



EGE ÜNİVERSİTESİ

DOKTORA TEZİ

**MERCİMEK GENOMUNDA REKOMBİNANT
KENDİLENMİŞ HATLARI KULLANARAK AFLP VE
SNP MARKIRLARININ HARİTALANMASI**

Deniz GÖL

Tez Danışmanı: Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ

**Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Sunuş Tarihi: 11.12.2015**

Bornova-İZMİR

2015

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**MERCİMEK GENOMUNDA REKOMBİNANT
KENDİLENMİŞ HATLARI KULLANARAK AFLP VE
SNP MARKIRLARININ HARİTALANMASI**

Deniz GÖL

Tez Danışmanı: Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 11.12.2015

Bornova-İZMİR

2015

Deniz GÖL tarafından doktora tezi olarak sunulan “Mercimek Genomunda Rekombinant Kendilenmiş Hatları Kullanarak AFLP ve SNP Markırlarının Haritalanması” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 11.12.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ	
Raportör Üye	: Prof. Dr. Aynur GÜREL	
Üye	: Prof. Dr. Muzaffer TOSUN	
Üye	: Doç. Dr. Levent ŞIK	
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Ozan KARAMAN	

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Mercimek Genomunda Rekombinant Kendilenmiş Hatları Kullanarak AFLP ve SNP Markırlarının Haritalanması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

11 / 12 / 2015

İmzası

Deniz GÖL

ÖZET**MERCİMEK GENOMUNDA REKOMBİNAT
KENDİLENMİŞ HATLARI
KULLANARAK AFLP VE SNP MARKIRLARININ
HARİTALANMASI**

GÖL, Deniz

Doktora Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ

Aralık 2015, 58 sayfa

Precoz X WA8649041 çaprazlanmasıyla elde edilen mercimek RIL haritalama popülasyonunun 101 bireyi SNP ve AFLP markörler kullanılarak genotiplendirilmiştir. Çalışma sonucunda SNP ve AFLP markörlerinden oluşan, RIL mercimek popülasyonuna ait yüksek çözünürlüklü genetik bağlantı haritasının oluşturulması hedeflenmiştir. RIL popülasyonu ve ebeveynlerinde (Precoz ve WA8649041) Illumina platform sekanslama ile GBS protokolü uygulanarak SNP keşfi yapılmıştır. Sekanslama sonucunda elde edilen 7758 SNP markörden 6688 SNP markörün skorlaması yapılmış ve bu tez çalışmasında bu SNP'lerin ilk 400 tanesi haritalamada kullanılmıştır. Çalışmada 6 adet AFLP kombinasyonundan toplam 194 polimorfik bant elde edilmiş ve haritalamada kullanılmıştır. Precoz X WA8649041 popülasyon genomu Joinmap 4.0 programı kullanılarak haritalanmış ve toplam 413 cM uzunluğunda harita elde edilmiştir. Çalışmada uzunlukları 16,9 cM ile 73,8 cM arasında değişen 9 farklı bağlantı grubu elde edilmiştir. Bağlantı gruplarının ortalama uzunluğu 45,9 cM ve bağlantı grubu başına düşen ortalama markör sayısı 37 olarak tespit edilmiştir. Harita üzerinde ortalama markör yoğunluğu her 0.9 cM'da 1 markör olarak saptanmıştır. Skorlanan markörlerden 321 SNP (%77) ve 162 AFLP (%9) markörü bağlantı grupları üzerinde yer almıştır. Bağlantı grubundaki maksimum markör sayısı 77 (LG3), minimum sayı ise 10'dur (LG9).

RIL popülasyonu ve ebeveynlerinde SNP ve AFLP markörler kullanılarak oluşturulan genetik bağlantı haritası büyük genoma (~4 Gbp) sahip mercimeğin haritalanması çalışmalarına önemli katkı sağlamıştır. Çalışma sonucunda elde edilen bu harita, mercimek ıslahında marköre dayalı ıslah (MAS) analizlerinde kullanılabilir.

Anahtar sözcükler: Precoz X WA8649041, SNP, AFLP, bağlantı haritası, GBS

ABSTRACT**MAPPING AFLP AND SNP MARKERS IN LENTIL GENOME
BY USING RECOMBINANT INBRED LINES**

GÖL, Deniz

PhD Thesis, Department of Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ

December 2015, 58 pages

One hundred one individuals from RIL mapping population derived from a cross between Precoz X WA8649041 were genotyped by using SNP and AFLP markers. This study aimed to develop high-density genetic linkage map of lentil RIL population composed of SNP and AFLP markers. SNP markers were determined by using Illumina sequencing platform-GBS protocol in RIL population and its parents. As a result of sequencing, 6688 SNP out of 7758 SNP markers were scored and in this thesis study first 400 SNPs were used to make linkage map. In this study, a total of 194 polymorphic band were obtained from 6 AFLP primer combinations and used in mapping. Precoz X WA8649041 population genome was mapped by using Joinmap 4.0 software and covered 413 cM. In this study, 9 different linkage group of which sizes were ranging from 73.8 cM to 16.9 cM were obtained. The mean length of linkage groups were determined as 45.9 and 37 markers were obtained per linkage group. An average marker density of 1 marker per 0.9 cM were provided. Among the scored markers, 321 SNP (77%) and 162 AFLP (9%) markers were able to be mapped on linkage groups. The maximum number of markers in one linkage group was 77 (LG3), the minimum was just 10 (LG9).

This map made by using SNP and AFLP markers in RIL populations and its parents can be a reference linkage map for lentil mapping studies which has large genome size (~4 Gbp). The linkage map obtained as a result of this study can be used for marker assisted selection (MAS) analysis in lentil breeding studies.

Keywords: Precoz X WA8649041, SNP, AFLP, linkage map, GBS

TEŞEKKÜR

Doktora sürecinin her aşamasında bilgi, deneyim, fikirleri ve vizyonu ile katkılarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ’a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez savunma jürisinde yer alan hocalarım Sayın Prof. Dr. Aynur GÜREL ve Sayın Prof. Dr. Muzaffer TOSUN’a destekleri için, teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez savunma jürisinde yer alan hocalarım Sayın Doç. Dr. Levent ŞIK ve Yrd. Doç. Dr. Ozan KARAMAN’a destekleri için, teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Doktora tez çalışması TÜBİTAK tarafından desteklenen Mercimek Genomunun Nucleotide Binding Site (NBS) Profiling ve Single Nucleotide Polymorphism (SNP, Tek nükleotit polimorfizmi) Markörleri ile Haritalanması başlıklı 110O361 numaralı proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamı gerçekleştirdiğim Biyomühendislik Bölümü Bitki Moleküler Genetiği Laboratuvarındaki arkadaşlarım Öğr. Gör. Hülya YILMAZ TEMEL, Betül KAYA, Yrd. Doç. Dr. Seda NEMLİ ve Duygu ATEŞ’e tüm destekleri için teşekkür ederim. Biyomühendislik Bölümü personeli, Dr. Yüksel GEZGİN’e doktora çalışmam sürecinde desteği için teşekkür ederim.

Yaşamımın her anında sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2.1 Baklagiller.....	3
2.2 Mercimek.....	4
2.2.1 Orijini ve dağılımı.....	4
2.2.2 Taksonomi	5
2.2.3 Kimyasal yapısı, besin içeriği ve sağlığa faydaları	5
2.2.4 Dünyada mercimek üretimi ve tüketimi	6
2.2.5 Mercimek üretiminde kısıtlamalar.....	8
2.2.6 Bitki ıslahında moleküler markör teknikleri.....	9
2.2.7 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markörleri	11

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.2.8 Yeni nesil sekanslama teknolojileri (Next-Generation Sequencing-NGS) ile SNP markör keşfi ve genotiplemesi	16
2.2.9 AFLP (Amplified Fragment Polymorfizm) markörleri	22
3. MATERYAL VE METOD	24
3.1 Bitki Materyali	24
3.2 DNA İzolasyonu	24
3.3 DNA Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi	25
3.4 DArT-Seq Analizi ile Genotipleme	25
3.5 SNP Markör Analiz Sonuçlarının Skorlanması	26
3.6 AFLP Markör Analizi	26
3.6.1 Genomik DNA'nın restriksiyon enzimlerle kesilmesi	26
3.6.2 Adaptörlerin ligasyonu.....	27
3.6.3 Pre- amplifikasyon	27
3.6.4 Selektif amplifikasyon	28
3.6.5 Poliakrilamid jel elektroforezi	30
3.6.6 AFLP markör analiz sonuçlarının skorlanması.....	30
3.7 Bağlantı (Linkage) Haritasının Oluşturulması	31

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4. BULGULAR.....	32
4.1 SNP Markör Analizi	32
4.2 AFLP Markör Analizi Sonuçları	32
4.3 Bağlantı Haritasının Oluşturulması	36
5. TARTIŞMA.....	41
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	47
ÖZGEÇMİŞ	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. M-CTT/E-AAG (700) primer kombinasyonu, ebeveyn ve 1-46 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü. W; WA8649041, P; Precoz, M; Markör.	33
4.2. M-CTT/E-ACC (700) primer kombinasyonu, ebeveyn ve 1-46 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü.	34
4.3. M-CTT/E-ACC (800) primer kombinasyonu, ebeveyn ve 1-46 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü	35
4.4. WA8649041 x Precoz ebeveynlerinin melezlenmesi sonucu oluşturulan RIL haritalama popülasyonundan elde edilen genetik haritanın içerdiği bağlantı grupları (1-9).	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Toplam kuru mercimek tohumunun yaklaşık bileşimi (100g kuru madde için) (Grusak 2009).	6
2.2. Mercimek üretimi yapılan ilk 10 ülkenin 2007-2008 yıllarındaki ortalama üretim (1,000 ton), hasat edilen alan (1,000 ha) ve ortalama ürün (kg/ha) miktarları ve 2007-2008 yıllarındaki mercimek ürün miktarının 15 yıl önceye (1992/93) göre yüzde değişimleri (FAO 2010). (Erskine et al., 2011).	7
2.3. Mercimek tüketiminin en fazla olduğu 12 ülkedeki tüketim miktarı (kg/cap/yr) (Erskine et al., 2011).	7
2.4. Yeni-nesil sekanslama teknolojilerinin karşılaştırılması	20
2.5. NGS datası için oluşturulan non-exhaustive SNP çağırma software listesi ...	22
3.1. Genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri kesilmesi için kullanılan reaksiyon miski	27
3.2. Adaptör ligasyonu için kullanılan reaksiyon miski	27
3.3. pre-amplifikasyon için kullanılan reaksiyon miski.....	28
3.4. Taq DNA polimeraz karışımı	28
3.5. Selektif amplifikasyon PCR miksi (1X Kokteyl için)	29
3.6. AFLP primer kombinasyonları	29
3.7. Selektif amplifikasyonu için PCR reaksiyon basamakları, süresi ve sıcaklıkları	30
4.1. WA8649041 x Precoz'dan oluşturulan RIL popülasyonu bağlantı haritası istatistiksel verileri	37

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
$\leftrightarrow$	dönüşebilir
$\sim$	yaklaşık
$^{\circ}\text{C}$	santigrat
$\geq$	büyük eşit
%	yüzde

Kısaltmalar

bp	base pair
Ca	kalsiyum
cap	capita
cM	centiMorgan
dk	dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EtBr	Etidyum bromid
EDTA	EtilenEdiamineTetraAsetik asit
FAO	Food and Agriculture Organization
Fe	demir
g	gram
GbP	giga base pair
ha	hektar
K	potasyum
kb	kilobase
kg	kilogram
kj	kilojoule

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
mA	Miliamper
Mbp	mega base pair
mm	milimetre
ml	mililitre
M.Ö	milattan önce
µl	mikrolitre
mM	miliMolar
ND	Nanodrop
ng	nanogram
nm	nonometre
OD	Optical Density
P	fosfor
pmol	pikomol
sn	saniye
UV	Ultraviyole
V	Volt
yr	year
Zn	çinko

1. GİRİŞ

Mercimek (*Lens culinaris* Medik.) dünya genelinde yarı kurak alanlarda yetiştirilen önemli yemeklik baklagil türlerinden birisidir. Yüksek düzeyde protein, mineral ve vitamin içeriğine sahip olan mercimek, dünyada milyonlarca insanın gıda ve besin ihtiyacını karşılamaktadır. Yetmişin üzerinde ülkede üretimi yapılan mercimek, yüz yirminin üzerinde ülkede tüketilmektedir. Asya kıtası en fazla mercimek üretiminin olduğu ilk 10 ülkenin 7'sini kapsamaktadır. Türkiye, Hindistan ve Kanada'dan sonra mercimek üretiminde üçüncü sırada yer almaktadır. Türkiye mercimek tüketiminde ise en fazla tüketim yapan ilk on iki ülke arasındadır (Erskine et al., 2011).

Mercimek, 14 kromozomlu ($2n = 2 \times = 14$) tek yıllık diploid bir bitkidir ve genom büyüklüğü yaklaşık 4063 Mbp'dir (Arumuganathan ve Earle, 1991). Tohumunun yüksek protein içeriği (yaklaşık %25), yüksek lif içeriği (%87) ve düşük yağ içeriği nedeniyle mercimek insan beslenmesinde oldukça önemlidir (Bosmali et al., 2012). Ayrıca mercimek tohumu mineral ve vitamin içermesi sebebiyle de iyi bir besin kaynağıdır (Erskine et al., 2011). Günümüzde sağlığına dikkat eden insanlar beslenmelerinde bitkisel proteinleri, hayvansal proteinlere göre daha fazla tercih etmektedir. Bu da FOASTAT 2014 verilerine göre son 50 yıllık süreçte mercimek üretiminin beş katlık bir artış göstermesinin sebeplerinden birisidir (Kumar et al., 2015).

Moleküler markörler, Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) düzeyinde polimorfizm tespitine olanak sağlayan, genom analizleri için işaret olan, genlere çok yakın bölgelerde lokalize olan, istenilen karakterlerin fenotipini etkilemeyen ve çevresel faktörlerden etkilenmeyen moleküler ıslah çalışmaları için vazgeçilmez araçlardır. Çoğaltılan parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP) tekniği, kesilen parça uzunluğu polimorfizmi (RFLP) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'ın birleştirilmesi sonucu oluşturulmuştur. Toplam genomik DNA'nın seçilen enzim kombinasyonları ile kesilmesi ve oluşan DNA fragmentlerinin PCR ile amplifiye edilmesi prensibine dayanmaktadır. AFLP markörlerin güvenilirliği, tekrarlanabilirliği yüksektir ve oldukça çok sayıda polimorfik bant tespitine olanak sağlamaktadır.

Tek Nükleotid Polimorfizm markörler (Single Nucleotide Polymorfizm-SNP) ökaryotik genomda sık rastlanan, bir DNA dizisindeki yalnızca tek bir nükleotid farklılığından kaynaklanan genetik varyasyonlardır (Vignal et al.,

2002). Bi-allelilik ve ko-dominant yapıdaki SNP markörler otomasyona uygun olmaları, düşük mutasyon oranına sahip olmaları (Duran et al., 2009), yüksek çözünürlüklü genetik harita eldesi imkanı gibi başlıca avantajlarından dolayı son yıllarda bitki ıslah çalışmalarında tercih edilen markör sistemleridirler (Pegadaraju et al., 2013). Bitki ıslah ve genomik çalışmalarda Yeni Nesil Sekanslama (Next-Generation Sequencing-NGS) teknolojileri kullanılarak sekanslama tabanlı genotipleme analizlerinde yeni yaklaşımlar geliştirilmektedir. Sekanslama ile Genotipleme (Genotyping-by Sequencing-GBS) bu yaklaşımlardan birisidir ve bitki genetik çalışmalarında onbinlerce markör ile tür, popülasyon ve araştırma hedefi sınırlaması olmadan araştırmacılara esnek çalışma imkanı sunmaktadır (Kumar et al., 2012). NGS tabanlı platformlardan birisi olan GBS ile SNP keşfi ve genotiplemesi sekanslama esnasında simultane olarak yapılabilmektedir (Chen, et al., 2013).

Bu çalışmada mercimek RIL popülasyonu (Recombinant Inbred Hat) ve ebeveynlerinde (Precoz ve WA8649041) Illumina platform sekanslama ile GBS protokolü uygulanarak SNP keşfi hedeflenmiştir. Ayrıca genotiplemesi yapılan SNP markörler ve AFLP markörler kullanılarak genetik bağlantı haritası oluşturulması amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1 Baklagiller

Baklagiller (Fabaceae), Angiospermilerin 700'den fazla cins ve 18,000'den fazla türe sahip olan önemli bir ailesidir (Hofer and Ellis, 2014). Yüksek bitkiler içerisinde üçüncü büyük aile olan baklagiller, tarımsal öneme sahip pek çok önemli bitki türünü içermektedir. Baklagiller minik yabani ottan dev tropikal ağaçlara kadar oldukça büyük bir bitki çeşitliliğine sahiptir. Kendi içerisinde Papilionoideae, Caesalpinioideae ve Mimosoideae olmak üzere 3 alt aileye ayrılır (Lewis et al., 2013). Kültürü yapılmış ve ekonomik öneme sahip olan baklagillerin çoğu Papilionoideae alt ailesinde yer almaktadır (Young et al., 2003).

Yüksek kalitede protein içeriğine sahip olmaları baklagillerin en önemli özelliğidir. Papilionoideae alt ailesinde yer alan mercimek, soya fasulyesi, nohut, fasulye, bezelye ve yer fıstığı beslenmede önemli yeri olan baklagiller arasındadır. Baklagiller dünya popülasyonunun büyük bir kısmının temel protein kaynağı olması, ek olarak soya fasulyesi ve yer fıstığının yenilebilir yağ kaynağı olması dolayısıyla oldukça büyük ekonomik öneme sahiptir. Godfray et al. (2010)'da yaptıkları çalışmada, yaklaşık bir milyarın üzerinde insanda protein ve mikrobesein yetersizliği tespit edildiğini raporlamışlardır. Dolayısıyla temel, birincil ve ekonomik, protein-mineral kaynağı olmaları ile baklagiller beslenmede protein-kalori yetersizliği ve mikrobesein (mineral, vitamin, vb.) eksikliğini azaltmada önemli role sahiptirler. Baklagiller ayrıca önemli ikincil metabolit (örneğin; izoflavanoidler) kaynağıdır (Bohra et al., 2014).

Son yıllarda bitki orijinli çeşitli protein bileşenlerinin, insan metabolizmasında sağlıkla ilgili biyolojik aktiviteler ve düzenleyici fonksiyonlar ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda raporlanmıştır. Baklagillerin insanlarda özellikle kemik ve kardiovasküler sağlık, kanserden korunma, kilo kontrolü, insülin hassasiyeti, mineral absorpsiyonu ve inflamasyon gibi sağlık üzerinde faydalı etkileri vardır. Baklagillerin içeriğindeki pek çok protein ve peptid pazarlama sektöründe “nutrasötik” (fonksiyonel bileşen) kategorisinde yer almaktadır. Henüz bilimsel literatürde yer almayan nutrasötik kelimesi sağlık üzerine faydası olan ve hastalıklar üzerinde koruyucu etkisi olan gıdalar için kullanılmaktadır. Baklagil tüketen popülasyonlarda prostat, kolon ve göğüs kanseri görülme olasılığının azaldığı rapor edilmiştir (Carbonaro et al., 2014).

Birk, (1993)'te yaptığı çalışmada, proteaz inhibitörlerinin (soyada Bowman–Birk inhibitörü (BBI)), *in vitro-in vivo* çalışmalarda kanser gelişimini baskıladığını göstermiştir. Ardından 2007, 2010 ve 2014 yıllarında yapılan klinik ve epidemolojik çalışmada (*in vitro* ve *in vivo*), baklagillerdeki pek çok protein ve peptid bileşeninin, antikanserojenik, hipokolesteremik, şeker ve kan basıncı azaltma, antioksidant ve antimikrobiyal etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Carbonaro et al., 2014).

Fabaceae (baklagiller) ailesine ait bitkiler yine yüksek protein içerikleri sebebiyle hayvan beslenmesi için de tercih edilmektedirler. Baklagillerin bir diğer önemli özelliği ise önemli yem bitkileri olmaları ve global azot döngüsünde baş rolü oynamasıdır. Çok büyük miktarda biyolojik azotu, *Rhizobium* bakteri ailesi ile simbiyotik ilişkileri sonucunda birlikte fikse ederler. Bundan dolayı baklagiller temel organik gübre kaynağıdır ve ayrıca çoğu tarımsal rotasyon için gerekli bileşendirler (Young et al., 2003).

2.2 Mercimek

2.2.1 Orijini ve dağılımı

Mercimek (*Lens culinaris* Medik.) dünyada özellikle Asya'da milyonlarca insanın beslenmesinde önemli yeri olan baklagillerden birisidir. İlk kültüre edilen bitkiler arasında yer alan mercimeğin, yakın doğu bölgesinde *Lens culinaris* Medik. ssp. *orientalis* (Boiss.) Ponert'den orijinlendiği yaygın olarak kabul edilmektedir. Arkeolojik karbonize kalıntılara dayanarak, kültür mercimeğinin progenitorü olan *L. culinaris* ssp. *orientalis*'in erken neolitik dönemde 7000-6000 M.Ö kadar eskide bulunduğu belirlenmiştir (Erskine and Sarker, 2004). Mercimek yaklaşık 10,000 yıl öncesi Yakın Doğu'da ilk kültürü yapılan bitkiler arasındadır ve tarımsal devrimin başlangıcı ile ilişkilendirilmektedir (Erskine et al., 2011). Mercimek üretimi daha sonra Nil Vadisi, Avrupa ve Merkez Asya'da hızlı bir şekilde yayılmıştır. Ardından Hindistan, Güney Amerika, Şili ve son olarak Meksika, Kanada, Yeni Zelanda, Amerika ve Avusturalya'da yetiştirilmeye başlanmıştır. Kuzey Amerika bölgesine adaptasyon çalışmaları 1970'lerin sonlarında başlayan mercimek, günümüzde Kanada ve Amerika'da yetiştirilen önemli bitkiler arasında yer almıştır (Erskine and Sarker, 2004).

2.2.2 Taksonomi

Familya	: Fabaceae
Genus	: Lens
Species	: <i>Lens culinaris</i> Medik.

Mercimek kendine döllenen diploid ($2n = 2x = 14$) tek yıllık bir bitkidir. Kültüre edilmiş mercimeğin haploid genom büyüklüğü 4063 Mbp'dir. *Lens* cinsi kültür türü *Lens culinaris* spp. *culinaris* 4 tür ile birlikte 7 taxayı içerir ve *Lens orientalis* mercimeğin yabani atası olarak kabul edilmektedir (Ferguson and Erskine, 2001). Barulina, (1930)'da kültür mercimeği (*L. culinaris*) tohum büyüklüğüne göre *macrosperma* (tohum çapı, 6-9 mm) ve *microsperma* (tohum çapı, 2-6 mm) olmak üzere iki gruba ayırmıştır. Gruplar arasında kotiledon, çiçek ve diğer bitki kısımlarının rengi gibi morfolojik farklılıklar vardır. *Microsperma* kuru iklime daha iyi adaptasyon göstermektedir. Diğer yandan *macrosperma*'nın soğuğa karşı toleransı daha yüksektir (Erksine, 1996). *Microsperma*'nın ayrıca plazmada kolesterol düzeyini düşürme ve antikanser aktivite sergileme düzeyi daha yüksektir (Bermejo, et al., 2010).

Mercimek bitkisi çevre koşullarına göre farklılık göstermekle birlikte, genellikle 20-75 cm aralığında kısa boylu bir bitkidir. İlk çiçeklenme yaklaşık olarak onbirinci ve ondördüncü boğum oluşumu aralığında (node stage) gözlenmektedir. Mercimek tohum kabuk rengi yeşil, kahverengi, gri, pembe lekeli ya da siyah lekeli renkte olabilmektedir. Kotiledon rengi ise sarı, turuncu ya da yeşildir. Morfolojik ve fizyolojik avantajlara sahip olan köklerinden dolayı, mercimek bitkisi topraktaki besin ve suyu yüksek oranda alabilmektedir. Dolayısıyla besin içeriği düşük ve kurak bölge topraklarında gübrelemeye gerek olmadan ya da çok az gübre kullanarak iyi verim alınabilmektedir.

2.2.3 Kimyasal yapısı, besin içeriği ve sağlığa faydaları

Mercimek yüksek protein, mineral ve vitamin içeriği ile pek çok ülkede en önemli besin öğelerinden birisidir. Mercimek tanesinin protein içeriğinin %15,9 ile %31,4 arasında değiştiği, ortalama protein içeriğinin ise %28,3 olduğu 17'nin üzerinde referans çalışma incelenerek raporlanmıştır (Erskine et al., 2011). Mercimek tohumu aynı zamanda Ca, K, P, Fe ve Zn gibi yüksek miktarda besin elementlerini içermektedir. Ek olarak mercimek tohumunun içeriğinde, niasin, vitamin A, askorbik asit ve inositol gibi vitaminler bulunmaktadır. Mercimeğin lif

içeriği de oldukça yüksektir ve beslenmede lifli gıdaların çokluğu özellikle obezite ile mücadelede önemlidir. Mercimek tohumunun bir diğer önemli özelliği glisemik indeksi düşük karbonhidrat içermesidir. Tahıl proteinlerinin içeriğinde bulunma oranı düşük olan lizin amino asit oranı mercimekte yüksektir. Çizelge 2.1’de mercimek tohumunun yapısal içeriği ortalama değerleri ile birlikte 100g kuru madde baz alınarak listelenmiştir.

Çizelge 2.1. Toplam kuru mercimek tohumunun yaklaşık bileşimi (100g kuru madde için) (Grusak 2009).

İçerik	Aralık	Ortalama
Enerji (kj)	1,418-2,010	1,638
Protein (g)	15,9-31,4	28,3
Karbonhidrat (g)	43,4-74,9	67,1
Yağ (g)	0,3-3,5	2,5
Toplam Lif (g)	5,1-26,6	12,2
Kül (g)	2,2-6,4	2,2

2.2.4 Dünyada mercimek üretimi ve tüketimi

Mercimek, dünyada yaygın olarak kurak-yarı kurak bölgelerde yetiştirilen en önemli soğuk iklim baklagillerinden birisidir. Diğer baklagillere kıyasla mercimeğin iklim koşulları ve toprak yapısı seçiciliği daha azdır. Yükseklik arttıkça verimde azalma gözlenmektedir. Mercimek geniş toprak çeşitliliğinde yetişebilen bir bitki olmakla birlikte, kumlu topraklarda en fazla verim alınmaktadır. Genellikle sonbaharda ekimi yapılır ve yazın hasat edilir (Çokkızgın and Shtaya, 2013).

Dünyada önde gelen mercimek üretiminin yapıldığı ülkeler Hindistan, Avusturalya, Kanada ve Türkiye’dir. Bu ülkelerin toplam mercimek üretimi, dünyadaki mercimeğin %73’ten fazlasını karşılamaktadır (Bohra, et al., 2014). Dünyanın toplam mercimek üretimini karşılayan 20 ülke arasında ayrıca Amerika, Bangladeş, Çin, İran, Nepal ve Suriye bulunmaktadır (Yılmaztemel et al., 2014). Çizelge 2.2’de mercimek üretiminin yapıldığı ilk 10 ülke, ürün miktarı, üretimin yapıldığı alan büyüklüğü ve bu değerlerin dünya çapındaki yüzde miktarları ile birlikte listelenmiştir. Listede ayrıca 15 yıllık süreçte bu değerlerde gözlenen % değişimler de yer almaktadır. Listeden görüldüğü üzere mercimek üretiminde ilk 10’da yer alan 7 ülkeyi kapsayan Asya, dünyada mercimek tüketiminde ilk sırada

yer almaktadır. Asya ürettiği mercimeğin %68'ini lokal olarak kendisi tüketmekte, %32'sini ise dünya ihracatına sunmaktadır.

Çizelge 2.2. Mercimek üretimi yapılan ilk 10 ülkenin 2007-2008 yıllarındaki ortalama üretim (1,000 ton), hasat edilen alan (1,000 ha) ve ortalama ürün (kg/ha) miktarları ve 2007-2008 yıllarındaki mercimek ürün miktarının 15 yıl önceye (1992/93) göre yüzde değişimleri (FAO 2010). (Erskine et al., 2011).

Sıra	Ülke	Üretim		Alan		Ürün (kg/ha)	1992/3'ten 2007-2008'e üründe % değişim
		1,000 ton	Dünyada (%)	1,000ha	Dünyada (%)		
1	Hindistan	910	26,6	1,470	39,4	619	-7
2	Kanada	889	26,0	638	17,1	1,381	18
3	Türkiye	538	15,7	390	10,4	1,379	50
4	Nepal	163	4,8	189	5,1	860	37
5	Avusturalya	142	4,2	118	3,2	1,225	10
6	Çin	133	3,9	68	1,8	1,967	32
7	USA	132	3,9	113	3,0	1,161	-22
8	İran	115	3,4	225	6,0	511	-12
9	Suriye	109	3,2	149	4,0	731	-17
10	Bangladeş	94	2,8	105	2,8	917	21
İlk 10		3,224	94,2	3,465	92,8	930	
Dünya		3,421	100,0	3,735	100,0	915	15

Mercimek tüketiminin en fazla olduğu 12 ülke Çizelge 2.3'te görülmektedir. Listedeki görüldüğü üzere, beslenmede mercimek Bangladeş, Eritre, Nepal ve Sri Lanka gibi gelir düzeyi düşük ülkelerde oldukça önemli bir yere sahiptir.

Çizelge 2.3. Mercimek tüketiminin en fazla olduğu 12 ülkedeki tüketim miktarı (kg/cap/yr) (Erskine et al., 2011).

Ülke	Tüketim (kg/cap/yr)	Ülke	Tüketim (kg/cap/yr)
Kanada	6,0	Lübnan	2,6
Sri Lanka	4,5	Cezayir	2,3
Nepal	4,1	Ürdün	2,2
Suriye	3,7	Kolombiya	2,1
Türkiye	2,9	İran	1,5
Eritrean	2,9	Bangladeş	1,5

Asya dışında mercimek üretiminde önde gelen ülkelerden Avusturalya ve Amerika mercimeği lokal tüketimden ziyade Asya'ya ihraç için üretmektedir. Ayrıca Kanada, Asya'ya mercimek ihraç eden ülkelerdendir. Dünya Gıda Örgütü (FAO) 2010 verilerine göre Avusturalya, Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Türkiye ve Suriye ile birlikte, 2007-2008 yılları arasında toplam mercimek ihracatının %92'sini karşılamıştır. Yine 2007-2008 periyodunda (FAO 2010) verilerine göre mercimek ithalatı yapan ülkeler ise Hindistan, Türkiye, Sri Lanka, Bangladeş, Pakistan, Mısır, Birleşik Arap Emirliği (UAE), Cezayir, Kolombiya, Suudi Arabistan, Fransa, Peru, Fas, İtalya ve İran'dır (Erskine et al., 2011). Mercimek üretimi FAO veri toplamalarının başladığı 1961-1963 periyodundan, 2007-2008 periyoduna gelindiğinde yaklaşık 4 kat (%373) artmıştır. Bu artış birincil olarak mercimek yetiştirilen alanların artmasından kaynaklanmaktadır (1961-1963: 1.64 milyon ha, 2007-2008: 3.74 milyon ha). Bir diğer etken de bu alanlardan elde edilen ortalama ürün veriminin artması olarak gösterilmektedir (1961-1963: 560 kg/ha, 2007-2008: 915 kg/ha) (Erskine, 2009).

2.2.5 Mercimek üretiminde kısıtlamalar

Soğuk iklim bitkisi olan mercimeğin çeşitli biyotik ve abiyotik faktörlere karşı hassasiyeti vardır. Dünya genelinde yetiştirilen bölgelerde mercimek ürün miktarını olumsuz etkileyen abiyotik etmenler soğuk, kuraklık, sıcak, tuza hassasiyet, besin yetersizliği ve besin toksisitesidir. Olumsuz etkileyen biyotik stresler ise Antrakroz'a karşı duyarlılık, mercimek pası, kök çürümesi ve kök solmasıdır (Muehlbauer et al., 2006).

Turner et al., (2001)'de yayınladıkları çalışmada abiyotik stresler arasında kuraklık ve sığağa karşı duyarlılığın dünya genelinde diğerlerinden daha önemli olduğu belirtilmiştir. Bunun yanında mercimek üretimini olumsuz etkileyen stres faktörlerinin dünyada bölgesel farklılıklar gösterebilmektedir. Örneğin Batı Asya-Kuzey Afrika bölgesinde (WANA bölgesi) soğuk stresi mercimek yetiştiriciliğinde karşılaşılan önemli kısıtlamadır. Diğer yandan Hindistan ve bazı WANA bölgelerinde tuzluluk stresi kısıtlayıcı olmaktadır. Besin eksikliği ve besin toksisitesi ise dünya genelinde daha az öneme sahipken, bazı lokalize bölgelerde önem teşkil etmektedir (Muehlbauer et al., 2006).

Mercimek üretimini olumsuz etkileyen en önemli biotik stres ise *Ascochyta lentis*'in sebep olduğu Antraknoz'dur. Bu hassasiyet daha çok Kanada bölgesinde etkili olmakla beraber mercimek üretiminin yapıldığı tüm bölgelerde

gözlenebilmektedir. *Stemphylium blight* Güney Asya ve Kuzey Amerikada yetiştirilen mercimeklerde etkili biyotik stres faktörleridir (Muehlbauer et al., 2006). *Uromyces fabae* kaynaklı mercimek pası Güney Asya, Fas ve Etiyopya’da yaygın olarak gözlenmektedir.

2.2.6 Bitki ıslahında moleküler markör teknikleri

Bitki ıslah çalışmalarında en temel hedef, bitki kültür çeşitlerinin genotiplerinde var olmayan, olması istenilen karakterlerin oluşturulmasıdır. Bu amaçla bu karakterleri taşıyan bitki hatları ile kültür çeşitleri arasında çaprazlama yapılır. Bitki ıslahçıları çaprazlama yoluyla yeni çeşitleri oluşturarak, tarımda oluşan pek çok ihtiyaca cevap vermektedirler. Tarım sektöründe, bir çeşitten yüksek miktarda ürün almak ilk sırada yer alan taleplerdendir. Son yıllarda tarıma uygun alanların azaldığı raporlanmıştır ve dolayısıyla bir alandan en yüksek kapasitede ürün almak ancak genetik yapısında bu karakteri (verim yüksekliği) taşıyan çeşit ile mümkündür. Aynı zamanda bitkinin yetişmesinde ve tohum veriminde doğrudan etkili olan abiyotik ve biyotik stres faktörlerine dirençli kültür çeşitleri geliştirmek de önemli tarımsal ihtiyaçlardandır. Bir diğer ihtiyaç değişen çevre koşullarına ve tarımsal uygulamalara adapte olabilecek çeşitleri üretmektir. Bu çalışmalara bitki direnç mekanizmasını zaman içerisinde genetik yapısını değiştirerek kıran, bitki zararlılarına karşı yeni çeşitler üretmek örnek verilebilir. Bir diğer önemli tarımsal ihtiyaç ise değişen tüketici istek ve ihtiyaçlarına cevap verecek çeşitleri üretmektir.

Yukarıda kısaca özetlendiği üzere bitki ıslahçıları sürekli yeni kültür çeşitleri geliştirerek sayısız ihtiyaca en kısa zamanda cevap vermek durumundadırlar. Tohum sektöründeki ihtiyaçlara geleneksel ıslah çalışmaları ile de sonuç alınabilmekle beraber, biyoteknoloji gibi yeni teknolojiler ile başarı oranı maksimum düzeyde ve kısa sürede elde edilebilmektedir. Biyoteknoloji çalışmaları dahilinde yer alan moleküler markör teknolojileri bitki ıslahçılarına çok büyük bir imkan sunmaktadır. Bitki ıslahında moleküler markörlerin kullanılması MAS (marköre dayalı seçim) olarak adlandırılır ve yeni ‘moleküler ıslah’ disiplininin bir parçasıdır (Collard and Mackill, 2008).

Genetik markörler kromozomda genom analizleri için işaret olan spesifik lokasyonlardır. Genetik markörler genlere çok yakın bölgelerde lokalize olurlar ve istenilen karakterin fenotipini etkilemezler. Çünkü, bu bölgeler kromozomda istenilen karakteri kodlayan genlerin yakınında ya da bu genlere bağlı (linked)

olarak lokalize olmuşlardır. Morfolojik, biyokimyasal ve moleküler olmak üzere üç farklı tipte genetik markör vardır. Moleküler markörler, DNA düzeyinde polimorfizm (varyasyon) tespitini sağlayan genetik markörlerdir (Collard et al., 2005). Moleküler markörler (DNA markörler) güvenilirlikleri dolayısıyla en çok tercih edilen markörlerdir. DNA markörler nokta mutasyonları, baz eklenmesi ya da baz çıkması, replikasyon sırasında meydana gelen mutasyonlar gibi çeşitli mutasyonlar sonucunda oluşurlar. Bu markörler kodlanmayan bölgede bulunduklarından nötral yapıdadırlar. Çevresel faktörlerden ve bitkinin büyüme dönemlerindeki değişimlerinden etkilenmezler. Ek olarak limitsiz sayıda DNA markör ile çalışma imkanı sunarlar (Collard et al., 2005).

Tespitlerinde kullanılan metodlara göre DNA markörler üç sınıfa ayrılırlar; 1) hibridizasyona dayalı (örneğin; RFLP), 2) PCR'ye dayalı, örneğin; RAPD (random amplification of polymorphic DNA), AFLP, SSR, (simple sequence repeat), 3) DNA dizi analizine dayalı, örneğin; SNP (single nucleotide polymorphism) (Varshney et al., 2007). DNA markör analizleri genetik bağlantı haritası oluşturma, karşılaştırmalı haritalama analizleri, germplasm ilişkilerini anlamada, ekonomik öneme sahip genlerin işaretlenmesinde, marköre dayalı seleksiyon ve haritalamaya dayalı klonlama gibi uygulama alanlarına sahiptir (Kumar, 1999).

Hangi markör sisteminin hangi çalışmaya uygun olduğuna, DNA markörlerinin sahip olduğu yapısal ve teknik özellikleri göz önünde bulundurularak karar verilir. Her bir DNA markör sistemi diğerlerine kıyasla avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Ancak tasarlanan projede çalışılacak olan moleküler markör sistemi ya da sistemleri seçilirken aşağıda listelenmiş olan hususlar göz önünde bulundurulmalıdır;

- a) Markör sisteminin ulaşılabilirliği
- b) Uygulama tekniğinin basitliği ve projede ayrılan zamanda yapılabilirliği
- c) Çalışılacak olan popülasyonda öngörülen polimorfizm düzeyi
- d) DNA miktar ve kalitesinin uygunluğu
- e) Laboratuvar, popülasyon, pedigri ve türler arasında aktarılabilirliği
- f) Çalışılacak olan popülasyonun yapısı ve büyüklüğü
- g) Yeterli ekipman ve beceri
- h) Yeterli ekonomik kaynak

- i) Markör kalıtımı (dominant-kodominant) ve popülasyonda araştırılan genetik bilginin tipidir (Semagn et al., 2006).

2.2.7 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markörleri

DNA tabanlı markörlerin kullanılması, genetik çalışmaları etkin bir şekilde değiştirmiştir ve DNA markörlerin ilk keşfinden günümüze kadar pek çok farklı çeşitte DNA markör sistemi geliştirilmiştir (RFLP, SSR, AFLP, RAPD, SNP, vb.). Ancak bu markörlerden yalnız SNP hariç diğerleri DNA dizi analizini dolaylı olarak yapmaktadır. SNP markörler ise pek çok birey arasındaki DNA dizi farklılığını direk olarak vermektedir (Rafalski, 2002). SNP en genel tanımıyla genomda spesifik bir lokasyondaki tek nükleotid varyasyonudur. Diğer bir tanımla da, belirlenmiş bir lokasyonda iki birey arasında bir baz farklılığıdır (Duran et al., 2009). Genomda en yaygın rastlanan genetik varyasyon olan SNP, popülasyonda normal bireylerde doğal olarak dizi alternatiflerinin (allellerin) oluşmasına sebep olmaktadır (Liao ve Lee, 2010).

Bazı çalışmalarda SNP markörler üç farklı kategoride sınıflandırılmıştır; transisyon sitozin/timin (C/T) veya guanin/adenin (G/A), transversiyon sitozin/guanin (C/G), adenin/timin (A/T) veya timin/guanin (T/G) ve baz eklenmesi/çıkarılmasıdır (Duran et al., 2009, Cho et al., 1999). Diğer yandan Brookes (1999)'da yayınlamış olduğu çalışmasında, SNP'yi bazı popülasyonlarda normal bireylerde, farklı dizi alternatiflerinin (allellerinin) olduğu genomik DNA'da tek baz çifti pozisyonları olarak tanımlamıştır. Bu tanımda bu allellerin popülasyonda rastlanma sıklığı %1 ya da daha fazla olması gerekmektedir. Brookes (1999)'da yaptığı tanımda, tek baz çifti eklenmesi/silinmesi (indels) kaynaklı varyasyonlar SNP olarak kabul edilmemektedir. SNP'ler transisyon; pürin-pürin ($A \leftrightarrow G$) yada pirimidin-pirimidin ($C \leftrightarrow T$) baz değişimleri ile olabildiği gibi, transversiyon pürin-pirimidin yada pürimidin-pürin baz değişimleri ($A \leftrightarrow C$, $A \leftrightarrow T$, $G \leftrightarrow C$, $G \leftrightarrow T$) ile de olabilmektedir (Vignal et al., 2002).

Teorik olarak, bir DNA dizisinde dört nükleotid olduğu için, genomda her bir nükleotid pozisyonunda dört allelin olma olasılığı vardır. Yani herhangi bir bölgedeki SNP'ler prensipte bi-, tri- ya da tetra-allel olabilirler, ancak tri- ve tetra-allel SNP'ler nadirdir, genelde SNP'ler bialleliktirler. Dolayısıyla diğer bir deyişle SNP'ler biallelik markörlerdir. Bu da nükleotid transisyonunun ve transversiyonunun eşit olmayan bir oranda oluşmasından kaynaklanmaktadır. Nükleotid transversiyon varyasyonlarının sayısı transisyon kaynaklı olanlardan iki

kat fazla olmasına rağmen transisyon oluşma sıklığı 1.5-2.5 kat daha fazladır. Bu da CpG dinükleotidlerinde (C'nin G'yi takip ettiği CG dizilerinin yoğun olduğu bölgeler), 5-metil sitozinin (5mC) timine kendiliğinden deaminasyon oranının yüksek olması ile açıklanmaktadır. Bunun sonucunda da yüksek oranda C $\leftrightarrow$ T SNP'ler (revers strandde G $\leftrightarrow$ A) oluşur (Vignal et al., 2002, Khlestkina and Salina, 2006).

SNP'ler gende kodlanan bölgede, kodlanmayan bölgede ve genler arası bölgede bulunabilirler ve gende bulundukları pozisyona göre gruplandırılırlar. Kodlanan bölgede (ekzon) bulunan SNP'ler synonymous ve nonsynonymous olmak üzere iki gruba ayrılır. Synonymous SNP'ler protein dizisini etkilemezken, nonsynonymous SNP'ler proteinin amino asit dizisini değiştirirler. Nonsynonymous SNP'lerde missense (nokta mutasyon ile amino asit dizisi değişir) ve nonsense (nokta mutasyon ile stop kodon oluşur) olmak üzere iki tiptedirler (Khlestkina and Salina, 2006).

Bi-allelilik ko-dominant yapıdaki SNP'lerin, multi-allelilik markörlere tercih edilmelerindeki etkenlerden biri genomda görülme sıklığıdır. SNP genomda en yaygın olan DNA polimorfizmidir. Mısır genomunda 70 baz çiftinde bir, buğday genomunda 370-540 baz çiftinde bir, hatta bazı bölgelerde 20 baz çiftinde bir SNP gözlenmiştir. Genetik haritalama çalışmalarında yüksek çözünürlüklü genetik harita elde edebilmeyi kısıtlayan birincil sebep yeterli polimorfik markör sayısına ulaşamamaktır. Bu kısıtlayıcı etken, tüm genomda yaygın olarak bulunan (tüm genomu kaplayan) SNP markörler ile aşılabilmektedir. SSR markörler 90'ların sonlarında ve 21. yüzyıl başlarında bitki moleküler genetik ve ıslah çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktaydı. Ancak son sekiz yıl süresince SNP markörler orta-çözünürlüklü SSR markörlerin yerini almış durumdadır. İlk önce insan genomunda keşfedilen SNP'ler aynı türün bireyleri arasında universal ve aynı zamanda en çok rastlanan markörlerdir. Bi-allelilik olmalarından dolayı SSR markörlere göre daha az polimorfiktirler fakat, bu dezavantajlarını genomda yaygın, çok sayıda olmaları ve otomasyona uygun olmaları ile elimine etmektedirler (Mammadov, et al., 2012). Multi-allelilik markörlerin aksine biallelik SNP markörler otomasyona uygun olmaları sayesinde binlerce SNP, DNA microarray (gen chip) uygulamaları ile eş zamanlı olarak analiz edilebilmektedir. Otomasyona uygunluk özellikle tek bir ıslah sezonunda, onlarca lokusun, binlerce örnek için taranmasını gerektiren, bitki ıslah çalışmalarında vazgeçilmez bir avantaj sağlamaktadır. Binlerce SNP ile tüm genom çok hızlı bir şekilde analiz edilebilmektedir (Jehan and Lakhanpaul, 2006; Khlestkina and Salina, 2006). SNP

markörlerin bir diğer avantajı da generasyonlar arasında belirgin bir değişime uğramayıp kararlı bir şekilde kalmalarıdır. Düşük mutasyon oranına sahip olmaları popülasyon genetik çalışmalarında büyük kolaylık sağlamaktadır (Duran et al., 2009). Ancak bu belirgin avantajlarına rağmen SNP markörlerin bitki ıslahında kullanımına dayalı çalışmaların sayısı 2009 yılına kadar sınırlıdır (Mammadov, et al., 2012).

SNP analizleri, bilinen genom ya da gen dizisi üzerinde belirlenmesi ve haritalanması, genom dizisinin belirlenen (bilinen) SNP'ler için taranması ve genomda SNP'lerin belirli fenotipik karakterleri kodlayan bölgelerle bağlantısının tespiti olmak üzere üç basamaktan oluşmaktadır (Liao ve Lee, 2010).

2.2.7.1 SNP markörlerin keşfi

Genetik çalışmalardaki çok büyük potansiyelinin görülmesiyle birlikte SNP markörlerin keşfinde çeşitli metodlar geliştirilmiştir. SNP keşfinde en direkt yol, PCR ile çoğaltılan DNA fragmentlerinin dizi analizidir. Her iki DNA zinciri için dizayn edilen primerler ile template DNA 400-700 baz çiftlik DNA fragmentleri oluşacak şekilde çoğaltılır. Oluşan DNA fragmentlerinin dizi analizi, nükleotid sekanslama metodları kullanılarak yapılır. Dizi analizi yapılan PCR ürünleri konum tespiti (allignment) yapılarak SNP'ler tespit edilir. Yanlış tespit oranı %5'in altında olan bu metod ile keşfedilen SNP'lerin güvenilirliği oldukça yüksektir. Ancak oldukça maliyetli olması, analiz basamaklarının fazla işgücü gerektirmesi ve fazla zaman alması metodun önemli dezavantajlarından (Jehan and Lakhanpaul, 2006; Liao and Lee, 2010; Rafalski, 2002).

SNP'ler ifade edilelen sekans etiketleri (EST)'ye dayalı yöntemlerle de keşfedilebilmektedir. EST'ler mRNA'nın tersine (revers) transkripsiyonu sonucu elde edilen kısa cDNA dizileridir ve genomik dizinin indirgenmiş temsili bir formudur. Farklı bireylerden elde edilen sekanslar ile EST kütüphaneleri oluşturulur. Bu kütüphanelerin çokluğu sayesinde aynı lokustaki örtüşen bölgelerin EST kütüphaneleri ile dizilerin birleştirilmesi (assembly) yapılması ile yeni SNP'ler keşfedilir. Ek olarak iki ebeveynden oluşan basit bir kütüphane ile dizilerin birleştirilmesi ile SNP'ler keşfedilebilir. Adams, et al.'un (1991)'de yapmış olduğu çalışmada ilk olarak SNP keşfinde kullanılmıştır. Referans genom sekans bilgisi olmayan genomlarda EST'ye dayalı yöntem elverişlidir. Ancak tespit edilen sekans varyasyonları düşük kalitede dizileme sonucu elde

edilebileceğinden bu metod %15 ile %50 arasında değişebilen yüksek düzeydeki yanlış tespit oranı gösterebilmektedir (Liao and Lee, 2010).

Array analizleri SNP keşfinde kullanılan bir diğer yöntemdir. Çalışılan diziye spesifik oligonükleotid problemler taşıyan arraylerde PCR amplifikasyonu ve hibridizasyonu yapılır. Varyasyona sahip olan diziler farklı hibridizasyon paternleri gösterir ve bu da SNP keşfine olanak sağlar. Bu tarama metodu %20'den fazla yanlış pozitif sonuçlar verdiğinden, keşfedilen SNP'ler ileri doğrulama yapmak için genellikle tekrar dizi analizine alınır (Liao ve Lee, 2010).

2.2.7.2 SNP markörlerin genotiplenmesi

Çeşit geliştirilmesi ve farmakogenomikte sahip olduğu büyük potansiyel nedeniyle SNP markörlerin genotiplenmesinde, keşfinde olduğu gibi çok sayıda farklı metodoloji geliştirilmiştir. SNP markör çalışmalarının ilk aşamasında çok sayıda SNP markör keşfedildiğinde, geniş çaplı bir araştırmada ikinci basamakta bu markörler için varyasyonların tespiti yani genotiplenmesi kritik bir süreçtir. Spesifik bir tanımla SNP genotiplenmesi, gen dizileri ya da genomun bilinen SNP'ler için test edilmesidir. Genel ifade ile genotiplenmede SNP'ler için allel spesifik ürünler oluşturulur ve ardından SNP'ler tespit edilerek genotip belirlenmesi yapılır (Kim and Misra, 2007).

Birkaç genotiplenme metodu dışında, güncel SNP genotiplenme teknolojilerinin çoğunda PCR amplifikasyon basamağı yer almaktadır. PCR amplifikasyonu genomda genotiplenmesi yapılan SNP'leri içeren bölgelerin spesifikliğinin ve takibinde allelik ayırım yapılacak molekül sayısının artırılması için yapılmaktadır. SNP genotiplenme teknolojileri allel ayırlaması (belirlenmiş SNP lokusunda bulunan bazı tipinin tespit edilmesi) ve allel tespiti (allelin varlığını bildiren-raporlayan bir metod-sinyal deteksiyonu) olmak üzere iki temel strateji üzerine kurulmuştur (Kim and Misra, 2007; Twyman, 2005).

Allelik ayırma dayalı stratejide beş farklı metod geliştirilmiştir ve bunlar aşağıda listelenmiş olan prensiplere dayanmaktadır;

- Primer uzaması
- Oligonükleotid hibridizasyonu
- Eşleşmeyen kısımların nükleaz ile kesilmesi
- Oligonükleotid bağlanması

– Direk DNA sekanslaması (Rafalski, 2002).

Her bir metotta kullanılan teknoloji homogeneous (solüsyon içinde) ya da heterogeneous (mikroarray gibi sıvı ve katı fazı bir arada içeren) olabilmektedir. Bazı metodlarda genomik DNA ya da cDNA ile direk çalışılabilirken, bazı metodlarda genomik DNA ön PCR amplifikasyonuna ihtiyaç duymaktadır. Sinyal tespit metodları ise gerçek zamanlı amplifikasyon olurken olabildiği gibi analiz bitiminde de olabilmektedir (Twyman, 2005).

Primer Uzaması

Spesifik olarak SNP genotiplemesi için geliştirilmiş minisekanslama (minisequencing) diye de adlandırılan ve çok kullanılan bir metottur. Metodun prensibi şöyledir; deteksiyon primeri tek nükleotid polimorfizmi gösteren bölgede 5' (upstream) ucuna bağlanacak şekilde dizayn edilir. DNA'nın 3' ucu işaretlenmiş ddNTPs'ler kullanılarak, DNA polimeraz enzimi ile çoğaltılır. Dolayısıyla deteksiyon tek nükleotid farklılığı baz alınarak hazırlanan primerin, kalıp DNA'ya bağlanması ve uzamasına dayalı olarak yapılır. Her bir bazı bir florasan boya rengi temsil eder, böylece polimorfik bölgede allelik farklılıklar tespit edilebilir ve ayrıca aynı zamanda genotiplemede homozigot ve heterozigot ayrımı yapılabilir. Mikroarray, kapiler elektroforez sistemleri, pirosekanslama, akış (flow) sitometrisi, kütle sitometrisi ya da florasan plate okuyucuları gibi farklı deteksiyon platformarı SNP genotiplemesinde kullanılabilir (Twyman, 2005). Primer uzaması metodu kullanarak Törjek et al. (2003)'te *A. thaliana*da 112 SNP markör geliştirdikleri çalışmaları örnek olarak verilebilir.

Hibridizasyon

Bir SNP lokusunda alleller arası farklılığın tespitinde en basit yöntem allel spesifik oligonükleotid problar (ASO) ile hibridizasyon yapılmasıdır. Problar SNP bölgesinde tüm muhtemel dizileri kapsayacak çeşitlilikte hazırlanır. Hibridizasyon çift iplikli DNA molekülünün ısı dengesi kararlılığına dayalı olarak geliştirilmiş bir metottur. Allelik ayırım hedef DNA ve prob çiftinin tam olarak eşleşmesi ya da eşleşmemesi tespit edilerek yapılır. Komplementer oligonükleotid dizilerinin hibridizasyonu, eşleşmeyen problemlerin hibridizasyonunu önlemek için kesinlik koşulları uygulanır. Bundan dolayı birbirine tam olarak komplementer olan hedef DNA ve problemlerin arasında hibridizasyonun olmasını sağlayan termal koşulların sağlanması oldukça önemlidir. Allel ayırlamasındaki verimlilik genellikle

probun uzunluğu, dizisi, SNP'nin prob dizisindeki yeri ve hibridizasyon koşullarına bağlı olarak değişmektedir. Enzimatik reaksiyonlara ihtiyaç duymadığından mikroarrayler kullanılarak yüksek çözünürlüklü platformlar ile hibridizasyona dayalı SNP genotipleme yapılabilmektedir. Bu yaklaşımda florasan sinyal deteksiyonu ile milyonlarca prob içeren arraylerde $10^4 \sim 10^5$ SNP paralel olarak genotiplenebilmektedir (Kim and Misra, 2007).

Oligonükleotid Bağlanması (Ligasyon)

Ligasyon metodunda ligaz enziminin spesifikliğı kullanarak allelik ayırlama yapılmaktadır. DNA ligaz, bir DNA fragmentinin 3' ucunu, bitişik DNA fragmentinin 5' ucuna ligasyonunu katalize eder. Bu mekanizma SNP sorgulamasını SNP polimorfik bölgesinde iki probun direk olarak hibridizasyonuna dayalı yapar. Bu metotta deteksiyon kalorimetrik olarak microtitre plaklar ile ve farklı elektroforetik hareketliliğe sahip florasan işaretli ligasyon problemleri kullanılarak multipleks olarak DNA dizi analizi cihazlarında yapılabilmektedir. Ayrıca yüzeye immobilize edilen ligasyon problemleri kullanılarak mikroarray yöntemi ile de gerçekleştirilebilmektedir. Eğer bitişik iki oligonükleotid tek iplikli kalıp mükemmel bir şekilde komplementer özellik gösterip hibridize oluyorsa, ligaz enzimi bu iki oligonükleotidi birleştirir ve tek bir oligonükleotid oluşturur. Ligasyon yönteminde ikisi kalıp SNP bölgesine bağlanan ve allel spesifik olan üç tane oligonükleotid prob kullanılır. Üçüncü prob ise allel spesifik probun bitişğine bağlanır ve geneldir (ligasyon prob). Eğer mükemmel komplementer şekilde allel spesifik prob SNP bölgesine bağlanırsa, DNA ligaz probu genel proba (ligasyon probu) birleştirir. Sonrasında SNP bölgesindeki ligasyon ürünü detekte edilir.

2.2.8 Yeni nesil sekanslama teknolojileri (Next-Generation Sequencing-NGS) ile SNP markör keşfi ve genotipleme

Dizileme ya da sekanslama nükleik asitlerin polimerlerinde (DNA ya da RNA), nükleotidlerin diziliminin belirlenmesidir. Böylece DNA dizi analizi ile bir DNA molekülündeki nükleotidlerin kesin dizilimi belirlenebilmektedir. Analiz bir nükleik asit dizisinin diğerine hibridizasyonuna dayanır. İlk olarak 1977'de uygulanmasından günümüze kadar genomik çalışmalarının oluşmasına ve dolayısıyla bitki genom kompozisyonu ve organizasyonu hakkında sahip olunan bilginin artmasına olanak sağlamıştır (Kumar, et al., 2012). İki farklı sekanslama yöntemi 1977 yılında geliştirilmiş ve yayınlanmıştır. Bunlardan Maxam ve

Gilbert'in geliştirdikleri yöntem kimyasal sekanslamaya dayanmaktadır. Frederick Sanger'in geliştirdiği yöntem ise sentez ile dizileme (sequencing-by-synthesis-SBS) prensibine dayanmaktadır. Yöntemde deoxy- ve dideoxy-işaretli zincir sonlandıran nükleotidlerin kombinasyonu kullanılarak sekanslama yapılır. Sanger metodu ile ilk olarak bakteriyofaj *phi X174*'ün genom sekanslaması yapılmıştır. Metod yaklaşık yirmi yıl kullanılmış ve aralarında insan genom dizilemeside olan devasal başarılar elde edilmiştir (Kumar, et al., 2012). Sanger sekanslama reaksiyonlarında, 500 bp ile 1 kb arasında uzunluğa sahip olan DNA fragmentlerinin dizilemesi yapılabilmektedir. Yöntemin biyokimyası template denatürasyonu, primer bağlanması ve primer uzaması basamaklarını içeren döngü sekanslama (cycle sequencing) reaksiyonlarını içermektedir. Florasan işaretli dideoxynükleotidler (ddNTPs) ve işaretli olmayan deoxynükleotidler (dNTPs) ile PCR reaksiyonu yapılır. Primer uzaması florasan işaretli dideoxynükleotidler (ddNTPs) ile sonlandırılır ve dizinin sonunda hangi nükleotidin olduğu detektör tarafından tespit edilir. Dideoxynükleotidlerin (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) her birinin farklı renk işaretlenmiş olması tespitlerine olanak sağlamaktadır (Shendure ve Ji, 2008). Sanger metodu pek çok önemli çalışmada ve uzun yıllar kullanılmış olmasıyla birlikte bazı dezavantajlara sahiptir. Metotta karşılaşılan en önemli dezavantaj her bir sekanslama reaksiyonunda DNA sekans miktarının kısıtlı sayıda olmasıdır. Klonlama basamağının olması, dizilemenin uzun sürmesi, ekonomik olmaması ve biyoinformatik kısıtlamalar Sanger metodunun diğer dezavantajlarıdır.

İçinde bulunduğumuz son on yılda ise, mevcut sekanslama yöntemlerinde karşılaşılan kısıtlamaların aşıldığı, Sanger sekanslama temelli yeni nesil teknolojileri geliştirilmiştir (Next Generation Sequencing-NGS). NGS teknolojileri ile tek bir PCR reaksiyonunda yüz milyonlarca bazdan yüz milyarlarca baza kadar çok büyük miktarda bazın aynı anda sekanslaması ve görüntülenmesi yapılabilmektedir. Ayrıca oldukça büyük miktardaki sekanslama NGS teknolojileri ile, Sanger metoduna kıyasla oldukça düşük maliyette yapılabilmektedir. Bir diğer avantaj ise; Sanger metodu ile aylarca sürebilecek olan bir dizi analizi NGS ile birkaç gün içerisinde yapılabilmektedir (Deschamps and Campbell, 2010). Günümüzde firmalar çok yüksek miktarda farklı DNA dizisinin tek bir reaksiyonda yüksek çözünürlüklü dizilemesini paralel reaksiyonlarda yapan farklı teknolojiye sahip NGS platformları üretmişlerdir. Geliştirilen tüm NGS teknolojilerinde ortak yapılan işlem; dizisel eklenen nükleotidlerin görüntülenmesi ve dizi analizi için kalıp DNA fragmentlerinin oluşturulmasıdır. Güncel NGS teknolojileri 'ikinci jenerasyon' ve 'üçüncü

jenerasyon' olmak üzere iki kategoriye ayrılmaktadır. Bu gruplandırma çoğunlukla sekanslamanın yapılacağı kalıp DNA'nın amplifiye edilmesi ve takibinde dizi analizinin yapılması ya da kalıp DNA'nın amplifiye edilmeden tek bir DNA molekülünden sekanslanmasına göre yapılmaktadır (Deschamps, et al., 2012). Farklı firmaların üretmiş olduğu ikinci jenerasyon NGS platformları şunlardır; 454 dizilemesi (454 Genome Sequencers, Roche Applied Science; Basel), Solexa dizilemesi (Illumina (San Diego) Genome Analyzer) ve SOLiD dizileme platformu (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) (Shendure and Ji, 2008).

Tüm NGS platformlarında, kalıp DNA'nın hazırlanması, sekanslama ve görüntüleme, son olarak data analizi olmak üzere üç temel işlem yapılmaktadır. Platformları bu üç işlem basamağındaki sahip oldukları spesifik protokolleri farklılaştırmaktadır ve ayrıca platformların ürettikleri sekanslama datasıda birbirlerine göre farklılık göstermektedir (Metzker, 2010).

454 GS FLX

İlk ticari NGS sekanslama cihazı olan, 454 GS20 sekanslama sistemi Roche (Basel, Switzerland) tarafından üretilmiştir. GS20, 100 bp uzunluğunda ~200,000 sekanslamayı yalnızca 4 saatte yapabilmektedir. GS FLX Titanium serisi ise ~450 bp uzunluğunda ~1,000,000 sekanslamayı 10 saatlik bir okumada yapabilmektedir. 454 sekans sistemi SBS (sentez yoluyla dizileme) metodunu kullanmaktadır (Deschamps ve Campbell, 2010). Sekanslamanın ilk basamağı olan kalıp DNA'nın hazırlanması aşamasında, rastgele kesilmiş DNA fragmentlerinin iki ucuna universal adaptörler bağlanır (Deschamps, et al., 2012). Adaptör bağlı DNA fragmentleri, adaptörlere komplementer oligonükleotidler ile kaplanmış boncuklara hibridize olur ve emülsiyon PCR amplifikasyonu ile orijinal DNA molekülünün milyonlarca kopyası oluşur (Berglund, et al., 2011). Daha sonra emülsiyondan ayrılan klonal olarak çoğalmış amplifiye kalıp DNA fragmentlerini taşıyan boncuklar sekanslama için picoliter-scale array'e yüklenir. Sekanslama prodizileme (pyrosequencing) metodu ile yapılır ve metot belirli bir sırada tek bir nükleotidin sırasıyla reaksiyona katılmasını içerir. Reaksiyon sırasında açığa çıkan ışımaya CCD (charge-coupled device) kamera ile tespit edilir (Deschamps and Campbell, 2010).

Illumina GAIIx

Illumina sekanslama sisteminin son versiyon cihazı olan (“Genome Analyzer IIx” ya da “GAIIx” olarak adlandırılan), Illumina (San Diego, CA) tarafından üretilmiştir ve 36-76 bp arasında değişen uzunlukta 160 milyondan fazla sekans datası üretebilmektedir (Deschamps and Campbell, 2010). Template DNA hazırlamak için, sonikasyon ya da nebulizasyon ile rastgele kesilmiş DNA fragmentlerinin iki ucuna üniversal adaptörler bağlanır (Deschamps, et al., 2012). Daha sonra, adaptör bağlı DNA fragmentleri direk olarak flow cell’e amplifiye edilir. Sekiz farklı kanalı olan flow cell adaptörlere komplementer olan oligonükleotidler ile kaplanmıştır. Burada adaptör bağlı DNA fragmentleri flow cell’e hibridize olur ve köprü (bridge) amplifikasyonu ile çoğalır. Amplifikasyon sonrası DNA molekülleri her biri orijinal DNA molekülünün yaklaşık 1,000 kopyasını içeren cluster oluşturur (Berglund, et al., 2011).

Cluster formasyonu sonrasında SBS yaklaşımı ile sekanslama işlemi gerçekleştirilir. Sekanslamada florasan işaretli nucleotidler kullanılır. Her biri farklı florasan işaretli dört nükleotidin hepsi aynı anda reaksiyona eklenir ve her bir kalıp molekülünde bir döngüde bir baz eklenmesi ile sekanslama yapılır (Berglund, et al., 2011). Sekanslama amplifikasyonu, linear tek iplikli amplikonlara sekans primerinin hibridize olarak modifiye nükleotidler ile komplementerlerinin oluşturulması ile gerçekleşir. Modifiye nükleotidler, polimeraz enzim aktivitesini geçici olarak durdurma özelliğine sahiptirler. Dolayısıyla bu şekilde, komplementer DNA amplifikasyonunda, homopolimerik bölgelerde bile her döngüde yalnızca bir nükleotid eklenmesi gerçekleşebilmektedir (Shendure and Ji, 2008). Florasan işaretler ve amplifikasyonu durduran materyaller (blocking agents), tek baz uzaması ve ardından görüntü alınması sonrasında bir sonraki döngünün gerçekleşmesi için uzaklaştırılır (Deschamps and Campbell, 2010).

Tüm sekanslama platformlarının analiz basamakları aynıdır ancak, sekanslama kimyası, analiz süresi, dizi okuma uzunluğu ve çözünürlüğü gibi özelliklerinde farklılıklar göstermektedir. Çizelge 2.4’te karşılaştırmalı olarak farklı NGS platformlarının ait özellikler özetlenmiştir (Deschamps and Campbell, 2010). Bu farklılıklar dolayısıyla sekanslama platformları birbirlerine kıyasla avantaj ve dezavantajlara sahiptirler. Örneğin 454 sekanslama platformunun ~450 bp uzunluğundaki okuma kapasitesi önemli bir avantajdır (Deschamps and Campbell, 2010).

Çizelge 2.4. Yeni-nesil sekanslama teknolojilerinin karşılaştırılması

Sekanslama platformu	Sekanslama Kimyası	Sekanslama süresi ^a	Okuma uzunluğu (bp)	Bir rundaki okuma (milyon)	Bir rundaki çözünürlük (GbP)
Roche 454 FLX	Sentezleme ile sekanslama	10 saat	400-500	~1	0,4-0,5
Illumina GAIIx	Sentezleme ile sekanslama	5,5 gün	100	160	16
ABI SOLiD	Sentezleme ile sekanslama	6-7 gün	50	500	25
Helicos Heliscope	Sentezleme ile sekanslama	8 gün	25-55	600-800	21-28
Polonator	Sentezleme ile sekanslama	80 saat ^b	28 (2 X 14) ^b	300-400	9 ^b

^a Fragment kütüphane oluşumunu içermez

^b Paired-end sekanslama okuması

2.2.8.1 NGS teknolojilerinin uygulamaları-sekanslama ile genotipleme (Genotyping-by Sequencing)

Sekanslama ile Genotipleme (Genotyping-by Sequencing-GBS), NGS protokollerinin çeşitli bitki ve popülasyonlarda SNP keşfi ve genotiplemesini amaçlayan en son uygulamasıdır (Spindel, et al., 2013). Bitki ıslah çalışmalarında genomik seleksiyon uygulamaları genellikle referans örnekler kullanılarak keşfedilen markörlerle yapılmaktadır. Ancak NGS ile DNA sekanslama teknolojilerindeki hızlı gelişmeler, ki bu gelişmeler kısa DNA fragmentlerinin sekanslamasına dayanmaktadır, büyük ve farklı germplasm koleksiyonlarında, doğrudan ve ekonomik SNP keşfine olanak sağlamaktadır (Crossa, et al., 2013). Yeni bir NGS platformu olan GBS ile genom kompleksliği RE enzimler ile azaltılarak (Elshire, et al., 2011), her bir birey için milyonlarca kısa okuma dizileri oluşturulurken, eş zamanlı olarak SNP genotiplemesi yapılabilmektedir (Chen et al., 2014). Bitkilerde bağlantı haritası oluşturmak için uygulanan GBS prosedürü; haritalama popülasyonunun oluşturulması, NGS dizileme kullanılarak yüksek çözünürlükte sekanslanma yapılması, SNP'lerin belirlenmesi –genotiplenmesi ve genetik bağlantı haritasının yapılması işlem basamaklarından oluşmaktadır (Deschamps, et al., 2012).

GBS bitki genetik çalışmaları yapan araştırmacılarının beklentilerini, eş zamanlı markör keşfi yapması, genotiplemeyi basit ve düşük maliyette moleküler biyoloji çalışma akışında sağlaması dolayısıyla en yüksek düzeyde karşılamaktadır. Kesimlemede kullanılan enzim ise tanımlanan markör sayısını ve gerekli sekans miktarını etkilemektedir. Genomu daha sık aralıklarla kesen bir enzim daha fazla sayıda DNA fragmentinin oluşmasına ve markör sayısının artmasına sebep olur (Kumar, et al., 2012).

Diversity Arrays Technology (DArT), Canberra, Avusturalya (<http://www.diversityarrays.com/>), DArT-seq olarak bilinen bir GBS platformudur. DArT metodunda RE enzimler kullanılarak genomda markör keşfi için bilgilendirici olan düşük kopya sekansları tekrarlanan bölgelerden ayrılır. Daha sonra bu fragmentlerin dizi analizi NGS platformu ile yapılır. Farklı enzim kombinasyonları kullanılarak DArTseq GBS ile yüksek çözünürlükte SNP keşfi yapılabilmektedir. Standart bir DArT analizinde örnek başına yaklaşık 2,000,000 tag sekanslanmaktadır (Li, et al., 2015).

DArT, DNA polimorfizm analizleri için geliştirilen katıhal, açık sistem bir metottur. Düşük maliyetli bir metod olan DArT ile yapılan genetik markör analizlerinde, az miktarda örnek DNA'sı ile herhangi bir DNA sekans bilgisi bulunmayan organizmalarda bile, tüm genomu kapsayan yüksek çözünürlüklü sonuç elde edilebilmektedir (Jaccoud et al., 2001). DArT genom kompleksliğini azaltarak, eş zamanlı bir şekilde binlerce markörü DNA hibridizasyonuna dayalı olarak tüm genomda analiz eder. DArT genomda düşük kopya sayısına sahip bölgeleri hedefler ve otomasyona uygun bir metottur. Kısa zaman önce kazanılmış bir metod olmasına rağmen, bu markör teknolojisi araştırmacıların dikkatini artarak çekmektedir (Sansaloni, et al., 2010).

2.2.8.2 NGS datasından polimorfizm tespiti

Genetik harita birbirleriyle ilgili (relative) olan karakter, gen ve markörlerin rekombinasyon sıklıklarının ölçülerek, kromozom üzerinde yerleşim düzenlerinin belirlenmesidir. Genetik haritalar bitki genetik yapısının geliştirilmesini hedefleyen moleküler ıslah çalışmaları için gerekli araçlardır. Çünkü genetik haritalar QTL'lerin saptanması, haritaya dayalı klonlama ve gen lokalizasyonlarının belirlenmesinde gereklidirler. Genetik haritaların oluşturulmasında araç olan markörlerden SNP'lerin ise daha yüksek çözünürlükte harita elde edilmesinde önceki markör sistemlerine göre üstünlükleri vardır. RNA-Seq ve expressed sequence tags (ESTs)'ler kullanılarak keşfedilen SNP'ler gene spesifik olma yönünden avantaja sahiptirler. Ancak diğer markörlere nazaran SNP markörler daha düşük polimorfik bilgi içeriği (PIC) değerine sahiptirler. Biallelik yapılarından kaynaklanan bu sınırlı bilgi genomda yüksek sıklıkta bulunmaları ile telafi edilmektedir (Kumar, et al., 2012).

NGS datasından SNP çağrılması (calling) ve genotiplemesi karakteristik olarak NGS teknolojisine özgüdür. NGS datası geleneksel sanger sekanslama ya da SNP genotipleme metodlarına göre daha yüksek hata oranına sahiptir. Buda daha yüksek çözünürlükte sekanslama yapmasına dayanmaktadır. Ek olarak, NGS teknolojileri ile Sanger sekanslamaya göre daha kısa okumalar (kontig) oluşturmaktadır ve dolayısıyla bu da yanlış hizalama (alignment) riskini artırmaktadır. Tüm bu sebeplerden ötürü bir popülasyonda SNP'lerin çağrılması oldukça zor bir işlemdir. SNP çağrılması için çeşitli algoritmalar geliştirilmiştir. Çizelge 2.5'te NGS datasından SNP tespiti için geliştirilen softwareler için örnekler görülmektedir (Deschamps, et al., 2012).

Çizelge 2.5. NGS datası için oluşturulan non-exhaustive SNP çağırma software listesi

Software	Link	Input Format	Primary Function
MAQ	http://maq.sourceforge.net/	FASTA, FASTQ	Mapping and Assembly
SAMtools	http://samtools.sourceforge.net/	SAM, BAM	Alignments
GATK	http://www.broadinstitute.org/gatk/	SAM	Alignments
SOAPSnp	http://soap.genomics.org.cn/soapsnp.html	SOAP	Mapping and Assembly
SNIP-Seq	http://polymorphism.scripp.edu/~vbansal/software/SNIP-Seq/	Pileup	Alignments
MapNext	http://evolution.sysu.edu.cn/english/software/mapnext.htm	FASTA, FASTQ	Alignments

Bağlantı dengesizliği (LD) popülasyon genetiğinde tipik olarak aynı kromozom üzerinde yer alan iki yada daha fazla lokusta bağlantılı allellerin rastgele olmayan ilişkileri olarak tanımlanabilir. Haplotip ise istatistiksel olarak ilişkili olan, kalıtımda beraber hareket eden, aynı kromozomda yer alan bir takım SNP'dir.

2.2.9 AFLP (Amplified Fragment Polymorfizm) markörleri

AFLP (1995) yılında Vos, et al., tarafından geliştirilen çoklu lokus (multi-locus) DNA parmakizi analizidir. RFLP ve RAPD tekniklerinin birleştirilip geliştirilmesi sonucu oluşmuştur. RFLP gibi enzim kesim bölgesindeki indelslere ve baz değişimini, RAPD'de olduğu gibi PCR primer bağlanma bölgesindeki baz değişimine dayalı olarak polimorfizmi tespit eder. AFLP'nin farklılığı dizisi bilinen adaptörlerin enzim kesimlemesi yapılan toplam genomik DNA'ya bağlanmasıdır (Liu and Cordes, 2004). AFLP restriksiyon enzimleri ile kesilen genomik DNA fragmentlerinin seçici PCR amplifikasyonuna dayalı olarak polimorfizm tespiti yapar. Teknik aşağıda listelenen basamakları içerir;

- 1) Toplam genomik DNA'nın iki enzim karışımı ile kesilmesi (genellikle EcoRI + MseI).
- 2) Enzimle kesilen DNA fragmentlerine adaptörlerinin bağlanması. Enzim kesim uçlarındaki diziler bilinmediğinden, dizisi bilinen adaptörler PCR'da primer olarak kullanılır.
- 3) İlk seçici PCR'ın yapılması (restriksiyon fragmentlerinin çoğaltılması). EcoRI primer + A and MseI primer + C milyonlarca DNA fragmentinin iki enzim kesimi olan ve adaptörlerin bağlandıklarını tek baz seçiciliği ile çoğaltılır.
- 4) İşaretli primerler ile seçici PCR'ın iki seçici baz eklenerek yapılması (Primer + 3 baz çifti; forward işaretli, revers işaretsiz). Örneğin; Eco+ATA and Mse+CAC. Eco+3 primeri florasan boya (fluorophore) ile işaretlenir ve böylece bu primerin sentezlediği tüm DNA zincirleri işaretli olur. Eco+3 seçici primeri farklı boyalar ile boyanarak aynı anda birden fazla primer kombinasyonunun sonucu alınabilir. Buda AFLP tekniğinin multipleks çalışmalara uygunluğunu sağlar.
- 5) AFLP fragmentleri agaroz jel, poliakrilamid jel (PAGE) ve otomasyona dayalı (florasan deteksiyon sistemi) ile amlifiye fragmentlerinin analizi yapılabilir (Arif et al., 2010).

AFLP araştırmacılara çalışmalarında pek çok avantaj sunmaktadır. Yöntemin başlıca avantajları güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği yüksek olmasıdır. Çalışılan organizmaya ait DNA dizi bilgisine ihtiyaç duymaz. RSPD, mikrosatellite ve RFLP markörlere göre yalnızca bir jelde ve bir primer kombinasyonunda bile oldukça çok sayıda polimorfik bant analizi yapılabilir. AFLP her bir bireye ait özgün lokus spesifik fragmentler verir. Yöntemin analiz basamaklarının fazla ve maliyetli olması, enzim kesimi için inhibitörlerden yüksek oranda arınmış template DNA'ya ihtiyaç duyması dezavantajlarıdır. Yöntemin bir diğer dezavantajı da homozigot dominant bantlar vermesi dolayısıyla heterozigot bantların ayırımına olanak sunmamasıdır. AFLP prokaryot ve ökaryotların parmak izi analizlerinde pratik olarak uygulanabilmektedir. MAS analizlerinde, yüksek çözünürlüklü moleküler haritalamada ve ilgilenilen genlerin positional clonlamalarında kullanılmaktadır. AFLP ayrıca bakteri, mantar ve bitki ve hayvanlardaki ökaryotik patojen karakterizasyonunda önemli bir kullanım alanına sahiptir. Ek olarak modifiye edilerek cDNA parmak izi analizlerinde de kullanılabilir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Bitki Materyali

Bu çalışmada genetik materyal olarak Precoz X WA8649041 ebeveynleri ve bu ebeveynlerin melezlenmesinden oluşan, F₂'den F₇'ye tek tohum dölü (Single-seed descent) yöntemiyle homozigotlaştırılan, 101 adet RIL (Recombinant Inbreed Line) mercimek popülasyonu kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan mercimek tohumları Washington State University, Pullman, WA, USA'dan elde edilmiştir. Ebeveynler ve 101 adet RIL popülasyonu tohumları, içinde torf ve perlit karışımı olan strafor viyollere ekilmiştir. Bitkiler yaklaşık 10-15 cm boyuna geldiğinde genç yapraklar hasat edilmiştir. Hasat edilen yapraklar DNA izolasyonu yapılana kadar sıvı azotla muamele edilip, üzerlerine numaralandırılmaları yapılan alüminyum folyalarda -80 °C derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2 DNA İzolasyonu

Ebeveynler ve 101 RIL popülasyonu bireyine ait genç yapraklardan, modifiye edilen Doyle ve Doyle'nin (1990) CTAB-PVP protokolü kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Sıvı azota konmuş yapraklar (yaklaşık 150 mg), 2 ml'lik tüplere alınmış ve TissueLyser (Teknogen Co., İzmir, Türkiye) cihazı kullanılarak parçalanmıştır. Parçalama işleminden sonra aşağıda listelenmiş olan işlem basamakları uygulanmıştır;

- Tüplere 0,9 ml CTAB tampon çözeltisi (100 mM Tris-HCl, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, %2 CTAB, %2 PVP, %0.1 Na₂S₂O₅) ilave edilerek 65°C su banyosunda 1 saat boyunca her 10 dakikada bir karıştırılarak bekletilmiştir.
- Su banyosundan sonra örnekler oda sıcaklığında 5-10 dk bekletilmiş ve üzerine 0,9 ml kloroform: isoamyl alkol (24:1) ilave edilmiştir.
- İçerisinde kloroform-isoamyl alkol bulunan tüpler, 15 dk boyunca sürekli ve yavaşça karıştırıldıktan sonra 14000 rpm'de 15 dk süre ile santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj edilen örneklerin üst fazları alınarak (yaklaşık 0,75 ml) yeni bir tüpe aktarılmış ve içerisine soğuk (-20°C'de bekletilmiş) isopropanol (0,5 ml) eklenerek, yavaşça çalkalanıp DNA'nın çökmesi sağlanmıştır.

- İsoopropanol ve DNA bulunan tüpler 5000 rpm’de 30 saniye santrifüj edildikten sonra tüp içerisindeki üst faz dökülmüş ve tüpün içerisine 10 mM amonyum asetat bulunan %76’lık etanolden 1 ml ilave edilip 15 dk boyunca çalkalanmıştır. Bu işlem sonucunda yıkanan DNA, 2000 rpm’de 30 saniye santrifüj edildikten sonra üst faz dökülmüş ve DNA 1 gün süreyle kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan DNA ultra saf su eklenerek çözdürülmüştür.

İzole edilmiş DNA’lar daha sonra markör analizlerinde kullanılmak üzere -80 °C derin dondurucuda saklanmıştır.

3.3 DNA Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi

İzole edilen DNA miktarı (konsantrasyonu) A260 ve A280 O.D. (Optical density)’de ölçüm yapılarak Nanodrop Spectrophotometer (ND1000) cihazında belirlenmiştir. Örnek DNA’larının saflığının belirlenmesi için, DNA’lar 1X TAE (Tris-Asetat-EDTA) tampon içerisinde % 1’lik agaroz jelle yüklenerek 60 V gerilimde 1 saat yürütülmüştür. Daha sonra görüntüleme işlemi için, agaroz jel 5 µl EtBr (Etidyum Bromid) / 100 ml saf su içinde 20 dakika yavaşça karıştırılarak boyanmıştır. Sonrasında saf su ile durulanan jel G-box SYNGENE görüntüleme sistemi ile UltraViyole (UV) ışık altında görüntülenmiştir.

3.4 DArT-Seq Analizi ile Genotipleme

SNP markör genotiplendirmesi amacıyla, GBS analizi yapmak için DarT-Seq sekanslama metodu (Raman et al., 2014) kullanılmıştır. Her bir RIL popülasyonu bireyi ve iki ebeveyne ait DNA’lar *PstI-MseI* enzimleri ile kesilmiş ve enzime uyumlu adaptör ligasyonu yapılmıştır. *PstI-MseI* fragment sayısını artırmak için aşağıda numaralandırılarak basamakları açıklanan PCR reaksiyonu yapılmıştır:

1. 94°C’de 1 dak.-30 döngü
2. 94°C’de 20 sn.-29 döngü
3. ramp 2.4°/dak. 58 °C’ye kadar
4. 58 °C’de 30 dak.
5. ramp 2.4°C/dak. 72 °C’ye kadar
6. 72 °C’de 45 dak.
7. 72 °C’de 7 dak.
8. 10 °C’de bekleme.

PCR sonrasında her bir örnekten alınan eşit miktarda amplifikasyon ürünü Illumina c-Bot (Cluster Station)'a yüklenerek köprü (bridge) PCR yapılmış ve tüm amplifikasyon ürünlerinin sekanslaması HiSeq2000 (Illumina, San Diego, USA) ile yapılmıştır. Tüm ampikonların sekanslaması tek bir şeritte yapılmaktadır. Tek bir okuma 77 PCR döngüsü ile gerçekleştirilmiştir. Her bir şeritten geliştirilen sekanslar DArT analytical pipeline kullanılarak analiz edilmiştir. Öncelikle oluşturulan FASTQ dosyasından düşük kalitedeki sekanslar uzaklaştırılmıştır. Diğer bölgelere göre barkod içeren bölgelere daha katı seçim kriterleri ($\geq$ Phred pass score of 30) uygulanmıştır. Böylece barkod split stepte spesifik örneklerde assignment esnasında daha güvenilir sonuçlar elde edilmiştir. SNP markör çağrılmasında barkod/örnek başına yaklaşık 2,000,00 sekans tanımlanmış ve kullanılmıştır. İdentikal sekanslar fastqcall dosyasında toplanmıştır. Bu dosya DArT P/L's proprietary SNP ve presence/absence markör (PAM) calling algorithms (DArTsoftseq) için ikincil pipeline için kullanılmıştır. Analitik pipeline sekans datasını proses etmiştir. DArT-Seq markörlere ait tüm polimorfik sekanslar, RIL popülasyonu ebeveynlerinden geliştirilmiştir ve RIL popülasyonu bireylerine uygulanmıştır.

3.5 SNP Markör Analiz Sonuçlarının Skorlanması

Agaroz jel elektroforez işlemi sonucunda elde edilen görüntüler, çalışmada kullanılan SNP primerlerin göstermiş olduğu polimorfik bantlar açısından değerlendirilmiştir. Polimorfik bandı bulunduran ebeveyn (ab), polimorfik bandı bulundurmeyen ebeveyn (aa) ve RIL popülasyonu bireylerinde de polimorfik bandı bulunduranlar (ab), bulundurmeyenler (aa) olarak skorlanmıştır. Elde edilen veriler haritalamada kullanılmak üzere, Microsoft Office Excel dosyasına kayıt edilmiştir.

3.6 AFLP Markör Analizi

3.6.1 Genomik DNA'nın restriksiyon enzimlerle kesilmesi

AFLP analizi için genomik DNA, EcoRI (6 bp lık tanıma bölgesi) ve MseI (4 bp'lık tanıma bölgesi) restriksiyon enzim karışımı ile kesilmiştir. EcoRI her 2 – 2.5 kb'de bir, MseI 300- 400 bp'de bir genomik DNA'yı keser. Her bir RIL popülasyonu ve 2 ebeveyne ait DNA'lar reaksiyon tüplerine alınır ve içerisine Çizelge 3.2'de yer alan enzim kesim miksi eklenir. Kesim işlemi PTC-225 Peltier

Thermal Cycler cihazında 37°C’de 2 saat, 70 °C’de 15 dakika’lık bir reaksiyon sonucunda gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. Genomik DNA’nın restriksiyon enzimleri kesilmesi için kullanılan reaksiyon miksi

Bileşen	Miktar
5X Reaksiyon Tamponu	2.5 µl
EcoRI/MseI Enzim Karışımı	1 µl
Up su	4 µl
DNA (40 ng/ µl)	5 µl
Toplam Hacim	12.5 µl

3.6.2 Adaptörlerin ligasyonu

Çizelge 3.2’te adaptör ligasyonu için kullanılan reaksiyon miksi içeriği verilmiştir. Ligasyon işlemi için DNA ve reaksiyon miksi içeren tüpler 20°C’de 2 saat bekletilmiştir.

Çizelge 3.2. Adaptör ligasyonu için kullanılan reaksiyon miksi

Bileşen	Miktar
Restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA	12.5 µl
Adaptör Karışımı	12 µl
T4 DNA Ligaz	0.5 µl
Toplam Hacim	25 µl

Adaptör ligasyonu sonucu elde edilen örneklere AFLP analizinde bir sonraki basamak olan pre-amplifikasyonda kullanılmak üzere, TE tampon çözeltisi ile 1:10 oranında seyreltme yapılmıştır.

3.6.3 Pre- amplifikasyon

Çizelge 3.3’te pre-amplifikasyon işleminde her bir örnek için kullanılan karışım içeriği ve miktarlarını içermektedir. Pre-amplifikasyon işlemi PTC–225 Peltier Thermal Cycler cihazında aşağıda yer alan PCR reaksiyonu sonucunda gerçekleştirilmiştir.

Pre- amplifikasyon thermal cyclers programı:

94°C 30 s.	} 20 döngü
56°C 1 dak.	
72°C 1 dak.	
4°C ∞	

Çizelge 3.3. pre-amplifikasyon için kullanılan reaksiyon miksi

Bileşen	Miktar
1:10 seyreltilmiş Ligasyon ürünleri	2.5 µl
AFLP 10X Pre-amplifikasyon Primer karışımı	20 µl
PCR Reaksiyon tamponu	2.5 µl
Taq DNA polimeraz (5 unit/µl)	0.5
Toplam Hacim	25.5 µl

AFLP analizlerinde polimorfizm tespitinin gerçekleştirildiği selektif amplifikasyonda pre-amplifikasyon ürünleri kullanıldığından pre-amplifikasyon ürünleri % 1.2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir.

3.6.4 Selektif amplifikasyon

Selektif amplifikasyonda 1:40 oranında seyreltilen pre-amplifikasyon ürünleri kullanılmıştır. Pre-amplifikasyon ürünleri ile farklı kombinasyonlarda primerlerle PCR reaksiyonları yapılmıştır. Seleksiyon EcoRI primerleri IRD'ye 700 ve IRD'ye 800 floresan boya ile işaretlenmesi sonucunda gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.4'te selektif PCR'da kullanılan taq DNA polimeraz karışımının bileşenleri verilmiştir. Selektif amplifikasyonda her bir örnek için kullanılan miks içeriği ve miktarları Çizelge 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Taq DNA polimeraz karışımı

Bileşen	Miktar
Ultra saf su	158 µl
10X Amplifikasyon Tamponu	40 µl
Taq DNA polimeraz (Roche) (0.5unit/µl)	2 µl
Toplam Hacim	200 µl

Çizelge 3.5. Selektif amplifikasyon PCR miksi (1X Kokteyl için)

Bileşen	Miktar
Taq DNA polimeraz karışımı	6 µl
1:40 Seyreltme işlemi yapılmış pre-amplifiye DNA	2 µl
MseI (1pmol)	2 µl
EcoRI (IRD'ye 700) (2 pmol)	1 µl
EcoRI (IRD'ye 800) (2 pmol)	1 µl
Toplam Hacim	12 µl

AFLP analizinde 25 adet primer kombinasyonu denenerek aralarından polimorfik olan 6 primer kombinasyonu seçilmiş ve polimorfik primerler 103 adet mercimek genotipi için analiz edilmiştir. Çizelge 3.6'da çalışmada kullanılan primer kombinasyonları listelenmiştir. Primer kombinasyonlarının yanında yer alan (700) ve (800) açıklamaları, primerlerin 700-800 nm dalga boylarının absorbe edildiği florasın boyalarla işaretlendiğini belirtmektedir.

Çizelge 3.6. AFLP primer kombinasyonları

Primer Kombinasyonu
M-CAT/E-ACC (700)
M-CAT/E-AGT (800)
M-CTT/E-ACA (700)
M-CTT/E-AGC (800)
M-CTT/E-AGT (800)
M-CTT/E-AAC (700)
M-CTT/E-ACT (800)
M-CTT/E-ACC (700)
M-CTT/E-AAG (700)
M-CAG/E-ACA (700)
M-CAG/E-ACT (800)

Selektif amplifikasyon PCR, PTC-225 Peltier Thermal Cycler cihazında Çizelge 3.7'de belirtildiği gibi programlanmıştır.

Çizelge 3.7. Selektif amplifikasyonu için PCR reaksiyon basamakları, süresi ve sıcaklıkları

Reaksiyon Basamağı	Reaksiyon Sıcaklığı	Reaksiyon Süresi
1	94°C	30 sn.
2	65°C	30 sn.
3	72°C	1 dk.
4	94°C	30 sn.
5	65°C	30 sn.
6	72°C	1 dk.
7	94°C	30 sn.
8-42	65°C'den 56°C'ye kadar her bir basamakta 7°C'lik sıcaklık düşüşü ile 5, 6 ve 7. basamaklar tekrarlanır.	
43	40 numaralı basamak 23 kez tekrarlanır.	
44	4°C	∞

3.6.5 Poliakrilamid jel elektroforezi

AFLP markör analizlerinde elektroforez için LICOR/Biosciences, NEN Model 4300, DNA Analyzer cihazı kullanılmıştır. Örnekler 1X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponu ile doldurulmuş tank içine yerleştirilmiş olan polimerize %8'lik poliakrilamid jelde görüntülenmiştir. Örnekler jel kuyucuklarına yüklenmeden önce 1200V, 35 mA, 25 W 45°C'de 15 dk ön ısıtma (pre-run) işlemi yapılmıştır. Jele yüklenecek olan selektif PCR ürünlerine 5 µl Blue Stop Çözeltisi ilave edilerek 94°C'de 3 dk denatürasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu aşamadan sonra jele yükleme yapılana kadar florasen boya ile boyanmış olan PCR ürünleri karanlıkta ve buzda bekletilmişlerdir. Denatüre olan, blue stop çözeltisi ile boyanan selektif PCR ürünleri ve 700-800 IRD ile işaretli markör (50-350 bp) jele yüklenmiştir. LICOR cihazında 1200V, 35 mA, 25 W 45°C elektroforez koşullarında 300 dk yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.6.6 AFLP markör analiz sonuçlarının skorlanması

LICOR cihazında elde edilen görüntüler, çalışmada kullanılan AFLP primerlerin göstermiş olduğu polimorfik bantlar açısından değerlendirilmiştir. Polimorfik bandı bulunduran ebeveyn (ab), polimorfik bandı bulundurmeyen ebeveyn (aa) ve RIL popülasyonu bireylerinde de polimorfik bandı bulunduranlar (ab), bulundurmeyenler (aa) olarak skorlanmıştır. Edilen veriler haritalamada kullanılmak üzere, Microsoft Office Excel dosyasına kayıt edilmiştir.

3.7 Bağlantı (Linkage) Haritasının Oluşturulması

Toplamda 400 SNP ve 162 AFLP markörü JoinMap4.0 (Ooijen, 2006) ile bağlantı haritası oluşturmak için kullanılmıştır. Markörler ab x aa ve aa x ab olarak skorlanmıştır.

ab x aa: WA8649041'de bant vermektedir.

aa x ab: Precoz'da bant vermektedir.

Linkage analizleri, JoinMap4.0 programında rekombinasyon frekanslarını harita uzaklıklarına çevirmek için Kosambi haritalama fonksiyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Kosambi, 1944). Bağlantı grupları, tespit limiti (LOD) değeri 1'er artan değerle 2.0 ile 10.0 arasında, "rekombinasyon frekansı" eşik 0.50, "ripple value" eşik 1.0, "jump threshold" 3.0 alınarak oluşturulmuştur. Bu çalışmada oluşturulan bağlantı grupları MAPCHART 2.2 for Windows (Voorrips, 2002) kullanılarak yapılmıştır.

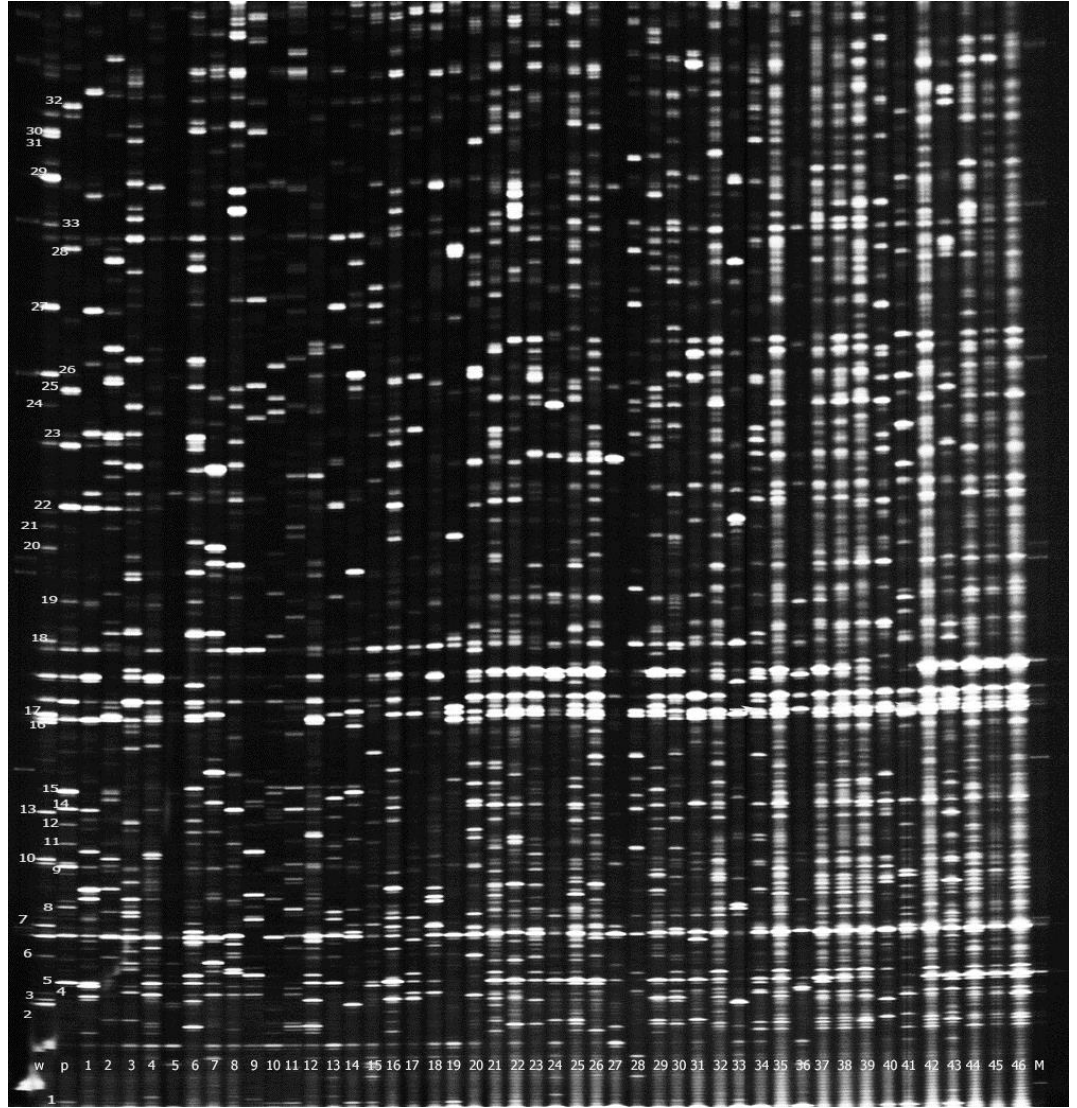
4. BULGULAR

4.1 SNP Markör Analizi

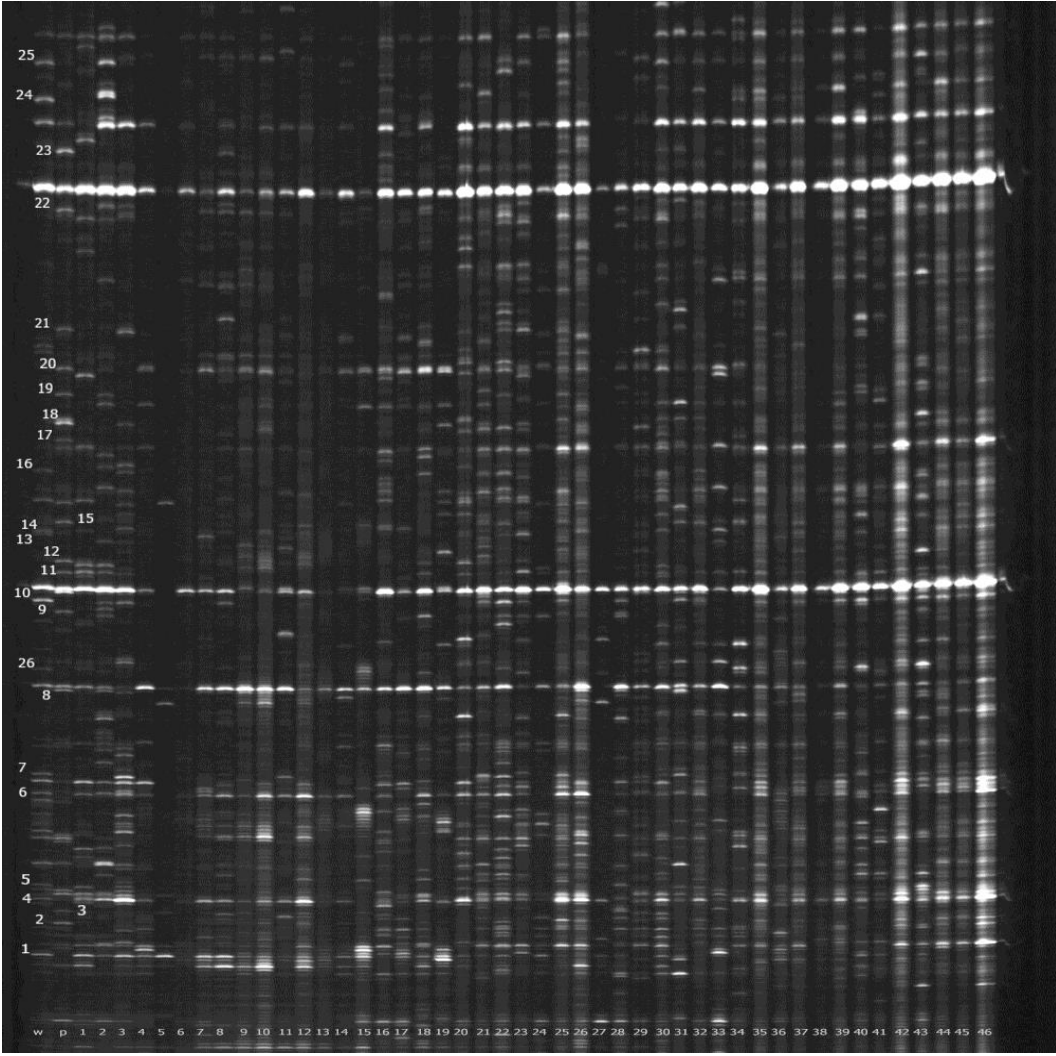
Ebeveynler (Precoz ve WA864904) ve 101 RIL mercimek popülasyonunda SNP markör analizi, DArT-seq sekanslama metodu (Raman et al., 2014) ile tespit edilen SNP markörler ile yapılmıştır. DArT-seq sekanslama analizi sonucunda elde edilen sekans verisinden, SNP markörler DArTsoftseq algoritması kullanılarak çağrılmıştır. Toplam 7758 SNP markör tespit edilmiştir. Bu SNP'lerden 1070 tanesinin skorlaması yapılamamıştır. Skorlaması yapılan toplam 6688 SNP markörden, bu tez çalışmasında ilk 400 SNP markör haritalamada kullanılmıştır. SNP markörlardan 307 tanesi ($\sim$ %77) linkage gruplar üzerinde yer almış, 93 tanesi ($\sim$ %23) bağlantı haritasında yer almamıştır.

4.2 AFLP Markör Analizi Sonuçları

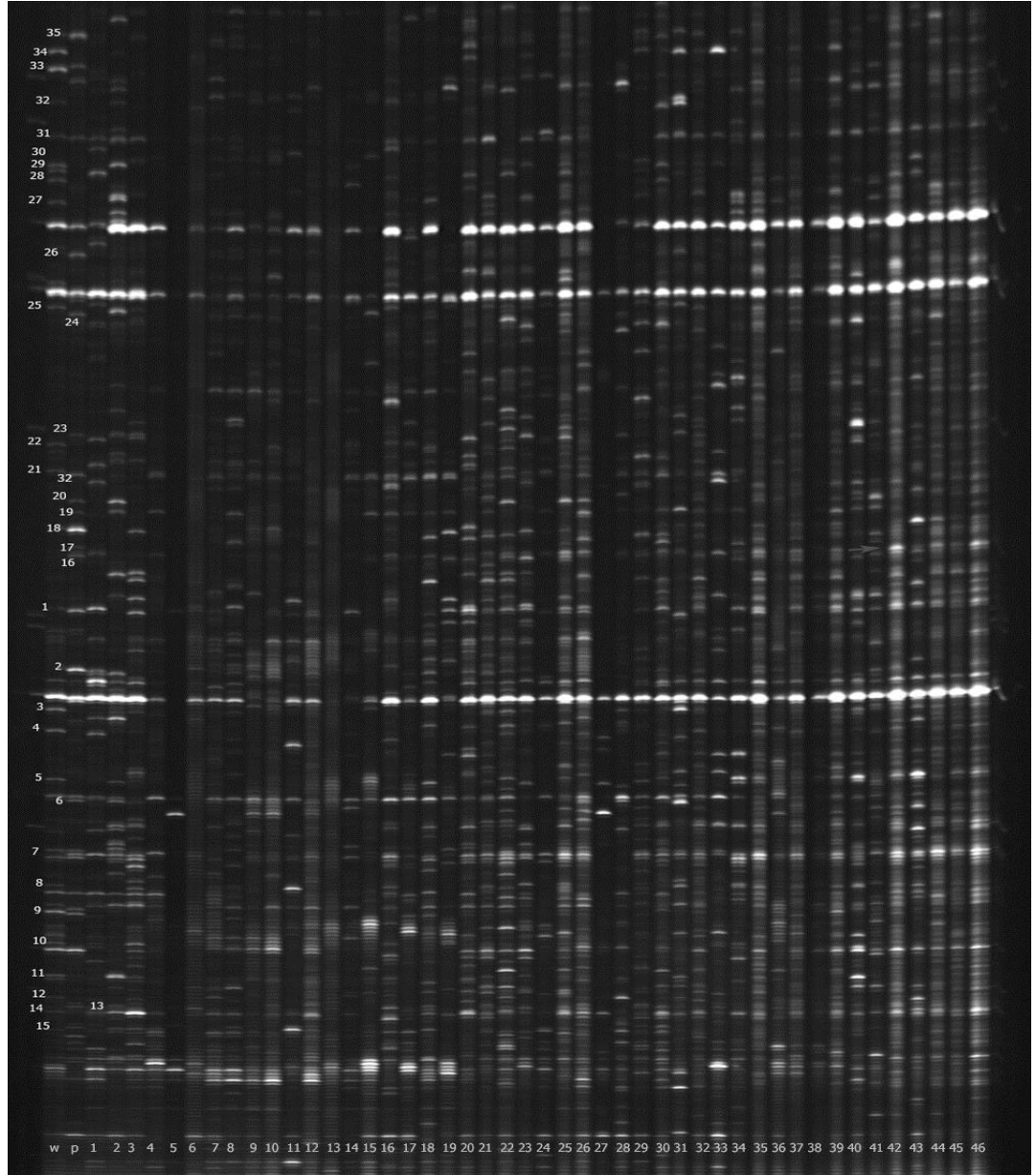
Çalışmada RIL popülasyonu ve ebeveynlerinde, her biri iki farklı (700 ve 800 florasan işaretli) AFLP primerinden oluşan toplam 25 adet AFLP markör kombinasyonu ile analiz yapılmıştır. Oluşturulan 25 AFLP kombinasyonundan 6 tanesinin PCR ve LICOR jel sonuçları skorlaması yapılmış ve oluşturulan bağlantı haritasında yerleri saptanmıştır. Skorlanan 6 AFLP kombinasyonuna ait 12 adet işaretli AFLP primerinden toplam 194 polimorfik bant elde edilmiştir. Şekil 4.5'te M-CTT/E-AAG (700) AFLP primerinin LICOR cihazında poliakrilamid jel görüntüsü yer almaktadır. Jel görüntüsünden soldan sağa 1 ile 46 ile numaralandırılan kuyucuklar RIL popülasyonu bireylerine aittir. Popülasyonun diğer 55 bireyi, jele yükleme yapılırken kuyucuk oluşturmada kullanılan tarağın kapasitesinden dolayı 2 farklı jelde görüntülenmiştir. Aşağıdan yukarıya 1 ile 33 arasındaki numaralar ise ebeveynlerde polimorfizm gösteren ve skorlaması yapılan bantları göstermektedir. Bu primere ait toplam 33 polimorfik bant tespit edilmiş ve skorlaması yapılmıştır. Şekil 5, 6 ve 7'de sırasıyla M-CTT/E-ACC (700) ve M-CTT/E-ACC (800) primer kombinasyonları poliakrilamid jel elektroforezi görüntüleri verilmiştir. M-CTT/E-ACC (700) ve M-CTT/E-ACC (800) primerlerinde sırasıyla 26 ve 35 adet polimorfik bant tespit edilmiş ve skorlamaları yapılmıştır.



Şekil 4.1. M-CTT/E-AAG (700) primer kombinasyonu, ebeveyn ve 1-46 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü. W; WA8649041, P; Precoz, M; Markör.



Şekil 4.2. M-CTT/E-ACC (700) primer kombinasyonu, ebeveyn ve 1-46 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü.



Şekil 4.3. M-CTT/E-ACC (800) primer kombinasyonu, ebeveyn ve 1-46 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü.

4.3 Bağlantı Haritasının Oluşturulması

WA8649041 x Precoz ebeveynlerinin melezlenmesinden oluşan ve F_2 'den F_7 'ye homozigotlaşmaya kadar tek tohum dölü yöntemiyle oluşturulan 101 adet RIL bireyi kullanılarak genetik bağlantı haritası oluşturulmuştur. Bağlantı haritalaması oluşturmak amacıyla bu çalışmada 400 tane SNP ve 162 tane AFLP markörünün skorlanması yapılmıştır. Ancak linkage haritalama için kullanılan JoinMap4.0 programına skrolama sonuçları girildiğinde, AFLP markörlerinden bazıları distortion göstermiş ve haritalama için kullanılan Excel dosyasından linkage haritalama yapabilmek için bu markörler çıkarılmıştır. Bu eleme sırasında AFLP markörlerin %67'si elenmiş ve haritalama programında kullanılamamıştır. Sonuçta linkage haritalama toplam 400 SNP ve 54 AFLP markörü ile yapılmıştır. Elde edilen 454 polimorfik markörden 321 tanesi (%71) harita üzerinde yer alırken, 133 tanesi (%29) haritalanamamıştır. Haritalanamayan markörlerin büyük çoğunluğunu AFLP markörler oluşturmaktadır. Çalışılan 162 polimorfik AFLP markörünün %9'u haritada yer alabilmiştir. SNP markörlerin ise %77'si linkage bağlantı grupları üzerinde yer almıştır.

Çalışmada mercimek popülasyonunda yapılan bağlantı haritalaması sonucunda 9 farklı bağlantı grubu (Linkage Grup-LG) elde edilmiştir. Oluşturulan mercimek bağlantı haritasının uzunluğu 413 cM'dır. Elde edilen bağlantı gruplarındaki ortalama markör yoğunluğu ise 0.9 cM'da 1 markör şeklindedir. Elde edilen 9 farklı bağlantı grubunun uzunlukları 16,9 cM ile 73,8 cM arasında değişmektedir. Haritalama sonucunda oluşturulan ortalama bağlantı grubu uzunluğu 45,9 cM'dur. Bağlantı grubu başına düşen ortalama markör sayısı ise 37'dir.

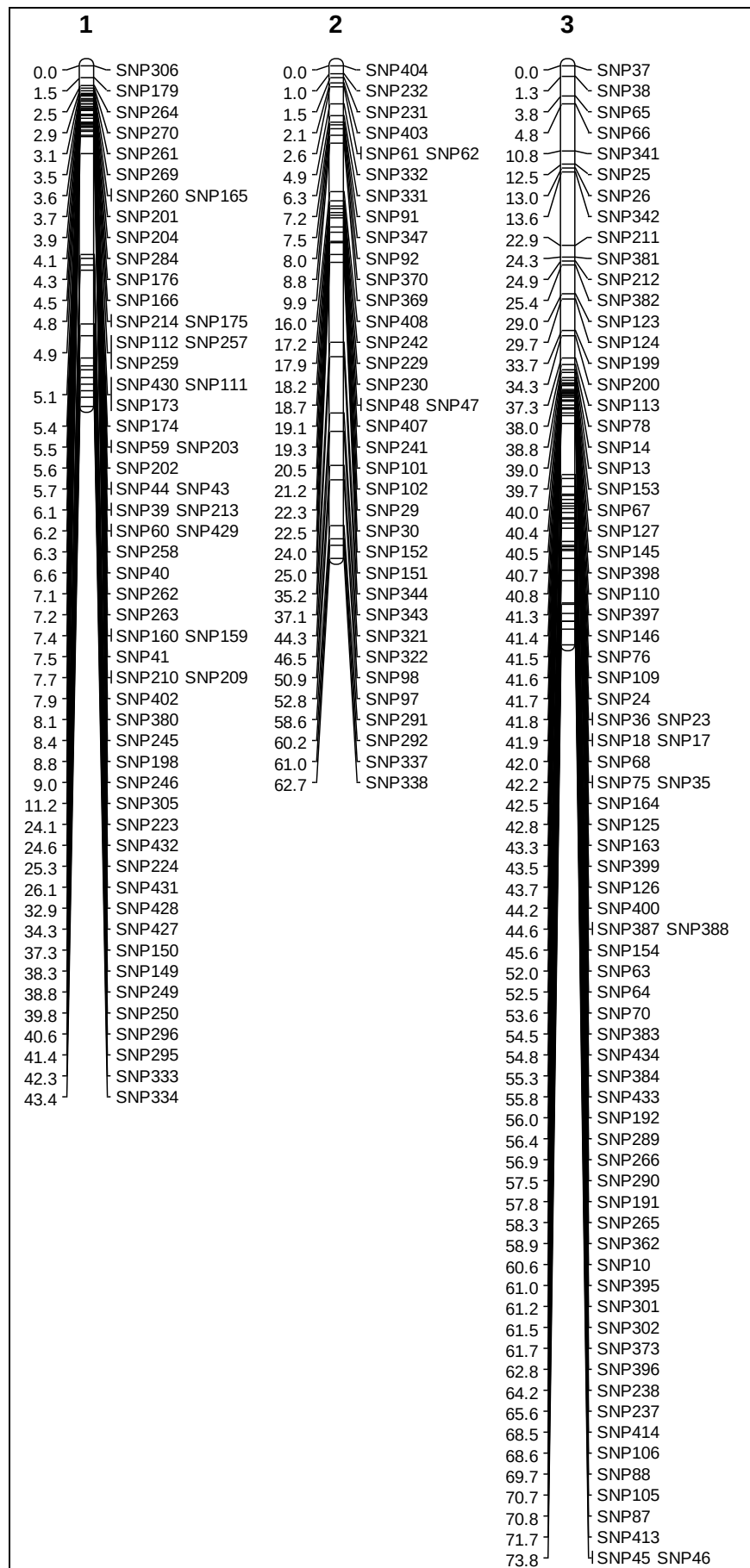
SNP markörler elde edilen 9 bağlantı grubundan 8'i üzerinde (LG1, LG2, LG3, LG5, LG6, LG7, LG8 ve LG9) dağılım göstermiştir. Bunun yanında AFLP markörler ise yalnızca bir bağlantı grubunda (LG4) toplu bir şekilde haritalanmışlardır.

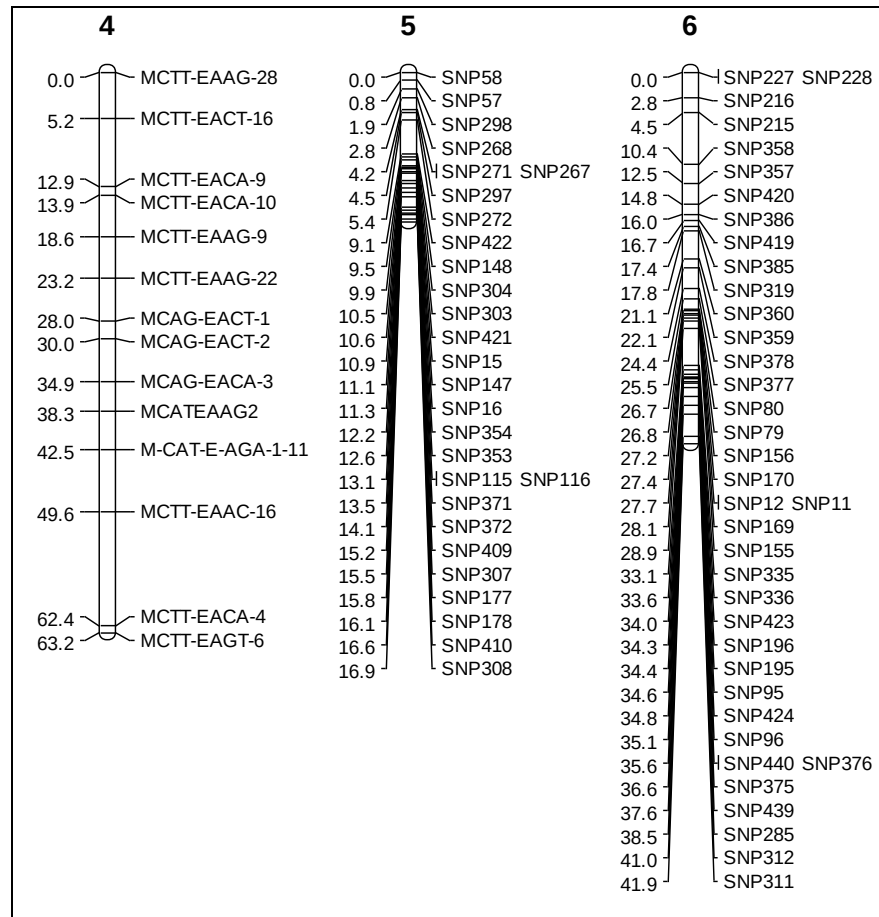
WA8649041 x Precoz ebeveynlerinin melezlenmesi sonucu oluşturulan RIL haritalama popülasyonundan elde edilen yoğun (dense) genetik haritanın içerdiği linkage gruplar Şekil 4.8'de görülmektedir. Çizelge 4.4'te ise her bir linkage grubunun toplam uzunluğu, markör sayısı ve ortalama markör yoğunluğunu içeren veriler listelenmiştir.

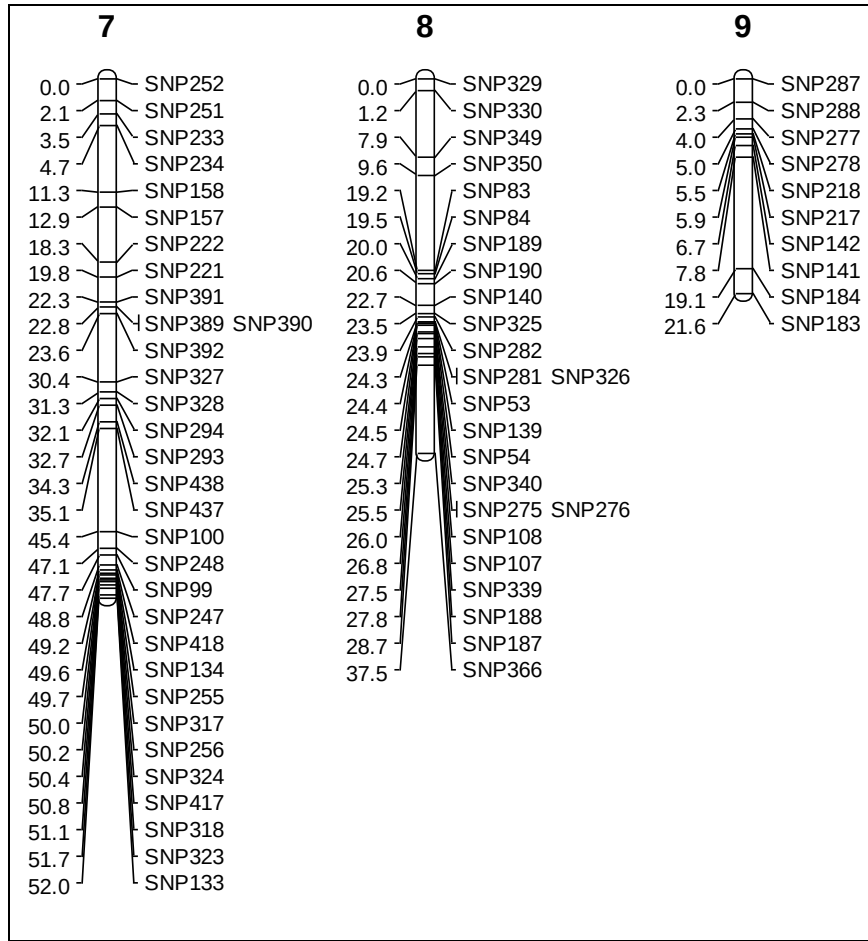
Çizelge 4.1'den görüldüğü üzere 3 numaralı bağlantı grubu 77 markör sayısı ile en fazla markörün yer aldığı bağlantı grubudur. Tüm AFLP markörlerinin yerleştiği 9 numaralı bağlantı grubu ise 10 markör sayısı ile en az sayıda markörün yer aldığı bağlantı grubudur. Markör yoğunluğunun en fazla olduğu linkage grubu 0,7 cM ortalama markör yoğunluğuna sahip olan 1 numaralı bağlantı grubudur. Sadece AFLP markörlerinin yerleşmiş olduğu 4 numaralı bağlantı grubu 4,5 cM ortalama markör yoğunluğuna sahip olup markör yoğunluğu en az olan gruptur.

Çizelge 4.1. WA8649041 x Precoz'dan oluşturulan RIL popülasyonu bağlantı haritası istatistiksel verileri

Linkage Grup	Toplam markör sayısı ve tipi	LG'un uzunluğu (cM)	Ortala markör yoğunluğu (cM)
1	60 (SNP)	43,4	0,7
2	37 (SNP)	62,7	1,6
3	77 (SNP)	73,8	0,9
4	14 (AFLP)	63,2	4,5
5	28 (SNP)	16,9	0,6
6	38 (SNP)	41,9	1,1
7	32 (SNP)	52	1,6
8	25 (SNP)	37,5	1,5
9	10 (SNP)	21,6	2,1







Şekil 4.4. WA8649041 x Precoz ebeveynlerinin melezlenmesi sonucu oluşturulan RIL haritalama popülasyonundan elde edilen genetik haritanın içerdiği bağlantı grupları (1-9).

5. TARTIŞMA

Mercimek (*Lens culinaris* Medik.) dünyada en çok yetiştirilen baklagiller arasında beşinci sırada yer almaktadır. Yetmişin üzerinde ülkede üretimi yapılan mercimek yüz yirminin üzerinde ülkede tüketilmektedir. İyi bir protein, karbonhidrat ve vitamin kaynağı olan mercimek, ayrıca doğada azot fiksasyonunda rol almaktadır. Bu özellikleri dolayısıyla mercimek genomik açıdan bakıldığında çalışılması öncelikli baklagiller arasında gelmektedir. Ancak iklimsel değişiklere adaptasyon kısıtlamalarından dolayı üretimi az yapılan mercimek, pahalı sekans teknolojileri ve büyük genoma (~4 Gbp) sahip olması nedeniyle araştırmacılar tarafından fazla çalışılmamıştır (Sharpe et al., 2013). Mercimek üretiminin yapıldığı ülkelerin çoğunda, günümüzde abiyotik ve biyotik stres faktörleri ile karşı karşıya gelmektedir. Dolayısıyla mercimek üretiminde kısıtlamalara sebep olan stres faktörlerine karşı dayanıklı çeşitleri geliştirmek birincil derecede öneme sahiptir. Yakın geçmişe kadar mercimek ıslahçıları rekombinant bireyleri seçmek ve istenilen karakterlere sahip çeşit geliştirmek için klasik bitki ıslahı tekniklerini kullanmışlardır. Ancak bu teknikler tek gen ile kontrol edilen karakterleri seçmede kolaylık sağlarken, çoklu gen bölgeleri tarafından kontrol edilen karakterlerin seçiminde kısıtlamalara ve özellikle de doğruluğu daha az sonuçlara sebebiyet vermektedir. Ekonomik öneme sahip olan karakterlerin büyük çoğunluğu çoklu gen bölgeleri (QTL-Quantitative Trait Locus) tarafından kontrol edilmekte ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Dolayısıyla bu karakterlerin seçiminde klasik ıslah çalışmaları yetersiz kalmakta ve marköre dayalı seleksiyon (MAS-Marker Assisted Selection) tekniklerine ihtiyaç duyulmaktadır (Kumar et al., 2015).

Mercimek genomik çalışmaları, nohut, soya fasulyesi ve fasulye gibi diğer baklagiller ile kıyaslandığında daha yavaş ilerlemektedir (Kumar et al., 2014). Mercimek bitkisinin geliştirilmesi için yapılan genomik çalışmalarda, mercimeğin büyük genom boyutu karşılaşılan temel zorluklardandır. Mercimek 4,063 Mbp büyüklüğünde genoma sahipken, örneğin nohutun genom büyüklüğü 740 Mbp'dir (Kaur et al., 2013).

İlk mercimek genetik haritası morfolojik markörler kullanılarak 1980'lerin başında yapılmıştır (Kumar et al., 2015). Daha sonra moleküler markörlerin keşfedilmesiyle birlikte ilk genetik bağlantı haritası, (1989)'da Havey ve Muehlbauer tarafından, RFLP markörler kullanılarak yapılmıştır. Başka bir çalışma 86 RIL mercimek hattında, 177 markör (89 RAPD, 79 AFLP, 6 RFLP ve

3 morfolojik markör) kullanılarak yapılmıştır. Toplam 7 tane bağlantı grubunun oluşturulduğu bu çalışmada, elde edilen harita mercimek genomunun 1073 cM'nunu kapsamış ve komşu iki markör arasındaki ortalama uzaklık 6.0 cM olmuştur. Toplamda 79 AFLP markör bağlantı gruplarında yer alırken 21 AFLP marköre bağlantı gruplarında yer almamıştır. Çalışmada kullanılan AFLP markörlerden PstI/MseI kombinasyonları (%15), EcoRI/MseI kombinasyonlarına göre (%15) daha fazla polimorfizm göstermiştir (Eujayl et al., 1998). Ford and Taylor (2003) tarafından intraspesifik F₂ popülasyonunda yapılan harita mercimek genomunun 784.1 cM'luk kısmını kapsamaktadır ve 9 farklı bağlantı grubu elde edilmiştir. Son yıllarda yapılan başka bir harita ise 207 (RAPDs, AFLPs ve ISSRs) markörden oluşan 12 bağlantı grubuna sahip ve 1868 cM'luk mercimek genomunu kapsamaktadır (Tullu et al., 2008). Tanyolaç et al., (2010)'da yaptıkları çalışmada, Precoz x WA8949041 ebeveynlerinden geliştirilen 94 RIL popülasyonu bireylerinde 166 markör ile bağlantı haritası oluşturmuşlardır. Bağlantı haritası 1396.3 cM'luk mercimek genomunu kapsamakta ve iki markör arasındaki ortalama uzaklık 8.4 cM olarak tespit edilmiştir. Çalışmada AFLP markörlerin büyük çoğunluğu LG1'de yerleşim göstermiştir. Bu tez çalışmasında da oluşturulan haritada da AFLP markörler bir bağlantı grubunda (LG4) toplu bir şekilde yerleşim göstermiştir.

Son yıllarda NGS teknolojilerinin ulaşılabilirliği, genom sekanslama, polimorfizm tespiti, gen ekspresyon ve popülasyon genotipleme analizlerinde NGS'nin kullanımını yaygınlaştırmıştır. Sekanslamanın hızlı ve daha ekonomik olması her genetik çalışmada kullanılmasını makul hale getirmiştir. Dolayısıyla NGS uygulamaları bitki genomik çalışmalarını ve bitki ıslah uygulamalarını kökten değiştirme potansiyeline sahiptir. NGS teknolojilerinde son dönemde kaydedilen hızlı gelişmeler SNP markörler ile genotipleme yapılarak oldukça yüksek çözünürlüklü bağlantı haritalarının elde edilmesine olanak sağlamaktadır. SNP markörler kullanılarak pek çok karakterin haritalaması yapılmıştır ve bu haritalar MAS ile mercimek ıslah programlarında kullanılabilir durumdadır. Ayrıca *Medicago truncatula* ve *Lotus japonicus* gibi model baklagiller ile yakın filogenetik ilişkili olması mercimek için karşılaştırmalı genom haritalaması ve ortolog genlerin tespitine imkan sağlamaktadır (Kumar et al., 2015).

Güncel bitki ıslah ve genomik çalışmalarında, NGS teknolojisinin potansiyelini kullanarak sekanslamaya dayalı genotipleme (sequence-based-genotyping) başlığında geliştirilmiş olan yeni metodlar kullanılmaktadır (RRL, RAD ve GBS) (Poland and Rife, 2012, Sonah et al., 2013). GBS her bir bireyden

eş zamanlı olarak milyonlarca kısa okumaları toplayan ve genom kompleksliğini RE (Restriksiyon Enzimler) ile azaltarak her bir lokusta sekans kapsamını geliştiren NGS tabanlı bir platformdur (Chen et al., 2013). GBS yüksek SNP kapsamı sunarak SNP analizlerinin etkinliğini artırmıştır (Sonah et al., 2013). Illumina NGS platformu için geliştirilen GBS yüksek düzeyde multipleks bir sistemdir (Elshire et al., 2011). Genetik analizler ve genotipleme için oldukça çok sayıda SNP geliştirebilen GBS; ekonomik maliyetli, daha az PCR ve pürifikasyon basamaklarına sahip, boyut ayırmamasına ve referans genoma ihtiyaç duymayan, ilaveten etkin barkodlamaya sahip ve artırma (scale up) işleminin kolay olduğu bir metoddur. Dolayısıyla bitkilerde genomik tabanlı ıslah çalışmalarında giderek önemli bir yer edinmektedir (He et al., 2014). Son yıllarda, GBS protokolü mısır ve arpada Elshire et al., tarafından (2011)'de çalışılmıştır. Bu çalışmada, RIL popülasyonunda mısırdaki 200,000 ve arpada 25,000 sekans etiketi (sequence tags) haritalanmıştır (Sonah et al., 2013).

Ham sekans datası elde edildikten sonra yapılan biyoinformatik analizler, doğruluğu yüksek düzeyde SNP genotiplemesi yapabilmek için oldukça önemlidir. Assembly kalitesi genellikle kontig uzunluğu (ortalama, minimum ve maksimum uzunluk, ya da assembly programına göre N50) ve assemblynin doğruluğundan (kontiglerin referans genomla ne kadar uyum gösterdiği) etkilenmektedir. Papanicolaou et al., (2009)'da yaptıkları çalışmada 6 (CAP3, MIRA, Newbler 2.3, Newbler 2.5, SeqMan, ve CLC) assemblyyi *de novo* koşullarında nematoda çalışarak karşılaştırmışlardır. Başka bir çalışma (Palmieri et al., 2009), 4 farklı organizmada *in silico* geliştirilen transkriptlerde yine 6 assembly (BLAT, SSAHA2, Bowtie, SeqMap, MAQ ve CLC) karşılaştırılmıştır. Sonuçlar göstermiştir ki okuma dizisi uzunluğu arttıkça doğruluk artmakta, bunun yanında genom heterozigotisi arttıkça yanlış haritalanan dizi okuma sayısı da artmaktadır (Shahin et al., 2012).

Yüksek oranda polimorfik, ko-dominant, kesin, tekrarlanabilir, yüksek çözünürlüklü, ekonomik ve yüksek düzeyde bilgi verici olan SNP markörler son yıllarda moleküler bitki ıslah çalışmalarında yaygın olarak tercih edilmektedirler (Lombardi et al., 2014). Bu tez çalışmasında her bir RIL popülasyonu bireyi ve iki ebeveyninde (Precoz ve WA8649041) DarT-Seq metodu kullanılarak 7758 tane SNP keşfedilmiştir. Keşfedilen SNP'lerin 6688 tenesi skorlanabilmiştir. Çalışmada keşfedilen SNP markör sayısı Kaur et al., (2013)'te yaptıkları çalışmaya kıyasla daha yüksektir. Bu çalışmada Kaur et al., 2011'de yapmış oldukları çalışmada elde ettikleri tüm kontigleri SNP tespiti için referans kabul

etmişler ve 2956 tane yüksek kalitede SNP markör tespit etmişlerdir. Çalışma sonucunda EST kaynaklı SSR ve SNP'lerden oluşan ve boron toksisitesine tolerans gösteren QTL'lere yakın markörlerin tespiti yapılmıştır. Bir önceki çalışmalarında ise 6 farklı mercimek genotipine ait cDNA örneklerinde 454 shotgun sekanslama yapılarak SSR (gene-based) tanımlaması yapmışlardır (Kaur et al., 2011).

Genomda yüksek oranda tekrarlanan bölgeler göz ardı edilip, kodlanan bölgelerde Illumina platformu ile *de novo* transkriptom sekanslama yapılarak SNP keşfi yapılmıştır. Illumina transkriptom sekanslama, model ve model olmayan bitki türlerinde başarılı sonuçlar vermektedir (Kaya et al., 2013). Çalışmada Illumina platformu, *de novo* transkriptom assembly için yüksek çözünürlüklü ve uygun okuma uzunluğunda data sağlaması sebebiyle tercih edilmiştir. Ayrıca, Illumina platformu ile elde edilen ~75 bp uzunluğundaki çok fazla sayıdaki okuma dizileri, model olmayan organizmalar için uygun kontig assemblysine olanak sağlamaktadır. Solexa/Illumina teknolojisinin 454/Roche teknolojisine göre yüksek kaliteli transkriptom assembly için daha uygun data ürettiği raporlanmıştır (Feldmeyer et al., 2011). Literatürde model olmayan bir türe ilk *de novo* assembly Solexa/Illumina kullanılarak Feldmeyer et al., tarafından (2011) yılında yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında NGS teknolojisi ile referans genoma sahip olmayan mercimekte yüksek çözünürlüklü SNP keşfi yapılmıştır. Çalışmada oldukça büyük genoma sahip olan ve genetik çalışmalarda model orgnizma olmayan mercimeğin, genom kompleksliği DArT sekanslama yapılarak aşılmıştır. Ayrıca keşfedilen SNP markörler ve AFLP markörler kullanılarak mercimek genomunun 9 bağlantı grubundan oluşan haritası oluşturulmuştur. Çalışmada Sharpe et al., (2013)'te yaptıkları çalışmada elde ettikleri bağlantı grup sayısından 2 fazla bağlantı grubu elde edilmiştir. Sharpe et al., (2013) 454 pyrosequencing ile 3'-cDNA transkript profiling yaparak, 2 yabani tür mercimek ve 9 mercimek genotipinde SNP keşfi yapmışlardır. CDC Redberry genotipi *de novo* assembly için referans genotip olarak belirlenmiştir. Toplam 50,146 arasından filtreleme yapılarak 27,921 kontig referans assembly için kullanılmıştır. Çalışmada 44,879 SNP keşfedilmiş ve SNP-SSR markörlerinden oluşan 7 farklı linkage gruba sahip RIL popülasyonuna ait harita oluşturulmuştur. Bu tez çalışmasında, iki komşu markör arasında ortalama uzaklık 0.9 cM olarak bulunmuştur. Bu değer Sharpe et al. (2013)'te yaptıkları çalışmada 1.53 cM olarak bulunmuştur. Yine bu tez çalışmasında elde edilen bağlantı haritası, toplam mercimek genomunun 413

cM'luk kısmını kapsarken, bu değer Sharpe et al. (2013)'te elde ettikleri bağlantı haritasında 834.7 cM'dır. Bu tez çalışmasında kullanılan markör sayısının (400 SNP ve 54 AFLP) Sharpe et al. (2013)'te yaptıkları çalışmaya kıyasla daha az sayıda olması bağlantı haritasının mercimek genomunun kapsadığı kısmının az olmasına sebep olmuştur. Bu tez çalışması sonucunda 9 bağlantı grubu elde edilmiştir. Sharpe et al. (2013)'te yaptıkları çalışmada 7 farklı bağlantı grubu elde etmişlerdir. Bu tez çalışmasındaki haritalamanın daha fazla sayıda markör ile yapılması elde edilen bağlantı grubu sayısının mercimek kromozom sayısına (7) eşitlenmesine olanak sağlayabilir.

Mercimekte yapılan başka bir çalışmada 2 tane 96-plex GBS kütüphanesi oluşturulmuş ve 266,356 genome-wide SNP tespit edilmiştir. Bu SNP'lerden 5,389 tanesi kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur (Wong et al., 2015). Pirinçte yapılan bir çalışmada 384-plex GBS protokol kullanılarak 176 RIL hattında 30,984 SNP tanımlanmış ve bu SNP'lerden 1,464 tanesinin 1. kromozomda olduğu tespit edilmiş ve aliminyum tolerans genlerinin (QTL) haritalanmasında kullanılmıştır (Spindel et al., 2013).

Mercimeğin tüm genomunun karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmalar hala devam etmektedir. Transkriptom assembly, SSR, SNP ve intron-targeted primerlerden (ITP) derived edilen EST'lerin tanımlanmasında oldukça etkilidir. Erken dönemde yapılan çalışmalarda cDNA kütüphanelerinin oluşturulması ve bunlardan EST'lerin geliştirilmesinde Sanger sekanslama metodu kullanılmıştır. NCBI verilerine göre 2015 Ocak ayı baz alındığında, mercimek için 10,341 EST kütüphanesine ulaşılabilir (Kumar, et., 2015).

Bu çalışmada mercimek genomunda GBS protokolü ile çok sayıda yüksek kalitede SNP markör keşfi yapılmıştır. Genotipleme yapılan SNP markörler ve AFLP markörlerden oluşan mercimek linkage haritası oluşturulmuştur. Çalışma sonucunda elde edilen SNP ve AFLP markörlerden oluşan bağlantı haritası, mercimek ıslahında MAS analizlerinde kullanılabilir niteliktedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R.F., et al.,** 1991, Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project, *Science*, 252:1651-1656pp.
- Arif, I.A., Bakir, M.A., Khan, H.A., Al Farhan A.H., et al.,** 2010, A brief review of molecular techniques to assess plant diversity, *International Journal of Molecular Sciences*'s.11: 2079-2096pp.
- Arumuganathan, K. and Earle, E.D.,** 1991, Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reports*. 9:208-218pp.
- Barulina, H.,** 1930, Lentils of the USSR and other countries, *Bull. Appl. Bot. Genet. Plant Breed.*40, 265–304pp.
- Berglund, E.C., Kiialainen, A. and Syvänen, A.C.,** 2011, Next-generation sequencing technologies and applications for human genetic history and forensics, *Investigative Genetics*, 15:2–23pp.
- Bermejo, C., Cravero, V.P., López Anido, F.S. and Cointry, E.L.,** 2010. Agronomic and molecular evaluation of recombinant inbred lines (RILs) of lentil, *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 2(9):280-285pp.
- Birk, Y.,** 1993, Protease inhibitors of plant origin and role of protease inhibitors in human nutrition. In *Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents*, edited by W. Troll & A. R. Kennedy, New York: Plenum Press. 97-106 pp.
- Bohra, A., Pandey, M.K., Jha, U.C., Singh, B., Singh, I.P., Datta, D., Chaturvedi, S.K., Nadarajan, N. and Varshney, R.K.,** 2014, Genomics-assisted breeding in four major pulse crops of developing countries: present status and prospects, *Theoretical Applied Genetics*, 127, 1263–1291pp.
- Bosmali, I., Ganopoulos, I., Madesis, P. and Tsaftaris, A.,** 2012, Microsatellite and DNA-barcode regions typing combined with high resolution melting (HRM) analysis for food forensic uses: a case study on lentils (*Lens culinaris*), *Food Research International*, 46, 141–147pp.
- Brookes, A.J.,** 1999, The esence of SNPs, *Gene* 234:177–186pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Carbonaro, D.A., Zhang, L., Jin, X., Montiel-Equihua, C., Geiger, S., Carmo, M., Cooper, A., Fairbanks, L., Kaufman, M.L., Sebire, N.J., Hollis, R.P., Blundell, M.P., Senadheera, S., Fu, P.Y., Sahaghian, A., Chan, R.Y., Wang, X., Cornetta, K., Thrasher, A.J., Kohn, D.B. and Gaspar, B.,** 2014, Preclinical demonstration of lentiviral vector-mediated correction of immunological and metabolic abnormalities in models of adenosine deaminase deficiency, *Molecular Therapy*, 22(3), 607–622pp.
- Chen, H., Xie, W., He, H., Yu, H., Chen, W., Li, J., Yu, R., Yao, Y., Zhang, W., He, Y., Tang, X., Zhou, F., Deng, X.W. and Zhang, Q.,** 2014, A high-density SNP genotyping array for rice biology and molecular breeding, *Mol Plant*, 7(3):541-553pp.
- Chen, Q., Ma, Y., Yang, Y., Chen, Z., Liao, R., Xie, X., Wang, Z., He, P., Tu, Y., Zhang, X., Yang, C., Yang, H., Yu, F., Zheng, Y., Zhang, Z., Wang, Q. and Pan, Y.,** 2013, Genotyping by Genome Reducing and Sequencing for Outbred Animals, *PLoS ONE* 8(7): e67500.
- Cho, R.J., Mindrinos, M., Richards, D.R., Sapolsky, R.J., Anderson. M., Drenkard, E., Dewdney, J., Reuber, T.L., Stammers, M., Federspiel, N., Theologis, A., Yang, W.H., Hubbell, E., Au, M., Chung, E.Y., Lashkari, D., Lemieux, B., Dean, C., Lipshutz, R.J., Ausubel, F.M., Davis, R.W. and Oefner, P.J.,** 1999, Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*, *Nat Genet*, 23, 203–207pp.
- Collard, B.C. and Mackill, D.J.,** 2008, Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 363, 557-572pp.
- Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B. and Pang, E.C.K.,** 2005, An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts, *Euphytica*, 142, 169-196pp.
- Crossa, J., Beyene, Y., Kassa, S., Pérez, P., Hickey, J.M., Chen, C., Campos, G. de los, Burgueño, J., Windhausen, V.S. Ed. Buckler, Jean-Luc Jannink, Lopez Cruz, M.A. and Babu, R.,** 2013, Genomic Prediction in Maize Breeding Populations with Genotyping-by-Sequencing, *G3 (Bethesda)*. 3(11): 1903–1926pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Çokkızgın, A. and Shtaya, M.J.Y.**, 2013, Lentil: Origin, Cultivation Techniques, Utilization and Advances in Transformation, Agricultural Science, 1, 55-62pp.
- Deschamps, S. and Campbell, M.A.**, 2010, Utilization of next-generation sequencing platforms in plant genomics and genetic variant discovery, Molecular Breeding, 25: 553–570pp.
- Deschamps, S., Llaca, V. and May, G.D.**, 2012, Genotyping-by-Sequencing in Plants, Biology, 1(3), 460-483pp.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L.**, 1990, Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12:13-15pp.
- Duran, C., Appleby, N., Edwards, D. and Batley, J.**, 2009, Molecular Genetic Markers: Discovery, Applications, Data Storage and Visualisation, Current Bioinformatics, 4, 16-27pp.
- Duran, C., Appleby, N., Vardy, M., Imelfort, M. and Edwards, D.**, 2009, Single nucleotide polymorphism discovery in barley using autoSNPdb, Plant Biotechnol Journal, 7: 326–333pp.
- Elshire, R.J., Glaubitz, J.C., Sun, Q., Poland, J.A., Kawamoto, K., Buckler, E.S. and Mitchell, S.E.**, 2011, A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species, PLoS One 6(5):e19379.
- Erskine, W. and Sarker, A.**, 2004, Lentil. Encyclopedia of Grain Sciences. Elsevier publication, London, UK, 142-150 pp.
- Erskine, W.**, 1996, Seed-size effects on lentil (*Lens culinaris*) yield potential and adaptation to temperature and rainfall in West Asia, J. Agric. Sci. 126, 335–341pp.
- Erskine, W.**, 2009, Global production, supply and demand. In W. Erskine, F. J. Muehlbauer, A. Sarker, & B. Sharma (Eds.), The lentil—Botany, production and uses (pp. 4–12). Wallingford:Comm Agric Bureau Int. Becerra Velasquez, L. and Gepts, P., 1994, RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in its centres of origin, Genome, 37, 256–263pp.
- Erskine, W., Sarker, A., and Kumar, S.**, 2011, Crops that feed the world 3. Investing in lentil improvement toward a food secure world, Food Sec. 3, 127–139pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Eujayl, I., Baum, M., Powell, W., Erskine, W. and Pehu, E.,** 1998, A genetic linkage map of lentil (*Lens* sp.) based on RAPD and AFLP markers using recombinant inbred lines sp.) based on RAPD and AFLP markers, *Theoretical and Applied Genetics*, 97:83–89pp.
- FAO,** 2010, FAOSTAT statistical database of the United Nations Food and Agriculture Organization (FAO), Italy:Rome.
- Feldmeyer, B., Wheat, C.W., Krezdorn, N., Rotter, B. and Pfenninger, M.,** 2011, Short read Illumina data for the de novo assembly of a non-model snail species transcriptome (*Radix balthica*, Basommatophora, Pulmonata), and a comparison of assembler performance, *BMC Genomics*, 12:317.
- Ferguson, M. and Erskine, W.,** 2001. Lentils (*Lens culinaris* L.). In: Maxted, N. and S.J. Bennett., *Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, pp. 132-157pp.
- Ford, R. and Taylor, P.W.,** 2003, Construction of an intraspecific linkage map of lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris*)., *Theoretical and Applied Genetics*, 107(5) 910-916pp.
- Godfray, H., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence., Muir., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S. and Toulmin, C.,** 2010, Food security: the challenge of feeding 9 billion people, *Science Express*, 327, 812-818pp.
- Grusak, M.A.,** 2009, A survey of the micro and macro mineral nutrient concentrations in the USDA Lentil Core Collection. <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/eval.pl?494182> (Erişim tarihi: 3 Mart 2015)
- Havey, M.J. and Muehlbauer, F.J.,** 1989, Linkages between restriction fragment length., Isozyme and morphological markers in lentil, ***Theoretical and Applied Genetics***, 77:395-401pp.
- He, J., Zhao, X., Laroche, A., Lu, Z.X., Liu, H. and Li, L.,** 2014, Genotyping-by-sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding, . *Front Plant Sci* 5: doi:0.3389/fpls.2014.00484.
- Hofer, J.M.I. and Ellis, T.H.N.,** 2014, Developmental specialisations in the legume family, *Current Opinion in Plant Biology*, 17, 153–158pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, D. and Kilian, A.,** 2001, Diversity arrays:a solid state technology for sequence information independent genotyping, *Nucleic Acids Research*, 29:e25.
- Jehan, T. and Lakhanpaul, S.,** 2006, Single Nucleotide Polymorphism (SNP). *Methods and Applications in Plant Genetics: A Review*. *Indian J. Biotechnol.*, 5:435-459pp.
- Kaur, C., Vishnoi, A., Ariyadasa, T.U., Bhattacharya, A., Singla-Pareek, S.L., and Sopory, S.K.,** 2013, Episodes of horizontal gene-transfer and gene fusion led to co-existence of different metal-ion specific glyoxalase, I. *Sci. Rep.* 3, 3076. doi: 10.1038/srep03076.
- Kaur, S., Cogan, N.O., Pembleton, L.W., Shinozuka, M., Savin, K.W., Materne, M. and Forster, J.W.,** 2011, Transcriptome sequencing of lentil based on second-generation technology permits large-scale unigene assembly and SSR marker discovery, *BMC Genomics*, 12:265.
- Kaya, H.B., Cetin, O., Kaya, H., Sahin, M., Sefer, F., Kahraman, A. and Tanyolac B.,** 2013, SNP Discovery by Illumina-based transcriptome sequencing of the olive and the genetic characterization of Turkish olive genotypes revealed by AFLP, SSR and SNP markers, *PLoS One* 8:e73674.
- Khlestkina, E.K. and Salina, E.A.,** 2006, SNP Markers: Methods of Analysis, Ways of Development, and Comparison on an Example of Common Wheat, *Russian Journal of Genetics*, 2006, 42, 585–594pp.
- Kim, S. and Misra, A.,** 2007, SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 9:289-320pp.
- Kosambi, D.D.,** 1944, The estimation of map distance from recombination values. *Ann Eugen* 12:172–175pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kumar, L.S.**, 1999, DNA markers in plant improvement: An overview, *Biotechnology Advances* 17:143–182pp.
- Kumar, S., Hamweih, A., Manickavelu, A., Kumar, J., Sharma, T. R., and Baum, M.**, 2014, “Advances in lentil genomics,” in *Legumes in Omics Era*, eds S. Gupta, N. Nadarajan, and D.S. Gupta (New York: Springer Science+Business Media), 111–130.
- Kumar, S., Rajendran, K., Kumar, J., Hamwieh, A. and Baum, M.**, 2015, Current knowledge in lentil genomics and its application for crop improvement. *Front Plant Science*. 6:78.
- Kumar, S., Stecher, G., Peterson, D. and Tamura, K.**, 2012, MEGA-CC: computing core of molecular evolutionary genetics analysis program for auto-mated and iterative data analysis, *Bioinformatics*, 28, 2685–2686pp.
- Lewis, G.P., Schrire, B.D., Mackinder, B.A., Rico, L. and Clark, R.**, 2013, A 2013 linear sequence of legume genera set in a phylogenetic context—A tool for collections management and taxon sampling, *South African Journal of Botany*, 89, 76–84pp.
- Li, H., Vikram, P., Singh, R.P., Kilian, A., Carling, J., Song, J., Burgueno-Ferreira, J.A., Bhavani, S., Huerta-Espino, J., Payne, T., Sehgal, D., Wenzl, P. and Singh, S.**, 2015, A high density GBS map of bread wheat and its application for dissecting complex disease resistance traits, *BMC Genomics*, 16:216.
- Liao, P.Y. and Lee, K.H.**, 2010, From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications, *Biochemical Engineering Journal*, 49, 149–158pp.
- Liu, Z.J. and Cordes, J.F.**, 2004, DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics, *Aquaculture*, 238:1-37pp.
- Lombardi, M., Materne, M., Cogan, N.O.I., Rodda, M., Daetwyler, H.D., Slater, A.T., Forster, J.W. and Kaur, S.**, 2014, Assessment of genetic variation within a global collection of lentil (*Lens culinaris* Medik.) cultivars and landraces using SNP markers, *BMC Genetics*, 15:150.
- Mammadov, J., Aggarwal, R., Buyyarapu, R. and Kumpatla, S.**, 2012, SNP Markers and Their Impact on Plant Breeding, Hindawi Publishing Corporation *International Journal of Plant Genomics*, 11p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Metzker, M.L.**, 2010, Sequencing technologies - the next generation, *Nature Reviews Genetics.*, 11(1):31-46pp.
- Muehlbauer, F.J., Cho, S., Sarker, A., McPhee, K.E., Coyne, C.J., Rajesh, P.N. and Ford, R.**, 2006, Application of biotechnology in breeding lentil for resistance to biotic and abiotic stress, *Euphytica*, 147, 149–165pp.
- Ooijen, V.**, 2006, JoinMap4, Software for the Calculation of Genetic Linkage Maps in Experimental Populations, Wageningen, the Netherlands: Kyazma B.V.
- Palmieri, F., Rieder, B., Ventrella, A., Blanco, E., Do, P.T., Nunes-Nesi, A., Trauth, A.U., Fiermonte, G., Tjaden, J., Agrimi, G., Kirchberger, S., Paradies, E., Fernie, A.R. and Neuhaus, H.E.**, 2009, Molecular identification and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* mitochondrial and chloroplastic NAD⁺ carrier proteins, *The Journal of Biological Chemistry*, 284(45), 31249-31259pp.
- Papanicolaou, A., Stierli, R., French-Constant, R. and Heckel, D.**, 2009, Next generation transcriptomes for next generation genomes using est2assembly, *BMC Bioinformatics*, 10:447.
- Pegadaraju, V., Nipper, R., Hulke, B.S., Qi, L.L. and Schultz, Q.**, 2013, De novo sequencing of the sunflower genome for SNP discovery using the RAD (Restriction site Associated DNA) approach, *BMC Genomics*, 14: 556p.
- Poland, J.A. and Rife, T.W.**, 2012, Genotyping-by-sequencing for plant breeding and genetics, *Plant Genome*, 5:92–102pp.
- Rafalski, A.**, 2002, Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics, *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 94-100pp.
- Rafalski, J.A.**, 2002, Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches, *Plant Science*, 162, 329 – 333pp.
- Raman, H., Raman, R., Kilian, A., Detering, F., Carling, J., Coombes, N., Diffey, S., Kadkol, G., Edwards, D., McCully, M., Ruperao, P., Parkin, I.A.P., Batley, J., Luckett, D.J. and Wratten, N.**, 2014, Genome-wide delineation of natural variation for pod shatter resistance in *Brassica napus*, *PLoS ONE* 9(7):e101673.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sansaloni, C.P., Petroli, C.D., Carling, J., Hudson, C.J., Steane, D.A., Myburg, A.A., Grattapaglia, D., Vaillancourt, R.E. and Kilian, A.,** 2010, A high-density Diversity Arrays Technology (DArT) microarray for genome-wide genotyping in Eucalyptus, *Plant Methods*, 6(16).
- Semagn, K., Bjørnstad, A. and Ndjiondjop, M.N.,** 2006, Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants, *African Journal of Biotechnology*, 5(25), 2569-2587pp.
- Shahin, A., Van Kaauwen, M., Esselink, D., Bargsten, J., Van Tuyl, J., Visser, R., et al.,** 2012, Generation and analysis of expressed sequence tags in the extreme large genomes *Lilium* and *Tulipa*, *BMC Genomics* 13:640. doi: 10.1186/1471-2164-13-640.
- Sharpe, A.G., Ramsay, L., Sanderson, L.A., Fedoruk, M.J., Clarke, W.E., Li, R., Kagale, S., Vijayan, P., Vandenberg, A. and Bett, K.E.,** 2013, Ancient orphan crop joins modern era: gene-based SNP discovery and mapping in lentil, *BMC Genomics* 14:192.
- Shendure, J. and Ji, H.,** 2008, Next-generation DNA sequencing, *Nature Biotechnology*, 26(10), 1135-1145pp.
- Sonah, H., Bastien, M., Iquira, E., Tardivel, A., Legare, G., Boyle, B., et al.,** 2013, An improved genotyping by sequencing (GBS) approach offering increased versatility and efficiency of SNP discovery and genotyping, *PLoS ONE* 8:e54603 10.
- Spindel, J., Wright, M., Chen, C., Cobb, J., Gage, J., et al.,** 2013, Bridging the genotyping gap: using genotyping by sequencing (GBS) to add high-density SNP markers and new value to traditional bi-parental mapping and breeding populations, *Theoretical and Applied Genetics*, 126: 2699–2716pp.
- Tabassum, J. and Lakhanpaul, S.,** 2006, Single nucleotide polymorphism (SNP)—Methods and applications in plant genetics: A review, *Indian Journal of Biotechnology*, 5:435-459pp.
- Tanyolac, B., Ozatay, S., Kahraman, A. and Muehlbauer, F.,** 2010, Linkage mapping of lentil (*Lens culinaris* L.) genome using recombinant inbred lines revealed by AFLP, ISSR, RAPD and some morphologic markers, *Agricultural Biotechnology and Sustainable Development* 2:1–6.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Torjek, O., Berger, D., Meyer, R.C., Mussig, C., Schmid, K.J., Rosleff Sorensen, T., Weisshaar, B., Mitchell-Olds, T., and Altmann, T.,** 2003, Establishment of a high-efficiency SNP-based framework marker set for *Arabidopsis*. *Plant J.*36:122–140pp.
- Tullu, A., Tar'an, B., Warkentin, T. and Vandenberg, A.,** 2008, Construction of an intraspecific linkage map and QTL analysis for earliness and plant height in lentil, *Crop Sciences*, 48:2254–2264pp.
- Turner, N.C., Wright, G.C. and Siddique, K.H.M.,** 2001, Adaptation of grain legumes (Pulses) to water-limited environments, *Adv Agron* 71, 193–231pp.
- Twyman, R.,** 2005, Single Nucleotide Polymorphism (SNP) genotyping techniques. *Encyclopedia Diagnostic, Genomics Proteomics*, 6: 1202-1207pp.
- Varshney, R.K., Marcel, T.C., Ramsay, L., Russell, J., Röder, M.S., Stein, N., Waugh, R., Langridge, P., Niks, R.E. and Graner, A.,** 2007, A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci, *Theoretical Applied Genetics*, 114:1091–1103pp.
- Vignal, A., Milan, D., Sancristobal, M. and Eggen, A.,** 2002, A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics , *Genet. Sel. Evol.* 34, 275-305pp.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee T, Hornes, M, Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M.,** 1995, AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Res* 23:4407–4414pp.
- Vorrips, R.E.,** 2002, MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs, *Journal Hered* 93:77–78pp.
- Wong, M.M.L., Verma, N.G., Ramsay, L., Yuan, H.Y., Caron, C., Diapari, M., Vandenberg, A. and Bett, K.E.,** 2015, Classification and characterization of species within the Genus *Lens* using Genotyping-by-Sequencing (GBS), *PLoS ONE* 10(3):e0122025.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yılmaztemel, H., Göl, D., Akkale, H.B., Kahraman, A. and Tanyolaç, M.B.,** 2014, Single nucleotide polymorphism discovery through Illumina-based transcriptome sequencing and mapping in lentil, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 38p.
- Young, N.D., Mudge, J. and Ellis, T.H.N.,** 2003, Legume genomes: more than peas in a pod, Current Opinion in Plant Biology, 199–204pp.

ÖZGEÇMİŞ

Deniz GÖL

Eğitim

- Doktora:** Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, Ege Üniversitesi, İzmir, Şubat 2010- ... devam ediyor.
- Tez:** Mercimek Genomunda Rekombinant Kendilenmiş Hatları Kullanarak AFLP ve SNP Markırlarının Haritalanması.
- Danışman:** Prof. Dr. M. Bahattin Tanyolaç
- Yüksek Lisans:** Moleküler Biyoloji ve Genetik, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir, 2006.
- Tez:** Domateste (*Lycopersicon esculentum*) Tuza Dayanıklılığın Fizyolojik ve Genetik Karakterizasyonu
- Danışman:** Prof. Dr. Anne Frary, Yard. Danışman: Prof. Dr. Sami Doğanlar.
- Lisans:** Biyoloji, Ege Üniversitesi, 2000.

Katıldığı Projeler

Domateste (*Lycopersicon esculentum*) Tuza Dayanıklılığın Fizyolojik ve Genetik Karakterizasyonu, 2006.

Mercimek (*Lens culinaris* L.) Genomunun Nucleotide Binding Site (NBS) ve Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Markörler kullanılarak haritalanması, 2015.

Yayınlar

Frary, A., **Göl, D.**, Keleş, D., Ökmen, B., Pınar, H., Şığva, H.Ö., Yemenicioğlu, A., Doğanlar, S. 'Salt tolerance in *Solanum pennellii*: antioxidant response and related QTL', BMC Plant Biology 2010, 10:58; 1471-2229.

Frary, A., **Göl, D.**, Keleş, D., Ökmen, B., Pınar, H., Şığva, H.Ö., Yemenicioğlu, A., Doğanlar, S. NaCl tolerance in ***Lycopersicon pennellii*** introgression lines: QTL related to physiological responses. Biologia Plantarum 55 (3): 461-468, 2011.

Yılmaztemel, H., **Göl, D.**, Akkale, H.B., Kahraman, A. and Tanyolaç, M.B., 2014, Single nucleotide polymorphism discovery through Illumina-based transcriptome sequencing and mapping in lentil, Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 38.

Katıldığı Toplantılar

EMBO Young Scientist Forum, 20-22 Şubat 2008, İstanbul (poster sunumu).

Göl, D., Frary, A., Doğanlar, S. and Yemenicioğlu, A., (2008). Biochemical and Genetic Characterization of Salt Tolerance in Tomato.

YABANCI DİL

İngilizce.