenson, R. L., Rodman, K., Aldous, D. G., Lane, D. E. (1999). An in-season approach to management under uncertainty: the case of the SW Nova Scotia herring fishery. *ICES Journal of Marine Science*, 56(6), 1005-1013.
- Stranneheim, H., Lundeborg, J. (2012). Stepping stones in DNA sequencing. *Biotechnology journal*, 7(9), 1063-1073.
- Surget-Groba, Y., Montoya-Burgos, J. I. (2010). Optimization of *de novo* transcriptome assembly from next-generation sequencing data. *Genome research*, 20(10), 1432-1440.
- Suzuki, M. M., Bird, A. (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nature reviews genetics*, 9(6), 465-476.
- Sümer, Ç., Özdemir, S., Erdem, Y. (2010). Farklı Göz Açıklıklarında Monofilament ve Multifilament Galsama Ağlarının İstavrit Balığı (*Trachurus trachurus* L., 1758) İçin Seçiciliğinin Hesaplanması. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 27(3), 125-128.
- Szoboszlay, M., Schramm, L., Pinzauti, D., Scerri, J., Sandionigi, A., Biazzo, M. (2023). Nanopore is preferable over Illumina for 16S amplicon sequencing of the gut microbiota when species-level taxonomic classification, accurate estimation of richness, or focus on rare taxa is required. *Microorganisms*, 11(3), 804.
- Taylor, M. I., Fox, C., Rico, I., Rico, C. (2002). Species-specific TaqMan probes for simultaneous identification of (*Gadus morhua* L.), haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.) and whiting (*Merlangius merlangus* L.). *Molecular Ecology Notes*, 2(4), 599-601.
- Tetreault, M., Bareke, E., Nadaf, J., Alirezaie, N., Majewski, J. (2015). Whole-exome sequencing as a diagnostic tool: current challenges and future opportunities. *Expert review of molecular diagnostics*, 15(6), 749-760.
- Thelwell, N., Millington, S., Solinas, A., Booth, J., Brown, T. (2000). Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic acids research*, 28(19), 3752-3761.

- Thompson, J. F., Steinmann, K. E. (2010). Single molecule sequencing with a HeliScope genetic analysis system. *Current protocols in molecular biology*, 92(1), 7-10.
- Tong, A. K., Li, Z., Jones, G. S., Russo, J. J., Ju, J. (2001). Combinatorial fluorescence energy transfer tags for multiplex biological assays. *Nature biotechnology*, 19(8), 756-759.
- Tsuchihashi, Z., Dracopoli, N. C. (2002). Progress in high throughput SNP genotyping methods. *The pharmacogenomics journal*, 2(2), 103-110.
- Turan, C., 2021. Data-limited stock assessment of two horse mackerel species (*Trachurus mediterraneus* and *T. trachurus*) from the Mediterranean coast of Turkey. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 44, 101732.
- Tyson, G. W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E. E., Ram, R. J., Richardson, P. M., ...Banfield, J. F. (2004). Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 428(6978), 37-43.
- Ulman, A., Bekisoglu, S., Zengin, M. A., Knudsen, S., Unal, V., Mathews, C., ...Pauly, D. (2013). From bonito to anchovy: a reconstruction of Turkey's marine fisheries catches (1950-2010). *Mediterranean Marine Science*, 309-342.
- Van Tassell, C. P., Smith, T. P., Matukumalli, L. K., Taylor, J. F., Schnabel, R. D., Lawley, C. T., ...Sonstegard, T. S. (2008). SNP discovery and allele frequency estimation by deep sequencing of reduced representation libraries. *Nature methods*, 5(3), 247-252.
- Vera, M., Alvarez-Dios, J.A., Fernandez, C., Bouza, C., Vilas, R., Martinez, P. (2013). Development and validation of single nucleotide polymorphisms (SNPs) markers from two transcriptome 454-runs of turbot (*Scophthalmus maximus*) using high-throughput genotyping. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 5694-5711.
- Wang, Y., Tian, K., Shi, R., Gu, A., Pennella, M., Alberts, L., ...Gu, L. Q. (2017). Nanolock–nanopore facilitated digital diagnostics of cancer driver mutation in tumor tissue. *ACS sensors*, 2(7), 975-981.
- Wenne, R. (2023). Single Nucleotide Polymorphism Markers with Applications in Conservation and Exploitation of Aquatic Natural Populations. *Animals*, 13(6), 1089.
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., Rasmussen, R. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 22(1), 130-138.

- Wittwer, C. T., Ririe, K. M., Andrew, R. V., David, D. A., Gundry, R. A., Balis, U. J. (1997). The LightCycler™: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques*, 22(1), 176-181.
- Xiao, S., Han, Z., Wang, P., Han, F., Liu, Y., Li, J., Wang, Z. Y. (2015). Functional marker detection and analysis on a comprehensive transcriptome of large yellow croaker by next generation sequencing. *PloS one*, 10(4), e0124432.
- Xu, J., Zhao, Z., Zhang, X., Zheng, X., Li, J., Jiang, Y., ...Sun, X. (2014). Development and evaluation of the first high-throughput SNP array for common carp (*Cyprinus carpio*). *BMC genomics*, 15, 1-10.
- Yáñez López, J., Yoshida, G., Barriá, A., Palma Véjares, R., Travisany, D., Díaz Madrid, D., ...Maass Sepúlveda, A. (2020). High-throughput single nucleotide polymorphism (SNP) discovery and validation through whole-genome resequencing in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*).
- Yang, Y., Wu, L., Wu, X., Li, B., Huang, W., Weng, Z., ...Xia, J. (2020). Identification of candidate growth-related SNPs and genes using GWAS in brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Marine Biotechnology*, 22, 153-166.
- Yankova, M. H., Raykov, V. S., Frateva, P. B. (2008). Diet composition of horse mackerel, *Trachurus mediterraneus ponticus* Aleev, 1956 (Osteichthyes: Carangidae) in the Bulgarian Black Sea waters. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8(2).
- Yankova, M. H., Raykov, V. S., Gerdzhikov, D. B., Frateva, P. B. (2010). Growth and length-weight relationships of the horse mackerel, *Trachurus mediterraneus ponticus* (Aleev, 1956), off the Bulgarian Black Sea coast. *Turkish Journal of Zoology*, 34(1), 85-92.
- Yankova, M., Paykov, D., Raykov, V. (2009). Population dynamics of horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*), as a valuable economic species for the Bulgarian Black Sea coast. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI-Food Technology*, 33(1), 70-79.
- Yu, A., Shi, Y., Yan, Y. (2020). Development and characterization of 50 SNP markers in *Coilia ectenes*. *Conservation genetics resources*, 12(2), 177-181.
- Yu, J. N., Kim, B. J., Yun, Y. E., Kim, H. S., Bae, C. H., Kim, S., Lim, C. E. (2014). Characterization of 11 novel polymorphic microsatellite loci in the threatened Korean loach, *Iksookimia koreensis*, isolated using a next-generation sequencing method. *Biochemical Systematics and Ecology*, 56, 132-137.
- Zhang, Y., Zhang, D., Li, W., Chen, J., Peng, Y., Cao, W. (2003). A novel real-time quantitative PCR method using attached universal template probe. *Nucleic acids research*, 31(20), e123-e123.