



**ZEYTİNDE (*Olea europaea L.*) YENİ NESİL DNA
DİZİLEME TEKNOLOJİSİ İLE GELİŞTİRİLEN SNP
MOLEKÜLER İŞARETLEYİCİLERİNE DAYALI
GENETİK HARİTANIN OLUŞTURULMASI
Kübra YILMAZ**



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ZEYTİNDE (*Olea europaea L.*) YENİ NESİL DNA DİZİLEME TEKNOLOJİSİ
İLE GELİŞTİRİLEN SNP MOLEKÜLER İŞARETLEYİCİLERİNE DAYALI
GENETİK HARİTANIN OLUŞTURULMASI**

Kübra YILMAZ

Doç. Dr. Ahmet İPEK
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Bursa-2016

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

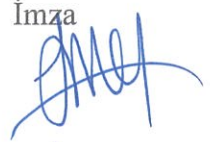
Kübra YILMAZ tarafından hazırlanan “Zeytinde (*Olea europaea L.*) Yeni Nesil DNA Dizileme Teknolojisi İle Geliştirilen SNP Moleküler İşaretleyicilerine Dayalı Genetik Haritanın Oluşturulması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ahmet İPEK

Başkan: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL
U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza

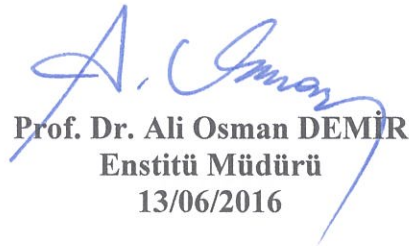

Üye: Prof. Dr. Murat ŞEKER
Ş.Ü. Ziraat Fakültesi
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

İmza


Üye: Doç. Dr. Ahmet İPEK
U.Ü. Ziraat Fakültesi
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

İmza


Yukarıdaki sonucu onaylarım


Prof. Dr. Ali Osman DEMİR
Enstitü Müdürü
13/06/2016

Bilimsel Etik Bildirim Sayfası

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

13/06/2016

İmza

Kübra YILMAZ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ZEYTİNDE (*Olea europaea L.*) YENİ NESİL DNA DİZİLEME TEKNOLOJİSİ İLE GELİŞTİRİLEN SNP MOLEKÜLER İŞARETLEYİCİLERİNE DAYALI GENETİK HARİTANIN OLUŞTURULMASI

Kübra YILMAZ

Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ahmet İPEK

Bu araştırmada zeytin bitkisinin Yeni Nesil Sekanslama ile DNA dizilemesi sonrası SNP moleküler işaretleyicilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırmada Gemlik ve Edincik Su zeytin çeşitleri ve bunların 121 adet melezi kullanılmıştır. Bu bitkilerden yaprak örnekleri alınmış ve DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Herbir ebeveyn ve 121 adet melez bitkiden 50 ng DNA örneği GBS analizi için Wisconsin Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarı'na gönderilmiştir. *ApeKI* restriksiyon enzimi ile kesilerek DNA parçalarına adaptörler ve barkod nükleotidler eklendikten sonra bu DNA parçalarının nükleotid dizileri Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. DNA parçalarına ait SNP moleküler işaretleyicileri 'Stacks' bilgisayar programı kullanılarak tespit edilmiştir. Elde edilen SNP moleküler işaretleyicileri arasındaki genetik bağlantı 'JoinMap 3.0' programı kullanılarak belirlenmiştir. Oluşturulan genetik bağlantı haritasında 25 adet Bağlantı Grubu (LG) belirlenmiş, sayıları 58 ve 361 arasında değişen ve toplam 5 736 adet SNP moleküler işaretleyicisi harita üzerine yerleştirilmiştir. Bağlantı gruplarının toplam uzunluğu 3 049 cM olarak tespit edilmiştir. Haritanın bütünü ele alındığında moleküler işaretleyiciler arası maksimum mesafe 9 cM, her bir moleküler işaretleyici arasındaki ortalama mesafe 0.61 cM olarak belirlenmiştir. Daha önce zeytin bitkisine ait SNP tabanlı bir genetik bağlantı haritası geliştirilmediğinden yaptığımız çalışma dünya genelinde bir ilk olmuştur. Oluşturulan bu harita önemli ekonomik karakterlerin belirlenmesi amacıyla yapılacak QTL çalışmalarına yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler : Zeytin, Yeni Nesil Sekanslama, GBS, SNP, Genetik Bağlantı, *de novo* Genetik Haritalama

2016, XI + 36 sayfa

ABSTRACT

MSc Thesis

Development of SNP Markers Using Next Generation DNA Sequencing Technologies and Construction of a SNP Based Genetic Map in Olive

Kübra YILMAZ

Uludag University
Graduate School of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet İPEK

In the present research, we aimed SNP discovery via Next Generation DNA sequencing Technology. In this study 50 ng DNA isolated from each 121 cross-pollinated full-sib F1 progeny between the olive cultivars ‘Gemlik’ and ‘Edincik Su’ and sent to Wisconsin University Biotechnology Center for analysis. DNA fragments identified by Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA) with adding barcodes and adaptor nucleotides after *ApeKI* enzyme restriction. SNP discovery implemented in the computer program ‘Stacks’. Linkage groups were defined with ‘JoinMap 3.0’ computer program. A high-density genetic linkage map for the olive genome was constructed using total of 5736 SNP markers between 58 and 361. This linkage map was composed of 25 linkage groups, covering 3049 cM of the olive genome. The maximum distance between the flanking markers was 9 cM and the mean distance between the flanking markers was 0.61 cM. This is the first study in the literature regarding SNP based genetic linkage map of olive. This integrated map provides a useful tool for the detection of QTLs controlling economically important traits.

Keywords : Olive, Next Generation Sequencing, GBS, SNP, Genetic Linkage, *de novo* Genetic Mapping

2016, XI + 36 pages

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ahmet İPEK'e teşekkürlerimi sunarım.

Bölümümüzü kurmak, geliştirmek ve üniversitemizin hak ettiği yere ulaştırmak adına canla başla çalışan bölüm başkanımız Prof. Dr. Sezai TÜRKEL hocama teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarında ve analiz çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Meryem İPEK hocama teşekkürlerimi sunarım. Desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Murat Şeker hocama teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca her zaman beni destekleyen ve topluma faydalı bir birey olmam için elinden gelen her şeyi yapan, hayallerime ulaşmamın en büyük kaynağı olan canım annem Sevgül YILMAZ'a ve canım babam Yener YILMAZ'a sonsuz teşekkür ederim. Kardeşlerim Büşranur, Eda ve Rumeysa YILMAZ'a bütün destekleri ve varlıkları için teşekkür ederim.

Desteklerini esirgemeyen Serhat Gökhan ÇIKTAY, Sabriye MERİÇ ÇIKTAY ve Cemre ÇIKTAY'a teşekkür ederim.

Bu çalışmaya finansal kaynak sağladığı için Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne teşekkür ederim (Proje No: OUAP(Z) - 2013/33)

Tez çalışmam sırasında Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Bursu ile beni destekleyen TÜBİTAK 2211 Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı dolayısıyla TÜBİTAK'a teşekkür ederim (2210-C 2014/2).

Kübra YILMAZ

13/06/2016

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	8
2.1. Genotyping by Sequencing Yöntemi ile Yeni Nesil Sekanslama.....	8
2.2. Stacks Bilgisayar Yazılımı ile SNP tespiti	9
2.3. Genetik Bağlantı Haritası Oluşturma Çalışmaları	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM	13
3.1. Materyal	13
3.2. Yöntem.....	13
3.2.1. Yaprak örneklerinin alınması.....	13
3.2.2 .DNA örneklerinin elde edilmesi	14
3.2.3. GBS Yöntemi ile Nükleotid Sekanslarının Belirlenmesi	15
3.2.4. Stacks Analiz Programı Kullanılarak SNP Moleküler İşaretleyicilerinin Belirlenmesi	15
3.2.5 JoinMap 3.0 Analiz Programı Kullanılarak Genetik Bağlantı Haritasının Oluşturulması	15
4. BULGULAR.....	17
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	30
KAYNAKLAR	33
ÖZGEÇMİŞ	36

SİMGE ve KISALTMALAR

Simgeler

°C

µl

Açıklama

Santigratderece

Mikrolitre

Kisaltmalar

bç

cM

DNA

dk

LG

ng

SNP

Açıklama

Baz çifti

centi-Morgans

Deoksiribo Nükleik Asit

Dakika

Linkage Group (Bağlantı Grubu)

Nanogram

Single Nucleotid Polymorphism

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Dünya üzerinde zeytin üretiminin ülkeler bazında sıralaması.....	1
Şekil 1.2. Türkiye’de zeytin üretim verileri.....	2
Şekil 1.3. Zeytin meyvesinin kimyasal bileşimi	3
Şekil 2.1. <i>de novo</i> aracının aşamaları	10
Şekil 4.1. ‘Gemlik’ x ‘Edincik Su’ melezlerinin SNP moleküler işaretleyicilerine dayalı 3049 cM uzunluğundaki 25 Bağlantı Grubu (LG) Özeti	18
Şekil 4.2. ‘Gemlik’ x ‘Edincik Su’ melezlerinin SNP moleküler işaretleyicilerine dayalı 3049 cM uzunluğundaki 25 Bağlantı Grubu (LG).....	20



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 4.1. SNP moleküler işaretleyicilerinin babasal, annesel ve her iki ebeveynden olmak üzere segregasyon durumları.....	16
Çizelge 4.2. ‘Gemlik’ x ‘Edincik Su’ melezlerinin Bağlantı Grupları (LG) üzerindeki SNP moleküler işaretleyicileri	19
Çizelge 4.3. Son dönemde zeytin genomunda yapılmış Genetik Bağlantı Haritası çalışmaları	31
Çizelge 4.4. Son dönemde zeytin genomunda yapılmış Genetik Bağlantı Haritası çalışmalarında moleküler işaretleyicilerin harita üzerine yerleştirilme sayıları	32

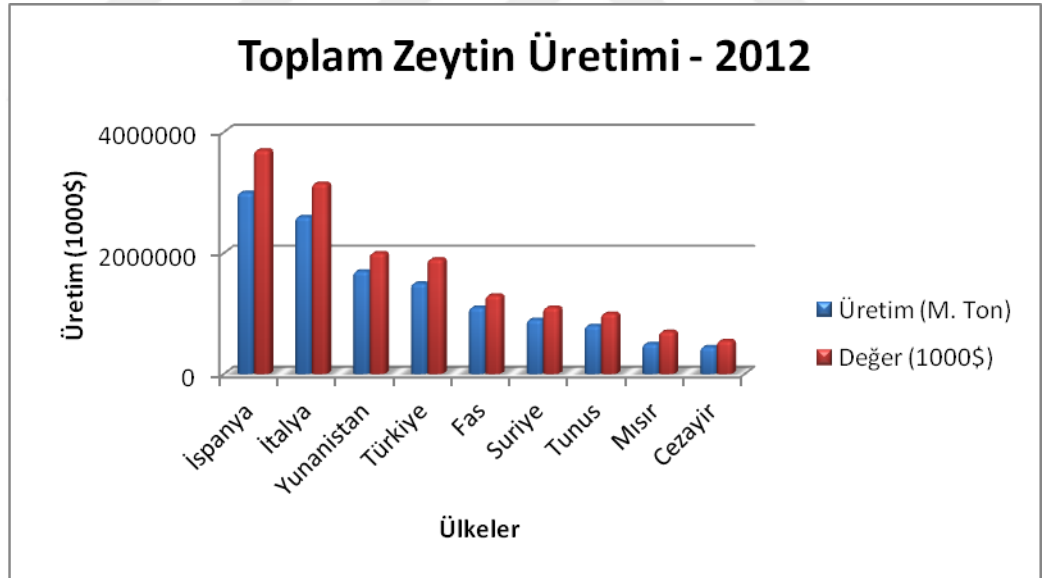


1. GİRİŞ

Dalları barışı simgeleyen Zeytin (*Olea europaea L.*) Oleacea familyasının bir türüdür ve anavatanı, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ni de içine alan Yukarı Mezopotamya ve Güney Ön Asya'dır (Heywood. 1978).

Akdeniz havzasındaki ülkelerde yaklaşık 4000 yıldır yetiştirilmekte olan zeytin, Türkiye ihracatı içerisinde oldukça önemli bir paya sahiptir. Akdeniz iklimi görülen başta Marmara ve Ege Bölgeleri olmak üzere Güneydoğu ve Akdeniz Bölgelerinde de yetiştirilmektedir.

Günümüzde ülkemizde ve dünyada önemli bir ticari ürün olan zeytinin, dünya ticaretindeki önemi giderek artmaktadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre, dünya zeytin üretiminde ilk sırada İspanya gelmektedir (Şekil 1.1). Türkiye ise İtalya ve Yunanistan'ın ardından 4. Sırada bulunmaktadır (Anonim, 2014).



Şekil 1.1. Dünya üzerinde zeytin üretiminin ülkeler bazında sıralaması (Anonim, 2014)

Zeytin insanoğlunun temel besinlerinden biridir ve tarih boyunca gerek sofralık gerek yağlık olarak kullanılarak günümüze kadar önemini sürdürmüştür. Sofralık ve yağlık üretimine ek olarak meyvenin işlenmesi esnasında ortaya çıkan yan ürünler sanayide hammadde olarak kullanılmaktadır (Dogac ve ark. 2013). Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı verilerine göre son 15 yılda Türkiye’de zeytin ağaçları ve zeytin üretimi Şekil 1.2’de istatikselsel olarak verilmiştir.

Zeytin üretimi, 2001-2015

Olive production, 2001-2015

	Ağaç sayısı Number of trees (Bin - Thousand)			Üretim (Ton) Production (Tonne)		
	Toplam Total	Meyve veren Bearing	Meyve vermeyen Non bearing	Toplam Total	Sofralık Olive (Tables)	Yağlık Olive (For oil)
2001	99 000	90 000	9 000	600 000	235 000	365 000
2002	101 600	91 700	9 900	1 800 000	450 000	1 350 000
2003	102 750	92 250	10 500	850 000	350 000	500 000
2004	107 100	94 950	12 150	1 600 000	400 000	1 200 000
2005	113 180	96 625	16 555	1 200 000	400 000	800 000
2006	129 265	97 773	31 492	1 766 749	555 749	1 211 000
2007	144 329	104 219	40 110	1 075 854	455 385	620 469
2008	151 630	106 139	45 491	1 464 248	512 103	952 145
2009	153 723	109 127	44 596	1 290 654	460 013	830 641
2010	156 448	111 398	45 050	1 415 000	375 000	1 040 000
2011	154 611	117 942	36 669	1 750 000	550 000	1 200 000
2012	157 061	120 821	36 240	1 820 000	480 000	1 340 000
2013	167 030	129 161	37 869	1 676 000	390 000	1 286 000
2014	168 997	140 712	28 285	1 768 000	438 000	1 330 000
2015	171 992	144 760	27 232	1 700 000	400 000	1 300 000

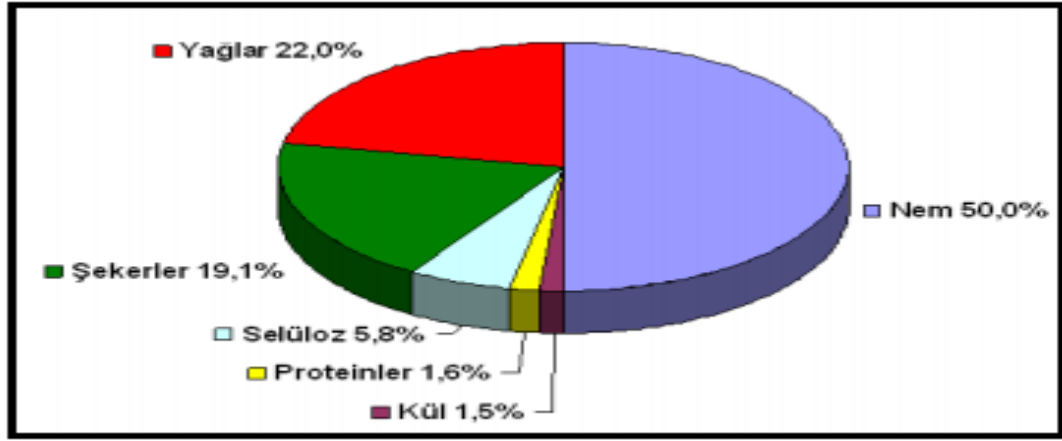
Kaynak: Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı

Source: Ministry of Food, Agriculture and Livestock

Şekil 1.2. Türkiye’de zeytin üretim verileri (Anonim, 2016)

Zeytinyağı insanlığa çok yönlü katkı sağladığı bilinen yenilebilir en eski yağıdır ve sağlıklı beslenme konusunda geliştirilen Akdeniz Beslenme Modeli’nin de temelini oluşturmaktadır. Japonya, Kanada, Amerika ve Avustralya’da zeytinyağı tüketiminin giderek arttığı belirtilmektedir (Şeker. 2008).

Zeytin meyvesinin kimyasal bileşimi yaklaşık olarak Şekil 1.3'te verilmiştir. Zeytin bileşenlerinin en önemlisi yağdır ve yağ oranı çeşitler arasında %2-30 arasında değişmektedir. Zeytinyağının bileşiminde bir çok bileşik bulunmaktadır ve yağ asitleri ve esterlermiş trigliseritler zeytinyağının yaklaşık %99'unu oluşturmaktadır. (Çolakoğlu. 1969).



Şekil 1.3. Zeytin meyvesinin kimyasal bileşimi (Şeker. 2008)

Sağlıklı besleme bilincinin dünya üzerinde giderek arttığı bu dönemde ülkemizde de zeytinin önemi iyice anlaşılmaya başlanmıştır. Sağlıklı beslenmenin temel maddelerinden olan zeytinin, yetiştiriciler tarafından yeni çeşitlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Yeni çeşitlerin geliştirilmesi için melezleme çalışmaları ülkemizde 1990'lı yıllarda başlamıştır.

Zeytinin yabani türleriyle melezlenmesinden ya da tiplerle çeşitlerin melezlenmelerinden ortaya çıkan zeytin çöğürlerinin arasından seçim yapılarak yeni çeşitler günümüze kadar geliştirilmiştir. Bu seçim çöğürlerin meyve özelliklerine göre seçilmesine dayanmaktadır. Melezlemeler sonucu elde edilen çöğürlerin karakterinin belirlenmesi gençlik kısırlığı döneminin uzunluğu sebebiyle uzun yıllar almaktadır. Zeytinde bulunan uzun gençlik kısırlığı dönemi melezleme ıslahının en büyük sorunlarından biridir ve uzun gençlik kısırlığı döneminde yapılan kültürel işlemler ıslah maliyetini, iş gücü ihtiyacını ve yeni çeşit geliştirmek için gereken süreyi arttırmaktadır. Bu geleneksel yöntem gelişen yeni dünyada yerini moleküler tekniklere bırakmaktadır. Zaman ve kaynak kaybını minimuma düşürmek ve uzun gençlik kısırlığı

döneminin üstesinden gelmek üzere moleküler işaretleyiciler kullanılarak yapılan erken seleksiyon önerilmiştir (Janick ve Moor. 1996). Bunun için kullanılacak moleküler işaretleyiciler önemli karakterlere bağlı olarak geliştirilmelidir. Daha sonra oluşturulan bu moleküler işaretleyiciler yardımıyla yapılan seleksiyonla zaman, maliyet gibi etkenlerde önemli azalmalar sağlanabilir. Zeytinde RAPD, AFLP, RFLP, SSR, ISSR moleküler işaretleyicileri karakter belirlenmesinde dünya genelinde kullanılmaktadır (La Rosa ve ark. 2003).

Düşük maliyet genotipleme çalışmalarında prosedürü belirlemede en önemli faktörlerden biridir. Mikrosatellitler, Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP), Sınırlayıcı Enzim Parça Uzunluğu Çeşitliliği (RFLP) gibi moleküler işaretleyicilerin elde edilmesinde klonlama ve primer dizaynı aşamalarının uğraştırıcılığı, maliyetinin fazla olması ve moleküler işaretleyici yoğunluğunun sınırlı olması gibi nedenlerle yeni moleküler işaretleyicilere ihtiyaç duyulmaktadır. SNP (Single Nucleotid Polimorphism) moleküler işaretleyicileri bu nedenle önem kazanmıştır (Beissinger ve ark. 2013). SNP moleküler işaretleyicileri DNA molekülleri arasında en fazla bulunan mutasyonlardır ve bitkilerde yapılan araştırmalarda son dönemde yoğun olarak kullanılan moleküler işaretleyicilerdir (Ward ve ark. 2013).

Yeni Nesil DNA Dizileme teknolojilerinin biyoloji bilimine kazandırılmasıyla beraber genomik ve transkriptomik çalışmalar boyut değiştirmiş, popülasyondaki genetik işaretleyicilerin keşfi, validasyonu ve anlamlandırılması adına büyük ilerleme sağlanmıştır (Davey ve ark. 2011). Günümüzde çok sayıda DNA dizileme tabanlı SNP genotipleme platformları ulaşılabilir durumdadırlar ki bunlar hedeflenmiş ya da tüm genom sekanslama bazlı teknolojilerdir (Fan ve ark. 2006).

DNA dizileme tabanlı SNP aleli bulma metodlarına tüm genom sekanslama, exom yakalama, RNA sekanslama, metillenmiş DNA sekanslama, restriksiyon enzimi tabanlı sekanslama yöntemleri örnek olarak verilebilir (Beissinger ve ark. 2013). Restriksiyon enzimi tabanlı sekanslama yöntemleri, RFLP yöntemi kullanılarak insan hastalıklarıyla genler arası ilişkileri çözme amaçlı çalışmalar yapıldığı zamandan beri moleküler işaretleyici tespiti çalışmalarının temelidir (Donis-Keller ve ark. 1987).

Restriksiyon enzimleri yardımıyla genomdaki hedef bölgenin karmaşık yapısı sadeleştirilip genetik işaretleyici tarama çalışması yapılabilmektedir. Restriksiyon enzimi tabanlı metodlardan olan RAD-Seq (Baird ve ark. 2008) ve GBS (Elshire ve ark. 2011) metodları günümüzde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. GBS ve RAD-Seq metodları benzer enzim kesim tekniğine dayansa da GBS daha az karmaşık bir metoddur ve zaman açısından değerlendirildiğinde de RAD-Seq'e oranla daha az zamanda daha çok veri elde etmeyi sağlamaktadır (Ward ve ark. 2013).

GBS metodu temelde mısır için geliştirilmiş olsa da basitliği ve tekrarlanabilirliği nedeniyle populasyon çalışmalarında, germplazma karakterizasyonlarında ve genetik ıslah çalışmalarında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Tercih edilmesinin en büyük etkenlerinden biri de GBS metoduyla üretilmiş dataların anlamlandırılabilmesi için gerekli olan biyoinformatik yazılımlar yaygın olarak geliştirilmiş olmasıdır (Donato ve ark. 2013). GBS platformu tarafından üretilen DNA parçalarının analiz edilebilmesi için biyoinformatik yazılımlara Tassel-GBS (Glaubitz ve ark. 2014) ve Stacks (Catchen ve ark. 2011) örnek verilebilir.

GBS metodunun gerçekleştirildiği sistemlerden biri olan Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA) sisteminde öncelikle tüm örnekleri içeren belirli sayıda DNA havuzu oluşturulur. Analiz bu havuz içerisindeki DNA parçalarının barkodlarına göre ayrı ayrı okunmasına dayanır. GBS metodunda kullanılan enzimler metilasyon duyarlı enzimlerdir. Böylece metillenmiş yüksek tekrarlı genomik bölgelerdeki sekans yoğunluğunu azaltırken düşük tekrarlı gen bölgelerindeki sekans yoğunluğunu yüksek tutabilmektedir (Gore ve ark. 2009). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda en yaygın kullanılan restriksiyon enzimi *ApeKI* enzimidir. *ApeKI* retrotranspozonları seyrek sıklıkla keser, metilasyon duyarlı bir enzimdir (Elshire ve ark. 2011).

Yeni Nesil Sekanslama Teknolojileri sayesinde çalışılmak istenen organizmaya ait geriye dönük hiçbir genetik bilgi olmadan populasyon çalışmaları yapılabilir durumdadır (Davey ve ark. 2011). Stacks analiz programında *de novo* sekanslama ile SNP tespiti mümkündür (Catchen ve ark. 2011).

Modern DNA sekanslama yöntemleriyle birlikte genom sekansları kolaylıkla ve düşük maliyetle elde edilebilir olmuştur fakat pratikte fragmentler halinde ve tamamlanmamış

taslak genomlar oluşmuştur. Fragmentlere ayrılmış genomun bir araya getirilebilmesi için bir bağlantı haritası oluşturulmalıdır. Bu harita Genetik Bağlantı Haritası (Linkage Map) olarak adlandırılır (Lewin ve ark. 2009). Genetik bağlantı haritaları fiziksel moleküler işaretleyiciler arasındaki rekombinasyon oranlarına dayalı olarak oluşturulur ve yaklaşık 100 yıldan fazladır biyoloji bilimine hizmet etmektedir. Genetik bağlantı haritası oluşturmak için; model organizmalar arasında rekombinasyonlar gerçekleşmeli ve bu organizmalar arasında genetik farklılıklar mevcut olmalıdır. Haritanın oluşturulması tespit edilen moleküler işaretleyicilerin lineer bir sekans üzerinde mesafelerine göre yerleştirilmesine dayanır (Fierst, 2015).

Bağlantı haritaları, yüksek çıktılı sekanslama cihazlarında üretilen milyonlarca moleküler işaretleyicinin düşük ölçekteki datalara dönüştürülmesi prensibine dayanır. Milyonlarca moleküler işaretleyici yerine daha kullanılabilir, yüzlerle ifade edilebilen saydaki moleküler işaretleyiciler bağlantı haritalarını oluşturmaktadır (Cheema ve Dicks. 2009).

JoinMap programı genetik analizler sonucu elde edilen datalar arasındaki bağlantıları göstermek ve analiz etmek amacıyla geliştirilmiş bir bilgisayar yazılımıdır. Linkage₁ (Suiter ve ark. 1983), G_{MENDEL} (Echt ve ark. 1992), MAPMAKER (Lander ve ark. 1987) gibi uygulamalar günümüze kadar yaygın olarak kullanılan uygulamalardan bazılarıdır. Günümüzde bir çok canlı üzerindeki moleküler işaretleyicilerin tespiti oldukça kolaylaşmış, ucuzlaşmış ve kısa zamanda elde edilebilir duruma ulaşmıştır. Mısır bitkisinde (Coe ve ark. 1990) ve *Arabidopsis thaliana*'da (Chang ve ark. 1988; Nam ve ark. 1989) yapılan çalışmalar sonucu elde edilen genetik haritalar ile genetik haritalama çalışmaları popülerlik kazanmıştır ve günümüzde bir çok canlıda genetik haritalama oluşturma çalışmaları oldukça yaygınlaşmıştır (Stam, 1993). Genetik haritalamalar yapılması amacıyla bir çok farklı sınıftaki ve farklı gruplardan elde edilmiş moleküler işaretleyicilerin bir arada değerlendirilebilmesi genom projeleri için büyük önem taşımaktadır. JoinMap 3.0 (Van Ooijen and Voorrips, 2001) programı bir çok farklı sınıftaki ve farklı gruplardan elde edilmiş moleküler işaretleyicileri bir arada analiz edebilir.

JoinMap 3.0 programında bağlantı haritası oluşturmak için aşağıdaki adımlar izlemektedir.

1. Veri programa aktarılır.
2. Bütün data seti içerisinde ulaşılabilir olan baz çiftlerinin (bç) rekombinasyon frekansları LOD skorlarına göre hesaplanır.
3. Bağlantı grupları belirlenir; eğer data birkaç bağlantı grubunu aynı anda içeriyorsa data dosyası bağlantı gruplarına göre ayrı dosyalara bölünür.
4. Moleküler işaretleyiciler genetik harita üzerinde sıralanır.
 - Moleküler işaretleyicilerin ilk çiftini seçer ve harita mesafesini hesaplar.
 - Haritaya hangi moleküler işaretleyicinin ekleceğine karar verir. Bunu da bütün moleküler işaretleyiciler için en başta belirlenmiş olan LOD skorlarına göre yapar.
 - Haritada hangi moleküler işaretleyicinin hangi pozisyona ekleneceğine karar verir.
 - 'Reshuffling' adı verilen bir tekrar karıştırma aşamasından geçirir böylelikle deneme yanılma yöntemiyle mesafeyi belirlediği aşamadan itibaren aşamaları tekrar ederek moleküler işaretleyicilerin en iyi pozisyonunu belirlemeye çalışır.

LOD skor insan, hayvan ve bitki popülasyonlarında bağlantı analizi yapmak için kullanılan Newton E. Morton tarafından geliştirilmiş istatistik bir testtir. LOD skor analizi, Mendeliyen özellikler arasında bağlantının belirlenmesi için karmaşık soyağaçlarının analizini kolaylaştırır (Griffiths ve ark. 1993).

Bu araştırmada Zeytin bitkisine ait 121 melez ve 2 ebeveyn için Yeni Nesil DNA Dizileme yöntemlerinden biri olan 'Genotyping by Sequencing' metodunun Illumina Hiseq 2000 (Illumina, San Diego, CA) cihazında uygulanmasıyla elde edilen DNA fragmentlerinin Stacks (Catchen ve ark. 2011) bilgisayar programında analiz edilmesiyle tespit edilen SNP moleküler işaretleyicilerine dayalı Genetik Bağlantı Haritası'nın, JoinMap 3.0 (Van Ooijen and Voorrips, 2001) analiz programı kullanılarak oluşturulması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Genotyping by Sequencing Yöntemi ile Yeni Nesil DNA Dizileme

GBS metodu ilk olarak mısır bitkisi için geliştirilmiş olsa da basitliği ve tekrarlanabilirliği nedeniyle populasyon çalışmalarında, gen kaynaklarının karakterizasyonlarında ve ıslah çalışmalarında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Tercih edilmesinin en büyük etkenlerinden biri de GBS metoduyla üretilmiş dataların anlamlandırılabilmesi için gerekli olan biyoinformatik yazılımlar yaygın olarak geliştirilmiş olmasıdır (Donato ve ark. 2013).

You ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA) cihazında Multiplexed Shutgun (Andolfatto ve ark. 2011) yöntemiyle edilen veriler ile cinsiyet temelli bağlantı haritası oluşturmuşlardır. *Epinephelus coioides* familyasına ait 142 melezden elde edilen DNA ile 594 142 945 90-bç büyüklüğündeki ham data ile 18 256 Mendel Segregasyonu'na sahip SNP moleküler işaretleyicisi elde edilmiştir. 24 Bağlantı grubu üzerine 4 608 SNP yerleştirilmiştir. Toplam Bağlantı Haritası 1581 cM olarak belirlenmiştir.

Gardner ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada '*Golden delicious x Scarlet spur*' elma çeşitlerinin melezlenmesiyle elde edilen 89 melezden 500 ng DNA *HindIII-HF* enzimi kullanılarak kesilmiş ve Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA) cihazında GBS yöntemiyle analiz edilmiştir. 96 kuyucuklu PCR plate'inde gerçekleştirilen analiz sonucunda toplam 85 129 960 100-bç DNA sekans okuması elde etmişlerdir. Fakat üretilen bu data içerisinde çok fazla kayıp ve genetik haritalamada kullanılamayacak veri elde ettiklerini belirtmişlerdir. Bu data içerisinden genotip kalitesine bağlı olarak kayıp dataların temizlenmesi sonucunda 273 835 SNP moleküler işaretleyicisi tespit etmişlerdir. Elde edilen moleküler işaretleyicilerden 3967 SNP genetik bağlantı haritasına aktarılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda SNP moleküler işaretleyicilerinin yüksek yoğunluklu genetik bağlantı haritaları oluşturmada ilk sırada tercih edilmesi gereken moleküler işaretleyiciler oldukları vurgulanmıştır.

Wang ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada ‘*Crassostrea gigas* x *Crassostrea angulata*’ çaprazlanmasıyla elde edilen 106 melezden 200 ng DNA *EcoRI* ve *HinfI* enzim kombinasyonu ile kesilmiştir. Illumina HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA) cihazında GBS yöntemiyle analiz edilen 6 840 000 90-bç DNA sekans okuması elde etmişlerdir. Referans genom varlığında yapılan çalışmada okumalar referans genom ile karşılaştırılmış intron, exon, genic ve intergenic bölgeler üzerindeki yerleşimlerine göre oranlar belirlenmiştir. Stacks yazılımı kullanılarak SNP tespiti yapılmış 65 031 RAD loci oluşturulmuş 40 445 SNP tespit edilmiştir. Tespit edilen SNP moleküler işaretleyicilerinden 8 743 SNP genetik bağlantı haritasına yerleştirilmiştir.

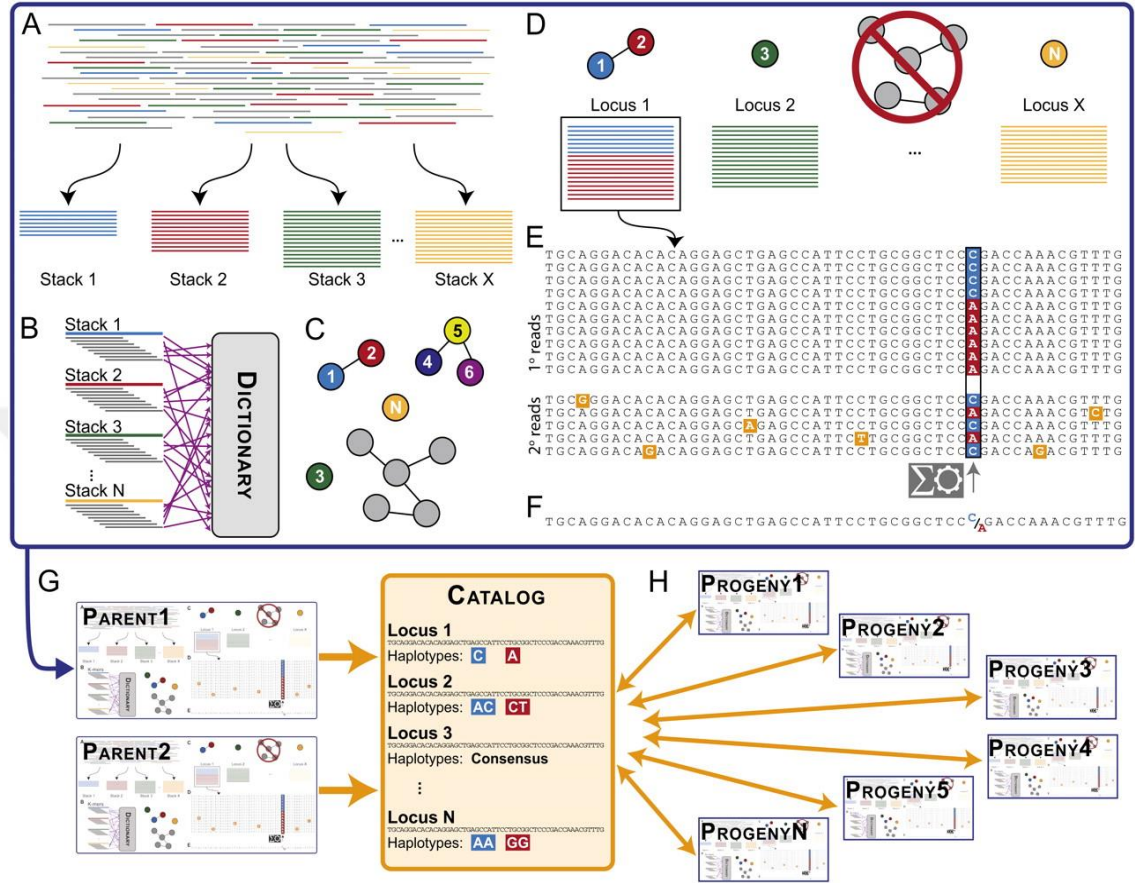
2.2. Stacks Bilgisayar Yazılımı ile SNP tespiti

Stacks bilgisayar yazılımı, Illumina cihazları tarafından üretilen kısa okumalı dizileme verilerini kullanarak bireylerin bir set içerisindeki lokuslarının üzerinde tanıma ve genotipleme amaçlı kullanılmaktadır. Stacks yazılımı referans genom varlığında karşılaştırmalı olarak da çalışabilmektedir. Günümüzde bir çok canlıya ait referans genomlar henüz tamamlanmış durumda olmadığından *de novo* olarak (ebeveyn karşılaştırmalı) çalışma prensibine de sahip olan yazılım, genotipleme çalışmalarına büyük katkı sağlamaktadır. Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA) cihazı tarafından ‘reduced representation’ prensibiyle üretilen sekanslarda, program yardımıyla tekrarlı bölgeler filtreden geçirilmekte ve indirgenmiş, basitleştirilmiş bir sunumda karşımıza getirilmektedir.

Stacks programı binlerce SNP moleküler işaretleyicisini popülasyonların ya da melezlemerin genetik analizi için kullanılabilir duruma getirmektedir. ‘Maximum likelihood’ istatistik modelini kullanan program, Illumina cihazlarında birkaç gün içerisinde üretilebilen yaklaşık 100 GB büyüklüğündeki dataları otomatikleştirilmiş bir sistemle analiz etmeye imkan vermektedir.

Stacks bilgisayar yazılımında *denovo_map.pl* aracı kullanılarak ebeveyn karşılaştırmalı SNP moleküler işaretleyicileri tespit edilmiştir. *de novo* aracında kullanılacak datanın fastq formatına dönüştürülmesi ve temizlenmesi *process_radtags.pl* aracı kullanılarak gerçekleştirilir. *process_radtags.pl* ile sekanslama sırasında belirlenmiş olan barkodlara göre sekanslar gruplandırılır. Her birey için ayrı dosyalar içerisinde barkodlara verilen

isimlere göre sekanslar oluşturulur. Komut girildikten sonra *de novo* haritalama işlemi otomatik olarak ilerler. İlerleyiş Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. *de novo* aracının aşamaları (A) *ustacks* programı ile her bir bireyden gelen kısa okumalı haldeki kümeleri tam eşleşmiş halde diziler, ayırır ve biçimlendirir. (B) Her bir kümedeki sekansları ayırır ve k-mer haline dönüştürür, oluşan k-mer'leri bir sözlüğe yükler. Potansiyel eşleşecek kümeleri sözlükten sorgulayarak nükleotidler arasındaki mesafe ile bağlı olan bir grafik ile sunulabilir bir liste oluşturur. (C) Eşleşen kümelerden varsayılan lokuslar oluşturulur. (D) Her bir lokustaki her bir nükleotid SNP olabileceği varsayımıyla kontrol edilir. (E) Bir konsensus dizi (benzer ya da aynı haldeki diziler) içerisinde SNP ve haplotip verileri kaydedilir. (F) *cstacks* çaprazlamadaki bütün potansiyel lokusları bir set haline getirmek amacıyla çaprazlanan ebeveynlerin verilerini bir katalog haline dönüştürür. (G) *sstacks* popülasyondaki her bir birey içerisinde hangi lokus / haplotip kombinasyonlarının olduğunu belirlemek amacıyla her bir melez ebeveynlerin oluşturduğu katalogla karşılaştırır. Eşleşmeleri kaydeder (Catchen ve ark. 2011).

de_novomap.pl'in *sstacks*'tan sonraki aşaması olan *markers.pl* aracı ile markerlar belirlenir ve *index_radtags.pl* aracı ile veritabanı indekslenir. *de novo* sekanslama işlemi bittikten sonra *genotypes.pl* aracı kullanılarak çaprazlanan popülasyondaki genotipler belirlenir ve JoinMap 3.0 gibi programlarda kullanılabilir dosyalara dönüştürülür.

Stacks bilgisayar yazılımı kullanılarak yapılan çalışmalardan Wang ve ark. (2016) '*Crassostrea gigas x Crassostrea angulata*' çaprazlanmasıyla elde edilen 106 melezden 65 031 RAD loci oluşturmuş 40 445 SNP tespit etmişlerdir. You ve ark. (2013) *Epinephelus coioides* türünden elde edilen 142 yavrudan 18 256 SNP tespit etmişlerdir.

SNP moleküler işaretleyicilerinin tespiti için bir çok bilgisayar yazılımı mevcuttur fakat günümüzde bir çok canlı türüne ait referans genom çalışmaları henüz tamamlanmamış durumdadır. Stacks yazılımı referans genom olmadığında da *de novo* çalışma prensibine sahip olduğundan bir çok çalışmada tercih edilen yazılımdır.

2.3. Genetik Bağlantı Haritası Oluşturma Çalışmaları

Mendel'in çalışmaları sonucunda bir çok bilim adamı elde edilen dataları yorumlama ve anlamlandırma çabasına girmiştir. Mendel yaptığı çalışmalarda bağlantı olasılığını belirleyememiştir. Thomas Hunt Morgan tarafından Columbia Üniversitesi'nde 'fly room' adı verilen laboratuarda *Drasophila melanogaster* modeli üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda genetik bağlantı konusu keşfedilmiştir. Günümüzde bir çok canlı üzerinde genetik bağlantı haritası oluşturulmuştur ve bu yöndeki çalışmalar devam etmektedir (Lobo ve Shaw. 2008).

Bağlantılı genler arasında krossover oranının farklı olduğunun Thomas Hunt Morgan tarafından gözlemi, krossover sıklığının kromozom üzerindeki genleri arasındaki uzaklığı belirttiği fikrini meydana getirmiştir. Morgan'ın öğrencisi Alfred Sturtevant ilk genetik bağlantısını geliştirmiştir. Sturtevant iki bağlantılı gen arasındaki mesafe ne kadar çoksa, bu iki gen arasındaki bölgede bir krossover olma olasılığının da o derece yüksek olacağını öne sürmüştür. Rekombinasyon olaylarını hesaplayarak genler arasındaki uzaklığı ölçmek mümkündür. Yüz mayoz bölünmesinden bir tanesinde bir rekombinasyon olan bu uzaklığa bir genetik harita birimi ya da bir santimorgan olarak adı verilmiştir. Yani %1'lik bir rekombinasyon sıklığı bir santimorgan'a karşılık

gelmektedir. Bir bağlantı haritası oluşturmak için aynı kromozomda bulunan bir grup özelliğin uzaklıkları bulunur. Birden çok rekombinasyon olayından kaynaklanacak hatalar oluşmaması adına, özellikler arasında büyük aralıklar olmamasına dikkat edilmelidir (Klug ve Cummings. 2003).

Genetik bağlantı haritaları cinsiyet bağımlı harita grupları ya da cinsiyet bağımsız gruplar şeklinde oluşturulabilmektedir. JoinMap programında SNP moleküler işaretleyicileri sadece anne ebeveynde heterozigot bulunmaları durumunda 'lm x ll' sadece baba ebeveynde heterozigot bulunmaları durumunda 'nn x np' olarak değerlendirilir. Her iki ebeveynde ortak olarak bulunan moleküler işaretleyiciler 'hk x hk' olarak kodlanır. Her iki ebeveynde bulunan 3 allelli moleküler işaretleyiciler 'ef x eg' olarak, 4 allelli moleküler işaretleyiciler ise 'ab x cd' olarak kodlanır. 'lm x ll', 'hk x hk', 'ef x eg' ve 'ab x cd' ana bitkinin genetik haritasını oluşturmak için 'nn x np', 'hk x hk' ve 'ef x eg' ve 'ab x cd' baba bitkinin genetik haritasının oluşturmak için kullanılabilir. Her bir ebeveyndeki ortak moleküler işaretleyiciler kullanılarak her iki ebeveyn için oluşturulan haritalar birleştirilebilmektedir (Van Ooijen ve Voorrips, 2001).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu araştırma 2013–2016 yıllarında Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarlarında yürütülmüştür. GBS analizi için Wisconsin Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarlarından hizmet alınmıştır. Genotipleme için GBS (Genotyping By Sequencing) analizi kullanılmıştır.

3.1. Materyal

Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nün zeytin koleksiyonunda bulunan Gemlik ve Edinciksu çeşitlerinin melezlenmesiyle elde edilen 121 adet G X E melez zeytin çöğürleri kullanılmıştır.

3.1.2. G X E Popülasyonun Yapısı

Gemlik ve Edincik Su bitkileri melezlenirken kastrasyon yapılmamıştır. Melezleme çiçeklenme dönemindeki Gemlik bitkilerinin üzerine Edincik Su çeşidinin çiçek tozlarının getirilip izole edilmesi ile yapılmıştır. Elde edilen 242 adet çöğürün meyve veren 141çöğüründen 139 tanesinin Gemlik ve Edincik su çeşitlerinin melezlemesi ile oluştuğu belirlenmiştir. Bu bitkilerden 121 tanesinden yaprak örnekleri alınmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Yaprak örneklerinin alınması

G X E popülasyonuna ait bütün çöğürlerden DNA izolasyonu yapmak üzere yaprak örnekleri alınmıştır. Yaprak örnekleri toplanırken en genç yapraklar tercih edilmiştir. Yapraklar alındıktan sonra laboratuvara ulaştırılıncaya kadar buz üzerinde saklanmıştır. Laboratuvara ulaştırılan örnekler liyofilizatörde kurutulmuştur. Kurutulan yaprak örnekleri DNA izolasyonu için kullanılıncaya kadar plastik torbalar içerisinde -80°C'de saklanmıştır.

3.2.2 DNA örneklerinin elde edilmesi

DNA örneklerinin çıkarılması için DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılmıştır.

1. Liyofilizatörde kurutulup -80°C 'ye kaldırılan örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra 40 mg tartılıp RNaz ve DNaz'dan arı steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
2. Yaprak örneklerinin parçalanması amacıyla santrifüj tüplerine 2 adet 6 mm çapında ve 5 adet 3 mm çapındaki cam boncuklar konularak öğütücü yardımıyla örnekler öğütülmüştür.
3. DNeasy Plant Mini Kit içerisindeki Buffer AP1'den 400 μL ve Rnase A'dan 4 μL her örneğe tek tek eklenmiş ve homojen görünüme ulaşmaya kadar vortekslenmiştir.
4. Tüp içerisindeki örnekler 30 dk 65°C su banyosunda bekletilmiştir. Bekleme süresi boyunca tüpler 3-5 kez ters düz edilerek karıştırılmıştır.
5. Sıcak su banyosundan alınan tüplerin her birine 150 μL Buffer P3 eklenmiştir. Tüpler ters düz edilerek karıştırıldıktan sonra buz üzerinde 15 dakika inkübe edilmiştir.
6. Tüpler 5 dakika 20,000 g 'de santrifüj edilmiş, örneklerin üzerinde oluşan sulu üst faz 2 ml mikrosantrifüj tüpü içerisinde konumlanmış QIAshredder spin column üzerine aktarılmıştır.
7. Tüpler 2 dk 20,000 g'de santrifüj edilmiştir.
8. Tüplerde oluşan sıvı üst faz pelete temas ettirilmeden steril 2 ml mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış her birinin üzerine 700 μL Buffer AW1 eklenmiştir. Pipetlenerek örnekler karıştırılmıştır.
9. Karışımdan 650 μL Dneasy Mini spin Column içeren 2 ml mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. 1 dk 6,000 g'de santrifüj edilmiştir. Sıvı üst faz atılmıştır. Kalan örnek için aynı aşama tekrarlanmıştır.
10. Spin column steril 2 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış üzerine 400 μL Buffer AW2 eklenmiştir. 6,000 g'de 1 dk santrifüj edilmiş sıvı üst faz atılmıştır.
11. Spin column üzerine 400 μL AW2 eklenerek 2 dk 20,000 g'de santrifüj edilmiştir. Spin column sıvı üst faza temas ettirilmeden steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.

12. Tüplerin üzerine 75 µL AE eklenmiş 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
13. 1 dk 6,00 g'de santrifüj edildikten sonra spin column tüplerden ayrılmış, DNA içeren tüpler -80°C'de saklanmıştır.

3.2.3 GBS Yöntemi ile Nükleotid Sekanslarının Belirlenmesi

Gemlik, Edincik Su çeşitleri ve bu çeşitlerin melezlemesi ile elde edilen 121 zeytin bitkisine ait DNA *ApeKI* enzimi ile kesilmiştir. *ApeKI* enzimi ile kesilen DNA parçalarına DNA'nın kesim yerine uygun Illumina DNA dizi primer bölgelerini içeren adaptörler eklenmiş ve her bir DNA örneği için adaptörlere barkod nükleotid dizisi, bitkilere ait DNA dizilerini birbirinden ayırmak için eklenmiştir. Adaptör eklenen DNA parçaları PCR'la çoğaltıldıktan sonra 24 bitkinin çoğaltılmış DNA örnekleri bir araya getirilerek 5 adet DNA örneği havuzu oluşturulmuştur. Bu havuzlarda yer alan DNA parçaları adaptör sekanslarında yer alan primerler ve Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA) DNA sekanslama platformu kullanılarak DNA parçalarının nükleotid dizileri belirlenmiştir.

3.2.4 Stacks Analiz Programı Kullanılarak SNP moleküler İşaretleyicilerinin Belirlenmesi

Her bir meleze ait DNA dizisi STACKS analiz programı kullanılarak de novo sekanslama yöntemiyle analiz edilmiştir.

Stacks bilgisayar yazılımında *denovo_map.pl* aracı kullanılarak ebeveyn karşılaştırmalı SNP moleküler işaretleyicileri tespit edilmiştir. *de novo* aracında kullanılacak datanın fastq formatına dönüştürülmesi ve temizlenmesi *process_radtags.pl* aracı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *process_radtags.pl* 5 parçaya bölünmüş olan GBS datasındaki her bir ham dataya ayrı ayrı uygulanmıştır. *process_radtags.pl* ile sekanslama sırasında belirlenmiş olan barkodlara göre sekanslar gruplandırılmıştır. Her birey için ayrı dosyalar içerisinde barkodlara verilen isimlere göre sekanslar oluşturulmuştur. *de novo* aracının aşamalarında *ustacks* programı ile her bir bireyden gelen kısa okumalı haldeki kümeleri tam eşleşmiş halde dizilenmiş, ayrılmış ve biçimlendirilmiştir. Her bir kümedeki sekanslar ayrılmış ve k-mer haline dönüştürülmüştür. Oluşan k-mer'ler bir referansa yüklenmiştir. Potansiyel eşleşecek kümeler referanstan sorgulanarak nükleotidler arasındaki mesafe ile bağlı olan ve bir grafik ile sunulabilen bir liste

oluşturulmuştur. Eşleşen kümelerden varsayılan lokuslar oluşturulmuştur. Her bir lokustaki her bir nükleotid SNP olabileceği varsayımıyla kontrol edilmiştir. Bir konsensus dizi (benzer ya da aynı haldeki diziler) içerisinde SNP ve haplotip datalar kaydedildi. *cstacks* aracı çaprazlamadaki bütün potansiyel lokusları bir set haline getirmek amacıyla çaprazlanan ebeveynlerin datalarını bir katalog haline dönüştürmüştür. *sstacks* aracı popülasyondaki her bir birey içerisinde hangi lokus/haplotip kombinasyonlarının olduğunu belirlemek amacıyla her bir melezi ebeveynlerin oluşturduğu katalogla karşılaştırmıştır. *markers.pl* aracı ile SNP moleküler işaretleyicileri belirlenmiş ve *index_radtags.pl* aracı ile veritabanı indekslenmiştir. Çaprazlanan popülasyondaki genotipler *genotypes.pl* ile tespit edilmiş ve JoinMap 3.0 (Van Ooijen ve Voorrips, 2001) analiz programında kullanılmak üzere .loc dosyası olarak kaydedilmiştir.

3.2.5 JoinMap 3.0 Analiz Programı Kullanılarak Genetik Bağlantı Haritasının Oluşturulması

Elde edilen genotip verileri JoinMap 3.0 (Van Ooijen ve Voorrips, 2001) analiz programına aktararak Genetik Bağlantı Haritası oluşturulmuştur. JoinMap 3.0 programında SNP moleküler işaretleyicileri sadece anne ebeveynde heterozigot bulunmaları durumunda 'lm x ll' sadece baba ebeveynde heterozigot bulunmaları durumunda 'nn x np' olarak skorlanmıştır. Her iki ebeveynde ortak olarak bulunan moleküler işaretleyiciler 'hk x hk' olarak değerlendirilmiştir. Her iki ebeveynde bulunan 3 allelli moleküler işaretleyiciler 'ef x eg' olarak, 4 allelli moleküler işaretleyiciler ise 'abxcd' olarak kodlanmıştır. 'lm x ll', 'hk x hk', 'ef x eg' ve 'ab x cd' annesel olarak 'nn x np', 'hk x hk' ve 'ef x eg' ve 'ab x cd' babasal olarak değerlendirilmiştir. Bağlantı haritaları her bir ebeveyndeki ortak moleküler işaretleyiciler kullanılarak birleştirilmiştir. Haritanın oluşturulmasında programda Kosambi Haritalama Fonksiyonu kullanılmıştır. Oluşturulan bağlantı grupları MapChart 2.3 (Voorrips, 2002) programı kullanılarak düzenlenmiş ve görsel hale getirilmiştir.

4. BULGULAR

Genotyping by Sequencing yöntemiyle Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA) cihazında üretilen her bir melez ve ebeveynde nükleotid dizisi belirlenen minimum DNA parçası sayısı 2 120 260'dır. Bu DNA parçalarına ait nükleotid dizileri ve Stacks programı kullanılarak SNP tespiti yapıldı. Her bir SNP moleküler işaretleyicisinde en fazla 4 allel olacak şekilde ve en fazla %10 eksik data olacak şekilde analiz gerçekleştirildi. Analiz sonucunda 10 941 SNP moleküler işaretleyicisi tespit edildi. Sonuçların anne, baba ya da her ikisinde bulunma durumundaki dağılımları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. SNP moleküler işaretleyicilerinin babasal, annesel ve her iki ebeveynden olmak üzere segregasyon durumları

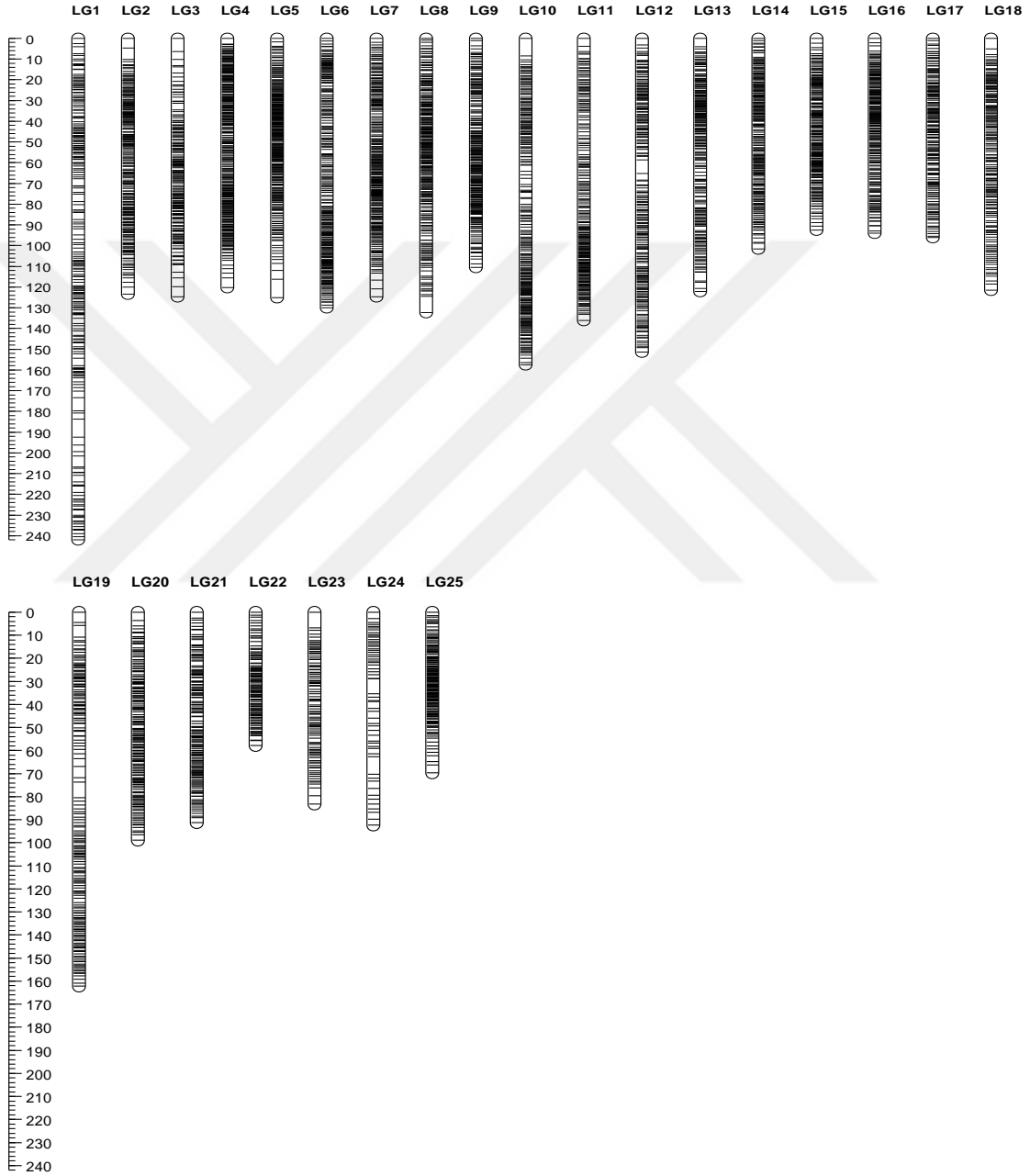
	Segregasyon Durumu			Toplam
	Baba	Anne	Her İkisi	
SNP	4020	4129	2792	10941

4 020 adet SNP (%37) babasal (paternal) olarak, 4 129 SNP (%38) annesel (maternal) olarak ve 2 792 adet SNP (%25) her iki ebeveynde de ortak olarak belirlenmiştir.

Belirlenen SNP moleküler işaretleyicileri harita üzerine yerleştirilirken Mendel segregasyon oranı uygun olarak açılım göstermeyen moleküler işaretleyiciler analizden çıkartılmışlardır. Baba ebeveynde açılım gösteren 1 624 SNP (%39,33) ve ana ebeveynde açılım gösteren 1 305 SNP (%32,46) moleküler işaretleyicisi mendel açılım oranına uygun olmadan açılım göstermiştir. (Beklenen segregasyon oranı 1:1, p. değeri<0,05).

Her iki ebeveynde de açılım gösteren SNP moleküler işaretleyicilerinde de yüksek oranda mendel açılım oranlarında sapmalar gözlemlenmiştir. 'ef x eg' olarak açılım gösteren SNP moleküler işaretleyicilerinin %28,68'i , 'hk x hk' olarak açılım gösteren SNP moleküler işaretleyicilerinin %59,39'u ve 'ab x cd' olarak açılım gösteren ömoleküler işaretleyicilerin %82,31'i beklenen mendel açılım oranlarından farklı açılım göstermiştir. ('ab x cd' ve 'ef x eg' için beklenen segregasyon oranı 1:1:1:1, 'hk x hk' için beklenen segregasyon oranı 1:2:1 , p.değeri<0,05).

JoinMap 3.0 programı kullanılarak ‘Gemlik’ x ‘Edincik Su’ melezlerinin Bağlantı Grupları (LG) oluşturulmuş, MapChart 2.3 programında grafikler düzenlenmiştir. Moleküler işaretleyicilerin yoğunluğu ve her bir bağlantı grubunun cM cinsinden uzunluğu Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Bağlantı gruplarına ait daha ayrıntılı görüntü Şekil 4.2.’de verilmiştir.

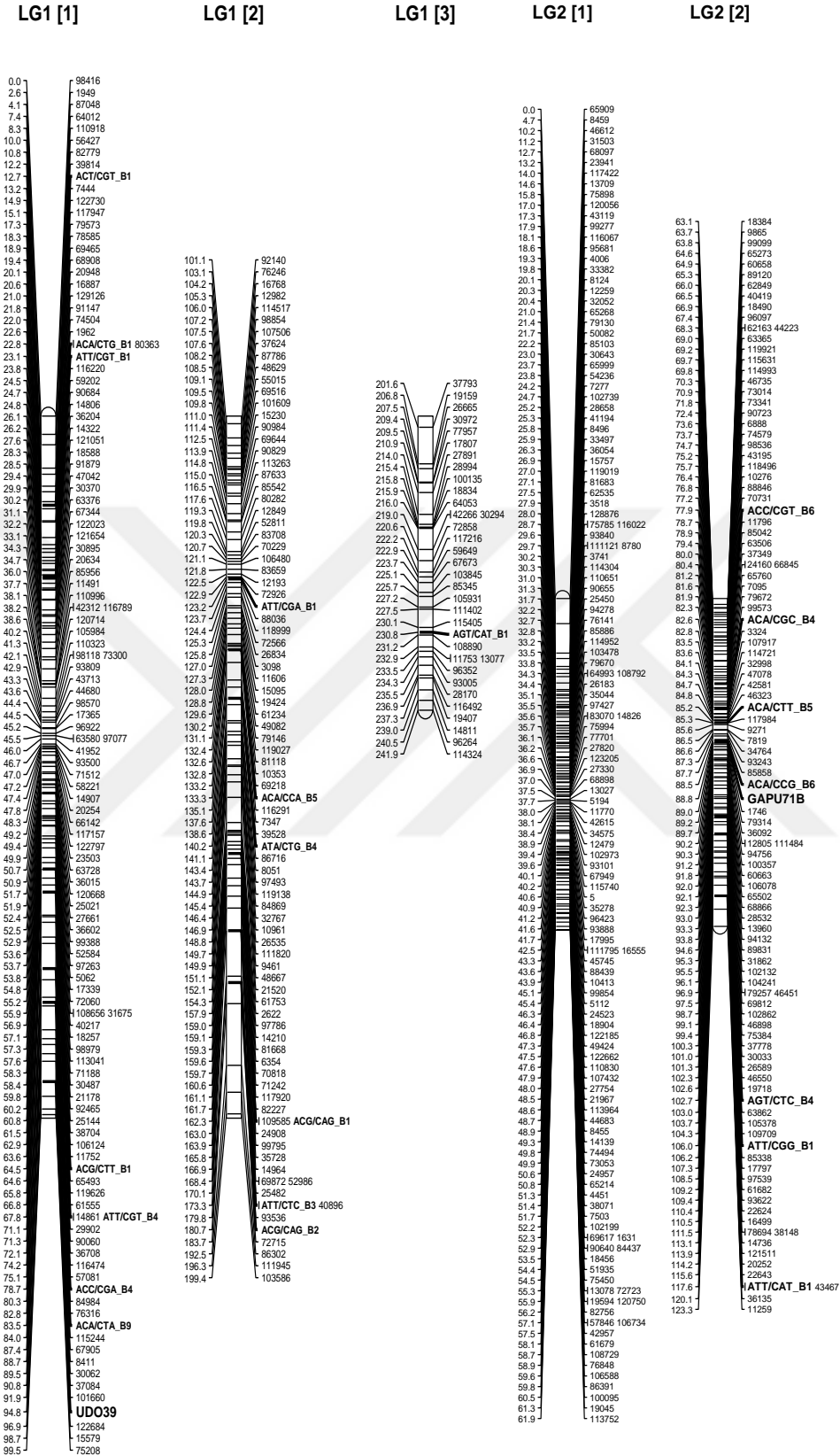


Şekil 4.1 ‘Gemlik’ x ‘Edincik Su’ melezlerinin SNP moleküler işaretleyicilerine dayalı 3049 cM uzunluğundaki 25 Bağlantı Grubu (LG) Özeti

Oluşturulan Bağlantı Grupları'na (LG) ait veriler Çizelge 4.2'de detaylı olarak verilmiştir. 25 adet Bağlantı Grubu (LG) oluşturulmuş sayıları 58 ve 361 arasında değişen ve toplam 5 736 adet SNP moleküler işaretleyicisi harita üzerine yerleştirilmiştir. Bağlantı gruplarının toplam uzunluğu 3 049 cM olarak belirlenmiştir. Bir bağlantı grubu üzerindeki SNP moleküler işaretleyicilerinin arasındaki en uzun mesafeler ve ortalama mesafeler belirlenmiştir. Haritanın bütünü ele alındığında moleküler işaretleyiciler arası maksimum mesafe 9 cM, her bir moleküler işaretleyici arasındaki ortalama mesafe 0.61 cM olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. 'Gemlik' x 'Edincik Su' melezlerinin Bağlantı Grupları (LG) üzerindeki SNP moleküler işaretleyicileri

Bağlantı Grupları (LG)	Haritalanan Moleküler İşaretleyici Sayısı (SNP)	LG Uzunluğu (cM)	Maksimum Mesafe (cM)	Ortalama Mesafe (cM)
LG1	230	242	8	1.06
LG2	233	214	5	0.92
LG3	190	125	6	0.66
LG4	361	120	4	0.33
LG5	334	125	9	0.37
LG6	291	130	2	0.44
LG7	278	125	4	0.44
LG8	272	132	8	0.49
LG9	263	110	3	0.42
LG10	257	157	9	0.61
LG11	250	136	4	0.54
LG12	230	151	6	0.65
LG13	230	122	4	0.53
LG14	214	102	2	0.48
LG15	217	92	2	0.42
LG16	215	94	3	0.44
LG17	191	96	2	0.51
LG18	192	121	5	0.63
LG19	184	162	6	0.88
LG20	176	99	4	0.56
LG21	150	91	2	0.60
LG22	108	58	2	0.54
LG23	96	83	7	0.87
LG24	58	92	7	1.59
LG25	215	70	3	0.32
Toplam	5736	3049	-	0.61



Şekil 4.2. ‘Gemlik’ x ‘Edincik Su’ melezlerinin SNP moleküler işaretleyicilerine dayalı 3049 cM uzunluğundaki 25 Bağlantı Grubu (LG)

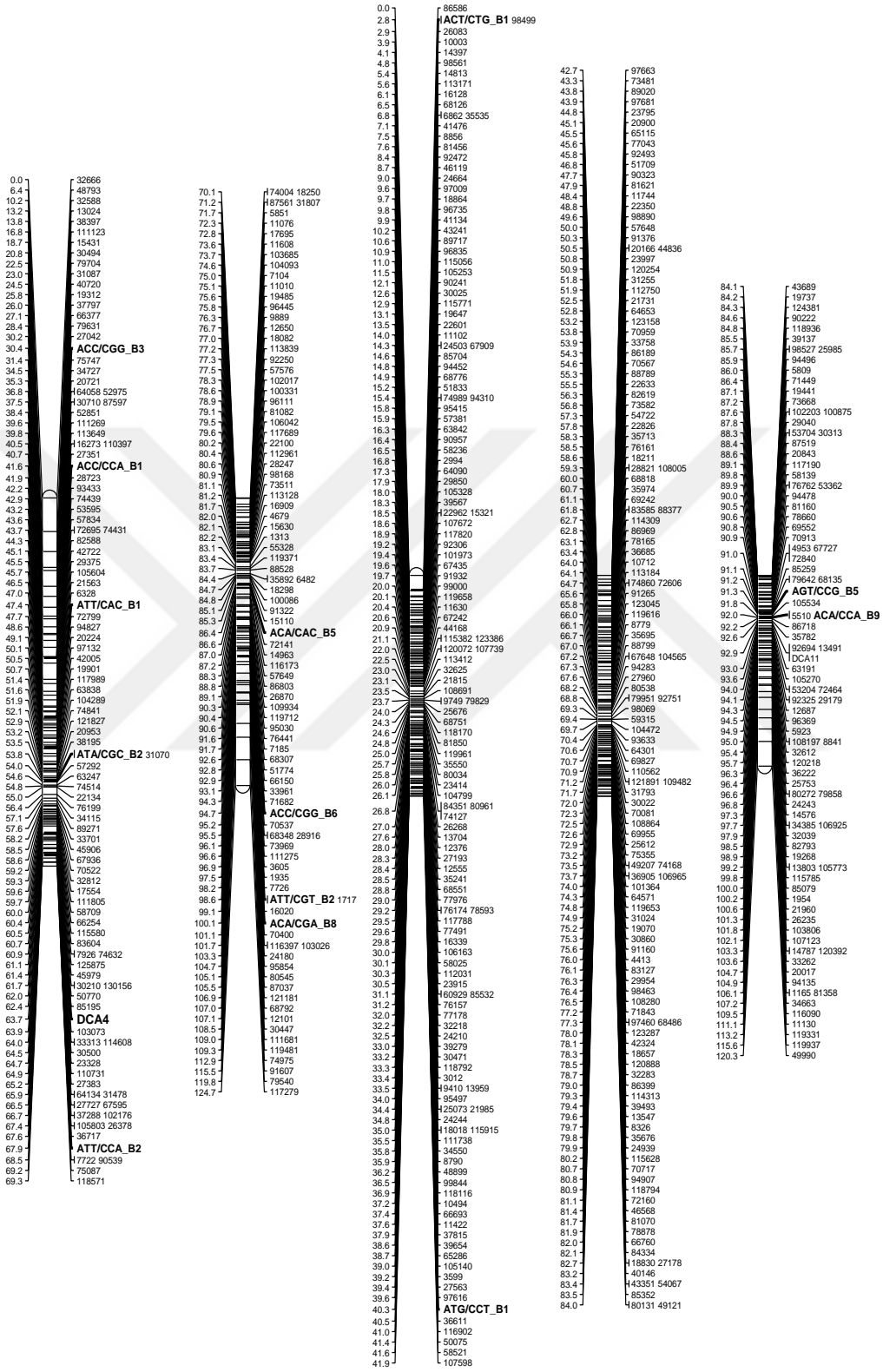
LG3 [1]

LG3 [2]

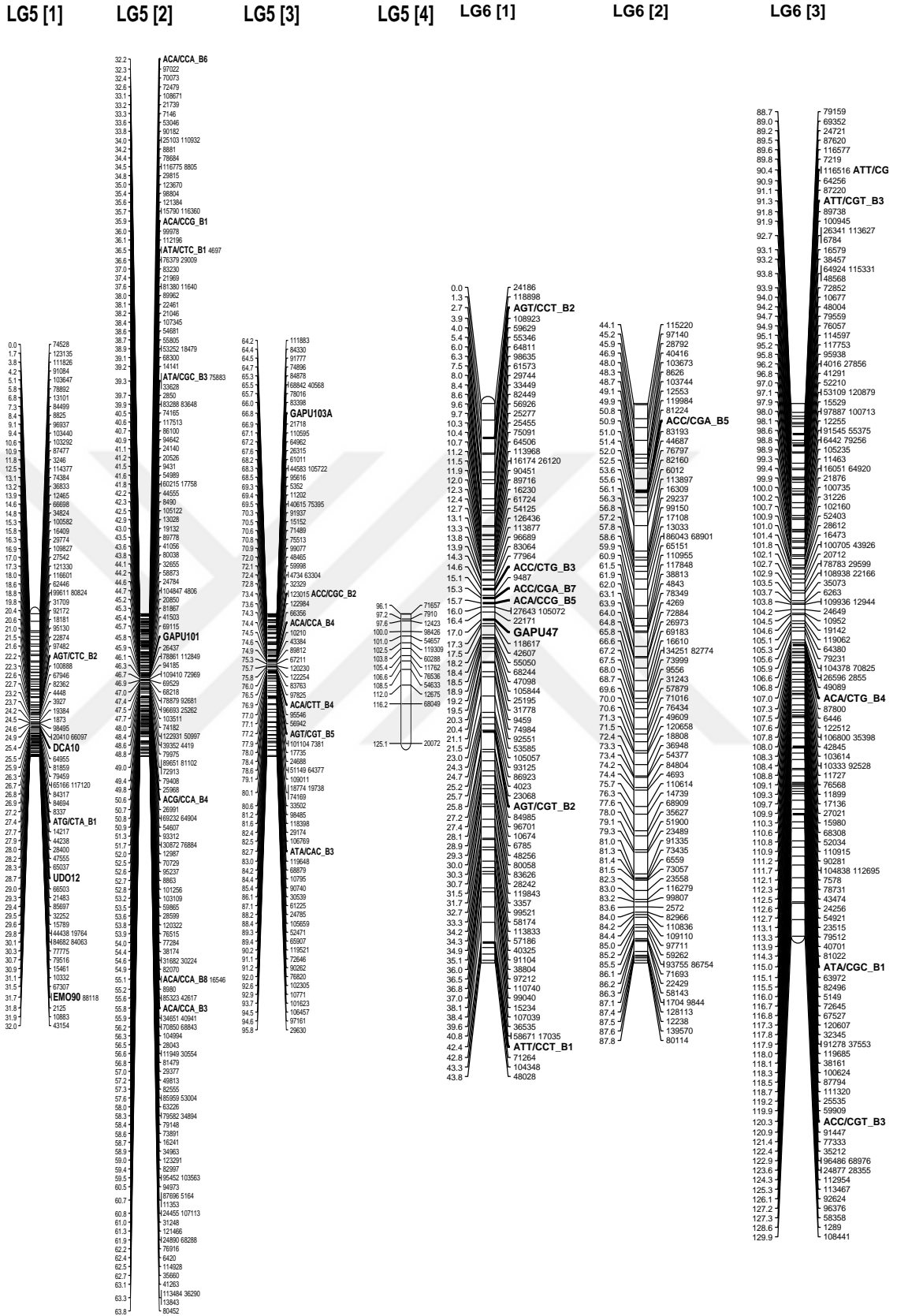
LG4 [1]

LG4 [2]

LG4 [3]



Şekil 4.2. 'Gemlik' x 'Edincik Su' melezlerinin SNP moleküler işaretleyicilerine dayalı 3049 cM uzunluğundaki 25 Bağlantı Grubu (LG) (devam)



Şekil 4.2. 'Gemlik' x 'Edincik Su' melezlerinin SNP moleküler işaretleyicilerine dayalı 3049 cM uzunluğundaki 25 Bağlantı Grubu (LG) (devam)

LG7 [1]

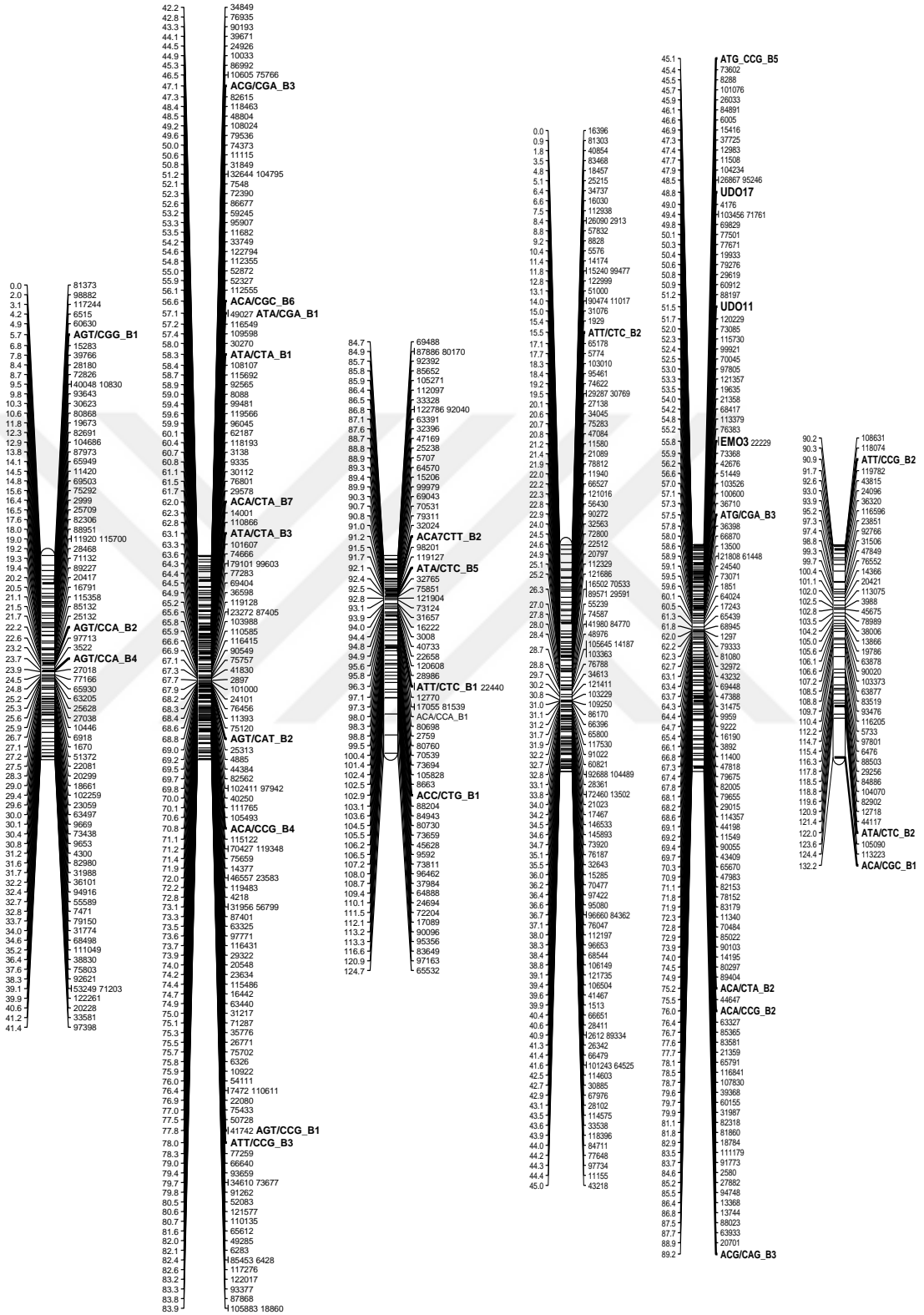
LG7 [2]

LG7 [3]

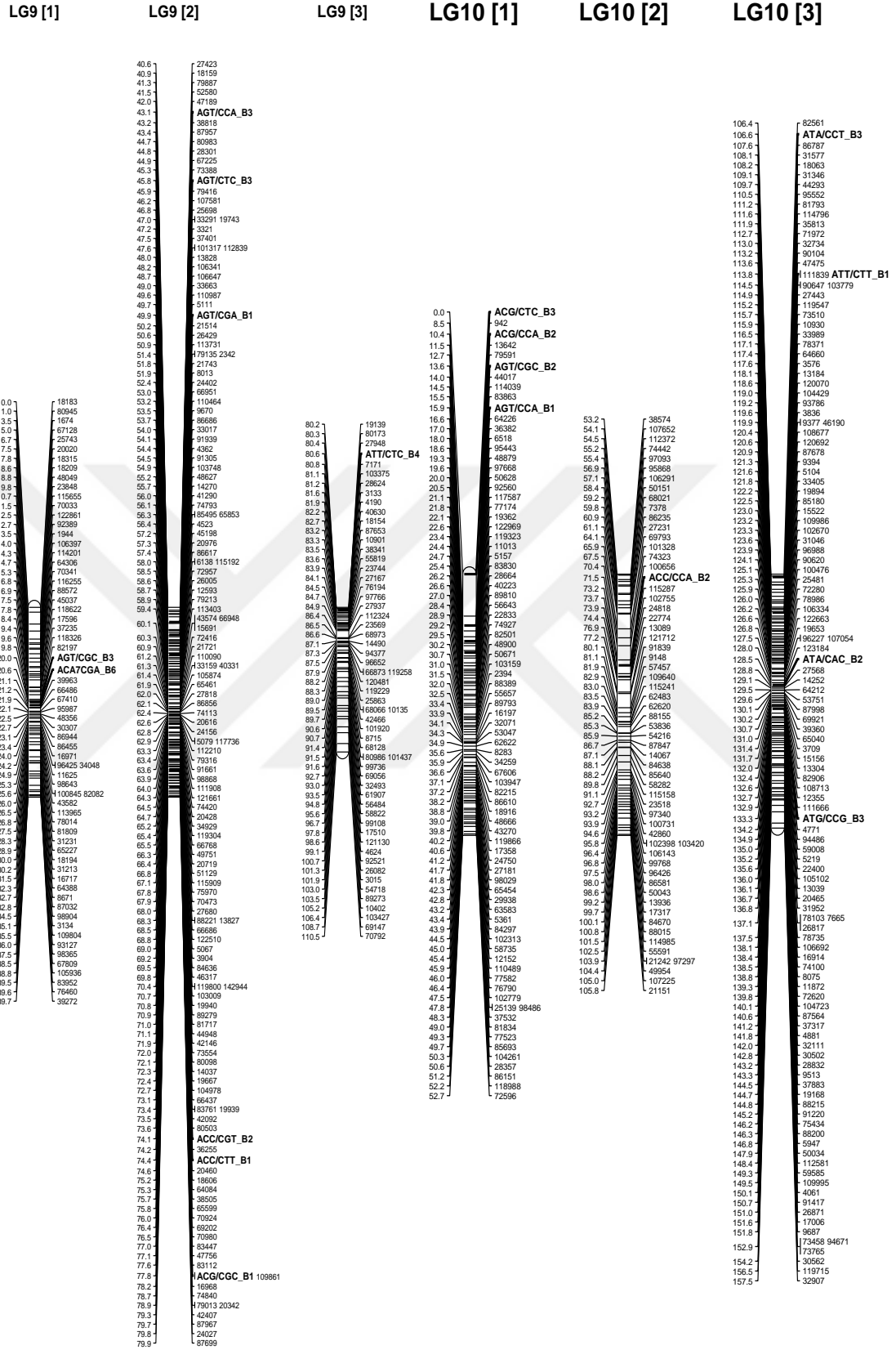
LG8 [1]

LG8 [2]

LG8 [3]



Şekil 4.2. ‘Gemlik’ x ‘Edincik Su’ melezlerinin SNP moleküler işaretleyicilerine dayalı 3049 cM uzunluğundaki 25 Bağlantı Grubu (LG) (devam)



Şekil 4.2. ‘Gemlik’ x ‘Edincik Su’ melezlerinin SNP moleküler işaretleyicilerine dayalı 3049 cM uzunluğundaki 25 Bağlantı Grubu (LG) (devam)

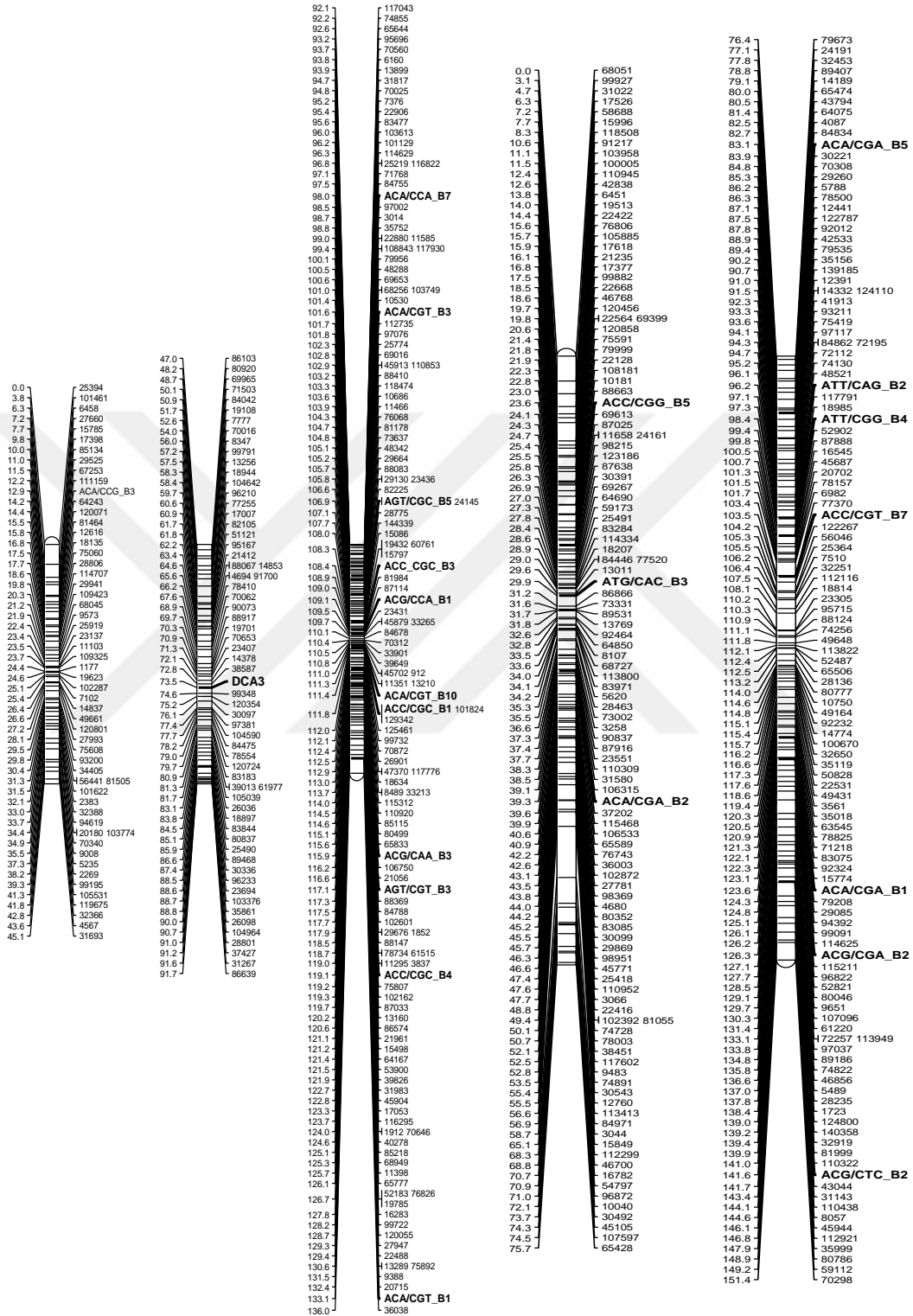
LG11 [1]

LG11 [2]

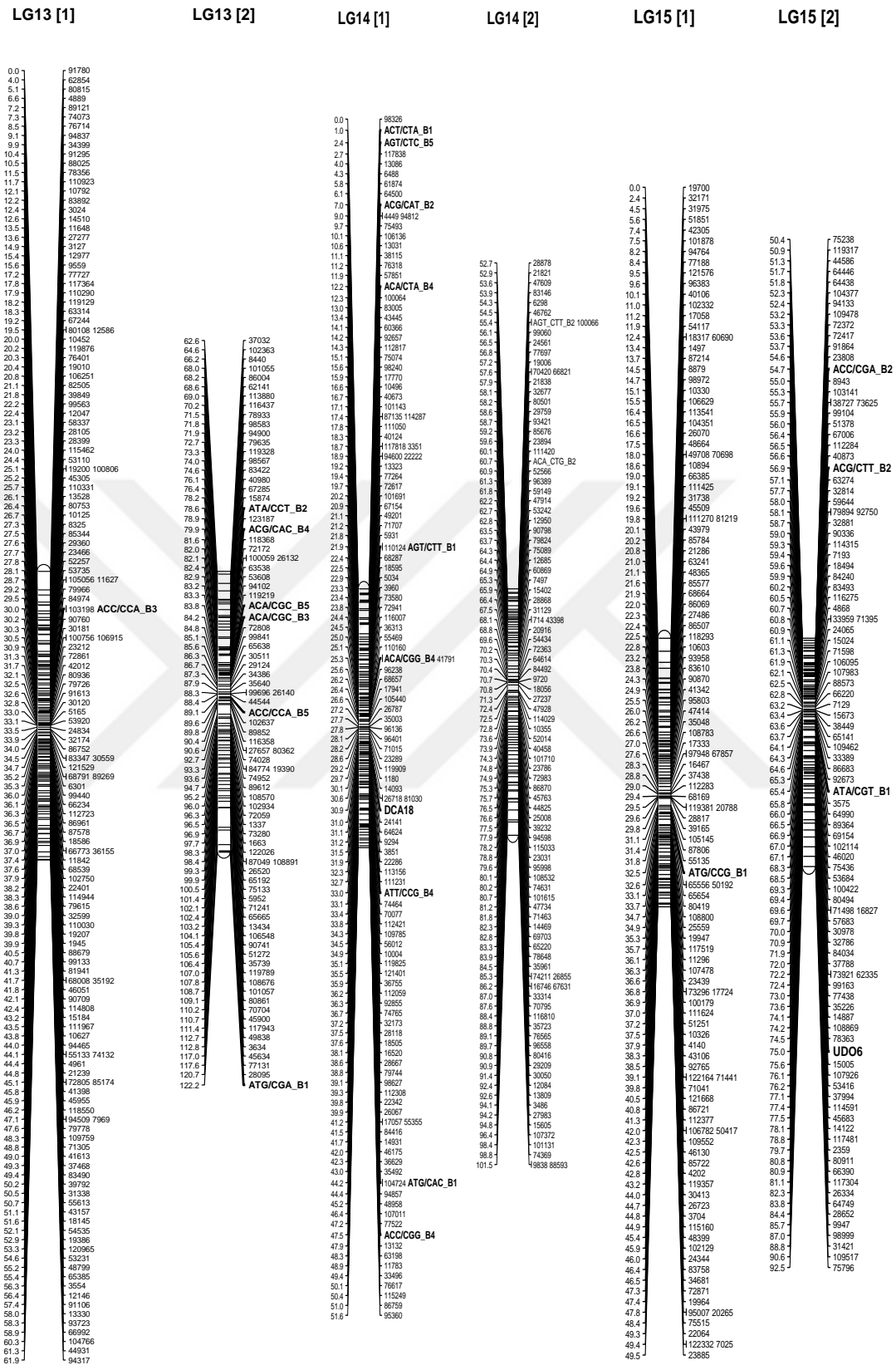
LG11 [3]

LG12 [1]

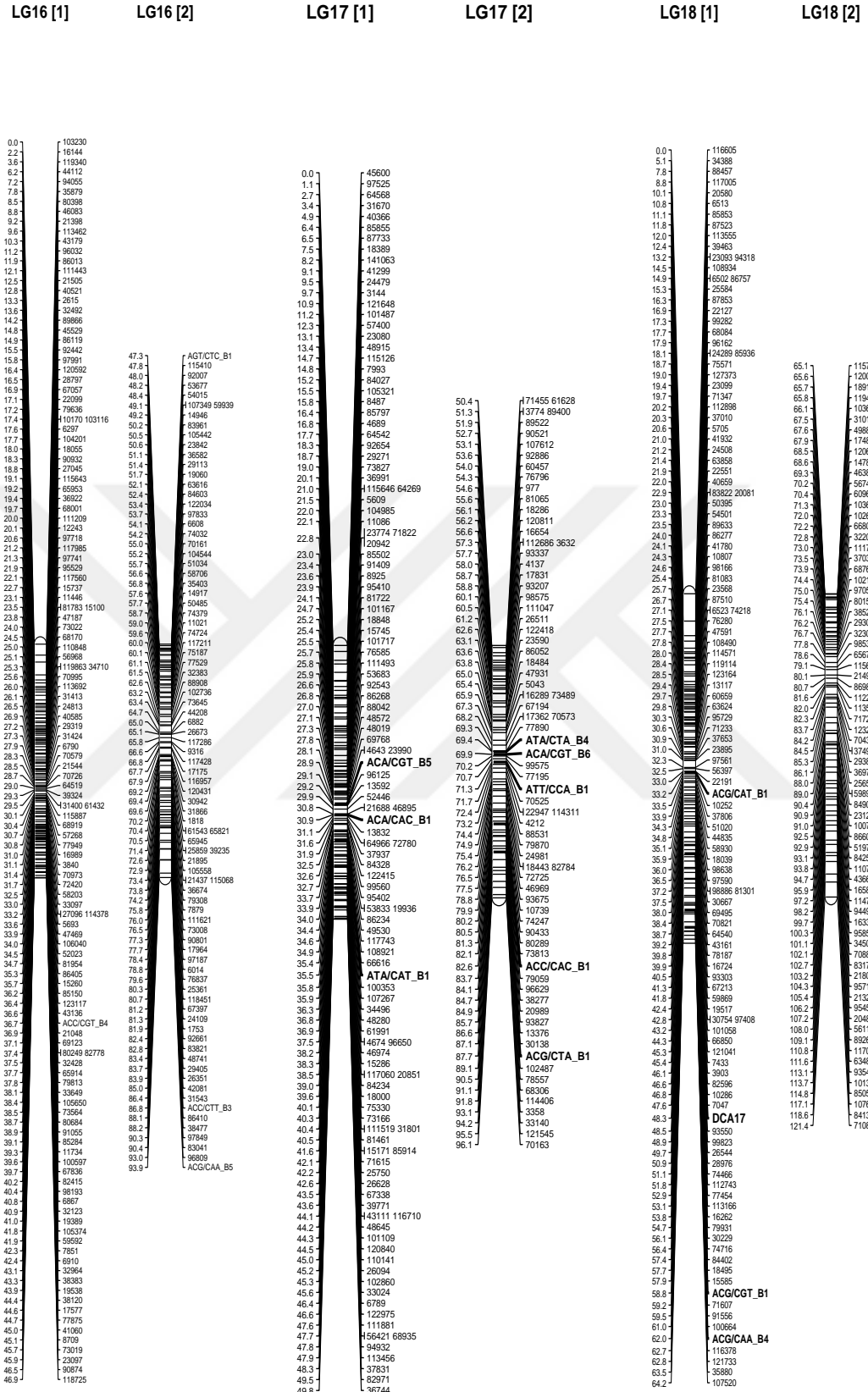
LG12 [2]



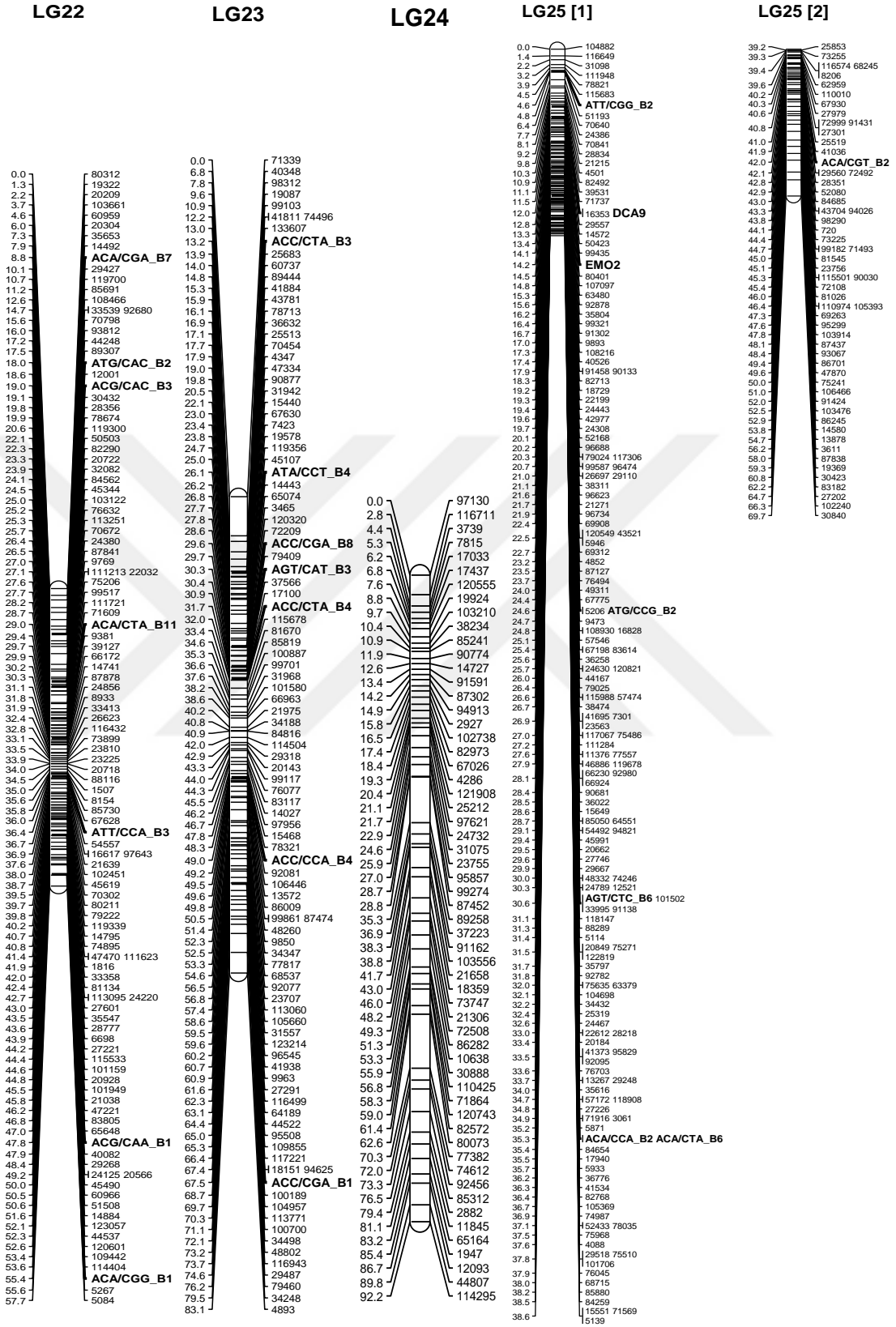
Şekil 4.2. ‘Gemlik’ x ‘Edincik Su’ melezlerinin SNP moleküler işaretleyicilerine dayalı 3049 cM uzunluğundaki 25 Bağlantı Grubu (LG) (devam)



Şekil 4.2. ‘Gemlik’ x ‘Edincik Su’ melezlerinin SNP moleküler işaretleyicilerine dayalı 3049 cM uzunluğundaki 25 Bağlantı Grubu (LG) (devam)



Şekil 4.2. ‘Gemlik’ x ‘Edincik Su’ melezlerinin SNP moleküler işaretleyicilerine dayalı 3049 cM uzunluğundaki 25 Bağlantı Grubu (LG) (devam)



Şekil 4.2 ‘Gemlik’ x ‘Edincik Su’ melezlerinin SNP moleküler işaretleyicilerine dayalı 3049 cM uzunluğundaki 25 Bağlantı Grubu (LG) (devam)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sekanslama bazlı genotipleme stratejileri genetik bağlantı haritalarında istenilen moleküler işaretleyici yoğunluğunu az maliyetle ve daha az iş gücü ile üretmede başarılı olsa da genom yapısının özgünlüğü elde edilen verilerin işe yararlılığını limitleyebilir (Treangen ve Salzberg. 2012). Genom kompleksliğini azaltarak haritalama işlemini kolaylaştıran Restriksiyon Enzimi Tabanlı metodlardan olan RAD-Seq (Baird ve ark. 2008) ve GBS (Elshire ve ark. 2011) metodları günümüzde oldukça yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. GBS ve RAD-Seq metodları benzer enzim kesim tekniğine dayansa da GBS daha az karmaşık bir methoddur ve zaman açısından değerlendirildiğinde de RAD-Seq'e oranla daha az zamanda daha çok veri elde etmeyi sağlamaktadır (Ward ve ark. 2013).

Zeytinde bugüne kadar oluşturulmuş genetik haritalar genellikle RAPD, AFLP, RFLP, SSR, ISSR moleküler işaretleyicileri ile oluşturulmuştur ve dünya genelinde kullanılmaktadır (La Rosa ve ark. 2003). Düşük maliyet genotipleme çalışmalarında prosedürü belirlemede en önemli etkidir. Mikrosatellitler, Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP), Sınırlayıcı Enzim Parça Uzunluğu Çeşitliliği (RFLP) gibi moleküler işaretleyicilerin elde edilmesinde klonlama ve primer dizaynı aşamalarının uğraştırıcılığı, maliyetinin fazla olması ve moleküler işaretleyici yoğunluğunun sınırlı olması gibi nedenlerle SNP (Single Nucleotid Polimorphism) moleküler işaretleyicileri önem kazanmıştır (Beissinger ve ark. 2013). SNP moleküler işaretleyicileri DNA üzerinde en fazla bulunan mutasyonlardır ve bitkilerde yapılan araştırmalarda son dönemde popüler olarak kullanılan moleküler işaretleyiciler durumundadırlar (Ward ve ark. 2013). SNP moleküler işaretleyicilerinin maliyet, elde edilmesindeki kolaylık ve yoğunluklu harita elde etmedeki avantajları nedeniyle SNP tabanlı bir bağlantı haritası oluşturulması tercih edilmiştir.

Daha önce zeytin bitkisine ait bağlantı haritası oluşturma çalışmalarında SNP moleküler işaretleyicileri tabanlı bir harita geliştirilmemiştir. Bu yüzden yaptığımız çalışma dünya genelinde bir ilk olmuştur. El Aabedine ve ark. (2010) ve Khadari ve ark. (2010) zeytine ait genetik bağlantı haritası oluşturmuşlardır. Yapılan çalışmalarda AFLP, ISSR ve SSR

moleküler işaretleyicileri kullanılmıştır. Bu haritalara ait ve bizim yaptığımız çalışmaya ait moleküler işaretleyici sayıları ve veriler Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Son dönemde zeytin genomunda yapılmış Genetik Bağlantı Haritası çalışmaları

Çaprazlamalar	Pop. Sayısı	Harita Uzunlğ. (cM)	Moleküler İşrt. Arası Ort. Uzaklık (cM)	Moleküler İşrt. Arası Maks. Uzaklık (cM)	Ort. Bağlantı Grubu Uzun. (cM)
'Picholine marocaine' × 'Picholine du Languedoc'*	140	2366	8.06	32	48
'Oliviere' × 'Arbequina'**	147	3823	8.70	66	91
'Gemlik' × 'Edincik Su'***	121	3049	0.61	9	122

* El Aabidine ve ark. (2010)

** Khadari ve ark. (2010)

*** Yaptığımız çalışma

Zeytin diploid bir bitki çeşitidir ve 46 kromozoma sahiptir ($2n=46$) (Green and Wickens 1989). Zeytine ait bir haritanın her bir haploid kromozoma ait olmak üzere 23 bağlantı grubu içermesi beklenmektedir. Yapılan son iki çalışmadan birinde 49 diğerinde ise 42 bağlantı grubu oluşturulmuştur (Çizelge 4.3). Yaptığımız çalışmada oluşturduğumuz bağlantı haritasındaki moleküler işaretleyiciler arasına giremeyen moleküler işaretleyicileri gözardı etmemek ve aynı zamanda harita güvenilirliğini de arttırmak amacıyla genetik bağlantı haritasında zeytin haploid kromozom sayısı olan 23'e yakın 25 bağlantı grubu oluşturulmuştur. (Çizelge 4.2).

Yaptığımız çalışmada 25 adet Bağlantı Grubu (LG) oluşturulmuş sayıları 58 ve 361 arasında değişen ve toplam 5 736 adet SNP moleküler işaretleyicisi harita üzerine yerleştirilmiştir. Bağlantı gruplarının toplam uzunluğu 3 049 cM olarak belirlenmiştir. Bir bağlantı grubu üzerindeki SNP moleküler işaretleyicilerinin arasındaki en uzun mesafeler ve ortalama mesafeler belirlenmiştir. Birden çok rekombinasyon olayından kaynaklanacak hatalar oluşmaması adına, özellikler arasında büyük aralıklar olmamasına dikkat edilmiştir.

Haritanın bütünü ele alındığında moleküler işaretleyiciler arası maksimum mesafe 9 cM, her bir moleküler işaretleyici arasındaki ortalama mesafe 0.61 cM olarak belirlenmiştir. El Aabedine ve ark. (2010) ve Khadari ve ark. (2010) tarafından oluşturulan zeytine ait genetik bağlantı haritalarıyla kıyaslandığında moleküler işaretleyici mesafeleri birbirlerine daha yakındır. Ortalama bağlantı grubu uzunluğuna bakıldığında da daha uzun gruplar elde edilmiştir (Çizelge 4.3).

Yaptığımız çalışmada 2 ebeveyn ve 121 melezden elde ettiğimiz verilerle 5 736 adet SNP moleküler işaretleyicisi 25 Bağlantı Grubu (LG) üzerine yerleştirilmiştir. El Aabedine ve ark. (2010) tarafından oluşturulan haritada 140 melezden 345 moleküler işaretleyici ve Khadari ve ark. (2010) tarafından oluşturulan haritada ise 147 melezden 436 moleküler işaretleyici haritalanabilmiştir (Çizelge 4.4). Buradan yola çıkılarak SNP moleküler işaretleyicilerinin Ward ve ark. (2013) tarafından bildirdiği gibi DNA üzerinde en fazla bulunan mutasyonlar olduğundan SNP tabanlı bağlantı haritalarının daha yoğunluklu haritalar oldukları söylenebilir.

Çizelge 4.4. Son dönemde zeytin genomunda yapılmış Genetik Bağlantı Haritası çalışmalarında moleküler işaretleyicilerin harita üzerine yerleştirilme sayıları

Çaprazlamalar	Populasyon Sayısı	Haritalanan Moleküler İşaretleyici Sayısı	Bağlantı Grubu Sayısı (LG)
‘Picholine marocaine’ × ‘Picholine du Languedoc’*	140	345	49
‘Oliviere’ × ‘Arbequina’**	147	436	42
‘Gemlik’ × ‘Edincik Su’***	121	5736	25

* El Aabedine ve ark. (2010)

** Khadari ve ark. (2010)

*** Yaptığımız çalışma

Elde edilen haritanın yoğunluğu arttıkça önemli ticari karakterlere ait moleküler işaretleyicileri belirlemek amacıyla yapılacak QTL analizleri daha da kolaylaşacaktır.

KAYNAKLAR

- Aabidine, A. Z. E., Charafi, J., Grout, C., Doligez, A., Santoni, S., Moukhli, A., Khadari, B. (2010).** Construction of a genetic linkage map for the olive based on AFLP and SSR markers. *Crop science*, 50(6), 2291-2302.
- Andolfatto, P., Davison, D., Erezyilmaz, D., Hu, T. T., Mast, J., Sunayama-Morita, T., & Stern, D. L. (2011).** Multiplexed shotgun genotyping for rapid and efficient genetic mapping. *Genome research*, 21(4), 610-617.
- Anonim, 2014.** The State of Food and Agriculture 2014. FAO, Rome.
- Anonim, 2016.** İstatiksel Tablolar ve Dinamik Sorgulama. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001 (Erişim Tarihi : 20.05.2016).
- Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Lewis, Z. A., Johnson, E. A. (2008).** Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS one*, 3(10), e3376.
- Beissinger, T. M., Hirsch, C. N., Sekhon, R. S., Foerster, J. M., Johnson, J. M., Muttoni, G., de Leon, N. (2013).** Marker density and read depth for genotyping populations using genotyping-by-sequencing. *Genetics*, 193(4), 1073-1081.
- Catchen JM, Amores A, Hohenlohe PA, Cresko WA, Postlethwait JH. (2011).** Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3 Genes Genomes Genetics* 1: 171-182.
- Chang , C. , Bowman , J.L. , DeJohn , A.W. , Lander , E.S. and Meyerowitz , E.M. (1988)** Restriction fragment length polymorphism linkage map for *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 85, 6856–6860.
- Cheema, J., & Dicks, J. (2009).** Computational approaches and software tools for genetic linkage map estimation in plants. *Briefings in bioinformatics*, 10(6), 595-608.
- Coe , E. , Hoisington , D.A. and Neuffer , M.G. (1990)** Linkage map of corn (maize) (*Zea mays* L.) (2N = 10). In *Genetic Maps*, 5th Edn. (O'Brien , S.J. , ed.). Cold Spring Harbor , NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 6.39.
- Çolakoğlu, M., (1969)** 1666-67 Kampanyasında Elde Edilen Türk Zeytinyağlarının Analitik Karakterleri, E. Ü Z. F. Yayın, No. 138.
- Davey, J. W., Hohenlohe, P. A., Etter, P. D., Boone, J. Q., Catchen, J. M., & Blaxter, M. L. (2011).** Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 12(7), 499-510.
- Donis-Keller, H., Green, P., Helms, C., Cartinhour, S., Weiffenbach, B., Stephens, K., Botstein, D. (1987).** A genetic linkage map of the human genome. *Cell*, 51(2), 319-337.
- De Donato, M., Peters, S. O., Mitchell, S. E., Hussain, T., & Imumorin, I. G. (2013).** Genotyping-by-sequencing (GBS): a novel, efficient and cost-effective genotyping method for cattle using next-generation sequencing. *PLoS One*, 8(5), e62137.
- Dogac E., Kandemir İ., Taskın V. (2013).** The genetic polymorphisms and colonization process of olive fly populations in Turkey. *PlosONE*. 8:2-e56067. – 2013
- Echt, C., Knapp, S., & Liu, B. H. (1992).** Genome mapping with non-inbred crosses using GMendel 2.0. *Maize Genet. Coop. Newsl*, 66, 27-29.
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., & Mitchell, S. E. (2011).** A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS one*, 6(5), e19379.
- Fierst, J. L. (2015).** Using linkage maps to correct and scaffold de novo genome assemblies: methods, challenges, and computational tools. *Frontiers in genetics*, 6.

- Fan J., Chee M. S., Gunderson K. L., (2006)** Highly parallel genomic assays. *Nat. Rev. Genet.* 7: 632–644.
- Gardner, K. M., Brown, P., Cooke, T. F., Cann, S., Costa, F., Bustamante, C., ... & Myles, S. (2014).** Fast and cost-effective genetic mapping in apple using next-generation sequencing. *G3: Genes/ Genomes/ Genetics*, 4(9), 1681-1687.
- Glaubitz, J. C., Casstevens, T. M., Lu, F., Harriman, J., Elshire, R. J., Sun, Q., & Buckler, E. S. (2014).** TASSEL-GBS: a high capacity genotyping by sequencing analysis pipeline. *PLoS One*, 9(2), e90346.
- Gore, M. A., Chia, J. M., Elshire, R. J., Sun, Q., Ersoz, E. S., Hurwitz, B. L., Ware, D. H. (2009).** A first-generation haplotype map of maize. *Science*, 326(5956), 1115-1117.
- Green PS, Wickens GE (1989).** The *Olea europaea* complex. In: Tan K, Mill RR, Elias TS, (eds) Edinburgh Univ Press, Edinburgh, pp. 287-299
- Griffiths, Anthony J. F.; Miller, Jeffrey H.; Suzuki, David T; Lewontin, Richard C.; Gelbart, William M. (Eds.) (1993).** *An Introduction to Genetic Analysis* (5th ed.) Chap. 5. New York: W.H. Freeman and Company. 2285-2.
- Janick, J., & Moore, J. N. (1996).** *Fruit breeding, tree and tropical fruits* (Vol. 1). John Wiley & Sons.
- Khadari, B., El Aabidine, A. Z., Grout, C., Sadok, I. B., Doligez, A., Moutier, N., Costes, E. (2010).** A genetic linkage map of olive based on amplified fragment length polymorphism, intersimple sequence repeat and simple sequence repeat markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 135(6), 548-555.
- Klug, W. S., & Cummings, M. R. (2003).** *Concepts of genetics* (No. Ed. 7). Pearson Education, Inc.
- La Rosa, R., Angiolillo A., Guerrero C., Pellegrini M., Rallo L., Besnard G., Bervill A., Martin A., Baldoni L., (2003).** A first linkage map of olive (*Olea europaea* L.) cultivars using RAPD, AFLP, RFLP and SSR markers, *Theor. Appl. Genet.*, 106, 1273–1282.
- Lander, E. S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M. J., Lincoln, S. E., & Newburg, L. (1987).** MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1(2), 174-181.
- Lobo, I., & Shaw, K. (2008).** Discovery and types of genetic linkage. *Nature education*, 1(1), 139.
- Stam, P. (1993).** Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: Join Map. *The plant journal*, 3(5), 739-744.
- Suiter, K. A., Wendel, J. F., & Case, J. S. (1983).** LINKAGE-1: a PASCAL computer program for the detection and analysis of genetic linkage. *Journal of Heredity*, 74(3), 203-204.
- Şeker, M., (2008).** *Subtropik Meyveler Ders Notları*, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Ders Notları, Çanakkale
- Treangen, T. J., & Salzberg, S. L. (2012).** Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nature Reviews Genetics*, 13(1), 36-46.
- Van Ooijen, J. W., & Voorrips, R. E. (2001).** JoinMap® 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. *Plant Research International, Wageningen, The Netherlands*, 1-51.

Voorrips, R. E. (2002). MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of Heredity*, 93(1), 77-78.

Wang, J., Li, L., & Zhang, G. (2016). A High-Density SNP Genetic Linkage Map and QTL Analysis of Growth-Related Traits in a Hybrid Family of Oysters (*Crassostrea gigas* × *Crassostrea angulata*) Using Genotyping-by-Sequencing. *G3: Genes/ Genomes/ Genetics*, 6(5), 1417-1426.

Ward, J. A., Bhangoo, J., Fernández-Fernández, F., Moore, P., Swanson, J. D., Viola, R., Sargent, D. J. (2013). Saturated linkage map construction in *Rubus idaeus* using genotyping by sequencing and genome-independent imputation. *BMC genomics*, 14(1), 2.

You, X., Shu, L., Li, S., Chen, J., Luo, J., Lu, J., Cai, Y. (2013). Construction of high-density genetic linkage maps for orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* using multiplexed shotgun genotyping. *BMC genetics*, 14(1), 113.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Kübra YILMAZ
Doğum Yeri ve Tarihi : Osmangazi / 1990
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu
Lise : Bursa Anadolu Kız Lisesi / 2008
Lisans : T.C. Haliç Üniversitesi / 2013
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi / 2016

Çalıştığı Kurum : Koçak Farma İlaç ve Kimya Sanayii
Ar&Ge Biyoteknoloji Proje Geliştirme Sorumlusu
2015 -
İletişim (e-posta) : kbraaylmz@gmail.com

Yayınlar

İpek, A., **Yılmaz, K.**, Sıkıcı, P., Tangu, N. A., Öz, A. T., Bayraktar, M., İpek, M., Gülen, H. (2016). SNP Discovery by GBS in Olive and the Construction of a High-Density Genetic Linkage Map. *Biochemical genetics*, 1-13.