



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI

KARADENİZ ALABALIĞINDA (*Salmo labrax*) POLİMORFİZMİN
BİYOENFORMATİK YÖNTEMLER KULLANILARAK
BELİRLENMESİ

DOKTORA TEZİ

Asiye Nur SALTAN

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Sebahattin ERGÜN

ÇANAKKALE – 2023



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

SU ÜRÜNLERİ YETİŞTİRİCİLİĞİ ANABİLİM DALI

**KARADENİZ ALABALIĞINDA (*Salmo labrax*) POLİMORFİZMİN
BİYOENFORMATİK YÖNTEMLER KULLANILARAK BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Asiye Nur SALTAN

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Sebahattin ERGÜN

Bu çalışma, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Trabzon Su Ürünleri
Merkez Araştırma Enstitüsü kurumu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: TAGEM/HAYSÜD/G/19/A6/P2/2448

ÇANAKKALE – 2023



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



Asiye Nur SALTAN tarafından Prof. Dr. Sebahattin ERGÜN yönetiminde ve Prof. Dr. Emre KESKİN ikinci danışmanlığında ve **08/09/2023** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Karadeniz Alabalığında (*Salmo labrax*) Polimorfizmin Biyoenformatik Yöntemler Kullanılarak Belirlenmesi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı**’nda **DOKTORA TEZİ** olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Sebahattin ERGÜN

(Danışman)

Prof.Dr. Murat YİĞİT

Prof.Dr.Ekrem Şanver ÇELİK

Prof.Dr. Süleyman AKHAN

Doç.Dr. Bilge KARAHAAN

Tez No :

Tez Savunma Tarihi : 08/09/2023

.....
İSİM SOYİSMİ

Enstitü Müdürü

.././20..

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

(İmza)

Asiye Nur SALTAN

(Tarih) .././2023

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocalarım Prof. Dr. Sebahattin ERGÜN ve Prof. Dr. Emre KESKİN, tez süresince rehberlik yapıp, yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Prof.Dr. Murat YİğİT ve Prof.Dr.Ekrem şanver ÇELİK'e yardımlarından dolayı, değerli arkadaşım ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Doktora öğrencisi Metehan ARIKAN'a teşekkür ve minnetlerimi sunarım. Ayrıca tezin gerçekleştirilmesi için imkan sağlayan Tarımsal Araştırmala ve Politikalar Genel Müdürlüğü Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırmalar Müdürlüğü'ne ve kurum müdürümüz Dr. Ercan KÜÇÜK'e teőekkürü bir borç bilirim. Hayatımın her evresinde bana destek olan başta değerli annem Yıldız SALTAN'a ve aileme sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Asiye Nur SALTAN
anakkale, Ağustos 2023

ÖZET

Karadeniz Alabalığında (*Salmo labrax*) Polimorfizmin Biyoformatik Yöntemler Kullanılarak Belirlenmesi

Asiye Nur SALTAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Su Ürünleri Yetiştiriciliği Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Sebahattin ERGÜN

İkinci Danışman: Prof. Dr. Emre Keskin

08/09/2023, 57

Sucul kaynakların korunması ve sorumlu bir şekilde yönetilmesi geniş kitleler tarafından tanınmış ve öncelik haline getirilmiştir. Bu nedenle yaygın olarak tüketilen ve üretimi yapılan türlerin genetik olarak istenen özelliklere sahip olması arzu edilen bir hale gelmiştir. Çalışmada karadeniz bölgesi ve çevresinde bulunan ve üretimi gerçekleştirilen *Salmo labrax* türünün genetik özelliklerinin bir kısmının ortaya konması hedeflenmiştir. Doğadan 30 ve yetiştiricilik hatlarında 30 olmak üzere toplam 60 balık üzerinde yürütülen çalışmada doğal örneklerde 37 haplotip elde edilmiştir ve haplotip çeşitliliği (Hd) 0,9880 olarak tespit edilmiştir ve toplam 51663 SNP sonucuna ulaşılmıştır. Yetiştiricilik hatları popülasyonunun toplamda 27 haplotipe ve Hd:0,9436 haplotip çeşitliliğine sahip olduğu görülmüştür ve yetiştiricilik popülasyonlarında toplamda 706053 SNP verisine ulaşılmıştır. Bir sonraki aşamada türün kendi referans genomunun oluşturulabilmesi açısından genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) yürütmek oldukça faydalı olacaktır. Belirlenen genlerdeki değişimlerin her hangi bir etkisinin olup olmadığının araştırılması ve bu tür değişimlerin başka genlerde de rastlanıp rastlanmadığının ortaya konması önem taşımaktadır. Gelecek dönemde yapılacak çalışmalarda linkage disequilibrium analizleri (LD) ve quantitative trait loci (QTL) çalışmalarının yürütülmesi bu nedenle önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Salmo labrax*, Tek Nükleotid Polimorfizmi, Biyoformatik, Karadeniz Alabalığı

ABSTRACT

Determination of Polymorphism in Black Sea Salmon (*Salmo labrax*) Using Bioinformatics Methods

Asiye Nur Saltan

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Doctoral Dissertation in Aquaculture

Supervisor: Prof. Dr. Sebahattin ERGÜN

Co-supervisor: Prof. Dr. Emre KESKİN

08/09/2023, 57

The conservation and responsible management of aquatic resources has been widely recognized and made a priority. For this reason, it has become desirable that the species that are widely consumed and produced have genetically desirable characteristics. In this study, it was aimed to reveal some of the genetic characteristics of *Salmo labrax* species found and produced in and around the Black Sea region. In the study carried out on a total of 60 fish, 30 from nature and 30 from aquaculture lines, 37 haplotypes were obtained in natural samples and the haplotype diversity (Hd) was determined as 0.9880, and a total of 51663 SNPs were obtained. The population of breeding lines was found to have a total of 27 haplotypes and a haplotype diversity of Hd: 0.9436, and a total of 706053 SNP data were obtained in the breeding populations. In the next stage, it will be very useful to conduct genome-wide association studies (GWAS) in order to create the species' own reference genome. It is important to investigate whether the changes in the identified genes have any effect and whether such changes are also found in other genes. Therefore, it is important to conduct linkage disequilibrium analyses (LD) and quantitative trait loci (QTL) studies in future studies.

Keywords: *Salmo labrax*, Single Nucleotide Polymorphism, Bioinformatics, Black Sea Salmon

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

JÜRİ ONAY SAYFASI.....	i
ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

1.1. Dünyada Su Ürünleri Sektörünün Genel Durumu.....	1
1.2. Türkiye’de Su Ürünleri Sektörünün Genel Durumu.....	2
1.3. Dünyada Üretilen Salmonidae Türleri ve Üretim Oranları.....	3
1.4. Karadeniz Alabalığı.....	4
1.4.1. Tür: <i>Salmo trutta labrax</i> PALLAS, 1811.....	4
1.5. DNA dizileme teknolojileri.....	5
1.5.1. Birinci Nesil Dizileme.....	6
1.5.2. İkinci Nesil Dizileme.....	6
1.5.3. Üçüncü Nesil Dizileme.....	7
1.5.4. Sekans Analiz Araçları.....	8
1.6. İslahta Genomik Teknolojiler.....	12
1.7. Tüm Genom Dizileme [Whole Genome Sequencing (WGS)]	13
1.8. Moleküler Genetik Markörler.....	13
1.8.1. Allozym Markörler.....	14
1.8.2. Mitokondrial DNA Markörler.....	15
1.8.3. Rastgele Amplifikasyonlu Polimorfik DNA (RAPD) Belirteçleri.....	16
1.8.4. Mikrosatelit Markörler.....	16

1.8.5.	Tek Nükleotid Polimorfizmi [Single Nucleotide Polimorphism (SNP)].....	17
1.8.6.	Popülasyon Yapısının Çıkarımında Tek Nükleotid Polimorfizmleri ve Mikrosatellitlerin Karşılaştırılması	18
1.8.7.	Balıkçılık ve Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Yeni Gelişen Markörler.....	19
1.8.8.	Çalışmanın Amacı.....	19
İKİNCİ BÖLÜM		
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR		20
2.1.	Salmo Türleri Üzerine Yapılan Genetik Çalışmalar.....	20
ÜÇÜNCÜ BÖLÜM		24
MATERYAL YÖNTEM		
3.1.	Çalışmada Kullanılan Tür ve Biyolojik Özellikleri.....	24
3.2.	Örneklerin Orjinleri	24
3.3.	DNA İzolasyonu	24
3.4.	Sekanslama	25
3.5.	Sanger Sekanslama.....	26
3.5.1.	Sanger Sekanslama Protokolü.....	26
3.5.2.	ExoSap Pürifikasyon.....	26
3.5.3.	EtOH Çöktürme – PCR Pürifikasyonu.....	28
3.5.4.	Denatürasyon ve Cihaza Yükleme.....	29
3.6.	Biyoenformatik Analizler.....	29
3.6.1.	Tam Genom Sekanslama (Whole Genome Sequencing).....	30
3.6.2.	Tam Genom Sekanslama Kütüphane Hazırlanması.....	30
3.6.3.	Veri (Data) Analizi.....	36
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM		39
ARAŞTIRMA BULGULARI		
4.1.	Türlerin Teyyidi ve Karşılaştırılması.....	39
4.2.	SNP Profili ve Değişimleri.....	42

BEŞİNCİ BÖLÜM
SONUÇ ve ÖNERİLER

	46
5.1. Sonuç	46
5.2. Öneriler	48
KAYNAKÇA	49
ÖZGEÇMİŞ	I



SİMGELER VE KISALTMALAR

SNP	Single nucleotide polymorphisms
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
NCBI	National Center for Biotechnology Information
WGS	Whole Genome Sequencing
GWAS	Genome Wide Association Studies
QTL	Quantitative Trait Loci
LD	Linkage Disequilibrium
AS	Doğal Populasyonlar İçin Kod İsim
ANS	Yetiştiricilik Populasyonları İçin Kod İsim
FAO	Food And Agriculture Organization
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	ASCII karakterleri ile Phred kalite puanları ilişkisi	11
Tablo 2	ExoSAP ve PCR ürün miktarları	26
Tablo 3	Thermal cycler döngüsünün sıcaklıkları ve süreleri	27
Tablo 4	Sekans PCR'ı için hazırlanan örneklerin	27
Tablo 5	Sekans için hazırlanan örneklerin Thermal döngü sayıları, sıcaklık ve süreleri.	28
Tablo 6	PCR pürifikasyonu için kullanılan kimyasallar ve miktarları	28
Tablo 7	Denatürasyon sıcaklığı ve süresi	29
Tablo 8	DNA Konsantrasyonları	31
Tablo 9	TAG Programı	32
Tablo 10	ELM Programı	33
Tablo 11	ITD Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A	34
Tablo 12	Quantify ve Pool Kütüphaneler	36
Tablo 13	Doğal populasyon örneklerinin BLAST sonuçları.	39
Tablo 14	Doğal (AS) ve Yetiştiricilik(ANS) populasyonlarının Pairwise Distance analizi.	41
Tablo 15	Doğal (AS) ve Yetiştiricilik (ANS) populasyonlarının diğer salmon türleri ile Pairwise Distance analizi.	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1	Karadeniz alabalığı (<i>Salmo labrax</i> L.) (Çakmak, E., 2008)	4
Şekil 2	Çoklu FASTA dosyası örneği.	9
Şekil 3	Çoklu FASTAQ dosya formatı örneği	10
Şekil 4	Okuma kalitesinin baz pozisyonuna karşı kutu grafiği.	11
Şekil 5	Tagmentasyon sonrası saflaştırma aşamaları	33
Şekil 6	Qbit cihazı ve kütüphane konsantrasyonlarının ölçümü.	35
Şekil 7	Doğal (AS) ve Yetiştiricilik (ANS) türlerinin diğer salmon türleri içindeki mitokondrial COI geni baz alınarak oluşturulan maximum likelihood ve neighbor-joining bootstap consesus filogenetik ağacı.	42
Şekil 8	Populasyonlar üzerindeki sayısal SNP dağılımı.	43
Şekil 9	Yetiştiricilik populasyonlarındaki igfbp1a ve mstnb genleri üzerinde gözlenen nükleotid değişimleri.	44
Şekil 10	Doğal populasyonların MAF sonuçları (minor allele frequency)	44
Şekil 11	Yetiştiricilik populasyonların MAF sonuçları (minor allele frequency)	45

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

1.1. Dünyada Su Ürünleri Sektörünün Genel Durumu

Son yıllardaki bilimsel gelişmeler sucul sistemlerin fonksiyonlarını ve işleyiş şeklinin anlaşılmasında gözle görülür bir gelişmeye sebep olmuş ve aynı zamanda sürdürülebilir bir şekilde yönetilmesi gerekliliği konusunda bir bilinç ortaya koymuştur. Sucul kaynakların korunması ve sorumlu bir şekilde yönetilmesi geniş kitleler tarafından tanınmış ve öncelik haline getirilmiştir. Bu bağlamda bilimsel alt yapıyı koruma ve sürdürülebilirlik politikalarının oluşumu ön plana konmuş durumdadır. Doğal stoklar ve yetiştiricilik yoluyla üretilen balıkların ne gibi sorunlarla karşılaşabileceğini bilmek ise hayati önem taşımaktadır (FAO, 2020).

Dünyada genel olarak balık üretimi 2018 yılı itibari ile toplamda 179 milyon tona ulaşmıştır. Toplam satış gelirinin ise 401 milyar dolar ve bunun 82 milyon tonu ve yaklaşık 250 milyar dolarlık karşılığı ise yetiştiricilik faaliyetlerinden gelmiştir (FAO, 2020). Toplam üretimin 156 milyon tonluk kısmı insan tüketimi için kullanılmış olup, bu da ortalama olarak yıllık kişi başı 20,5 kg tüketime eşdeğerdir. Kalan 22 milyon tonluk kısım ise tüketim dışı sektörlere aktarılmış olup, bunlar genel olarak balık unu ve balık yağı üretim sektörleridir. Yetiştiricilik sektörünün payı ise toplam üretimin % 46'lık kısmını ve insan tüketimi için kullanılan balık üretiminin ise % 52'lik kısmını oluşturmaktadır. Çin 2018 yılında toplam üretimin % 35'lik kısmını gerçekleştirerek yine en çok üretim yapan ülke olarak başı çekmektedir. Çin dışarıda bırakıldığında, 2018 yılında yapılan üretimin büyük bir kısmı Asya kıtasından (% 34) gelmektedir, sırasıyla Amerika kıtası (% 14), Avrupa kıtası (% 10), Afrika kıtası (% 7) ve Okyanusya (% 1) üretim oranlarıyla Asya kıtasını izlemektedir. Son yıllarda toplam balık üretimi Avrupa (80'lerin sonuna doğru azalma göstermiştir fakat son yıllarda az da olsa düzelme göstermektedir) ve Amerika (hamsi türlerinin yakalanmasında karşılaşılan dalgalanmalar sebebiyle 90'ların ortalarından itibaren azalış ve artışlar yaşanmıştır) kıtaları dışında kalan bütün kıtalarda önemli ölçüde artış göstermiştir. Dolayısıyla, Afrika ve Asya kıtalarında üretim son 20 yılda neredeyse iki katına çıkmıştır. Küresel balık tüketimi yıllık % 3,1'lik bir oranla 1961'den 20017'ye kadar yıllık bir artış göstermiştir. Bu oran yıllık nüfus artışının (% 1,6) neredeyse iki katıdır ve aynı periyotda

diğer hayvansal kaynaklı protein kaynakları üretim kalemlerinin (et, süt ürünleri, süt, vb.) artışı yıllık % 2,1 oranında seyretmiştir. Kişi başı balık tüketimi 1961 yılından 2018'e kadar 9 kilodan (canlı ağırlık olarak) 20,5 kiloya çıkmıştır, bu da yıllık % 1,5'lük bir artışa denk gelmektedir. Bölgeler ve eyaletler arasında balık tüketim oranlarında devam eden değişiklikler olmasına rağmen belirli tüketim trendleri mevcuttur. Gelişmiş ülkelerde görünür balık tüketimi 1961'de 17,4 kilo iken 2007'de 26,4 kilograama çıkmıştır, daha sonra kademeli olarak 2017 yılına kadar 24,4 kilograama kadar gerilemiştir. 2017 yılında balık tüketimi bütün hayvansal kaynaklı protein tüketiminin % 17'sini ve tüm protein tüketiminin % 7'sini oluşturmaktadır. Küresel olarak balık tüketimi 3,3 milyar insanın ortalama hayvan protein tüketiminin % 20'sini oluşturmaktadır ve bu oran Bangladeş, Kamboçya, Gambia, Gana, Endonezya, Sierra Leone, Sri Lanka ve küçük gelişmekte olan ada devletlerinde % 50 gibi bir orana ulaşmaktadır. Küresel avlama oranları 2018 yılında geçen üç yıla oranla ortalama % 5,4'lük bir artışla 96,4 milyon ton gibi rekor bir rakama ulaşmıştır. Artış genel olarak deniz kaynaklı avlamadan kaynaklanmaktadır. Üretim oranları 2017 yılında 81,2 milyon tondan 2018 yılında 84,4 milyon tona ulaşmıştır ve bu da hala 1996 yılında yakalanana tüm zamanların en yüksek üretim oranı olan 86,4 milyon tonun altındadır (FAO, 2020). Türkiye'de su ürünleri üretimi başlangıcından bu yana artan bir trendle devam etmektedir.

1.2. Türkiye'de Su Ürünleri Sektörünün Genel Durumu

Gerek coğrafi konumu gerekse sahip olduğu doğal kaynakları açısından Türkiye su ürünleri üretimi için oldukça yüksek bir potansiyele sahiptir. Türkiye üç tarafında oldukça verimli olan dört deniz kütlesi ile sarılıdır. Kuzeyde Karadeniz ve Marmara denizi, batıda Ege denizi ve Güneyde bulunan Akdeniz denizel üretim açısından Türkiye'ye oldukça büyük bir potansiyel sunmaktadır. Ayrıca iç suların zenginliği tatlı su türlerinin üretimi ve avlanması için oldukça elverişli koşullar oluşturmaktadır. Toplamda 33 nehir, 200 doğal göl, 822 baraj gölü ve 507 gölet barındıran Türkiye sucul kaynaklar açısından bölgedeki en zengin ülkelerden biri olması dolayısıyla büyük bir su ürünleri üretim kapasitesi ve potansiyeline sahiptir. (Arslan, G., 2021).

Türkiye'de su ürünleri üretimi seksenli yılların sonunda yetiştiricilik faaliyetlerinin de başlaması ile bir ivme kazanmıştır. Başlangıçta küçük aile işletmelerinin alabalık üretimi

ile başlayan bu trend daha sonra baraj göllerinde ağ kafes üretiminin başlaması ile hız kazanarak Türkiye'nin çeşitli bölgelerine dağılmıştır. Bu ve takip eden yıllarda kafes ve yem teknolojilerinin gelişmesi ve alanda uzmanların ortaya çıkması ile hızlı bir şekilde ilerleme göstermiştir. Sonuç olarak 2019 yılında denizde gerçekleştirilen yetiştiricilik ve iç suların uzun süren baskın trendini geride bırakarak iki katına ulaşmıştır. 2019 yılında gerçekleştirilen toplam yetiştiricilik üretimi ise 373,4 bin metrik tona ulaşmıştır ve bunun 265,9 tonu (% 68,82) denizlerde gerçekleştirilen yetiştiricilik faaliyetlerinden, 116,4 bin metrik tonu da (% 31,18) iç sularda gerçekleştirilen yetiştiricilik faaliyetlerinden elde edilmiştir Atalay, M. A., 2020).

Yeni türlerin üretimi devlet tarafından desteklenmesine rağmen alabalık, çipura ve levrek halen en çok üretilen türlerdir. İç sularda gerçekleştirilen alabalık üretimi 2010 ve 2019 yılları arasındaki periyotta 2013 yılına kadar artış göstermesine rağmen 2014 yılında az da olsa bir azalış trendi seyretmiş ve 101 bin metrik ton civarında kalmıştır, takip eden 2015 ve 2016 yıllarında da bu oranda üretilmeye devam etmiştir. Alabalık üretimi iç sularda 2018 yılında 104, 9 bin metrik tona 2019 yılında ise 116,1 metrik tona ulaşmıştır. Denizde alabalık üretimi ise çoğunlukla Karadeniz'de yapılmaktadır. 2010 yılında 7,1 bin ton üretim gerçekleştirilirken bu oran 2019 yılında 9,7 tona kadar ulaşmıştır. Son yıllarda uluslararası pazarda Karadeniz alabalığına (Türk somonu) olan ilgi oldukça artmıştır, bu da Karadeniz alabalığının üretim oranının artmasına sebebiyet vermektedir (TÜİK, 2020).

1.3. Dünyada Üretilen Salmonidae Türleri ve Üretim Oranları

Salmon ismi Salmonidae familyasına ait balıklar için kullanılan ortak bir isimdir (Atlantik salmon, Pasifik salmon vb.) ve familyanın diğer üyeleri ise alabalık olarak isimlendirilmektedir (Kahverengi alabalık, Deniz alabalığı vb.). Salmon türleri genellikle anadrom özelliktedir (tatlı suda doğarlar ve denizlere göç ederler, daha sonra üremek için tekrar tatlı suya dönerler). Dünyanın salmon üretiminin % 69'unu yetiştiricilik yoluyla elde edilmektedir. Salmonid türlerinin tüketimi içeriğindeki yüksek protein, omega-3 yağ asitleri, vitamin ve mineraller dolayısıyla oldukça sağlıklı kabul edilmekte ve teşvik edilmektedir (Atalay, M. A., 2020).

Dünyada salmonid türlerinin (Somon, Alabalık ve Smolt) üretimi 90'larda avcılığı geçmiş ve günümüzde genel itibari ile yetiştiricilik yolu ile elde edilmektedir. 2018 yılında yetiştiricilik yoluyla elde edilen ve global pazara sunulan salmonid üretimi % 69'u bulmuştur (FAO 2020).

Salmonid türlerinin küresel üretimi 2016 yılında % 2 azalarak 3,3 milyon tona gerilemiştir. Dünyanın en önemli üreticilerinin arasında olan Norveç (global üretimin % 37'si) ve Şili'nin (% 22'si) yaşadığı üretim sorunları düşük arza sebep olmuştur (FAO 2018). Bu durumu takiben 2020 ve 2021 yıllarında küresel pandemi Covid-19 yüzünden üretimde azalmalara ve fiyatlar konusunda da dalgalanmalara devam etmiştir. Genel olarak Dünyada hacim ve değer kaybeden salmonid türleri tüketicinin tüketim alışkanlıklarının değişmesi ile hazır ve donmuş ürünlere doğru bir değişim göstermiştir(FAO 2022).

1.4. Karadeniz Alabalığı

1.4.1. Tür: *Salmo labrax* PALLAS, 1811

Deniz alası, Karadeniz alabalığı ya da Karadeniz somonu olarak da bilinen *Salmo labrax* Avrupa ve Asya'nın Karadeniz'e dökülen akarsularının birçoğunda ayrıca, Makedonya vardar nehrinin üst kısımlarında da bulunmaktadır.



Şekil 1. Karadeniz alabalığı (*Salmo labrax* L.) (Çakmak, E., 2008)

Yapılan çalışmalar sonucunda denizden göç gerçekleştirdiklerinde boyutları 100cm ve 16 kg'ı bulan bireylere rastlanmıştır. Ayrıca literatürde bu türün deniz, dere ve göl ekotipleri olduğuna değinilmektedir (Pavlov, D. S., 2010).

Yapılan çalışmalar sonucunda deniz ekotipinde görülen bireylerin smoltlaşma sonrasındaki dönemde gümüşe çalan bir renk aldıkları bildirilmiştir ve bu bireylerin diğer ekotiplere kıyasla daha büyük boyutlara ulaştıkları bildirilmiştir. Deniz ekotipi Gürcistan ve Türkiye'nin (İyidere, Solaklı, Baltacı, Kapistre, Sümer, Fırtına ve Çağlayan) bazı akarsularında bulunduğu son dönemde yapılan çalışmalarda sayılarındaki azalmaya dikkat çekerek bildirilmiştir (Çakmak, E., 2010).

Karadeniz alabalığı genel olarak yaşamlarının çoğunluğunu ve beslenme periodunu denizlerde geçirmektedirler. Kış aylarında üreme dönemlerine geldiklerinde ise Karadeniz'e bağlanan nehirlerle girerek özellikle çakıllı ve taşlık alanlarda yumurtalarını bırakır. Karadeniz alabalığı ilkbaharda smolt sonbaharda ise üreme göçlerini tatlısu ile deniz arasında yapmaktadırlar. (Svetovidov, A.N., 1984; Geldiay, R., 1996).

Bu türün göl ekotipine gelinecek olursa, hayatlarının büyük çoğunluğunu göllerde ve durağan sularda geçirmektedirler. Bu nedenden dolayı üreme ve beslenme için göç davranışı sergilemezler. Bu tür davranış gösteren Karadeniz alabalıkları genel olarak göl ekotipi (*Natio lacustris*) olarak adlandırılmaktadırlar. Bunun yanında bazı akarsular ve onların kollarına yerleşerek tüm hayat döngüsünü burada gerçekleştiren tatlı su ekotipleride bulunmaktadır. Karadeniz alabalığının bu türleri, deniz ve akarsulara göç etmezler fakat buldukları akarsu ekosistemi dahilindeki kaynak, yan kollar ve dere ağızları arasında kısa süreli göç hareketleri gösterebilmektedirler. Akarsu üzerinde gerek beslenme gerekse üreme amacıyla aşağı yukarı havzalar arasında göç hareketleri sergilerler bu tip ekotipler ise dere ekotipi olarak adlandırılmaktadır (Slastenenko, E.P., 1956; Geldiay, R., 1996).

1.5. DNA dizileme teknolojileri

Watson ve arkadaşlarının 1953'de dört Deoksiribo nükleik Asit (DNA) bazından {A, T, C, G} oluşan çift sarmallı yapının keşfi ile genomik dizilerin kodunun çözülmesine ve organizmaların DNA kompozisyonunun ortaya çıkarılabilmesine imkan sağlamıştır (Watson, JD, 1953). Bu keşif DNA sekanslama teknolojilerinin geliştirilmesinin kapısını da aralamış ve DNA bileşimini kullanarak dünyadaki tüm biyolojik yaşamın kodunu anlama ve şifresini çözme, genetik hastalıkları anlama ve tedavi etme imkanlarını sağlamıştır (Le Tourneau, C, 2015). Sekanslama teknolojilerinin ortaya çıkışı organizmaların genomik

dizilerinin analizinde önemli bir rol oynamıştır. Sekanslama sonucunda oluşan veriler DNA dizileri olarak elde edilmektedir (Shendure, J., 2008) ve beş harften oluşan bir alfabede okuma adı verilen dizelerdir {A, T, C, G, N}. Okumalarda kullanılan N sembolü belirsizliği temsil etmek için kullanılır. Bu teknoloji 1977'de Cambridge üniversitesinden Sanger ve arkadaşları ve Harvard üniversitesinden Maxam ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Sanger, F., 1977) ve 1980 yılında kimya alanında Nobel ödülüne layık görülmüştür (Maxam, A. M., 1977). Bu keşifle birlikte canlıların genetik yapısının incelenmesinin yolu açılmış ve başka bilim insanlarının da yeni daha hızlı ve verimli dizileme teknolojileri geliştirmesi için ilham kaynağı olmuştur. Sanger dizileme, yüksek verimliliği ve düşük radyoaktivitesi nedeniyle en çok uygulanan dizileme tekniği haline gelmiştir (Pareek, C. S., 2011) ve "Sanger Dizileme Teknolojisi" olarak ticarileştirilmiş ve otomatikleştirilmiştir.

1.5.1 Birinci Nesil Dizileme

Sanger sekanslama yöntemi (Sanger, F., 1977) birinci nesil bir dizileme teknolojisi olarak kabul edilmekte ve 1970'lerden günümüze kadar yaygın olarak kullanılmaktadır (Metzker, M.L., 2010). Bu teknoloji 2001 yılından bu yana yaygın olarak kullanılmaktadır ve ilk insan genomu dizileme projesi bu yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Daly, M.J., 2001, Venter, J.C., 2001). Bu teknoloji, birkaç yüz nükleotide kadar oldukça uzun diziler üretebilmekte ve yüksek doğrulama oranına sahip diziler elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Sanger teknolojisi yaygın kullanılan ve iyi sonuçlar sağlamanın yanında bazı dezavantajlara da sahiptir. Bunlar, sekans verilerini oluşturmak için gereken sürenin yanı sıra, yüksek hacimlerde veri üretmenin toplam maliyetini düşürmek için süreci paralelleştirme yeteneğinin sınırlı olması olarak sıralanabilir (Daly, M.J., 2001, Venter, J.C., 2001).

1.5.2. İkinci Nesil Dizileme

İkinci Nesil Dizileme (SGS) teknolojisi, ilk olarak 2005 yılında 454 Life Sciences tarafından geliştirilerek kullanıma sunulmuştur (<http://www.454.com>, Margulies ve diğerleri, 2005). Aynı dönemde 2006 yılının sonlarına doğru Solexa tarafından Genome Analyzer adlı başka bir SGS platformu piyasaya sürülmüştür. Solexa, bu platformun yayınlanmasından kısa bir süre sonra Illumina tarafından (Illumina, 2021) satın alınmıştır.

İkinci Nesil dizileme yöntemleri, artan kalite ve okuma uzunluğu ile daha düşük bir fiyat ve daha yüksek hız ile sürekli olarak artan hacimlerde dizi verileri üreterek DNA ve RNA dizilemesini hızlandırmıştır (Metzker, M.L., 2010). Genom başına maliyet 2001'de 100 milyon dolar iken 2021 yılında bu rakam 1,000 dolara kadar düşmüştür (Genome sequencingcosts, 2021).

Başka bir ikinci nesil dizileme platform olan Roche'un 454 GS FLX Titanyum teknolojisi (Margulies M., 2005) bir günde 1.000 nükleotit uzunluğunda bir milyon okuma üretebilme olanağı sağlamaktadır. En yaygın kullanılan platformlardan olan Illumina'nın HiSeq2000 sekanslama yöntemi, yaklaşık 10 gün içinde 150 nükleotitlik bir okuma uzunluğuyla 600 milyar nükleotid dizi verisi üretebilme kabiliyetine sahiptir. Ayrıca yine Illumina'ya ait olan MiSeq sekanslama teknolojisi, 300 bç uzunluğa kadar eşleştirilmiş okumalar üretebilmektedir (Illumina, 2020). İlk kütüphaneye eşleştirilmiş uç (Paired-end) denmektedir ve maksimum ekleme boyutu 1 Kbç'nin altında olan eşleştirilmiş okumalar üretebilmektedir. İkincisi ise eş çifti (Mate-end) olarak adlandırılmaktadır ve yaklaşık 20 Kbç'den daha az maksimum ekleme boyutuyla okumalar üretebilmektedir.

Life Technologies'in ilk ikinci Nesil dizileme teknolojisi, şu anda kullanımdan kaldırılmıştır, bu teknoloji Polonator teknolojisine dayanmakta ve SOLiD olarak adlandırılmakta olan bu teknoloji, 75 nükleotide kadar okuma uzunluğu ve günde 20 milyardan fazla nükleotit üretim kapasitesine sahiptir. Life Technologies'in ikinci platformları ise, çalıştırma başına 1 Gbç'ye kadar veri ile 400 bç'lik dizi okumaları üreten Ion Torrent'tir. Life teknolojilerinin üçüncü teknolojisi, 200 bç'ye kadar dizi okuma uzunlukları üreten ve çalışma başına yaklaşık 10 Gb'lik bir iş hacmine sahip olan Ion Proton'dur (Valouev, A., 2008).

1.5.3. Üçüncü Nesil Dizileme

2000'li yılların sonlarına doğru, İkinci Nesil Dizilemeden daha büyük hacimli dizi verileri ve daha uzun okumalar vaat eden yeni teknolojiler geliştirilmeye başlanmıştır. Pacific Biosciences'in SMRT (Tek Molekül Gerçek Zamanlı) dizileme teknolojisi, 10.000 bç'nin üzerindeki genişletilmiş bir parça üzerinde daha kısa okumaların anlık görüntülerini alma potansiyeline sahip yaklaşık 1.000 bç'lik okuma uzunlukları üretme kabiliyetine

sahiptir. Oxford Nanopore, son yıllarda USB boyutlu dizileme "MinION"u ve tezgah üstü dizileme cihazları"GridION"u tanıtımını gerçekleştirdi. Yaklaşık 50.000 baz uzunluğunda son derece uzun okumalar üretebilen, 'GridION' tüm insan genomunu 15 dakikada, MinION' ise 60 dakikada dizileme kabiliyetine sahiptir. Fakat, bu nanopor teknolojilerin kullanımı henüz yaygın olarak gerçekleşmemiştir (Eid, J., 2009).

1.5.4. Sekans Analiz Araçları

İkinci Nesil Dizilemenin Kalite Kontrolü

NGS (Yeni Nesil Sekanslama) analizleri, özellikle ampliconlara dayalı olanlar, çok sayıda primerin aynı reaksiyon koşulları altında bağlanmasından dolayı büyük zorluklar yaratırken, kütüphane hazırlığı, sekanslama ve biyoenformatik analizler gibi teknik değişkenler potansiyel yanlış sonuçlara yol açabilmektedir (Vezi, F., 2012) Özellikle klinik bağlamda, NGS testinin her bir bileşeninin laboratuvar protokollerinin ve kalite kontrolünün (QC) standardizasyonuna yönelik stratejiler, gerekli değilse de oldukça arzu edilir. Referans standartlar, NGS teknolojisinin klinik uygulamasından önce test sonuçlarının analitik geçerliliğini sağlamak için ıslak laboratuvar (wet-lab) ve in silico NGS süreçlerinin değerlendirilmesi için gereklidir. Referans DNA materyalleri, kalitatif ve kantitatif özellikleri ölçmek için dizilenebilen ve kararlı, yeniden düzenleme kaynakları olarak kullanılabilen yapıda olmalıdır (Mardis, E. R., 2008).

Yukarıda bahsedilen ikinci nesil sekanslama teknolojilerinin her birinin kendine özgü hata profilleri bulunmaktadır. Roche GS FLX teknolojisi, nükleotitlerin homopolimer dizilerini doğru bir şekilde yorumlamakta sorun yaşar: genellikle bu bölgelerdeki dizi çıktısından bazlarını siler veya ekler (Mardis, E.R., 2008). Öte yandan, Illumina sıralama teknolojisi, C'yi A ile ve G'yi T ile değiştirme eğilimindedir. Ayrıca, Illumina dizisi okumalarının 3' ucuna doğru bazlar daha düşük bir baz kalitesine sahip olabilmektedir (Erich, Y., 2009). ABI SOLiD dizileme teknolojisi kullanılarak üretilen dizi okumaları, okumaların 3' ucuna doğru benzer şekilde daha düşük kalite temellerine sahiptir (Flicek, P., 2009). ABI SOLiD ve Illumina dizileme teknolojileri ayrıca AT bakımından zengin tekrarlanan dizilerin düşük dizi kapsamını üretme eğilimindedirler (Harismendy, O., 2009). Ion Torrent kişisel genom makinesi (PGM), yanlış akış çağrılarında (flow calls)

kaynaklanan ekleme/silme (indel) hata türlerine sahiptir. Referans genom, herhangi bir kalite bilgisi içermeyen FASTA formatında gelir. Ancak SGS verileri, içeri aktarım temel kalite bilgilerini içeren (import base quality information) FASTQ formatında gelir. Hem FASTA hem de FASTQ formatları aşağıda açıklanmıştır.

Fasta Formatı

FASTA formatı, bir biyolojik sekans karşılaştırma algoritması için geliştirilmiş ve adını buradan almaktadır (Pearson, W.R., 1988). FASTA formatı, günümüze kadar DNA veya amino asit dizilerini depolamak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Referans genomlar bile bu formatta saklanır.

FASTA dosyaları düz metin olarak saklanır ve her zaman bir veya daha fazla sıra satırıyla takip edilen bir başlık satırıyla başlar. Başlık satırları her zaman ">" simgesiyle başlar ve ardından doğrudan aşağıdaki sıra satırlarını açıklayan metin gelir. Genellikle tüm satırların 80 karakterden kısa olması önerilmektedir (Şekil 2.). Dizi satırlarının uzunluğu 80 karakterden uzun olduğunda, diziler birden çok satıra bölünür. Ancak, başlık satırı hiçbir zaman birden çok satıra bölünmez. Birden fazla başlık ve dizi içeren FASTA dosyaları, çoklu FASTA dosyaları olarak adlandırılır.

```
>seq1
GTACGACGGAGTGTTATAAGATGGGAAATCGGATACCAGATGAAATTGTGGATCAGGTGCAAAAAGTCGGC
AGATATCGTTGAAGTCATAGGTGATTATGTTCAATTAAGAAGCAAGGCCGAACTACTTTGGACTCTGT
CCTTTTCATGGAGAAAGCACACCTTCGTTTTCCGTATCGCCCGACAAACAGATTTTTCATTGCTTTGGCT
>seq2
ACAAGATGCCATTGTCCCCGGCCTCCTGCTGCTGCTGCTCTCCGGGGCCACGGCCACCGCTGCCCTGCC
CCTGGAGGGTGGCCCCACCGGCCGAGACAGCGAGCATATGCAGGAAGCGGCAGGAATAAGGAAAAGCAGC
CTCCTGACTTTCCTCGCTTGGTGGTTTGAGTGGACCTCCCAGGCCAGTGCCGGGCCCTCATAGGAGAGG
```

Şekil 2. Çoklu FASTA dosyası örneği.

FASTQ Formatı ve Sıralama Hatalarının Görselleştirilmesi

Wellcome Trust Sanger Enstitüsü, sıralı okumaları kaliteyle birlikte depolamak için standart FASTA formatının (FASTQ) değiştirilmiş bir versiyonunu icat etmiştir. Hem FASTA hem de FASTQ, dizi verilerini düz metin olarak saklanmasına olanak sağlamaktadır.

İlk satır “@” ile başlar ve kayıt tanımlayıcı olarak kullanılır. İkinci satır okuma sırasını içerir. Üçüncü satır, okuma dizisinin sonunu belirtmek için “+” içerir. Son satır, okunan sekansın kalitesini içerir. Bu formatın örneği aşağıdaki figürde gösterilmiştir (Şekil 3).

```
@HWUSI-EAS762_0026:3:120:16408:21310#0/1
TAGGAGTTGGGATGAAGAAGTTATCCCAGTTTCAANNAGGNGATTCCAGTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
+HWUSI-EAS762_0026:3:120:16408:21310#0/1
ffef^ggea_faRfcddffffWffggfggcaacBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBB
@HWUSI-EAS762_0026:3:120:16469:21305#0/1
CTCGTATACTCCACTTAGAAAAATCTTCATTATTGTAATCGAGTTTTTAGANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
+HWUSI-EAS762_0026:3:120:16469:21305#0/1
hhhhehgheghhhheha[\ffff\efhahhhfh_ffffdhWffff_BBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBBB
```

Şekil 3. Çoklu FASTAQ dosya formatı örneği

Sekans işlemi sırasında Phred adlı bir program, bir bazın ne zaman yanlış olabileceğini algılar ve bunu bir kalite puanı olarak kaydeder. Phred kalite skoru (Ewing, B., 1998) tarafından Sanger sekanslama için geliştirilmiş ve daha sonra ikinci nesil sekanslama dizilerine uygulanmıştır.

Phred puanları aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır:

$$q = -10 \log_{10} P$$

Phred kalite puanı q , temel baz çağırma olasılıkları p ile logaritmik olarak ilişkili bir özellik olarak tanımlanır. Böylece, yüzde birlik bir hata oranı ($p = 0.01$), 20'lik kayıtlı bir kalite puanına karşılık gelir. Kalite puanının değeri tipik olarak tek ASCII karakterlerinden oluşan bir dizi olarak kodlanır. Dizideki her baz için bir ASCII karakteri vardır.

ASCII karakterleri ile Phred kalite puanları arasındaki ilişkide bu formatlar arasındaki farklılıkları göstermektedir (Tablo 1), (Cock, P.J., 2010). Ne yazık ki, FASTQ, kalite puanı için hangi formatın kullanıldığına dair herhangi bir bilgi içermemektedir. Bu üç format arasında ayırım yapabilmek için bir takım araçlar geliştirilmiştir. Böyle bir araç, aşağıda açıklanan FastQC'dir.

FastQC, sekanslayıcıdan veya başlangıç kütüphanesi materyalinden kaynaklanan sorunları bulabilen bir kalite kontrol raporu sağlayan yüksek verimli sekans verileri için bir

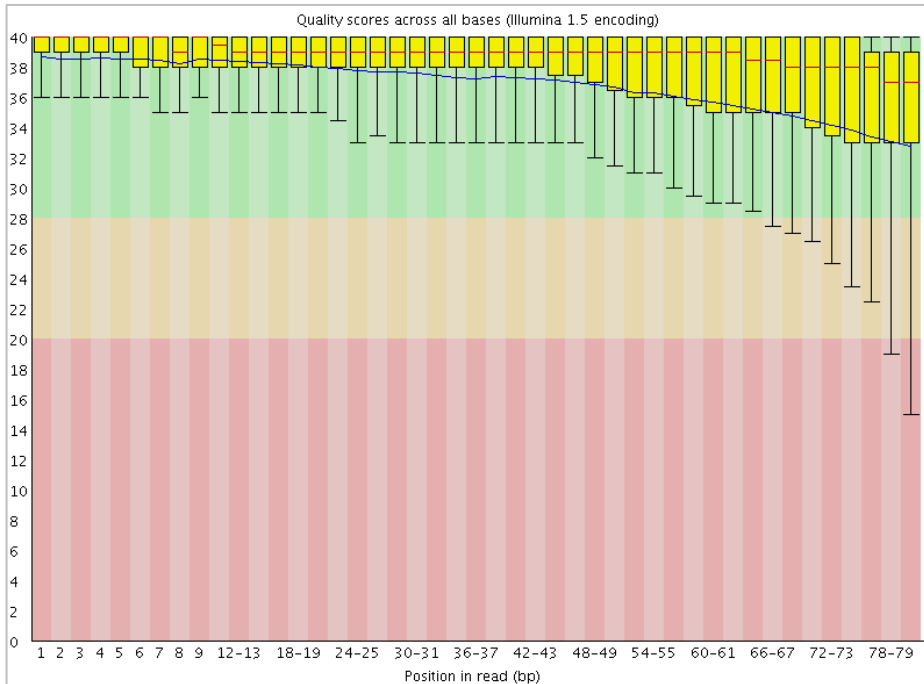
kalite kontrol aracıdır. Bu sorunlar daha sonraki analizleri etkileyebilir. Ayrıca, sekanslama çalışmasının genel kalitesi hakkında fikir veren okuma konumuna karşı ortalama kalite puanının kutu grafiğini de sağlar (Şekil 4). FastQC, az sayıda FastQ dosyasının analizi için bağımsız bir etkileşimli uygulama olarak çalışır. Bununla birlikte, çok sayıda dosyanın işlenmesi için etkileşimli olmayan bir modda da çalışır. 100bç okumalar için okuma kalitesinin baz pozisyonuna karşı kutu grafiği aşağıda görülmektedir. Tüm SGS platformları, okumaların uçlarına doğru hata oranında bir artış göstermektedir (Şekil 4).

Tablo 1

ASCII karakterleri ile Phred kalite puanları ilişkisi

Tanım	ASCII Karakterleri	Kalite Skoru
Aralık	Offset	Aralık
Sanger	33 - 126	33 - 93
Solexa/Illumina	59 - 126	-67 - 93
Illumina 1.3+	64 - 126	0 - 62
Illumina 1.8+ = Sanger	33 - 126	0 - 93

Illumina 1.8+ ise Sanger ile aynıdır. Diğer sütunlar kalite dizisinde izin verilen ASCII karakter aralığı ve ASCII kodlama ofsetidir. Son sütun olası puan aralığını açıklamaktadır (Cock, P.J., 2010).



Şekil 4. Okuma kalitesinin baz pozisyonuna karşı kutu grafiği.

1.6. Islahta genomik teknolojiler

Hem aile içi hem de aileler arası değişkenliği kullanma ve aile düzeyinden ziyade bireye dayalı seçim yapma yeteneği, genetik belirteçlerin [geleneksel olarak mikrosatellit işaretleyicileri ve son zamanlarda da tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler)] son yıllarda hayvancılık ve bitki ıslah programlarında popüler hale gelmesine neden olmuştur. Bu, özellikle fileto kalitesi gibi karkas özellikleri seçilirken faydalı olurken aynı zamanda bireysel performansa dayalı seçimin mümkün olmadığı hastalık direncindeki iyileştirmeler için seçim yaparken de faydalı olmaktadır Bunun nedeni, bireyin bir patojene enfeksiyona tepkisinin, bireyi patojene maruz bırakmadan, markör genotipine dayalı olarak çıkarılabilmesidir. Ayrıca, genetik bilgi doğumda veya en azından DNA toplanabildiği anda mevcuttur ve seçim potansiyel olarak bir bireyin yaşam döngüsünün daha erken dönemlerinde gerçekleşebilir. Tam bilgilendirici belirteçlerin (yani popülasyon düzeyinde direnci tahmin edebilen ve aile içi varyasyonu yakalayabilen belirteçler) tanımlanmasıyla, aile temelli meydan okuma testlerine duyulan ihtiyaç azalabilir ve hatta artık gerekli olmayabilir. Bu, hastalığa maruz kalma nedeniyle balıkların yaşadığı stres seviyelerini azaltacak ve nihai ekonomik değeri olmayacak olan meydan okuma çalışmalarında kullanılan bireylerin yetiştirilmesi ve bakımı ile ilgili maliyetleri azaltacaktır (Meuwissen, T., 1996; Haley, C.S., 1998; Sonesson, A., 2005).

Bunun nedeni, bir bireyin bir patojen ile enfeksiyona verdiği tepkinin, bireyi patojene maruz bırakmadan, belirteç genotipine dayalı olarak çıkarılabilmesidir. Dahası, genetik bilgi doğumda veya en azından DNA toplanır toplanmaz elde edilebilir ve seçim potansiyel olarak bireyin yaşam döngüsünde daha erken gerçekleşebilir. Tamamen bilgilendirici belirteçlerin (yani, popülasyon düzeyinde direnci tahmin edebilen ve aile içi varyasyonu yakalayabilen belirteçler) tanımlanmasıyla, aile temelli zorlama testlerine olan ihtiyaç azalabilir ve hatta artık gerekmez. (Meuwissen, T., 1996; Goddard, M.A., 2010).

1.7. Tüm Genom Dizileme [Whole Genome Sequencing (WGS)]

Tüm genom dizileme, bir bireyin genetik varyasyonunun en kapsamlı koleksiyonunu ortaya konmasını sağlamaktadır. Son yıllarda dizileme teknolojisinin düşen maliyetleriyle birlikte, mikrodizi tabanlı genotipleme çalışmalarından çok tüm genom dizilemesine doğru bir geçiş olacağı öngörülmektedir.

Günümüzde, tüm genom ilişkilendirme çalışmaları, insan popülasyonundaki yaygın genetik varyasyonun çoğunu yakalayan SNP mikro dizilerini kullanarak özelliklerin ve hastalık duyarlılıklarının genetik temelini belirlemeyi amaçlamaktadır. Birçok hastalık için risk varyantları tanımlanmıştır. Bununla birlikte, sadece birkaç önemli istisna dışında (örneğin, yaşa bağlı makula dejenerasyonu, Tip 1 diyabet), risk varyantları genellikle var olduğu bilinen genetik riskin sadece küçük bir kısmını açıklamaktadır. Bu gözleme katkıda bulunması muhtemel birkaç faktör vardır. Yaygın varyantların bir fenotip üzerinde yalnızca küçük etkileri olabilir veya epistatik veya epigenetik etkiler nedeniyle değişken penetransa sahip olabilirler. İki ek faktör ise nadir varyantlar ve kopya sayısı varyantlarıdır (CNV'ler). Bu tür genomik varyasyonların hastalık fenotipleri üzerinde önemli etkilere sahip olabileceği bilinmektedir (Cohen, J. C., 2004; Estivill, X., 2007).

1.8. Moleküler Genetik Markörler

Türlerdeki genetik çeşitlilik, bir organizmanın değişen bir çevreye uyum sağlama kabiliyetini artırabilir ve bu da türlerin hayatta kalmasına yardımcı olur. Araştırmalarda, genetik çeşitlilik evrimin anlaşılmasına, genetik iyileştirmelere ve doğal kaynakların yönetimine yardımcı olur (Chauhan, T., 2010). Yabani üreme hücrelerinden (germplasm) yeni ve uygun özellikler getirilerek yeni genetik varyasyon kaynakları yaratılabilir. Moleküler genetik belirteçler, türleri geliştirmek için genetik varyasyonun anlaşılmasına yardımcı olabilmektedir. Balık yetiştiriciliğinde amaç, verimliliği artırmak ve türlerini daha zorlu koşullara adaptasyonunun sağlanıp yetiştiriciliğinin yapılabilmesidir. Bunları yapabilmek için ıslahı yapılacak yeni türlerin üretimine olanak sağlayacak yeterli çeşitliliğe sahip olması gerekir. Genom tabanlı belirteçler, çevreden etkilenmemeleri, test edilmelerinin nispeten kolay olması ve yüksek oranda kalıtsal olmaları nedeniyle fenotipik belirteçlere göre avantajlara sahiptir. Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizmi (RFLP) markörleri ilk

olarak kullanılan yöntemler arasındadır ve bunu Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs) izlemiştir. Başlıca kültür türleri için birçok Basit Dizi Tekrarları (SSR) markörü kullanılmıştır (Liu, Z.J., Cordes, J.F., 2004). Bununla birlikte, Tek Nükleotid Polimorfizm (SNP) markörleri ve bağlantılı teşhis markörleri ile yüksek verimli genotiplemenin geliştirilmesi artık daha etkili moleküler ıslah için kullanılmakta ve genomik seçim için fırsatlar yaratmaktadır (Askari, G.H., 2013).

1.8.1 Allozym Markörler

Allozim lokuslarının analizi popülasyon genetiğinin incelenmesinde popüler yaklaşımlar ve balıklarda stok yapısı sorularının ele alınmasında en çok uygulanan analizlerden biri olmuştur (Suneetha, B.K., 2000). Teknik olarak hızlıdır, nispeten ucuzdur ve içindeki varyasyon seviyesinin bağımsız tahmini kapsamlı bir morfolojik ve nicel araştırmaya olanak sağlamaktadır (Menezes M.R., 1993). İzohyetler yapısal olarak farklıdır bir enzim sisteminin moleküler formları ile niteliksel olarak aynı katalitik fonksiyon tarafından kodlanan bir veya daha fazla lokusu ele almaktadır (Markert, C.L., 1959). Farklı lokuslar tarafından kodlanan izohyetler aynı gen lokusunun alelleri, "allozimler" veya "alloenzimler" olarak adlandırılır (Starck, M.G., 1998). Amino asit farklılıkları farklı alel formlarının polipeptit zincirinde bir enzim, alta yatan DNA dizisindeki değişiklikleri yansıtır. Amino asit değişikliklerinin doğasına bağlı olarak, ortaya çıkan protein ürünleri, elektrik alanına maruz bırakılan bir jelden geçirildiğinde farklı oranlarda (yük ve boyut farklılıkları nedeniyle) göç edebilir. Alellerin göreceli frekanslarındaki farklılıklar, genetik varyasyonu ölçmek ve popülasyonlar, türler ve daha yüksek taksonomik tanımlamalar düzeyinde genetik birimler arasında ayırım yapmak için kullanılır. Allozimlerle ilişkili dezavantajlar arasında ara sıra görülen heterozigot eksiklikleri yer alır null (enzimatik olarak inaktif) aleller ve hassas doku örneklerinin kalitesinin yanı sıra miktarına da bağlıdır. Buna ek olarak, DNA dizisindeki bazı değişiklikler protein seviyesinde maskelenerek tespit edilebilir ve varyasyon seviyesini azaltır. Nükleotid dizisindeki bazı değişiklikler kodlanan polipeptidi değiştirmez (sessiz süstitüsyonlar) ve bazı polipeptid değişiklikleri proteinin elektroforetik jel içindeki hareketliliğini değiştirmez (eşanlı süstitüsyonlar). Şu anda birkaç yüz genetik lokusu temsil eden 75 izozim sistemi bilinmektedir (Murphy, R.W., 1996). Kodominant belirteç olarak gücü, kullanım kolaylığı ve düşük maliyeti ile allozim

belirteçleri popülasyon yapısı ve filogenetik çalışmalarda popülerdir, ancak su ürünleri genetiğinde sınırlı bir rolü vardır.

1.8.2. Mitokondrial DNA Markörler

Mitokondriyal DNA (mtDNA) analizi, organizmaların son popülasyon ve filogenetik araştırmalarında giderek daha fazla kullanılmaktadır. Omurgalı türleri üzerinde yapılan çalışmalar genellikle dizi farklılığının mitokondriyal DNA'da nükleer DNA'dan daha hızlı biriktiğini göstermiştir (Brown, W.M., 1985). Bu durum, mtDNA'da replikasyon sırasında onarım mekanizmalarının eksikliğinden kaynaklanabilecek daha hızlı bir mutasyon oranına ve haploid mitokondriyal genomun katı maternal kalıtımı nedeniyle daha küçük etkili popülasyon boyutuna bağlanmıştır (Birky, C.W., 1989). Hızlı evrim oranı nedeniyle, mtDNA analizinin yakın akraba türler arasındaki ilişkileri açıklığa kavuşturmada yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Mitokondriyal genomun farklı bölümlerinin farklı oranlarda evrimleştiği bilinmektedir (Meyer, A., 1993). Molekülün replikasyonunun ve transkripsiyonunun başlatıldığı yaklaşık 1 kb kontrol bölgesi (D-loop) dışında neredeyse tüm mtDNA molekülü transkribe edilir. Genel olarak, D-loop gibi kodlama yapmayan segmentler muhtemelen işlevsel kısıtlamaların azalması ve seçilim baskısının gevşemesi nedeniyle kodlama dizilerine göre Sitokrom b geni gibi, yüksek düzeyde varyasyon sergiler (Brown, J.R., 1993). Mitokondriyal genomdaki 16S rRNA geni en yavaş evrimleşen genlerden biri iken, hızla evrimleşen bölgeler kontrol bölgeleri olarak değerlendirilir (Chow, S., 1997, Gold, J.R., 1997). Mendelci olmayan kalıtım şekli nedeniyle, mtDNA molekülü tek bir lokus olarak kabul edilir (Avise, J.C., 1994). Ayrıca, mtDNA maternal olarak kalıtıldığından, mtDNA verilerinden türetilen filogeniler ve popülasyon yapıları, cinsiyete bağlı göç veya seçilim (Brown, W.M., 1985) veya introgression (Chow, S., 1995) varsa nükleer genomun tam resmini yansıtmayabilir. mtDNA belirteçlerinin analizleri, çeşitli omurgalılarda stok yapısını araştırmak için kapsamlı bir şekilde kullanılmıştır balıklar (Avise, J.C., 1986, Heist, E.J. 1999), kuşlar (Baker, A.J., 1997, Zink, R.M., 2000), memeliler (Menotti-Raymond, M. 1993) ve sürüngenler dahil (Avise, J.C., 1998, Shanker, K., 2004).

1.8.3. Rastgele Amplifikasyonlu Polimorfik DNA (RAPD) Belirteçleri

RAPD belirteçleri, fenotipik düzeyde seçilime güçlü bir şekilde yanıt vermeyen genomun daha az işlevsel bölümlerinin çoğaltılmış ürünleridir. Bu tür DNA bölgeleri, popülasyonlar arası genetik farklılaşmayı değerlendirme potansiyeli ile daha fazla nükleotid mutasyonu biriktirebilir. Genomik DNA'nın rastgele nükleotid dizisi primerleri ile PCR yoluyla amplifikasyonu olan RAPD, yüksek seviyelerde DNA polimorfizmlerini tespit edebilir (Williams, J.G.K., 1990, Welsh, J. 1990). Teknik, kodlamanın yanı sıra kodlamayan DNA dizilerini de tespit eder ve en bilgilendirici polimorfik dizilerin çoğu, genomdaki tekrarlayan (kodlamayan) DNA dizilerinden türetilenlerdir (Haymer, D.S.,1994).

Çünkü omurgalı nükleer genomunun % 90'ı kodlanmayan bölge olduğundan, çoğaltılan lokusların çoğunun seçici olarak nötr olacağı varsayılmaktadır. RAPD lokusları Mendel belirteçleri olarak kalıtılır, baskın şekilde ve var/yok olarak puanlanır. RAPD'ler PCR tabanlı bir markörün tüm avantajlarına sahip olmakla birlikte primerlerin ticari olarak mevcut olması ek bir avantajdır ve sekansı veya genom organizasyonu, hedef DNA hakkında önceden bilgi sahibi olmayı gerektirmez. RAPD'lerin diğer avantajları arasında çok sayıda lokusun ve bireyin aynı anda taranabilmesinin kolaylığı yer almaktadır. Bu tip markörlerin eksiklikleri arasında lokusların Mendel kalıtımını göstermenin zorluğu ve homozigotlar ile heterozigotları ayırt edememe de yer almaktadır. Analiz prensibi, incelenen popülasyonların Hardy-Weinberg beklentilerini takip ettiği varsayımına dayanmaktadır. Buna ek olarak, paralog PCR ürününün varlığı (aynı uzunluklara sahip olan ve bu nedenle tek bir lokus gibi görünen farklı DNA bölgeleri), PCR amplifikasyonunda kullanılan düşük tavlama sıcaklığı nedeniyle düşük tekrarlanabilirlik, bu markörün balıkçılık biliminde uygulanmasını sınırlamıştır (Wirgin, I.I. 1994).

1.8.4. Mikrosatellit Markörler

Mikrosatellitler, boyutları 1 ila 6 baz çifti arasında değişen tandem olarak düzenlenmiş basit dizi tekrarlarının (SSR'ler) birden fazla kopyasından oluşur (örneğin, ACA veya GATA (Tautz, D., 1989; Litt, M., 1989). Bugüne kadar incelenen tüm türlerde bol miktarda bulunan mikrosatellit motiflerinin balıklarda her 10 kb'de bir en az bir kez olmak üzere sıkça görüldüğü tahmin edilmektedir (Wright, J.M. 1993). Mikrosatellitler genomda

tüm kromozomlarda ve kromozomun tüm bölgelerinde eşit olarak dağılıma eğilimindedir. Ancak, tüm genom dizilemesinden elde edilen veriler bu ifadeyle biraz çelişmektedir. Gen kodlama bölgelerinde (Liu, Z.J., Li, P., 2001), intronlarda ve gen dışı dizilerde de bulunabilmektedirler. Çoğu mikrosatellit lokusu nispeten küçüktür, birkaç ila birkaç yüz tekrar arasında değişir. Spesifik mekanizmalar ne olursa olsun, bir popülasyondaki lokus tekrar ünitelerinin sayısındaki değişiklikler her bir mikrosatellitte çok sayıda alel ile sonuçlanabilir. Mikrosatellitler, kodominant belirteçler olarak Mendel tarzında kalıtılmıştır. Mikrosatellitlerin, diğer belirteçlerde neredeyse hiç varyasyon göstermeyen birkaç türde bilgilendirici olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, mikrosatellit belirteçlerin kullanımı büyük miktarda ön yatırım ve çaba gerektirir. Her bir mikrosatellit lokusunun tanımlanması ve PCR primerlerinin tasarlanması için yan bölgelerinin dizilenmesi gerekmektedir. Replikasyon sırasında polimeraz kayması nedeniyle, küçük Belirli bir mikrosatellitin alelleri arasındaki boyut farklılıkları lokusundan oluşan bir lokusta 2 bç kadar küçük bir di-nükleotid tekrarları mümkündür. Mikrosatellitler son zamanlarda çok çeşitli genetik araştırmalar açısından son derece popüler bir işaretleyici türü haline gelmiştir (Taylor, A.C., 1994).

1.8.5. Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)

Tek nükleotid polimorfizmi (SNP), bir lokus içindeki belirli bir nükleotid pozisyonunda alternatif bazlar içeren farklı alellere yol açan nokta mutasyonlarının neden olduğu polimorfizmleri tanımlar. SNP'ler, herhangi bir organizmanın genomunda (kodlayan ve kodlamayan bölgeler) en bol polimorfizmi temsil ettikleri, otomasyona uyarlanabildikleri ve diğer belirteçler ve yöntemlerle tespit edilemeyen gizli polimorfizmi ortaya çıkardıkları için moleküler belirteç geliştirmede odak noktası haline gelmektedir (Chauhan, T.,2010, Liu, Z. J., 2004). Teorik olarak, bir lokus içindeki bir SNP, her biri SNP bölgesinde iki olası baz çiftinden birini içeren iki alel üretebilmektedir. Bu nedenle SNP'ler bi-alelik olarak kabul edilmiştir. SNP belirteçleri eş baskın belirteçler olarak kalıtılır. SNP keşfi için SSCP analizi (Hecker, K.H., 1999), heteroduplex analizi ve doğrudan DNA dizileme dahil olmak üzere çeşitli yaklaşımlar kullanılmıştır. DNA dizileme, SNP keşfi için en doğru ve en çok kullanılan yaklaşımdır. Bununla birlikte, SNP'lerin sınırlamaları yoktur, ancak bazı uygulamalarda (örneğin akrabalık) marjinal ek veya hatta daha az fayda sağlayabilmektedir (Chauhan, T., 2010).

Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), atasal mutasyonlardan kaynaklanan ve tek DNA nükleotidinde meydana gelen farklılıklardır. Genom boyunca yaygındırlar, belirleyici ve bir tür moleküler işaretleyici olarak kullanılabilirler. SNP'ler, teknolojiye son zamanlarda kaydedilen ilerlemeler sayesinde (son 10 yıl kadar) birçok çalışma türü için bir işaretleyici (marker) olarak benimsenmiştir. Yüksek verimli dizilemenin başlangıcı, daha önce tespit edilmesi çok zaman alan ve aşırı derecede pahalı olan genom çapında (genome-wide) SNP'lerin keşfedilmesini sağlamıştır. Tek SNP alleller açısından daha zengin mikrosatellitlerle karşılaştırıldığında daha az bilgi içermektedir bu nedenden dolayı daha iyi istatistiksel bilgi elde edilebilmesi açısından daha fazla SNP'nin elde edilmesi gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Ancak, yeterli SNP elde etmek artık bir sorun değil. Aslında, SNP'lerin genom çapında temsil edilebilirliği, potansiyel genomik önyargıları en aza indirdiği için birçok çalışma türü için idealdir (Liu, N., 2005).

1.8.6. Popülasyon Yapısının Çıkarımında Tek Nükleotid Polimorfizmleri ve Mikrosatellitlerin Karşılaştırılması

Genetik belirteçlerden popülasyon yapısı çıkarımı, karışım ve ilişkilendirme haritalaması, evrimsel çalışmalar, adli tıp, tıbbi risk tahmini ve vahşi yaşam yönetimi gibi çeşitli bağlamlarda çok önemlidir (Pritchard, J.K., 2000, Patterson, N., 2004). Popülasyon yapısı çıkarımı için multilocus genotipleri kullanan istatistiksel yöntemler önerilmiş (Hoggart, C.J., 2003, Falush, D., 2003) ve pratikte yaygın olarak kullanılmıştır (Paetkau, D., 1995). Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), popülasyon genetiği çalışmaları ve karmaşık özelliklerin altında yatan genetik varyasyonları belirlemek için önemli bir genetik belirteçler sınıfıdır. Bunun nedeni, SNP'lerin oldukça bol olması, işlevsel olarak alakalı olması, nispeten düşük mutasyon oranlarına sahip olması ve daha hızlı ve yüksek oranda otomatikleştirilmiş genotipleme sunmasıdır. Genotipleme teknolojisinde, yüksek yoğunluklu SNP'lerin genom çapında taranması fazla birey sayısı içeren çalışmalar için giderek daha uygun hale gelmektedir. Yinede, SNP'lerin kullanılabilirliği ve etkinliğinin, özellikle az sayıda çalışmanın yapıldığı popülasyon yapısı çıkarımı ve, büyük ampirik çalışmalarla gösterilmesi gerekmektedir (Rosenberg, N.A., 2003).

1.8.7. Balıkçılık ve Su Ürünleri Yetiştiriciliğinde Yeni Gelişen Markörler

Allozimler, mikrosatellitler, RAPD'ler, mt-DNA ve SNP'ler dahil olmak üzere çeşitli DNA belirteçleri geliştirilmiştir. Balık popülasyonlarındaki bu belirteçler, balık genomu boyunca dağılmış yüksek düzeyde genetik varyasyonu ortaya çıkarmıştır. DNA işaretleyici geliştirme, genom haritalama ve tür tanımlama çabalarını hızlandırmak için yeni bir girişimde bulunulmuştur. Çeşitli su ürünleri türlerinde Eksprese Edilmiş Dizi Etiketleri (EST) ve DNA barkod geliştirme yönünde büyük ilerleme kaydedilmiştir (Regan, T., 2021).

1.8.8. Çalışmanın Amacı

Mevcut çalışma Karadeniz bölgesinde bulunan *Salmo labrax* türünün genetik karakteristiklerinin ve SNP profilini ortaya koymak amacıyla planlanmıştır. Hali hazırda yetiştiriciliği yapılan bu türün genetik potansiyelinin derinlemesine araştırılıp buna binaen ıslah çalışmalarının ayrıntılı olarak yapılması türün potansiyelinin gerçekleştirilmesi açısından önem arz edilmektedir. *Salmo labrax* türünün genomik verisi oldukça az olmakla beraber bulunan verilerin tamamına yakını mitokondrial DNA'dan oluşmaktadır. Bu sebeple bu konuda yapılacak her çalışma hem literatüre hem de türün ticari geleceğine katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle çalışma hem doğal hatların hem de yetiştiriciliği yapılan hatların genetik kompozisyonu ve SNP profilini araştırılması ve ortaya konulması açısından öncü bir araştırma olacaktır.

İKİNCİ BÖLÜM

KURAMSAL ÇERÇEVE/ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Salmo Türleri Üzerine Yapılan Genetik Çalışmalar

Karadeniz alabalığı (*Salmo labrax* Pallas) genetik çalışmalar açısından yeterli bilginin bulunmadığı ve bu konuda yapılacak çalışmalara açık bir türdür. Literatürde bulunan çalışmalar genel olarak mitokondrial DNA çalışmaları olmaktadır.

Filogenetik sinyal seviyesinin düşük olması nedeniyle yakın zamanda yayılmış grupların taksonomik statüsünün tanımlanmasında özellikle zorluklar yaşanmaktadır. Çoğunlukla Pleistosen sırasında ve sonrasında evrimleşen *Salmo trutta* tür kompleksinin üyeleri, çok geniş coğrafi dağılımlarının yanı sıra, 47 mevcut nominal türün morfolojik olarak tanımlanmasına yol açan yüksek morfolojik ve ekolojik çeşitlilik göstermektedir. Bununla birlikte, bu türlerin birçoğu önceki filogenetik çalışmalarla desteklenmemiştir; bunun nedeni kısmen aralarında önemli genetik farklılıkların olmaması, daha önce kullanılan moleküler yöntemlerin sunduğu sınırlı çözünürlük ve bu çalışmaların genellikle yerel ölçekte olması olabilir (Segherloo, I.,2021).

Dudu A., (2010) çalışmalarında Romanya'ya adapte olmuş beş salmonid türünün (*Salmo trutta fario*, *Salmo labrax*, *Salvelinus fontinalis*, *Onchorhynchus mykiss* ve *Thymallus thymallus*) 16S rRNA ve 12S rRNA mitokondriyal dizilerinin ön analizini GenBank veri tabanındaki benzer dizilerle karşılaştırarak ve nükleotid varyasyonlarını analiz ederek gerçekleştirmiştir. Yapılan çalışmada , benzer NC_01007 dizisine referanslandığında *Salmo labrax* 16s rRNA dizisi için gözlemlenen nükleotid varyasyonunun *Salmo trutta fario* 16S rRNA'ya kıyasla daha az sayıda olduğu görülmüştür. Dolayısıyla, Karadeniz alabalığı (*Salmo labrax*) ile kuzeybatı Avrupa (Atlantik kıyısı) ve Baltık Denizi'nden gelen deniz alabalığı (*Salmo trutta fario*) arasında daha önce düşünülen daha yakın bir ilişki olduğu görülmektedir. Bu husus, hem analiz edilen nükleotid dizilerinin yüksek benzerliği hem de bu iki türün benzer anadrom davranışı göstermesi ile açıklanmıştır. 12S rRNA durumunda, *Salmo trutta fario* ve *Salmo labrax* dizileri ile benzer GenBank *Salmo trutta trutta* dizisi arasındaki nükleotid varyasyonlarının sayısı 16S rRNA geni kıyaslandığında daha azdır, bu da 12S rRNA geninin *Salmo* cinsinin çeşitli türlerinde daha iyi korunduğunu göstermektedir.

Segherloo ve ark. çalışmalarında, Avrupa, Batı Asya ve Kuzey Afrika'daki doğal dağılımları boyunca 84 lokaliteden toplanan 21 tanımlanmış türü ve üç tanımlanmamış grubu temsil eden 166 kahverengi alabalık arasındaki filogenetik ilişkileri değerlendirmek için 15.169 filtrelenmiş SNP ve mitokondriyal DNA (mtDNA) D-loop dizilerinin Dizileme ile Genotipleme (GBS) birleştirilmiştir. Ponto-Hazar kahverengi alabalıkları *S. labrax*, *S. coruhensis*, *S. rizeensis* ve *S. abanticus*'u (Karadeniz havzasında), *S. caspius*, *S. ciscaucasicus*, *S. ezenami* ve *Salmo ischchan*'ı (Hazar Denizi havzasında) ve *S. oxianus*'u (Aral Denizi havzasında) içerir) Karadeniz ve Hazar Denizi havzalarından kahverengi alabalık türlerinin mtDNA kontrol bölgesi ve Cyt-b dizilerini analiz etmiştir. Karadeniz havzasında yalnızca *S. rizeensis* ve *S. labrax*'ın, Hazar Denizi havzasında ise *S. caspius* ve *S. ciscaucasicus*'un geçerli türler olarak kabul edilmesini önermişlerdir. GBS verilerine dayanan büyük ölçekli DAPC ve karışım kümelerimiz Karadeniz türlerini tek bir genomik kümede gruplandırmıştır. Öte yandan, yalnızca Ponto-Hazar ve Mezopotamya kahverengi alabalıkları üzerinde gerçekleştirilen DAPC (ince ölçekli DAPC), Tuna Nehri'ndeki *Salmo* sp. türünü Karadeniz havzasındaki diğer alabalıklardan ayırmıştır. Sadece Karadeniz havzası kahverengi alabalıkları üzerinde yapılan bir DAPC, Tuna drenajından *S. abanticus* ve *Salmo* sp. türlerini de ayırt edebilmiştir, ancak *S. rizeensis* ve *S. coruhensis*, *S. labrax* ile çok yakın akraba görünmüştür (BFD test sonuçlarıyla uyumlu), bu da tür ayrımının garanti edilemeyebileceğini, oysa Tuna drenajından *S. abanticus* ve *Salmo* sp. için durumun böyle olabileceğini düşündürmektedir.

Kalaycı G.,(2018) Karadeniz bölgesinde bulunan türler içinde F1 ve F2 yavruları üretmek için çaprazlamalar yaparak *Salmo trutta abanticus*, *S.t. labrax*, *S.t. caspius* ve *S.t. fario* arasındaki üreme izolasyonunu test etmişlerdir. Ayrıca, COI, D-loop ve Cytb mitokondriyal genleri boyunca dizi varyasyonunu inceleyerek her üç balık türü arasındaki genetik farklılığın boyutunu tahmin etmişlerdir. Tüm F1 çapraz tipleri başarıyla üretilmiştir. 2 yıllık kültürün ardından F2 nesli de üretilmiştir. F1 ve F2 nesillerinin döllenme, kuluçka ve hayatta kalma oranları ile kuluçka performansları değerlendirmişlerdir. F2 nesli ebeveynlerine benzer performans gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Safkan F2 *S.t. abanticus* hariç, F1 ve F2 nesillerinin döllenme, kuluçka, larva yaşama oranı ve kuluçkahane performansı benzer olduğunu bulmuşlardır. Safkan F1 bireyleri ebeveynleri ile benzer renklenme desenleri ve benekleri paylaşmış, ancak melezlemenin yönü melezlerin morfolojisi üzerinde belirleyici olarak görülmüştür. Bazı melezler ebeveynlerinden farklı

morfolojik karakterler sergilediği gözlemlenmiştir. Üç genin kısmi hizalamalarına dayanan filogenetik analiz, bu *S. trutta*'ların aynı klad içinde toplandığını ve monofiletik grup olarak görüldüğünü göstermiştir. *S. trutta* alttürleri arasında bazı morfolojik ve genetik varyasyonlar olduğu, ancak varyasyon derecesinin tür düzeyinde tanınmayı gerektirmediği bulunmuştur. Bu bulgular, dört alt türün Tuna soyunun farklı morflarına karşılık gelen tek bir biyolojik varlık oluşturduğuna işaret etmiştir. Bu nedenle, Türkiye'deki Danubian soyuna ait *S. trutta*'nın *Salmo trutta* olarak adlandırılmasını ve türlerin Abant, Hazar, Karadeniz ve Anadolu gibi bölgelere göre adlandırılmasını önermişlerdir. Yüzgeç örnekleri, hibridizasyon deneyinden hemen önce cinsel olgunluğa erişmiş *S.t. labrax*, *S.t. abanticus*, *S.t. fario* ve *S.t. caspius*'tan (her alt türden 5 dişi ve 20 erkek balıktan örnekler kullanılmış) alınmış ve 4° C'de % 95 etanol içinde muhafaza edilmiştir. Toplam DNA, üreticinin talimatları doğrultusunda Wizard Genomic DNA saflaştırma kitleri (Promega; www.promega) kullanılarak yüzgeç kliplerinden çıkarılmıştır. Mitokondriyal coI (632 bç), cytb (843 bç) ve d-loop (575 bç) bölgeleri çoğaltılmıştır. Primer dizileri Tablo 3'te verilmiştir. Literatürde listelenen D-loop primerleri amplifiye olmadı, bu nedenle *Salmo L. 1758* cinsinin tam bir mtDNA dizisinden yeni bir primer seti tasarlamışlardır (GenBank erişim numaraları; KT633607). Bu çalışmada incelenen dört *S. trutta* türünün, birbirini tamamlayan organizmal, morfolojik ve genetik kanıtlara dayanarak tek bir tür oluşturduğu sonucuna varılmıştır. Kanıtların ağırlığı, dört ekotipin tek bir türün morfları, suşları veya alt türleri gibi farklı formları oluşturduğunu göstermişlerdir. Bu nedenle, Türkiye'deki *S. trutta*'nın *Salmo trutta* olarak adlandırılmasını ve türlerin Abant, Hazar, Karadeniz ve Anadolu gibi bölgelere göre adlandırılmasını önermişlerdir (Kalaycı, G.,2018).

Genotip-fenotip ilişkilerini aydınlatmak ve önemli özelliklerin moleküler temelini belirlemek için önemli sayıda tek nükleotid polimorfizmi (SNP) gereklidir. Yáñez, (2016) ve arkadaşları çalışmalarında, Amerikan ve Avrupa somon popülasyonlarından hem genom duplikasyonunu hem de genetik varyasyonu hesaba katan de novo SNP keşfi gerçekleştirmişlerdir. Tüm genom dizilimi ile 20 balıktan oluşan bir sette toplam 9 736 473 nonredundant SNP tanımlamışlardır. Altı bioinformatik filtreleme adımı uygulandıktan sonra, bir Affymetrix Axiom_ myDesign Custom Array geliştirmek için 200 K SNP seçilmişler ve bu dizi, Avrupa, Kuzey Amerika ve Şili'den yabancı ve çiftlik somonlarını temsil eden 480 balığı genotipleme için kullanmışlardır. Toplam 159 099 (% 79,6) SNP, kümeleme özelliklerine göre yüksek kaliteli olarak onaylanmıştır. Toplam 151 509

doğrulanmış SNP genomda benzersiz bir konum göstermiştir. Bu SNP'ler diğer iki Atlantik somon dizisinde mevcut olan 238 572 belirteçle karşılaştırıldığında, SNP'nin sadece % 4,6'sı bu çalışmada geliştirilen panelle örtüşmüştür. Bu yeni yüksek yoğunluklu SNP paneli, ekonomik ve ekolojik olarak ilgili özelliklerin incelenmesi, genomik seçim yoluyla ıslah programlarının geliştirilmesi ve yüksek çözünürlüklü genom çapında bilgi kullanarak Atlantik somonunun hem vahşi hem de çiftlik popülasyonlarında genetik çalışmaların desteklenmesi için çok yararlı olacağını ortaya koymuşlardır.



ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Tür ve Biyolojik Özellikleri

Karadeniz alası yada alabalığı olarak adlandırılan *Salmo labrax* (Pallas, 1814) salmonidae familyasına ait Karadenize dökülen bir çok nehir ve akarsu kollarında yayılım göstermekte olan anadrom bir balık türüdür. Vücut şekli fusiformdur ve pelajik olarak yerleşik bir balık çeşididir. Tatlı su kaynaklarında doğan ve yumurtlayan bu balıklar beslenme ve erişkin hayatının büyük kısmını denizde geçirir (Fishbase, 2023) . Karadeniz alabalığı'nın 85-100cm uzunluğa ve 3-4 kg ağırlığa ulaştıkları rapor edilmiştir (Çakmak. E., 2001).

3.2. Örneklerin Orjinleri

Doğadan toplanan 79 örneğin kaudal yüzgeçlerinden alınan kesi örnekleri % 90'lık alkolde fikse edilmiş ve genel olarak 2000 ve 2002 yılları arasında Karadeniz bölgesinde konumlanan Fırtına Deresi (14 birey) ve Uzungöl'den (26 birey) ve İyidere (39 birey) mevkiinden toplanmıştır.

Yetiştiricilik orijinli örnekler için Tarımsal Araştırmalar ve Genel Müdürlüğü Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü bünyesinde 2000 yılından bu yana yetiştiriciliği gerçekleştirilen ve % 90'lık alkolde fikse edilen 96 bireylerden alınan kaudal yüzgeç örnkeler kullanılmaktadır. Örnekler F4, F5 ve F6 (önceki jenerasyonların arşivde bulunamamamsından dolayı) jenerasyonundan kullanılmıştır.

3.3. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için doğadan alınan 79 örnek ve yetiştiricilik hatlarından elde edilen 96 ve arşivlerde % 90'lık alkolde eppendorf® tüplerde saklanan örnekler kullanılmıştır. DNA izolasyonu için yaygın olarak kullanılan QIAamp 96 DNA QIAcube HT Kit® kullanılmıştır. Her gurup (yetiştiricilik ve doğa örnekleri) ayrı ayrı DNA izolasyon işlemine tabi tutulmuştur. Her bireyden alınan yaklaşık 20 mg kuyruk örneği 1,5 ml lik eppendorf®

tüpler içerisine yerleştirilerek lysis aşamasını kolaylaştırmak amacıyla steril makas yardımı ile küçük parçalara ayrılmıştır, daha sonra QIAamp 96 DNA QIAcube HT Kit® kullanıcı manuelindeki basamaklar izlenerek öncelikle Proteinaz K (her bir örnek için 20µl) ve ATL bufferları (her bir örnek için 180µl) ve RNA sız (RNA-Free) DNA elde etmek için Rnase A (her bir örnek için 4µl) eklenerek örnekler homojen hale gelene kadar vortexleme işlemi gerçekleştirilmiştir ve örneklerin tamamen solüsyon içinde kalmasından emin olmak için bir kere 3000 rpm se santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler bir gece 56°C’de sarsaklı inkübatörde bir gece bekletilmiştir. Örnekler tekrar vortex uygulanarak homojen dağılım sağlandıktan sonra 96’lık deepwell’e aktarılmıştır, daha sonra 3000 rpm’de santrifüj uygulanmıştır. Daha sonraki aşamada Biomek NX^P Automated Workstation (otomatik pipetleme) cihazı yardımıyla 410 µl önceden karıştırılmış buffer AL–ethanol alkolher örneğe eşit olarak dağıtılmıştır. Sonraki aşamada 15 saniye boyunca 3000rpm’de santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Kit içinde bulunan DNeasy 96 plateler S-Blok’un üzerine yerleştirilmiştir. Lisat tekrar DNeasy 96 platelere aktarılmıştır ve platelerin yüzeyi plastik kapatıcı (seal) ile dikkatlice kapatılmıştır. Platede bulunan mikro tüplere aktarım gerçekleştirildikten sonra kalan supernatant atılmıştır. DNeasy 96 plateler AirPore tape sheet (kit içinde gelen özel kaplama) ile kapatılmıştır ve 10 dk 6000 rpmde santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Tekrar cihaz yardımı ile 500 µl Buffer AW1 her bir örneğin üzerine eklenmiştir. Tekrar özel seal ile üzerleri kapatılan örnekler 5dk boyunca 6000 rpmde santrifüje edilmiştir. Üzerlerine 500 µl Buffer AW2 eklemesi yapılmıştır ve 15 dk 6000 rpm de santrifüje edilmiştir. Örnekler bu işlemlerin ardından kit içinde gelen Elution Microtubes RS’lerin üzerine yerleştirilmiştir. DNA’yı elüt etmek için her bir örneğin üzerine 200 µl Buffer AE eklenmiştir ve üzerleri seal ile kapatılıp oda sıcaklığında 1dk boyunca inkübe edilip 2 dk süreyle santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonraki aşamada DNA’nın % 75’i DNeasy 96 plate’e elde edilmiştir bu aşamada 200 µl Buffer AE eklenmiştir. Bu aşamadan sonra elde edilen DNA’lar üzerleri kapatılarak buzdolabında saklanmıştır.

3.4. Sekanslama

Çalışmada Doğadan toplanan örneklerin ve Yetiştiricilik sistemlerinden elde edilen örneklerin tür teyidi ve SNP kütüphanesinin oluşturulması ve ortaya konulması olmak üzere iki ayrı sekanslama sistemi kullanılmıştır. Örneklerin hazırlanma aşamasında doğadan alınan örnekler (F₀) ve Yetiştiricilikten elde edilen örnekler (F₄, F₅, F₆) kolay takip

yapılabilmesi için kod isimlerle isimlendirilmiştir. Doğal populasyonlar için AS, Yetiştiricilik populasyonları için ANS kısaltmaları kullanılmıştır.

3.5. Sanger Sekanslama

Doğadan toplanan örneklerin tür tescilinin yapılması ve kullanılan doğal örneklerle yetiştiriciliği yapılan örneklerin tam olarak birbiri ile aynı türden olduğunun sağlanması açısından kullanılacak 141 örneğin (96 yetiştiricilik, 45 Doğal) Sanger sekanslaması yapılmıştır. Sanger sekanslama Applied Biosystems SeqStudio™ Genetic Analyzer System kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her iki populasyonun örnekleri ayrı ayrı sekanslama için hazırlanmış ve aşağıdaki protokol izlenmiştir.

3.5.1. Sanger Sekanslama Protokolü

Ortalama 650bp olan COI geni (5'-TCA ACY AAT CAY AAA GAT ATY GGC AC-3') yükseltgenme için seçilmiştir.

3.5.2. ExoSap Pürifikasyon

10 units/ μ l gelen Exonuclease 1 ile SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) 1:1 oranda mix yapılmıştır. (Exonuclease1 unit değerine dikkat edilmiştir ve gelen Exonuclease 1 20 units/ μ l ise bu birleşim Exo:SAP 1:2 olarak yapılmıştır) Sanger sekanslama yapılacak PCR ürünleri kısaca vorteks spin yapılmıştır (ExoSAP aşaması buz üzerinde çalışılmış ve enzim buz üzerinde tutulmuştur.)

Tablo 2

ExoSAP ve PCR ürün miktarları.

İçerik	Miktar
ExoSAP	2 μ L
PCR Ürünü	5 μ l

5 μ l PCR ürünü ile 2 μ l Exosap karıştırılarak kısaca vortex spin yapılmıştır. Thermal cyclers cihazına yerleştirilerek aşağıdaki protokol uygulanmıştır.

Tablo 3

Thermal cycler döngüsünün sıcaklıkları ve süreleri

Sıcaklık	Süre
37°C	37 dk
80°C	15dk
4°C	∞

PCR sonrası ürünler -20°C'de muhafaza edilmiştir. Exosap ürünleri -20°C'den alınarak çözdürülmüş, kısaca vortex spin yapılmıştır. PCR da kullanılan ileri (Forward) (10 nmol) ve geri (Reverse) (10 nmol) primerler ayrı ayrı sulandırılarak 2 nmol derişime getirilmiştir. Bu aşamada bir örnek için iki ayrı tüp isimlendirilmiştir. Dolayısıyla yapılacak mix de örnek sayısının iki katı olmuştur (Forward ve Reverse yön için ayrı PCR yürütülmüştür).

Tablo 4

Sekans PCR'ı için hazırlanan örneklerin

	Forward	Reverse
BigDye Terminator Mix	0,25µl	0,25µl
5X Seq. Buffer	2µl	2µl
dH ₂ O	3,75µl	3,75µl
Forward Primer (2nM)	2µl	-
Reverse Primer(2nM)	-	2µl
ExoSAP Ürünü	2µl	2µl

Tabloda belirtilen miktarlarda ürünler ile 2 µl ExoSAP ürünü mix yapılmıştır. F yön sekansı içine yalnızca forward primer F tüpü içerisine ve R yön sekansı için sadece reverse primer R tüpü içerisine eklenmiştir.

Tüm ürünler eklendikten sonra tüpler vortex spin yapılarak PCR cihazına yerleştirilmiştir ve aşağıdaki thermal protokol uygulanmıştır. PCR sonrası ürünler -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Tablo 5

Sekans için hazırlanan örneklerin Thermal döngü sayıları, sıcaklık ve süreleri.

Döngü	Sıcaklık	Döngü Sayısı
1	96°C 01:00	
2	96°C 00:10 50°C 00:05 60°C 04:00	25 Döngü
3	4°C ∞	

3.5.3.EtOH Çöktürme – PCR Pürifikasyonu

Aşağıdaki tabloda yer alan kimyasallar önceden hazırlanarak, 1,5 - 2 ml ependorf tüplere alikotlanmış ve -20 °C de saklanmıştır.

Tablo 6

PCR pürifikasyonu için kullanılan kimyasallar ve miktarları

Kimyasallar	Kullanılacak Miktar
125nM EDTA	1µl
3M NaOAc	1µl
Glikojen % 2 (hazırlanması: 98 ul su + 2 ul stok Glikojen)	1µl
% 100'lük soğuk Ethanol	25µl
Toplam hacim	28µl

Sodyum Asetat çalışma öncesi çıkarılıp oda sıcaklığında çözündürülmüştür. Örneklerin Forward (F) ve Reverse (R) kuyucuklarına göre hesaplama yapılmıştır (Örnek başına iki kuyucuk F ve R şeklinde). Glikojen EDTA ve NaOAc kullanılarak yukarıda belirtilen miktarlarda her örneğe iki tüp olacak şekilde hesaplama yapılarak gerekli miktarlarda mix yapılmıştır (Mix hazırladıktan sonra beyaz çökelti gözlemlenebilmektedir, bunu önlemek adına mix homojen görüne kadar vortekslenmiştir). BigDye ürünleri üzerine 3 µl hazırlanan mix eklenmiştir. Plate kısaca spinlenerek mix dibe çöktürülmüştür. Spin sonrasında kuyucukların üzerine soğuk 25 µl EtOH eklenmiş ve seal ile sıkıca kapatılmıştır. Plate, 15 dak oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve 15 dk bittikten sonra +4 C'de 45 dk 2000 g ya da 4000 rpm 'de santrifüj edilmiştir. Bu esnada % 70'lik alkol hazırlanmış ve soğuması

için -20 °C de saklanmıştır. Santrifüj cihazından çıkan plate üzerine 3 kat peçete sarılarak plate ters çevrilmiş ve o şekilde santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Ters çevrilmiş plate, 160 g'de short spin yapılmıştır. Santrifüjden çıkarılan plate üzerine önceden hazırlanıp soğutulan % 70'lik alkolden her kuyucuğa 35 µl eklenmiş ve seal ile sıkıca kapatılmıştır. Plate 1650 g'de 15 dk santrifüjlenmiş, 15 dk bittikten sonra plate peçeteye sarılıp ters çevrilerek 185 g'de 1 dk tekrar santrifüjlenmiştir. Kalan alkolün uçması için PCR cihazı 56°C ayarlanmış ve bu sıcaklığa çıkması beklenip, 56°C 'ye çıkan PCR cihazının üstüne plate ağzı açık şekilde yerleştirilip ve 3 dk bekletilmiştir.

3.5.4.Denatürasyon ve Cihaza Yükleme

PCR cihazından aldığımız plate kuyucuklarına 10 µl HIDI-Formamide eklenmiş ve üzeri seal ile sıkıca kapatılmıştır. Plate kısaca 600 G'de spinlendikten sonra PCR cihazına konulmuş ve aşağıdaki protokol uygulanmıştır.

Tablo 7

Denatürasyon sıcaklığı ve süresi

Sıcaklık	Süre
95°C	3dk

Plate cihazdan alınarak buzlu rack üzerine yerleştirilmiş 30 sn'ye bekletilmiş, sonrasında kısa spin yapılmıştır. Plate üzerinde bulunan bütün örnekler sanger plate'ine aktarılmış ve üzeri septa ile kapatılmıştır. Sanger plate'ı son bir kısa spin yapılarak cihaza yüklemeye hazır hale getirilmiştir.

3.6.Biyoenformatik Analizler

Sanger sonucunda elde edilen okumalar Doğal (AS) ve Yetiştiricilik (ANS) popülasyonları ayrı ayrı olacak şekilde değerlendirmeye alınmıştır. Öncelikle her bireyin okuması BioEdit 7.0 uygulaması kullanılarak düzenlenmiştir öncelikle okumalar hizalanmış ve her okumadaki kartogram pikleri kontrol edilerek filtreleme yapılmıştır, daha sonra Clustal W kullanılarak çoklu dizi hizalaması yapılmıştır. Hizlama tamamlandıktan sonra dizilerin düzenlemesi yapılmıştır ve okumaların baş ve sonunda bulunan hatalı kısımlar

kesilmiştir. Hizalanan örnekler haplotip ve indel analizleri DNAsp v.6.12.03 programı kullanılarak yapılmıştır. Mega v.11.0 veri analiz programı kullanılarak Pairwise sekans hizalama kullanılarak popülasyonların kendi içindeki karşılaştırmaları yapılmıştır.

3.6.1. Tam Genom Sekanslama (Whole Genome Sequencing)

30 adet yetiştiricilik ve 30 adet doğal örnek olmak üzere toplamda 60 *Salmo labrax* örneğinin kütüphane hazırlanma aşaması tamamlandıktan sonra Illumina NovaSeq 6000® cihazında tam genom sekanslama işlemi gerçekleştirilmiştir. Sekanslama sonucunda toplamda 12X coverage ve 6Gb data sağlanmıştır. Tam genom sekans sonuçları fasta dosya formatında alınmış ve toplamda doğal popülasyonlardan 35-151 sekans uzunluğu, % 44'lük bir GC oranı ve toplam 1485978532 ham data elde edilmiştir. Yetiştiricilik popülasyonlarında % 43'lük GC oranıyla toplamda 3185834998 ham data eldesi gerçekleşmiştir. Bu aşamadan sonra elde edilen veriler biyoenformatik analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.6.2. Tam Genom Sekanslama Kütüphane Hazırlanması

DNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Invitrogen dsDNA HS Qubit kiti ile izole edilen DNA örneklerinin Qubit (Qubit Flex Fluorometer) ile konsantrasyon tayini yapılmıştır (Tablo 8).

Qubit çalışma solüsyonu hazırlanırken; Çalışma Solüsyonu = $1 \mu\text{l} * n \text{ Dye} + 199 \mu\text{l} * n \text{ Qubit Solution}$ olacak şekilde hazırlanmıştır. Qubit tüplerine hazırlanan solüsyondan 198 μl dağıtılmış, üzerine de 2 μl ölçülecek DNA ilave edilmiştir. Vorteks-spin yapılmış, tüpler karanlık ortamda 2 dakika boyanın DNA ile bağlanması için bekletilmiştir.

Tablo 8

DNA Konsantrasyonları

Örnek Adı	Konsantrasyon ng/µl	Örnek Adı	Konsantrasyon ng/µl	Örnek Adı	Konsantrasyon ng/µl
ANS2	37,5	ANS25	51	AS28	27,6
ANS3	85,9	ANS26	60,9	AS32	33,9
ANS4	80,9	ANS27	49,2	AS34	24
ANS5	55	ANS28	55	AS38	75,9
ANS7	63,8	ANS29	33,2	AS39	41,1
ANS9	77,4	ANS30	59	AS41	41,8
ANS10	57	ANS31	36,6	AS43	24
ANS11	63,6	ANS32	63,1	AS44	49,7
ANS12	78,5	ANS33	27	AS45	59
ANS13	47,1	ANS35	51	AS53	24
ANS14	60,7	AS1	25,7	AS56	60
ANS15	27,4	AS2	24,4	AS57	60
ANS16	62,8	AS4	43,7	AS58	44,2
ANS17	48,4	AS17	45,5	AS59	31,9
ANS19	52	AS20	38,5	AS60	60,9
ANS20	63,3	AS21	37,1	AS61	62,3
ANS21	32,6	AS22	29,4	AS62	80,1
ANS22	68,5	AS25	22,7	AS63	73,5
ANS23	92,7	AS26	50	AS64	65,1
ANS24	39,9	AS27	59,2	AS71	32

Illumina DNA PCR-Free Library Prep, Tagmentation Kiti ile Kütüphanelerin Hazırlanması

Her bir örnek 25 µl, 500 ng olacak şekilde RSB (Resuspension Buffer) ile dilüe edilmiştir.

Tagmentasyon (Tagment Genomic DNA)

Örnek başı 15 µl BLT-PF (Bead-Linked Transposomes PCR-Free) ve 10 µl TB1 TB1 (Tagmentation Buffer 1) mix yapılmış ve 25 µl 500 ng olacak şekilde dilüe edilen örneklerin üzerine eklenmiştir. Thermal Cycler'da (MiniAmp Plus Thermal Cycler) tablo 9'deki koşullarda (TAG Programı) inkübasyona bırakılmıştır.

Tablo 9

TAG Programı

Preheat Lid 100°C – Reaksiyon Hacmi 50 µl	
Isı	Süre
41 °C	5 Dakika
4 °C	∞

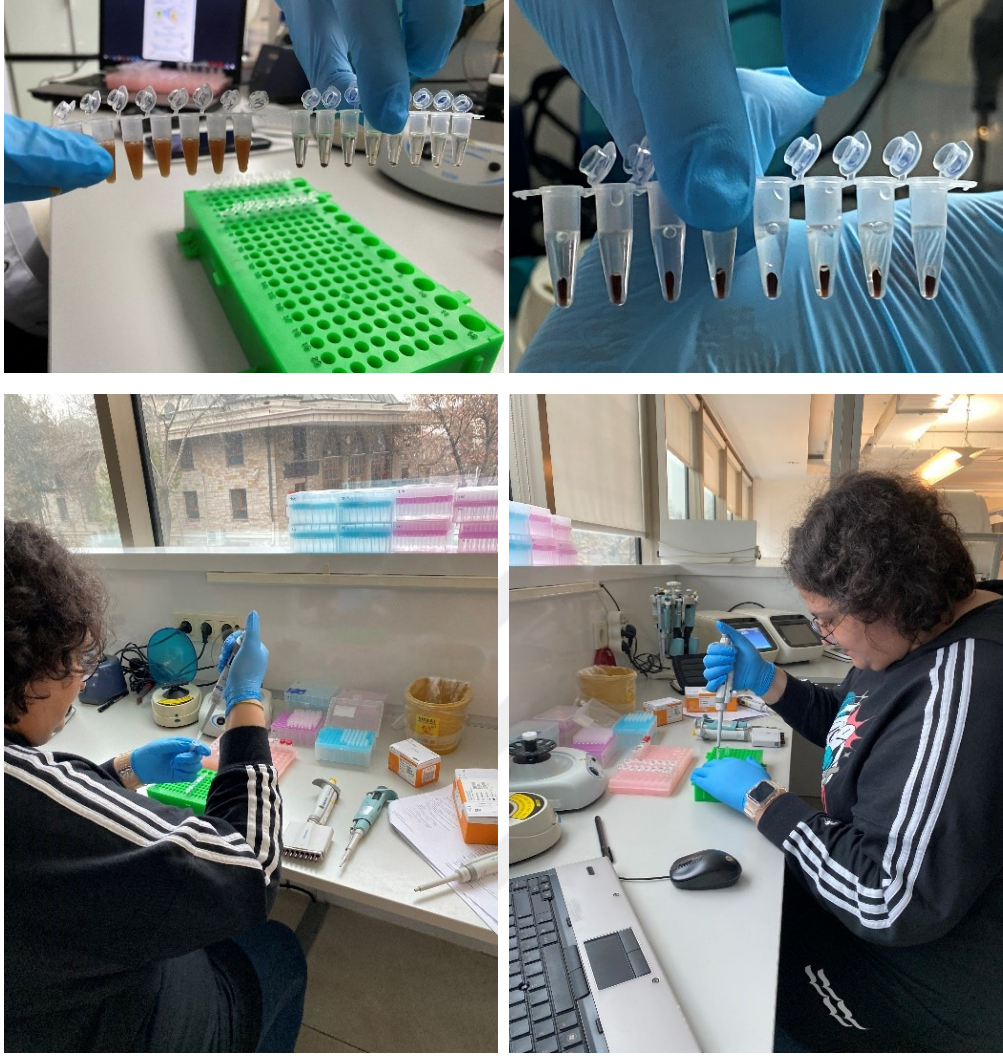
Tagmentasyon Sonrası Saflaştırma (Post Tagmentation Clean Up)

Tagmentasyon sonrası her örneğin üzerine 10 µl ST2 (Stop Tagment Buffer 2) eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır ve 2 dakika oda ısısında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra örnekler manyetik standı (DynaMag 96-Side) alınmış ve bead'ler toplanıp sıvı berraklaşana kadar yaklaşık 2 dakika boyunca beklenmiştir. Bead'lere dokunmadan tüm sıvı çekilip atılmış, üzerine 150 µl TWB (Tagment Wash Buffer) eklenmiştir. Tüpler manyetik standtan alınmış, TWB içindeki bead'ler çözündürülmüş tüpler tekrar manyetik standı alınmıştır, berraklaşana kadar yaklaşık 2 dakika beklenmiştir. Berraklaştıktan sonra süpernatant çekilip atılmıştır (Şekil 5).

Ligate Indexes

Tüpler manyetik stand'tan alındıktan sonra her bir örnek üzerine 45 µl ELM (Extension Ligation Mix) eklenmiştir. Ardından her bir örnek için önceden belirlenen index'lerden [Index adapters (IDT for Illumina DNA/RNA UD Indexes)] (Tablo 10) ayrı ayrı 5 µl eklenmiştir. Tüpler thermal Cycler'da tablo 3'teki (ELM Programı) koşullarda reaksiyona bırakılmıştır.

ELM Programı bittikten sonra tüpler manyetik standı alınmıştır, sıvı berraklaşana kadar yaklaşık 2 dakika bekletilmiştir. Berraklaştıktan sonra sıvı bead'lere dokunulmadan çekilip atılmıştır. Tüpler manyetik stand'tan alınmış, üzerine 75 µl TWB (Tagment Wash Buffer) eklenmiştir. TWB içindeki bead'ler çözündürülmüş, tüpler tekrar manyetik standı alınmış ve berraklaşana kadar yaklaşık 2 dakika beklenmiştir. Berraklaştıktan sonra süpernatant çekilip atılmıştır. Bead'lerin üzerine 45 µl dilüe edilmiş HP3 (2N NaOH) (Örnek başı 6 µl HP3 + 54 µl NFW) eklenmiş, bead'ler çözündürülmüştür (Tablo 11).



Şekil 5. Tagmentasyon sonrası saflaştırma aşamaları (Orijinal, 2022)

Tablo 10

ELM Programı

Preheat Lid 100°C – Reaksiyon Hacmi 50 µl	
Isı	Süre
37°C	5 Dakika
50°C	5 Dakika
4 °C	∞

Tablo 11

ITD Illumina DNA/RNA UD Indexes Set A

Örnek Adı	UD Index Set A	Örnek Adı	UD Index Set A	Örnek Adı	UD Index Set A
ANS2	A01	ANS25	E04	AS28	A06
ANS3	B01	ANS26	F04	AS32	B06
ANS4	C01	ANS27	G04	AS34	C06
ANS5	D01	ANS28	H04	AS38	D06
ANS7	E01	ANS29	A05	AS39	E06
ANS9	F01	ANS30	B05	AS41	F06
ANS10	G01	ANS31	C05	AS43	G06
ANS11	H01	ANS32	D05	AS44	H06
ANS12	A03	ANS33	E05	AS45	A07
ANS13	B03	ANS35	F05	AS53	B07
ANS14	C03	AS1	A02	AS56	C07
ANS15	D03	AS2	B02	AS57	D07
ANS16	E03	AS4	C02	AS58	E07
ANS17	F03	AS17	D02	AS59	F07
ANS19	G03	AS20	E02	AS60	G07
ANS20	H03	AS21	F02	AS61	H07
ANS21	A04	AS22	G02	AS62	A08
ANS22	B04	AS25	H02	AS63	B08
ANS23	C04	AS26	G05	AS64	C08
ANS24	D04	AS27	H05	AS71	D08

Kütüphanelerin Saflaştırılması (Clean Up Libraries)

45 µl dilüe edilmiş HP3 ile çözdürülmüş bead'lerin üzerine 36 µl IPB (Illumina Purification Beads) eklenmiştir, pipetajla homojen hale getirilmiş ve oda ısısında 2 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra tüpler manyetik standı alınmıştır, sıvı berraklaşana kadar yaklaşık 5 dakika beklenmiştir, 5 dakikalık bekleme süresinde her bir örnek için yeni tüpler isimlendirilmiştir. 5 dakikalık bekleme süresi bittikten sonra berraklaşan sıvıdan 76 µl çekilmiş ve yeni isimlendirilen tüplere aktarılmıştır, üzerine 42 µl IPB (Illumina Purification Beads) eklenmiş, pipetajla homojen hale getirilmiş ve oda ısısında 2 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Tüpler tekrar manyetik standı alınmış, sıvı berraklaşana kadar yaklaşık 5 dakika beklenmiştir. 5 dakikalık bekleme süresinde her bir örnek için en az 180+180 µl taze % 80'lik EtOH (Ethanol Absolute \geq % 99.9) hazırlanmış, 5 dakikalık bekleme süresi bittikten sonra berraklaşan sıvı çekilip atılmıştır. Bead'lerin üzerine 180 µl

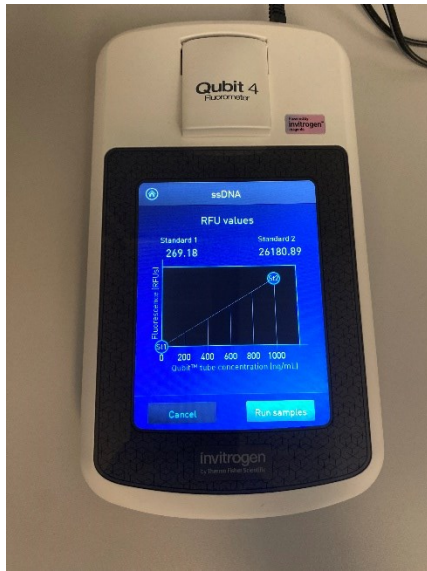
taze % 80'lik EtOH eklenmiş ve 30 saniye beklenip, alkol çekilip atılmıştır. Aynı işlem bir kez daha tekrarlanmıştır. Alkol çekilip atıldıktan sonra kalan alkolün uçması için tüpler manyetik stand üzerinde yaklaşık 2 dakika bekletilmiştir ve ardından bead'lerin üzerine 22 µl RSB (Resuspension Buffer) eklenmiştir. Bead'ler manyetik stand'tan alınıp ve RSB içinde çözdürülmüştür ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 2 dakikalık inkübasyon süresinde her bir örnek için yeni tüpler isimlendirilmiştir. 2 dakikalık inkübasyon süresi bittikten sonra tüpler manyetik standda alınmış, sıvı berraklaşana kadar bekletilmiştir. Berraklaşan sıvının 20 µl'si yeni isimlendirilen tüplere aktarılmıştır.

Kütüphane Konsantrasyonlarının Ölçülmesi ve Tek Havuzda Toplanması (Quantify and Pool Libraries)

Her örnek için hazırlanan kütüphane konsantrasyonu Qubit ssDNA Assay Kit ile ölçülmüştür (Şekil 6). Her bir örnek için aşağıdaki formül kullanılarak nM konsantrasyonu hesabı yapılmıştır (Tablo 12).

$$\text{Konsantrasyon [nM]} = \text{Qubit Ölçüm Sonucu} \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \times 3,36$$

Her bir amplikon kütüphanesi 1,6 nM konsantrasyonda olacak şekilde dilüe edilmiştir. Her bir kütüphaneden eşit hacimde alınmış ve kütüphaneler tek tüpte toplanmıştır.



Şekil 6. Qbit cihazı ve kütüphane konsantrasyonlarının ölçümü (Orijinal, 2022).

Tablo 12

Quantify ve Pool Kütüphaneler.

Örnek Adı	Qubit Sonucu	ng→nM	1,6 nM'e Dilüsyon		Örnek Adı	Qubit Sonucu	ng→nM	1,6 nM'e Dilüsyon	
			Library	RSB				Library	RSB
ANS2	2,43	8,2	2,0	8,0	AS1	1,57	5,3	3,0	7,0
ANS3	2,03	6,8	2,3	7,7	AS2	1,62	5,4	2,9	7,1
ANS4	2,17	7,3	2,2	7,8	AS4	1,18	4,0	4,0	6,0
ANS5	1,63	5,5	2,9	7,1	AS17	2,16	7,3	2,2	7,8
ANS7	1,96	6,6	2,4	7,6	AS20	0,68	2,3	7,0	3,0
ANS9	1,78	6,0	2,7	7,3	AS21	0,54	1,8	8,8	1,2
ANS10	1,83	6,1	2,6	7,4	AS22	1,03	3,5	4,6	5,4
ANS11	1,76	5,9	2,7	7,3	AS25	1,4	4,7	3,4	6,6
ANS12	4,3	14,4	1,1	8,9	AS26	6,8	22,8	0,7	9,3
ANS13	2,37	8,0	2,0	8,0	AS27	1,41	4,7	3,4	6,6
ANS14	2,38	8,0	2,0	8,0	AS28	0,51	1,7	9,3	0,7
ANS15	1,25	4,2	3,8	6,2	AS32	1,6	5,4	3,0	7,0
ANS16	3,26	11,0	1,5	8,5	AS34	0,99	3,3	4,8	5,2
ANS17	3,62	12,2	1,3	8,7	AS38	2,42	8,1	2,0	8,0
ANS19	2,21	7,4	2,2	7,8	AS39	0,91	3,1	5,2	4,8
ANS20	2,06	6,9	2,3	7,7	AS41	2,3	7,7	2,1	7,9
ANS21	2,93	9,8	1,6	8,4	AS43	1,68	5,6	2,8	7,2
ANS22	2,35	7,9	2,0	8,0	AS44	1,77	5,9	2,7	7,3
ANS23	2,85	9,6	1,7	8,3	AS45	1,15	3,9	4,1	5,9
ANS24	3,33	11,2	1,4	8,6	AS53	0,67	2,3	7,1	2,9
ANS25	2,82	9,5	1,7	8,3	AS56	2,48	8,3	1,9	8,1
ANS26	3,32	11,2	1,4	8,6	AS57	2,12	7,1	2,2	7,8
ANS27	2,65	8,9	1,8	8,2	AS58	2,04	6,9	2,3	7,7
ANS28	3,12	10,5	1,5	8,5	AS59	1,23	4,1	3,9	6,1
ANS29	3,1	10,4	1,5	8,5	AS60	2,14	7,2	2,2	7,8
ANS30	2,04	6,9	2,3	7,7	AS61	1,93	6,5	2,5	7,5
ANS31	1,5	5,0	3,2	6,8	AS62	1,09	3,7	4,4	5,6
ANS32	1,77	5,9	2,7	7,3	AS63	1,47	4,9	3,2	6,8
ANS33	1,84	6,2	2,6	7,4	AS64	2	6,7	2,4	7,6
ANS35	2,26	7,6	2,1	7,9	AS71	0,51	1,7	9,3	0,7

3.6.3. Veri (Data) Analizi

Sekanslama Doğal Populasyonlar ve Yetiştiricilik populasyonları için ayrı ayrı ileri (Forward) ve geri (reverse) okuma olarak gerçekleştirilmiştir. Data analizine başlamadan önce ileri ve geri okumalar 'cat' komutu kullanılarak birleştirilmiştir. Veriler tek FASTQ verisi olarak birleştirilerek analize başlanmıştır.

```
>cat *fastq.gz > ANS_all.fastq
```

Elde edilen okumaların tamamı FASTQ dosyası formatında olmaktadır ve verilerinin hepsini tek bir FASTQ dosyası olarak birleştirmek için ‘‘cat’’ komutu kullanılmıştır.

Gerçekleştirilen okumaların De novo analizine başlamadan önce kalitelerinin kontrolü. FASTQC yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Öncelikle aşağıdaki ilk komut dizisi kullanılarak aracın yüklenmesi gerçekleştirilmiş daha sonra takip eden komut dizisi ile QC raporu hazırlanmıştır.

```
>sudo apt-get install fastqc  
>fastqc DizilemeVerisi.fastq.gz
```

Kalite kontrolü gerçekleştirildikten sonra referans dizilerinin hizalama aşamasına geçilmiştir. Çalışma *Salmo labrax* türünün yeterli genome verisi olmaması dolayısıyla De-novo gerçekleştirilmiştir, bu nedenle referans için kullanılacak NC_042957.1 aksesyon numarası ile kayıt edilen *Salmo trutta* tam genom dizisinin NCBI (National Library of Medicine) sistemi üzerinden verinin indirilmesi gerçekleştirilmiştir. Okumaların referans dizisine hizalanması ve NCBI üzerinden verilerin indirilmesi amacıyla BWA (Burrows-Wheeler) Aligner tool v. 1.1.4 kullanılmıştır. Indexlenmiş referans verileri ile ileri geri okumalar hizalanmıştır, çıkan dosyalar bam ya da sam formatında oluşturulmuştur. Hizalanan okumaların sıralama ve istatistiksel analizlerini gerçekleştirilmesi için SAMtools v.1.17 kullanılmıştır. Hizalanmış verilerin genom üzerindeki yerinin belirlenmesi ve hizalanan bölgenin gösterilmesi amacıyla kullanılmıştır. Sıralanmış veriden bazı istatistiksel verilerin alınması için samtools flagstat Align.sorted.bam kullanılmıştır. Örneğin yüzde olarak coverage ve okumaların yüzde olarak ne kadarının kullanıldığı gibi bilgiler elde edilmiştir. Kullanılacak verinin görüntülemesinin yapılabilmesi amacıyla samtools index Align.sorted.bam komutu kullanılarak veri indexlenmesi yapılmıştır. Variant calling için bcftools aracı kullanılmıştır.

```
>bcftools mpileup -Ou -f Referans.fasta Align.sorted.bam | bcftools call -vmO z -o  
Align.vcf.gz komutu yardımıyla mpileup variantları kontrol edilmiş ve bulunmuştur.
```

>tabix -p vcf LSDV.vcf.gz kodu tabix programı kullanılarak vcf dosyası indekslenmiştir.



DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Türlerin Teyyidi ve Karşılaştırılması

Hem yetiştiricilik türlerine hem de doğal popülasyonlara tür doğrulaması amacıyla yapılan Sanger sekanslama analizleri sonucunda ;

F₀ olarak nitelendirilen doğal popülasyonlar üç istasyondan elde edilmiştir. İstasyonlar Trabzon'da bulunan İyidere (AS1) Uzungöl (AS2) ve Fırtına Deresi ana koldan alınmıştır (AS3). Örneklerin Cytochrome oxidase subunit 1 (COI) mitokondrial gen bölgesi analiz edilmiştir ve yapılan BLAST analizi sonucunda, örneklerin *Salmo labrax* türü olduğu doğrulanmış, fakat aynı aileden olan türlerle de benzerlik gösterdikleri gözlemlenmiştir (Tablo 13).

Tablo 13

Doğal popülasyon örneklerinin BLAST sonuçları.

Doğal Popülasyon Örnekleri	Bilimsel İsmi	Gen	Max Skor	Total Skor	Query Cover	E Değeri	Per. Ident	Acc. Len	Accession Numarası
AS1	<i>Salmo labrax</i>	cytochrome oxidase subunit 1	1131	1131	100%	0.0	99.20%	632	MH424332.1
	<i>Salmo trutta fario</i>	cytochrome oxidase subunit 1	1136	1136	100%	0.0	99.36%	632	MH424333.1
AS2	<i>Salmo labrax</i>	cytochrome oxidase subunit 1	1151	1151	98%	0.0	99.22%	652	MG951580.1
	<i>Salmo trutta</i>	cytochrome oxidase subunit 1	1151	1151	99%	0.0	98.77%	16677	MW632108.1
AS3	<i>Salmo labrax</i>	cytochrome oxidase subunit 1	1158	1158	100%	0.0	98.92%	1262	JX960946.1
	<i>Salmo trutta</i>	cytochrome oxidase subunit 1	1166	1166	100%	0.0	99.23%	16677	MW632108.1

Doğal örneklerdeki 47 bireyden elde edilen 675 bç'den alignment boşlukları göz ardı edilerek toplamda 229 variable bölge değerlendirilmesi sonucunda toplamda 37 haplotip elde edilmiştir ve haplotip çeşitliliği (Hd) 0,9880 olarak tespit edilmiştir. Tetraallelic indel (insertion and deletion) modeli uygulanarak toplamda 70 indel analiz edilmiş, 8 adet örtüşen indel dışarıda bırakılmış ve indel event analizi sonucunda I: 38 ve 5 adet örtüşen indeller dışarıda bırakıldığında 43 adet indel eventi gözlemlenmiştir. Ortalama indel event uzunluğu 2,000 olurken ortalama indel uzunluğu 1,371 olarak bulunmuştur. İnDel haplotip sayısı 17 ve İnDel haplotip çeşitliliği 0,854 olarak bulunmuştur. Çeşitlilik , k(i): 3,060, her bölge için

çeşitlilik $Pi(i)$: 0,00459 ve $\Theta(i)-W$: 8,604 olarak bulunmuştur. Tajima'nın istatistik yöntemine göre D : -2,20417 ve önem $P < 0.01$ olarak bulunmuştur.

F_4 , F_5 , F_6 Yetiştiricilik hatları Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Trabzon bünyesinde 2000 yılından itibaren üretime başlanan hattın (F_1) devamıdır. F_4 , F_5 , F_6 jenerasyonu 2010 ve 2018 yılları arasında üretilen hatlardır. Haplotip analizi sonucunda yetiştiricilik hatları popülasyonunun toplamda 27 haplotipe ve Hd :0,9436 haplotip çeşitliliğine sahip olduğu görülmüştür. Yine yapılan InDel analizi sonucunda 658 baz uzunluğundaki dizi içerisinde toplamda 70 adet InDel bölgesine raslanmıştır toplamda I :36 InDel olayı analizi gerçekleştirilmiştir. Ortalama indel olay uzunluğu 2,056 olurken ortalama indel uzunluğu 1,317 olarak hesaplanmıştır. Toplam indel haplotip sayısı 14 olurken InDel haplotip çeşitliliği 0,762 olmuştur. InDel çeşitliliği $k(i)$: 2,723, her bölge için InDel $Pi(i)$:0,00414 ve $\Theta(i)-W$:8,151 olarak hesaplanmıştır. Tajima istatistik modeline göre D :-2,26892 ve istatistik önem $P < 0.01$ olmuştur. Tek popülasyon olarak değerlendirilen yetiştiricilik hatlarının tür teyidi yapıldığında *Salmo labrax* (COI) ile % 98 oranında Query Covarage yakaladığı görülmektedir.

Aşağıdaki tabloda yetiştiricilik (ANS) ve doğal (AS) popülasyonların pairwise uzaklık (distance) analizi sonuçları verilmiştir (Tablo 14). Genel olarak genetik uzaklık 0,001'in altında izlenmiştir.

Salmonidae ailesi içinde yer alan diğer türlerle yapılan pairwise uzaklık analizi (Tablo15.) yapıldığında ise Doğal popülasyonların beklendiği üzere birbirine yakın olduğu gözlemlenmiştir (0,006).

Tablo 14

Doğal (AS) ve Yetiştiricilik(ANS) populasyonlarının Pairwise Distance analizi.

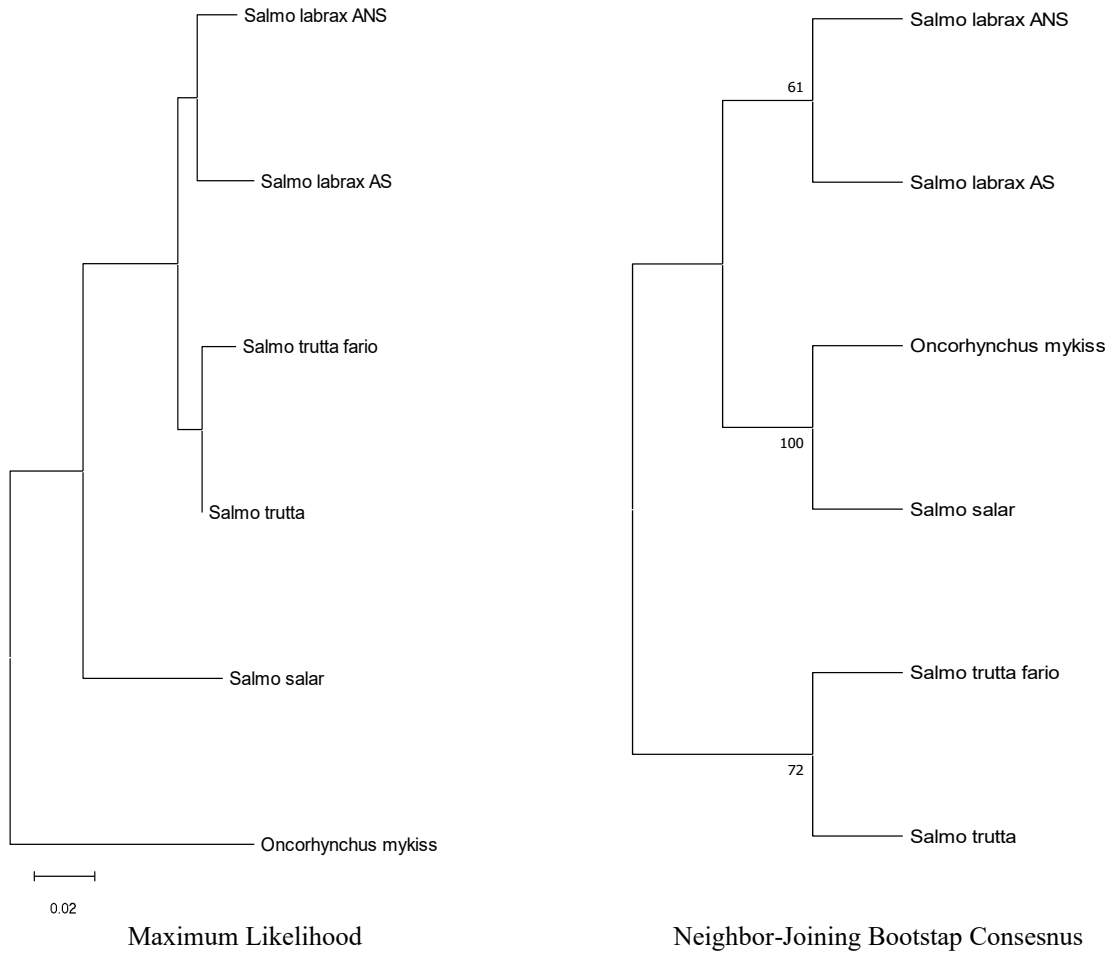
Column	Column	Column	Column	Column	Column	Column	Column	Column	Column	Column	Column	Column	Column	Column	Column	Column	Column	Column	Column	Column	Column	Column
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
	ANS2	ANS3	ANS4	ANS5	ANS7	ANS9	ANS10	ANS11	ANS12	ANS13	AS1	AS2	AS4	AS17	AS20	AS21	AS22	AS25	AS26	AS27		
ANS2																						
ANS3	0,0017																					
ANS4	0,0000	0,0017																				
ANS5	0,0137	0,0119	0,0137																			
ANS7	0,0000	0,0017	0,0000	0,0137																		
ANS9	0,0000	0,0017	0,0000	0,0137	0,0000																	
ANS10	0,0119	0,0102	0,0119	0,0017	0,0119	0,0119																
ANS11	0,0017	0,0000	0,0017	0,0119	0,0017	0,0017	0,0102															
ANS12	0,0034	0,0017	0,0034	0,0137	0,0034	0,0034	0,0119	0,0017														
ANS13	0,0034	0,0017	0,0034	0,0137	0,0034	0,0034	0,0119	0,0017	0,0000													
AS1	0,0137	0,0119	0,0137	0,0000	0,0137	0,0137	0,0017	0,0119	0,0137	0,0137												
AS2	0,3294	0,3276	0,3294	0,3276	0,3294	0,3294	0,3294	0,3276	0,3276	0,3276	0,3276											
AS4	0,0188	0,0205	0,0188	0,0119	0,0188	0,0188	0,0102	0,0205	0,0222	0,0222	0,0119	0,3362										
AS17	0,0085	0,0068	0,0085	0,0051	0,0085	0,0085	0,0034	0,0068	0,0085	0,0085	0,0051	0,3276	0,0137									
AS20	0,0085	0,0102	0,0085	0,0051	0,0085	0,0085	0,0034	0,0102	0,0119	0,0119	0,0051	0,3311	0,0102	0,0034								
AS21	0,0119	0,0102	0,0119	0,0017	0,0119	0,0119	0,0000	0,0102	0,0119	0,0119	0,0017	0,3294	0,0102	0,0034	0,0034							
AS22	0,0119	0,0102	0,0119	0,0017	0,0119	0,0119	0,0000	0,0102	0,0119	0,0119	0,0017	0,3294	0,0102	0,0034	0,0034	0,0000						
AS25	0,0119	0,0102	0,0119	0,0017	0,0119	0,0119	0,0000	0,0102	0,0119	0,0119	0,0017	0,3294	0,0102	0,0034	0,0034	0,0000	0,0000					
AS26	0,1075	0,1075	0,1075	0,0973	0,1075	0,1075	0,0973	0,1075	0,1058	0,1058	0,0973	0,3259	0,1041	0,1007	0,0990	0,0973	0,0973	0,0973				
AS27	0,0137	0,0119	0,0137	0,0000	0,0137	0,0137	0,0017	0,0119	0,0137	0,0137	0,0000	0,3276	0,0119	0,0051	0,0051	0,0017	0,0017	0,0017	0,0017	0,0973		

Tablo 15.

Doğal (AS) ve Yetiştiricilik (ANS) populasyonlarının diğer salmon türleri ile Pairwise Distance analizi.

	<i>Salmo labrax</i>	<i>Salmo labrax</i> AS	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Salmo salar</i>	<i>Salmo trutta fario</i>	<i>Salmo trutta</i>
<i>Salmo labrax</i> ANS						
<i>Salmo labrax</i> AS	0,00667					
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	0,12667	0,12889				
<i>Salmo salar</i>	0,07333	0,08000	0,14222			
<i>Salmo trutta fario</i>	0,01333	0,02000	0,13333	0,08667		
<i>Salmo trutta</i>	0,00222	0,00889	0,12444	0,07556	0,01111	

Salmonidae ailesi içerisinde bulunan diğer türlerle yapılan filogenetik yakınlık ağacı her iki populasyonunda genetik olarak en yakın birbirine ve daha sonra *Salmo trutta* türüne yakın olduğu gözlenmiştir (Şekil 7).

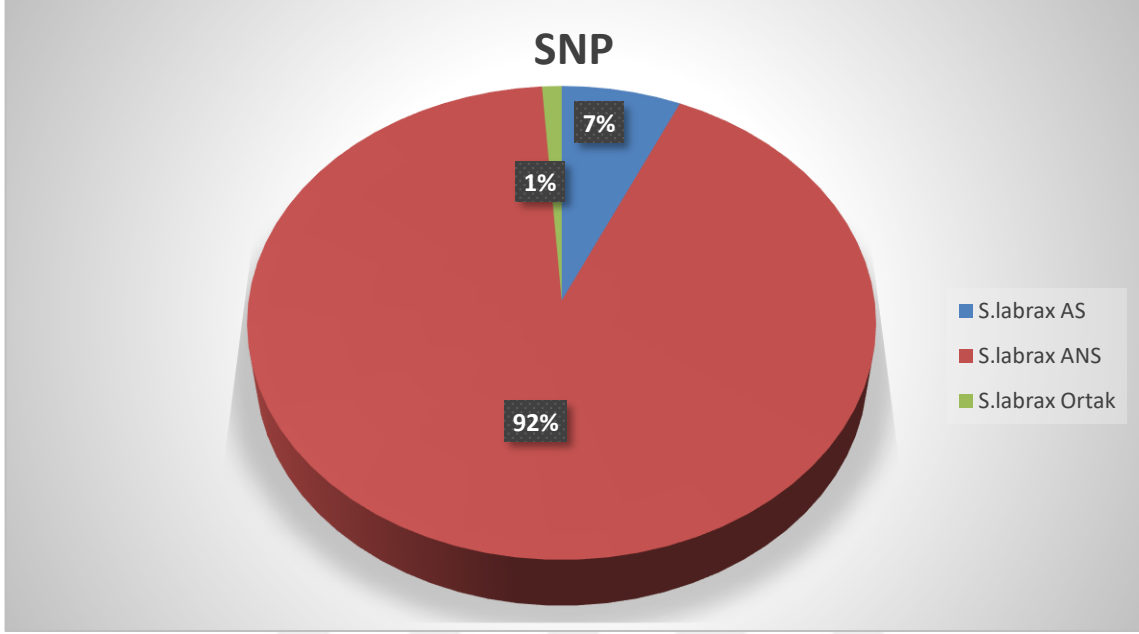


Şekil 7. Doğal (AS) ve Yetiştiricilik (ANS) türlerinin diğer salmon türleri içindeki mitokondrial COI geni baz alınarak oluşturulan maximum likelihood ve neighbor-joining bootstap consesus filogenetik ağacı.

4.2. SNP Profili ve Değişimleri

Yetiştiricilik ve doğal populasyonlara gerçekleştirilen Tam Genom Analizi (WGS) sonrasında toplamda yetiştiricilik örnekleri için % 43'lük bir GC içeriği ile toplam 3185834998 varsayılan (putative) okuma gerçekleştirilmiştir. Doğal populasyon örnekleri için bu % 44'lük bir GC içeriği ve 1485978532 olarak gerçekleşmiştir. Örnekler GCA_901001165.1 accession numaralı *Salmo trutta* genom sekansına hizalanmış ve gerçekleştirilen ve filtrelenen SNP analizi sonrasında yetiştiricilik populasyonlarında toplamda 706053 SNP doğal populasyonlarda ise 51663 SNP sonucuna ulaşılmıştır. Sonraki aşamada gerçekleştirilen karşılaştırmalar sonrasında ise Yetiştiricilik populasyonlarına

özgü 696939 ve doğal populasyonlara özgü olarak 43178 SNP ortaya konmuştur, iki populasyonda ortak bulunan SNP sayısı ise 8451 olmuştur (Şekil 8).



Şekil 8. Populasyonlar üzerindeki sayısal SNP dağılımı.

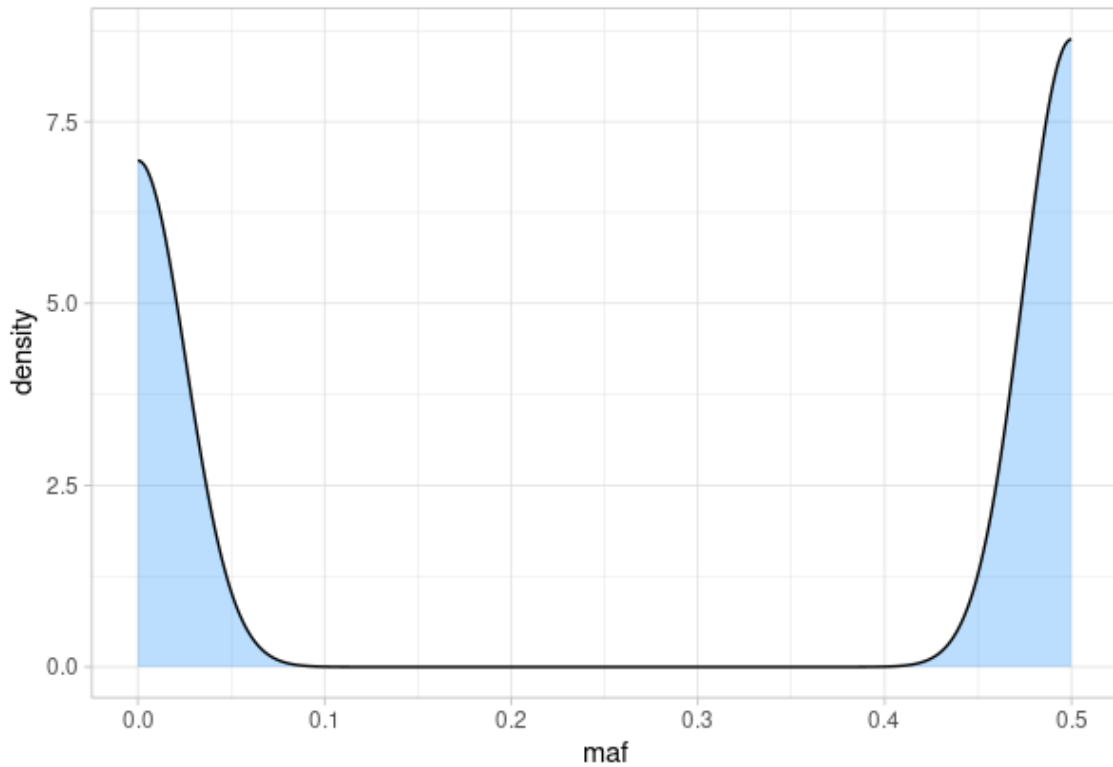
İkinci aşama olarak da üç adet aday gen seçilmiş ve referans genom baz alınarak *Salmo labrax* üzerindeki değişimler ortaya konmuştur (Şekil 8). Aday olarak seçilen IGFBP-1 (insulin-like growth factor binding protein 1a NCBI gen kimliği. 115158653) bir sekretuar endometriyum ve desidualize stromal endometriyal hücrelerde IGF'lerin ana bağlayıcısıdır ve IGFBP-1'in IGF biyoaktivitelerini modüle ettiği ve fetal büyümeyi etkilediği gösterilmiştir. İkinci aday gen *mstnb* (Myostatin b NCBI gen kimliği 115156151) olarak seçilmiştir, *mstnb* proteini, vücuttaki dokuların büyümesini ve gelişimini kontrol etmeye yardımcı olan bir grup protein olan dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF β) süper ailesinin bir parçasıdır. Myostatin neredeyse sadece hareket için kullanılan kaslarda (iskelet kasları) bulunur ve burada hem doğumdan önce hem de sonra aktiftir. Üçüncü aday gen *myd88* (MYD88 innate immune signal transduction adaptor NCBI gen kimliği 115195308) toll bağlanma aktivitesini ve interlökin-1 reseptör bağlanma aktivitesini etkinleştiren, JNK kaskadı; hücre yüzeyi reseptör sinyal yolu; ve düz kas hücresi proliferasyonunun pozitif düzenlenmesi dahil olmak üzere çeşitli süreçlerde yer alan ve protein içeren kompleksin bir parçasıdır. Bu üç aday gen üzerinde yapılan analizler sonucunda *igfbp1a* ve *mstnb* genleri üzerinde yetiştiricilik populasyonlarında değişimler gözlenirken doğal populasyonlarda

herhangi bir değişime rastlanmamıştır (Şekil 9). Üçüncü aday gen olan myd88 üzerinde ise her iki populasyon için de herhangi bir değişime rastlanmıştır.

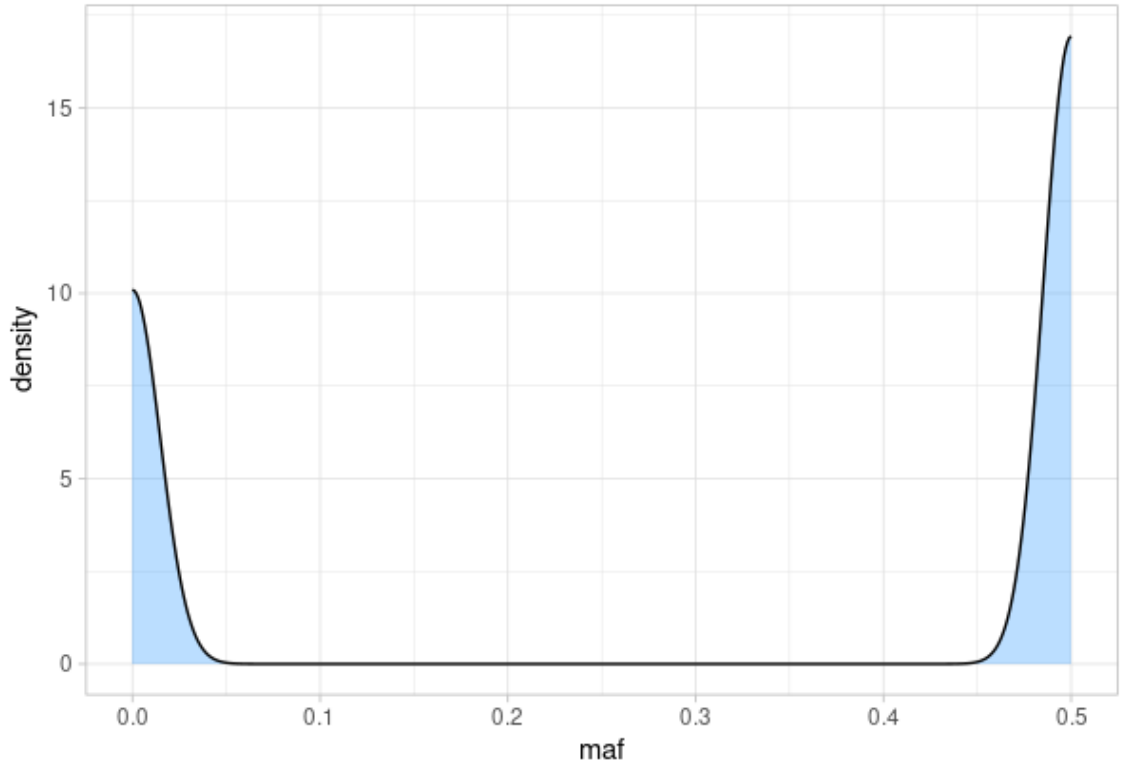


Şekil 9. Yetiştiricilik populasyonlarındaki igfbpla ve mstnb genleri üzerinde gözlenen nükleotid değişimleri.

Her iki populasyon için yapılan MAF (minor allele frequency) analizi sonucunda allel frekanslarının 0,1'den düşük ve 0,4'ün üzerinde olarak iki tepe noktası verdiği gözlemlenmiştir (Şekil 10-11). 0,5 MAF değeri, için populasyonun yaklaşık % 50'sinde bulunduğu ve doğal populasyonlarda bu oranın yetiştiricilik populasyonlarına oranla daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 9). Gözlemlenen her iki tepe noktası, lokusta iki farklı alelin varlığını ortaya koymuştur ve her biri yaklaşık % 50 sıklıkla ortaya çıkmıştır.



Şekil 10. Doğal populasyonların MAF sonuçları (minor allele frequency)



Şekil 10. Yetiştiricilik populasyonların MAF sonuçları (minor allele frequency)

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1 Sonuç

Çalışmada daha önce kısıtlı genomik çalışmalar yürütülmüş olan *Salmo labrax* türünün iki popülasyonu arasında nesiller boyunca oluşan değişimlerin ortaya konulması amacıyla Tam Genom Analizi ve çeşitli biyoenformatik yöntemler kullanılarak iki popülasyon arasında oluşan Tek Nükleotid Polimorfizmleri (SNP) ortaya konmuştur. Mevcut türün referans genomunun bulunmaması aynı aile içindeki farklı türlerin kullanılması zorunluluğunu ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle referans genom olarak seçilen *Salmo trutta* türü çalışmalar için kullanılmıştır.

Tam olarak bir araya getirilmiş ve açıklanmış bir referans genomun yokluğunda, model olmayan organizmalar için yüksek yoğunluklu bağlantı haritalarının oluşturulması zor olabilir. Tam Genom Analizi (WGS) gibi dizileme yoluyla genotipleme yaklaşımları, model olmayan organizmalar için yeni yüksek yoğunluklu genomik kaynakların (SNP bağlantı haritaları ve SNP dizileri gibi) oluşturulmasında kullanılmak üzere genetik belirteçlerin (genellikle SNP'ler) tanımlanmasını sağlamaktadır.

Yapılan çalışma sonucunda yetiştiriciliği yapılan popülasyonlarda 706053 ve doğal popülasyonlarda ise 51663 polimorfik bölgenin varlığı ortaya konmuştur. Daha önce yaptıkları araştırmada Saha ve arkadaşlarının 2020 yılında kahverengi alabalık türünün (*Salmo trutta*) iki popülasyonu üzerine yaptıkları çalışma sonucunda, toplamda ortak 60887 SNP verisine ulaşmışlardır (Saha, A., 2020). Mevcut çalışmadaki *Salmo labrax* popülasyonları arasında ise toplamda ortak 43178 SNP ortaya konmuştur. Aynı şekilde Yanez vd. (2016) Avrupa kuzey amerika ve Şili'deki salmon türleri üzerinde yürüttükleri *de novo* SNP çalışmasında balık başına yaklaşık 2-4 milyon SNP tanımlanmıştır. Toplamda 20 balıktan oluşan panelde 9 736 473 yedekli olmayan SNP tanımlanmış ve bu SNP'lerin 2 milyonu (% 20) tüm balıklarda genotiplenmişlerdir. Yürüttükleri çalışmada Kuzey Amerika kökenli iki popülasyon olan Çiftlik E ve Yabani A arasında MAF'leri (minor allele frequency) 0,05 ve 0,01'den yüksek olan SNP'lerin sayısında büyük bir fark olduğunu göstermişlerdir. İskoç kökenli iki popülasyon (Çiftlik F ve Yabani B) karşılaştırıldığında da benzer, ancak daha küçük bir fark görülmüşlerdir. Mevcut çalışmanın verileri de bu argümanı destekler nitelikte olmuştur. Gözlemlenen ikili dağılımlar bazen, iki farklı

popülasyonun melezlenmesine işaret edebilir ve bu nedenle alel karışımına yol açabilir. Fakat genel olarak MAF 0.5 ise, bu, her iki alelin de popülasyonda oldukça yaygın olduğunu ve bu belirli lokusta önemli bir genetik çeşitliliğin olduğunu göstergesi olabilmektedir. Yüksek genetik çeşitlilik genellikle sağlıklı ve adapte olabilen bir popülasyon için olumlu bir işarettir. Popülasyon farklılığı bakımından değerlendirildiğinde, MAF farklılıkları genetik sürüklenme, göç veya doğal seçimden kaynaklanabilmektedir. 0.5 MAF'de, popülasyon özgü farklılıkları dikkate alınmalıdır. Doğal popülasyonların MAF değerleri ağırlıklı olarak 0 ve 0.1 arasında dağılım göstermiştir, bunun yanında yetiştiricilik popülasyonlarında bu aralıktaki değer daha az olmaktadır. Her iki popülasyonda mitokondrial cytochrome oxidase 1 (COI) geni üzerinde iki popülasyon arasındaki değişimi ve tür teyidi açısından yapılan analiz sonucunda pairwise analizi sonucunda iki popülasyon arasında genetik olarak uzaklık kaydedilmediği bulunmamıştır. Dudu vd. (2010) *Salmo labrax* türünde yaptığı mitokondrial 16s geni çalışmasında bu gen üzerinde bu tür için *Salmo labrax* 16S rRNA durumunda, *Salmo trutta fario* ile karşılaştırdıklarında daha az sayıda nükleotid varyasyonuna rastlamışlardır. Mevcut çalışmada *Salmo labrax* türlerindeki COI geni baz alındığında ve sadece aynı türün iki farklı popülasyonu karşılaştırıldığında aralarında yine az sayıda nükleotid farkına rastlanmıştır. Bu karşılaştırma farklı gen bölgelerinde yapılmış olsada mevcut çalışmadaki popülasyonların 16s mitokondrial gen bölgeleri karşılaştırılarak daha kapsamlı bir sonuç ortaya konabilir. Sudhagar vd. *Salmo trutta* türündeki proliferatif böbrek hastalığında genom çapında alternatif birleştirme profili üzerine yaptığı çalışmada *myd88* geninin *Salmonella* enfeksiyon yolağında işlevi olduğunu ortaya koymuşlardır. Mevcut çalışmada bu gen üzerinde nükleotid değişimlerine rastlanmamıştır. Olsvik vd. (2010) yaptıkları Fungisit azoksistrobinin Atlantik somonu (*Salmo salar* L.) smolt'u üzerindeki etkileri isimli çalışmada Azoksistrobin gibi strobilürin pestisitler, mitokondriyal solunum elektron taşınımını bozarak mantarları olumsuz etkilediklerini ve çalışmalarında, azoksistrobinin balıklar üzerinde de aynı etkilere sahip olabileceğini, tedaviye yanıt veren transkriptlerin önerdiği gibi gösterdiklerini ortaya koymuşlardır. Aynı zamanda Katalaz, IGFBP1 ve MAPK1 transkriptleri, aktif bileşeni olarak azoksistrobin içeren bir fungusit olan Amistar ile muamele edilen Atlantik somon smoltunun karaciğerinde önemli ölçüde yukarı regüle edildiği ve kas dokusunda IGFBP1 geni üzerinde önemli ölçüde değişim gösterdiğini ifade etmişlerdir. *Salmo labrax* üzerinde yürüttüğümüz çalışmada aynı gen üzerinde nükleotid değişimine rastlanmıştır fakat henüz işlevi ortaya konmamıştır. Churova vd. (2017) Kahverengi alabalık *Salmo trutta*'da kasa

özgü gen ekspresyonunun yaşa ve evreye bağlı değişimlerini inceledikleri çalışmada çeşitli myostatin paralog genleri üzerinde gen ekspresyon seviyelerini çalışmışlardır. Bu çalışma, doğadaki kahverengi alabalık *Salmo trutta*'nin yavru ve smoltlarında miyogenez düzenlemesinde yer alan kas spesifik genlerin ekspresyonunun yaş ve evre ile ilgili özelliklerini göstermişlerdir. Çalışma, yavru ve smolt yaş gruplarında eş zamanlı kas spesifik gen ekspresyonunda belirli kalıplar olduğunu ortaya koymuştur. MyoD ve MSTN paraloglarının ifadesi yaş ve evreye bağlı olarak farklı şekilde değiştiğinden, aynı genin paraloglarının işlevsel bir farklılığa sahip olduğu ve gelişim sırasında miyogenez süreçlerini tamamlayıcı olarak kontrol ettiği öne sürmüştür. Mevcut çalışmada Myostatin B geni üzerindedeki nükleotid değişimlerine rastlanmıştır. Bu sonuç doğrultusunda hali hazırda bir ilişkilendirme söz konusu olmasa da rastlanan değişimler anlamlandırılabilir oldukları görülmektedir.

5.2. Öneriler

Karadeniz alabalığı türü genomik ve genetik çalışmalar açısından oldukça bakir durumdadır. Yapılacak her çalışma bu türün bilimsel ve üretim çalışmalarına katkı sağlayacak nitelikte olacaktır. Özellikle tam genom çalışmaları bu türün bilinmeyen özelliklerinin ortaya konup geliştirilmesi açısından oldukça önem arz etmektedir. Mevcut çalışma her iki popülasyon içinde (Doğal ve Yetiştiricilik) SNP varlığını ve sayılarını ortaya koymuş haplotip sayısı ve belirli genlerde meydana gelen mutasyonları göstermiştir. Bir sonraki aşamada türün kendi referans genomunun oluşturulabilmesi açısından genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) yürütmek oldukça faydalı olacaktır. Belirlenen genlerdeki değişimlerin her hangi bir etkisinin olup olmadığının araştırılması ve bu tür değişimlerin başka genlerde de rastlanıp rastlanmadığının ortaya konması önem taşımaktadır. Gelecek dönemde yapılacak çalışmalarda linkage disequilibrium analizleri (LD) ve quantitative trait loci (QTL) çalışmalarının yürütülmesi bu nedenle önem arz etmektedir. Ticai açıdan yüksek potansiyele sahip olan bu türün bilimsel yönden tür statüsünün tam olarak kesinleştirilebilmesi açısından da daha geniş kapsamlı çalışmalara yönelme gerekliliği de ortaya çıkmaktadır. Bölgedeki diğer alabalık türleri ve Kahverengi alabalıkla (*Salmo Trutta*) oldukça yakın akrabalık gösteren bu balığın tür statüsünün kesinleşmesi için yapılacak her genetik çalışma katkı getirecektir.

KAYNAKÇA

- Askari, G. H., Shabani, A., and Kolangi Miandare, H. (2013). Application of molecular markers in fisheries and aquaculture. *Scientific Journal of Animal Science*, 2(4), 82-88.
- Avise, J. C., Helfman, G. S., Saunders, N. C., and Hales, L. S. (1986). Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: population genetic consequences of an unusual life history pattern. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(12), 4350-4354.
- Avise, J. C., Walker, D., and Johns, G. C. (1998). Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265(1407), 1707-1712.
- Baker, A. J., and Marshall, H. D. (1997). Molecular evolution of the mitochondrial genome. *Avian Molecular Evolution and Systematics*, Academic Press, San Diego, 51-82.
- Birky Jr, C. W., Fuerst, P., and Maruyama, T. (1989). Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics*, 121(3), 613-627.
- Brown, J. R., Beckenbach, A. T., and Smith, M. J. (1993). Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Molecular Biology and Evolution*, 10(2), 326-341.
- Brown, W.M. (1985) The mitochondrial genome of animals. In: MacIntyre, R.J. Ed., *Molecular Evolutionary Genetics*, Plenum, New York, 95-130.
- Chauhan, T., and Rajiv, K. (2010). Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 1(04), 281-291.
- Chow, S. (1993). PCR-RFLP analysis on thirteen western Atlantic snappers (subfamily Lutjaninae): a simple method for species and stock identification. *Fish Bull*, 91, 619-627.
- Chow, S., and Kishino, H. (1995). Phylogenetic relationships between tuna species of the genus *Thunnus* (Scombridae: Teleostei): inconsistent implications from morphology, nuclear and mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 41, 741-748.
- Chow, S., Okamoto, H., Uozumi, Y., Takeuchi, Y., and Takeyama, H. (1997). Genetic

- stock structure of the swordfish (*Xiphias gladius*) inferred by PCR-RFLP analysis of the mitochondrial DNA control region. *Marine Biology*, 127, 359-367.
- Cock, P. J., Fields, C. J., Goto, N., Heuer, M. L., and Rice, P. M. (2010). The Sanger FASTQ file format for sequences with quality scores, and the Solexa/Illumina FASTQ variants. *Nucleic acids research*, 38(6), 1767-1771.
- Cohen, J. C., Kiss, R. S., Pertsemlidis, A., Marcel, Y. L., McPherson, R., and Hobbs, H. H. (2004). Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science*, 305(5685), 869-872.
- Çakmak, E., Kurtoğlu, İ. Z., Çavdar, Y., Firidin, Ş., Aksungur, N., Başçınar, N., ... ve Zengin, B. (2008). Karadeniz Alabalığının Yetiştiriciliği ve Balıklandırma Amacıyla Kullanımı. Proje Sonuç Raporu (TAGEM/HAYSÜD/2001/07/01/20) Trabzon.
- Daly, M. J., Rioux, J. D., Schaffner, S. F., Hudson, T. J., and Lander, E. S. (2001). High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nature genetics*, 29(2), 229-232.
- Dudu, A., Popa, O., Georgescu, S. E., Dinischiotu, A., and Costache, M. (2010). Molecular analysis of Romanian salmonid species based on 16S rRNA and 12S rRNA sequences. *Archiva Zootechnica*, 13(3), 30.
- Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., ... and Turner, S. (2009). Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science*, 323(5910), 133-138.
- Endrullat, C., Glökler, J., Franke, P., and Frohme, M. (2016). Standardization and quality management in next-generation sequencing. *Applied and translational genomics*, 10, 2-9.
- Erlich, Y., Chang, K., Gordon, A., Ronen, R., Navon, O., Rooks, M., and Hannon, G. J. (2009). DNA Sudoku—harnessing high-throughput sequencing for multiplexed specimen analysis. *Genome research*, 19(7), 1243-1253.
- Estivill, X., and Armengol, L. (2007). Copy number variants and common disorders: filling the gaps and exploring complexity in genome-wide association studies. *PLoS genetics*, 3(10), e190.
- Ewing, B., and Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome research*, 8(3), 186-194.
- Falush, D., Stephens, M., and Pritchard, J. K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164(4), 1567–1587.

- FAO. 2020. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action.* Rome.
- Flicek, P., and Birney, E. (2009). Sense from sequence reads: methods for alignment and assembly. *Nature methods*, 6(Suppl 11), S6-S12.
- Froese, R. and D. Pauly. Editors. 2023. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, (02/2023)
- Gargis, A. S., Kalman, L., and Lubin, I. M. (2016). Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical microbiology and public health laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(12), 2857-2865.
- Geldiy, R., ve Balık, S. (1996). Türkiye Tatlısu Balıkları.(II. Baskı), Ege Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi.
- Genome.gov sequencingcosts 1 Kasım 2021
- Goddard, M. A., Dougill, A. J., and Benton, T. G. (2010). Scaling up from gardens: biodiversity conservation in urban environments. *Trends in ecology and evolution*, 25(2), 90-98.
- Gold, J. R., Richardson, L. R., Furman, C., and King, T. L. (1993). Mitochondrial DNA differentiation and population structure in red drum (*Sciaenops ocellatus*) from the Gulf of Mexico and Atlantic Ocean. *Marine biology*, 116, 175-185.
- Gold, J. R., Sun, F., and Richardson, L. R. (1997). Population structure of red snapper from the Gulf of Mexico as inferred from analysis of mitochondrial DNA. *Transactions of the American Fisheries Society*, 126(3), 386-396.
- Graves, J., McDowell, J., and Jones, M. L. (1992). A Genetic-Analysis Of Weakfish *Cynoscion-Regalis* Stock Structure Along The Mid-Atlantic Coast. *Fishery bulletin*, 90(3), 469.
- Graves, J., McDowell, J., and Jones, M. L. (1992). A Genetic-Analysis Of Weakfish *Cynoscion-Regalis* Stock Structure Along The Mid-Atlantic Coast. *Fishery bulletin*, 90(3), 469.
- Greenberg, R., Cordero, P. J., Droege, S., and Fleischer, R. C. (1998). Morphological adaptation with no mitochondrial DNA differentiation in the coastal plain swamp sparrow. *The Auk*, 115(3), 706-712.
- Haley, C. S., and Visscher, P. M. (1998). Strategies to utilize marker-quantitative trait loci associations. *Journal of Dairy Science*, 81, 85-97.
- Hardwick, S. A., Deveson, I. W., and Mercer, T. R. (2017). Reference standards for next-

- generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 18(8), 473-484.
- Harismendy, O., Ng, P. C., Strausberg, R. L., Wang, X., Stockwell, T. B., Beeson, K. Y., ... and Frazer, K. A. (2009). Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. *Genome biology*, 10(3), 1-13.
- Haymer, D. S. (1994). Random amplified polymorphic DNAs and microsatellites: what are they, and can they tell us anything we don't already know?. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6), 717-722.
- Hecker, K. H., Taylor, P. D., and Gjerde, D. T. (1999). Mutation detection by denaturing DNA chromatography using fluorescently labeled polymerase chain reaction products. *Analytical Biochemistry*, 272(2), 156-164.
- Heist, E. J., and Gold, J. R. (1999). Microsatellite DNA variation in sandbar sharks (*Carcharhinus plumbeus*) from the Gulf of Mexico and mid-Atlantic Bight. *Copeia*, 182-186.
- Hoggart, C. J., Parra, E. J., Shriver, M. D., Bonilla, C., Kittles, R. A., Clayton, D. G., and McKeigue, P. M. (2003). Control of confounding of genetic associations in stratified populations. *The American Journal of Human Genetics*, 72(6), 1492-1504.
- Illumina, Inc. is an American biotechnology company, headquartered in San Diego, California 2023
- JGK, W. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 18, 7213-7218.
- Kalayci, G., Ozturk, R. C., Capkin, E., and Altinok, I. (2018). Genetic and molecular evidence that brown trout *Salmo trutta* belonging to the Danubian lineage are a single biological species. *Journal of Fish Biology*, 93(5), 792-804.
- Kotrova, M., Trka, J., Kneba, M., and Brüggemann, M. (2017). Is next-generation sequencing the way to go for residual disease monitoring in acute lymphoblastic leukemia?. *Molecular diagnosis & therapy*, 21(5), 481-492.
- Le Tourneau, C., and Kamal, M. (Eds.). (2015). *Pan-cancer integrative molecular portrait towards a new paradigm in precision medicine* (No. 12306). Springer International Publishing.
- Litt, M., and Luty, J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics*, 44(3), 397.
- Liu, N., Chen, L., Wang, S., Oh, C., and Zhao, H. (2005, December). Comparison of

- single-nucleotide polymorphisms and microsatellites in inference of population structure. In *Bmc Genetics* (Vol. 6, No. 1, pp. 1-5). BioMed Central.
- Liu, Z. J., and Cordes, J. F. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238(1-4), 1-37.
- Liu, Z.J., Li, P., Kocabas, A., Ju, Z., Karsi, A., Cao, D. and Patterson, A. (2001) Microsatellite-containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 289(2), 317-324.
- Mamuris, Z., Sfougaris, A. I., Stamatis, C., and Suchentrunk, F. (2002). Assessment of genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations based on variation in random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Biochemical Genetics*, 40, 323-338.
- Mardis, E. R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 9, 387-402.
- Markert, C.L. and Moller, F. (1959) Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenetic and species-specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)*, 45(5), 753-763.
- Maxam, A. M., and Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(2), 560-564.
- Menezes, M.R., Naik, S. and Martins, M. (1993) Genetic characterization in four sciaenid species from the Arabian Sea. *Journal of Fish Biology*, 43(1), 61-67.
- Menotti-Raymond, M. and O'Brien, S.J. (1993) Dating the genetic bottleneck of the African cheetah. *Proceedings of the National Academy of Science (USA.)*, 90(8), 3172-3176.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*, 11(1), 31-46.
- Meuwissen T, and Goddard M (1996). The use of marker haplotypes in animal breeding schemes. *Genet Sel Evol* 28:161-176.
- Meyer, A. (1993) Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: Mochachka, P.W. and Mommsen, T.P. Eds., *Biochemistry and molecular biology of fishes*, Elsevier Press Amsterdam, New York, 1-38.
- Mila, B., Girman, D. J., Kimura, M., and Smith, T. B. (2000). Genetic evidence for the effect of a postglacial population expansion on the phylogeography of a North

- American songbird. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1447), 1033-1040.
- Morin, P. A., Luikart, G., Wayne, R. K., and SNP Workshop Group. (2004). SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in ecology & evolution*, 19(4), 208-216.
- Murphy, R.W., Sites, J.J.W., Buth, D.G. and Haufler, C.H. (1996) Proteins I: Isozyme electrophoresis. In: Hillis, D.M., Moritz, C. and Mable, B.K. Eds., *Molecular Systematics*, Sinauer Associates, Sunderland, 51-132.
- Olsvik, P. A., Kroglund, F., Finstad, B., and Kristensen, T. (2010). Effects of the fungicide azoxystrobin on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolt. *Ecotoxicology and environmental safety*, 73(8), 1852-1861.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I., and Strobeck, C. (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular ecology*, 4(3), 347-354.
- Pareek, C. S., Smoczynski, R., and Tretyn, A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of applied genetics*, 52, 413-435
- Patterson, N., Hattangadi, N., Lane, B., Lohmueller, K. E., Hafler, D. A., Oksenberg, J. R., ... and Reich, D. (2004). Methods for high-density admixture mapping of disease genes. *The American Journal of Human Genetics*, 74(5), 979-1000.
- Pavlov, D. S., Kostin, V. V., and Ponomareva, V. Y. (2010). Behavioral differentiation of underyearlings of the Black Sea salmon *Salmo trutta labrax*: rheoreaction in the year preceding smoltification. *Journal of Ichthyology*, 50, 270-280.
- Pearson, W. R., and Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(8), 2444-2448.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Regan, T., Bean, T. P., Ellis, T., Davie, A., Carboni, S., Migaud, H., and Houston, R. D. (2021). Genetic improvement technologies to support the sustainable growth of UK aquaculture. *Reviews in aquaculture*, 13(4), 1958-1985.
- Riberon, A., Sotiriou, E., Miaud, C., Andreone, F., and Taberlet, P. (2002). Lack of genetic diversity in *Salamandra lanzai* revealed by cytochrome b gene sequences. *Copeia*, 2002(1), 229-232.
- Robison, K. (2010). Second-generation sequencing. *Briefings in bioinformatics*, 11(5), 455-456.
- Rosenberg, N. A., Burke, T., Elo, K., Feldman, M. W., Freidlin, P. J., Groenen, M. A., ...

- and Weigend, S. (2001). Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. *Genetics*, 159(2), 699-713.
- Rosenberg, N. A., Li, L. M., Ward, R., and Pritchard, J. K. (2003). Informativeness of genetic markers for inference of ancestry. *The American Journal of Human Genetics*, 73(6), 1402-1422.
- Saha, A., Andersson, A., Kurland, S., Keehnen, N. L., Kutschera, V. E., Hössjer, O., ... and Laikre, L. (2022). Whole-genome resequencing confirms reproductive isolation between sympatric demes of brown trout (*Salmo trutta*) detected with allozymes. *Molecular Ecology*, 31(2), 498-511.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the national academy of sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Segherloo, I. H., Freyhof, J., Berrebi, P., Ferchaud, A. L., Geiger, M., Laroche, J., ... and Bernatchez, L. (2021). A genomic perspective on an old question: *Salmo* trouts or *Salmo trutta* (Teleostei: Salmonidae)? *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 162, 107204.
- Serb, J.M., Phillips, C.A. and Iverson, J.B. (2001) Molecular phylogeny and biogeography of *Kinosternon flavescens* based on complete mitochondrial control region sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18(1), 149-162.
- Shanker, K., Ramadevi, J., Choudhary, B.C., Singh, L. and Aggarawal, R.K. (2004) Phylogeny of olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) on the east coast of India: implications for conservation theory. *Molecular Ecology*, 13(7), 1899-1909.
- Shendure J, Ji H (2008) Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 26: 135–1145.
- Slastenenko, E. P. (1956). *Karadeniz havzası balıkları*. Et ve Balık Umum Müdürlüğü.
- Slatkin, M. (1994). Avise, JC (1993); *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall. Price£ 75.00. ISBN: 0-412-03771-8 (hb). ISBN: 0-412-03981 (pb). *Journal of Evolutionary Biology*, 7(6), 766-767.
- Sonesson A, Meuwissen T (2009). Testing strategies for genomic selection in aquaculture breeding programs. *Genet Sel Evol* 41: 37.
- Starck, M.G. (1998) Isozymes in Molecular tools for screening biodiversity. In: Angela, K., Peter, G.I. and David, S.I. Eds., Chapman and Hall, London, 75-80.
- Sudhagar, A., El-Matbouli, M., and Kumar, G. (2022). Genome-wide alternative splicing

- profile in the posterior kidney of brown trout (*Salmo trutta*) during proliferative kidney disease. *BMC genomics*, 23(1), 446.
- SUMAE, 2010. Karadeniz Alabalığı (*Salmo trutta labrax*) Yetiştiriciliği El Kitabı, E. Çakmak, M. Aksungur (Ed.), Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yayın No: 2010–2 Trabzon, 58 s.
- Suneetha, B.K. (2000) Interspecific and inter specific genetic variation in selected mesopelagic fishes with emphasis on microgeographic variation and species characterization. Dr. Scient. Dissertation, Department of Fisheries and Marine Biology, University of Bergen, Bergen, Norway.
- Svetovidov, A.N. 1984. Gadidae. In Fishes of the Northtemperatures, with a quantitatives coring method Eastern Atlantic and the Mediterranean, Vol. II (P. J. forin traspecific comparisons. *Journal of Fish*
- Tabak, I., Aksungur, M., Zengin, M., Yilmaz, C., Aksungur, N., Alkan, A., Zengin, B., and Misir, M. (2001). Karadeniz Alabalığının Biyo-Ekolojik Özelliklerinin ve Kültür İmkanlarının Araştırılması (in Turkish). Trabzon, Turkey
- Tautz, D. (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17(16), 6463-6471.
- Taylor, A. C., Sherwin, W. B., and Wayne, R. K. (1994). Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked species: the northern hairy-nosed wombat *Lasiorninus krefftii*. *Molecular Ecology*, 3(4), 277-290.
- Thermo Fisher Scientific Inc. 2022 Annual Report (Form 10-K)". U.S. Securities and Exchange Commission. 23 February 2023.
- Valouev, A., Ichikawa, J., Tonthat, T., Stuart, J., Ranade, S., Peckham, H., Zeng, K., Malek, J. A., Costa, G., Mckernan, K., Sidow, A., Fire, A. and Johnson, S. M. 2008. A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. *Genome Research*, 18, 1051-1063.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., ... and Kalush, F. (2001). The sequence of the human genome. *science*, 291(5507), 1304-1351.
- Vezi, F. (2012). Next generation sequencing revolution challenges: Search, assemble, and validate genomes.
- Wasko, A. P., Martins, C., Oliveira, C., and Foresti, F. (2003). Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales.

Hereditas, 138(3), 161-165.

- Watson, J. D., and Crick, F. H. C. (2007). The classic: Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 462, 3-5.
- Welsh, J., and McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research*, 18(24), 7213-7218.
- Wilson, A. C., Cann, R. L., Carr, S. M., George, M., Gyllensten, U. B., Helm-Bychowski, K. M., ... and Stoneking, M. (1985). Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 26(4), 375-400.
- Wirgin, I.I. and Waldman, J.R. (1994) What DNA can do for you? *Fisheries*, 19, 16-27.
- Wright, J.M. (1993) DNA fingerprinting in fishes. In: W. Hochachka, P. and Mommsen, T. Eds., *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Elsevier, Amsterdam, 58-91.
- Yáñez, J. M., Naswa, S., López, M. E., Bassini, L., Correa, K., Gilbey, J., ... and Maass, A. (2016). Genomewide single nucleotide polymorphism discovery in Atlantic salmon (*Salmo salar*): validation in wild and farmed American and European populations. *Molecular ecology resources*, 16(4), 1002-1011.
- Zink, R. M., Barrowclough, G. F., Atwood, J. L., and Blackwell-Rago, R. C. (2000). Genetics, taxonomy, and conservation of the threatened California gnatcatcher. *Conservation Biology*, 14(5), 1394-1405.