

QTL TESPİTİ İÇİN HAYVANLARDA KULLANILAN POPULASYONLAR VE İSTATİSTİKSEL METODLAR

Hüseyin DAŞ

ÖZET

Kantitatif karakterler kesikli değildir, süreklilik gösterir ve çok sayıda genin toplamalı etkileri tarafından kontrol edilen karakterlerdir. Kantitatif karakterleri kodlayan genlerin, kromozom üzerinde bulunduğu bölgelere ise kantitatif karakter lokusları (QTL) adı verilmektedir. Kantitatif karakterler hayvanlarda genellikle verim ile ilgili karakterler olduğundan dolayı, seleksiyonda kullanılmak üzere, araştırmacılar için QTL keşfi ilgi odağı olmuştur. Dünya’da yaygın bir şekilde araştırılan QTL’ler ne yazık ki Türkiye’de çok fazla uygulama ve çalışma alanı bulamadı. Bunun nedeni büyükbaş ve küçükbaş hayvanlarda sistemli kayıtların ülke çapında tutulmaması ve kanatlılar için ise fazla zaman, emek ve maliyet gerektiren bir konu olmasındandır. Bu derlemede QTL tespiti çalışmalarının nasıl planlandığı, uygulandığı, dikkat edilmesi gereken konular, en çok karşılaşılan sorunlar, kullanılan popülasyon yapıları, istatistiksel veri analiz yöntemleri ve kullanılan bilgisayar yazılımları tarihi süreci içinde anlatılmaya çalışılmıştır. Konu çizilen grafikler ile anlaşılır hale getirilmeye çalışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Kantitatif Karakter Lokusları, İstatistiksel Veri Analizi, Popülasyon Karakteristikleri

POPULATIONS AND STATISTICAL METHODS USED FOR QTL DETERMINATION IN ANIMALS

ABSTRACT

Quantitative characters aren't intermittent, display persistent and controlled by additive effects of polygenic genes. The locations of genes which code the quantitative characters on the chromosomes are named quantitative character loci (QTL). Because quantitative characters are associated yield characters, to use in selection, QTL mining have been center of interest for researchers. The QTL which are researched widely in earth, unfortunately, have not found sufficiently research field in the Turkey. The reason for that are lack of recordkeeping systematically in country-wide for cattle and sheep and requiring too time, labor and cost for chickens. In this review, it has been tried to explain in the course of history how QTL mining works are planned, performed, the subject of be pointed, the trouble most faced, used population structures, statistical data analysis methods and used computer software. Subject has been tried to be understandable by drawing graphics.

Keywords: Quantitative Trait Loci, Statistical Data Analysis, Population Characteristics

¹Yrd. Doç. Dr. Gümüşhane Üniversitesi GMYO, Gümüşhane
İletişim/Corresponding Author: Hüseyin DAŞ
Tel: 0456-2331000 **posta:** huseyindas@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 04.03.2015
Kabul Tarihi / Accepted : 25.03.2015

GİRİŞ

I. KANTİTATİF KARAKTER LOKUSLARI NİÇİN TESPİT EDİLİR?

İnsanoğlu, genetik biliminin ve temel moleküler mekanizmaların keşf edilmesi ile birlikte, 10.000 yıldır insan eliyle sürdürülen fenotipe dayalı seleksiyondan belirteç destekli seleksiyona yönelmeye başlamıştır (1). Bu tip seleksiyonun başlıca yararı küçük bir popülasyondan alınan bilginin büyük popülasyonlara uygulanabilmesidir. Büyük popülasyonlarda fenotip ölçümü gibi zaman ve sermaye gerektiren işlemlere gerek kalmamasıdır.

QTL haritalamasında amaç, istediğimiz bir verim özelliğini belirleyen genleri bulmak olabildiği gibi bazen bir hastalığa veya bozukluğa yol açan bir veya birkaç geni tespit etmekte olabilir (2). Kantitatif karakterler klasik Mendel dağılımına uymazlar. Bu yüzden Mendel kalıtımıyla aktarılan resesif hastalıkların tespitinde kullanılan popülasyon dizaynlarından daha farklı dizaynlara ve kullanılan data analiz metodlarından daha farklı ve kompleks data analiz metodlarına ihtiyaç duyarlar (3). Mendel tipi kalıtılan resesif karakterlerin tespitinde birkaç birey yeterli olurken QTL analizinde genel olarak alt sınırın 200 birey olduğu bildirilmiştir (4). Mendel tipi genler özel bir yetiştirme, uzun emek ve zaman alan ölçümler gerektirmediği halde kantitatif karakterlerin tespiti daha fazla zaman, emek ve maliyet kaybına yol açar. Mendel karakterlerinde olduğu gibi var ve yok şeklinde belli olmadığı için bulunan QTL'nin doğruluğu ise kesin değildir (5). Bu kısıtlamalarına rağmen, hayvancılığın temelinde verim alınması olduğundan dolayı verimi ilgilendiren karakterler hep ilgi konusu olmuştur ve bugün için kantitatif karakterleri belirleyen majör genler hedef olsa da gelecekte tek tek bütün genlerin ve allellerinin hangi özelliği ne kadar belirlediğine dair detaylı haritalar çıkarılabilir. Bugüne kadar gelişen moleküler genetik, yetiştirme, seleksiyon ve istatistik teknikleri ile birlikte QTL tespitinde gittikçe daha güvenilir metodlar geliştirildi ve gelecekte de bu alanlarda olabilecek gelişmelerle gen ve belirteç tespiti daha da kolaylaşacaktır. QTL analizi sonucu aranılan karakteri belirlediği tespit edilen genler daha önceden ismi, işlevi ve dizisi bilinen bir gen olabilir. Bu genin işlevinin bilindiği halde neden bu karakteri etkilediği bilinemediği akla gelebilir. Bunun sebebi hücrelerde rol alan bazı proteinlerin hücre içindeki yakın etkisinin biliniyor olmasına rağmen bu gen ve proteinlerin organizma üzerinde değişik sistem ve verim özelliklerini nasıl etkilediği ise ayrıca araştırılması gerektiğidir. Örneğin PRDM16 geni hücre farklılaşmasını sağladığı biliniyor olmasına rağmen tavuklar da vücut ağırlığını da etkilediği daha sonra yapılan çalışmalarla aydınlanmıştır (6, 7). QTL tespitinden,

belirteç destekli seleksiyon uygulamaları için, sorumlu genin bulunması amacıyla direkt veya seleksiyon için yalnızca belirtecin tespitiyle dolaylı olarak yararlanılabilir (8). QTL belirlemede şu anda kullanılan metodlar bağlantı dengesizliğinin (linkage disequilibrium) kullanılması esasına dayanır (9). Bu metodlardaki temel mantık; kullanılan belirteçlere ait alleler ile fenotipik değerlerin karşılaştırılması ve hangi allellerin sonraki nesillere istenilen karakter ile kalıtıldığıının tespit edilmeye çalışılmasıdır.

A. Kantitatif Karakter Lokusu Tespinde İş Akışı

QTL tespit çalışmasına karar verildiğinde yapılacak çalışmaları özet halinde sunacak olursak, ilk iş hangi tür için hangi özelliği geliştirmek istediğimizin ortaya konulmasıdır. Bu özellik belirlendikten sonra uygun yetiştirme popülasyonunun oluşturulması gerekir. Bu popülasyonun kararı ise hayvan türüne, araştırma bütçesi ve personel iş gücü durumuna, zamana ve çalışacağımız özelliğe göre değişir. Fakat en bağlayıcı olan hayvan türüdür. Kullanılacak popülasyon yapısı da belirlendikten sonra yetiştirme işlemlerine başlanarak popülasyonlar elde edilir. Daha sonrasında bu popülasyonlar üzerinde araştırdığımız karakteri dikkatli ve hassas metotlarla ölçme işlemi başlar. Fenotipik ölçümler devam ederken bir taraftan da hayvanların birey bazında genotiplendirilmesi yapılır. Bu amaçla AFLP, RFLP, RAPD, SSR veya SNP gibi çeşitli belirteçler kullanılır (10). Hayvanlar yetiştirmeye alınıp istenilen karakterler ölçüldükten sonra elde edilen fenotipik ve genotipik verilerin analizi için ise istatistiksel genetik tekniklerinden yararlanılır. Bu tekniklerde veri olarak hayvanlara ait fenotipik değerler ve moleküler belirteç sonuçları kullanılır. Kullanacağımız analiz tekniği popülasyon yapısına, belirteçlere ve araştırmacıların istatistiksel bilgi düzeyine göre değişir. Tespit edilen QTL majör veya minör olarak sınıflandırılabilir (11). Bu sınıflandırma QTL bölgesinin toplam varyasyon üzerindeki etki derecesine göredir ve korelasyon katsayısı (r) ile belirlenir (12). QTL tespitinde başarıyı etkileyen önemli etkenler; karakteri belirlemek için doğru popülasyon yapısının seçilmesi, belirteç ve fenotip değerlerini alırken çok hassas davranılması, mümkün olduğunca fenotip üzerinde çevrenin etkisinin azaltılmasıdır. Ölçme işlemlerinin çok hassas devam etmesi gerekir, hata payı (Residual Error) değerini düşürmek için grup tekrarları oluşturularak ayrı ayrı QTL analizi yapılması daha iyidir. Fakat yapılan işin zorluğundan dolayı bu pek mümkün olmaz. Düşük kalıtım derecesine sahip bir özellik ile çalışılıyorsa tekrar gruplarını değişik çevre şartlarında denemeye almak kaçınılmazdır. Yüzde elli (% 50) kalıtım derecesine sahip karakterler bu iş için uygundur (13). Verilerin bilgisayara girilmesi esnasında dikkatli olunmalıdır, kayıp bir data araştırmacının farkına varmadan tüm

belirteç sırasını değiştirmesine sebep olabilir. Popülasyondaki bireylerin sayısı ve kullanılan belirteçlerin yoğunluğu yani birbirine yakınlığı ve kapsadığı alan ne kadar fazla olursa güvenilirlik o kadar artar. Fakat popülasyondaki birey sayısının fazla olması belirteç sayısının fazla olmasından daha önemlidir. QTL bölgesine 5 cm uzaklıkta tespit edilecek bir belirteç güvenle belirteç destekli seleksiyonda kullanılabilir (14). Epigenetik etkilerden dolayı QTL için yapılan seleksiyon her zaman tam anlamıyla başarıya ulaşmayabilir. Diğer bir etken de epistatis mekanizmasıdır. Yani, QTL bölgesinde olduğunu düşündüren belirteçlerin bazen bir genin değil birçok genin etkisiyle oluşan bir fenotipi belli etmesindedir. Yine bu durumda QTL için belirteç elde edilecek fakat aranan gen bulunamayacaktır (15).

B. Hangi Belirteçler Kullanılmalıdır?

Belirteçlerde, yüksek oranda polimorfik olması, tüm genom boyunca bilgi vermesi, kodominant olması aranan özelliklerdir. Daha önceden oluşturulmuş bilinen belirteç haritaları da uygundur. Bu haritalar tek belirteç çeşidi kullanılarak oluşturulabildiği gibi birden çok çeşidin kullanılmasıyla oluşturulan konsensüs haritalarda olabilir (16). Kullanılan belirteçler birinci, ikinci ve üçüncü nesil belirteçler olarak adlandırılmaktadır. İlk nesil belirteç sistemlerini (RFLP, RAPD vs.) geliştirilen ikinci nesil belirteç sistemleri (SSR) takip etti (17), bunlar daha güvenilir ve yüksek oranda bilgi verir. Yakın bir zamanda birkaç ticari firmanın piyasaya sürmesi ile yaygınlaşan üçüncü nesil belirteç sistemi olan EST'ler ve SNP çipleri ise şu an için çözünürlüğü en yüksek, en çok bilgi veren, en güvenilir ve kullanımında en basit belirteç sistemleridir (18). Şu anda QTL haritalamada kullanılan en çok kullanılan belirteç sistemi SNP çipleridir. SSR belirteçleri ise yine kullanımdadır. Diğer belirteçlerin QTL analizinde kullanılabilirliği kalmamıştır. Belirteç yoğunluğunu belirlerken kullanılan belirteç tipi dikkate alınmalıdır. Örneğin mikrosatellitler ile çalışırken kromozomun uzunluğu 100 cM olarak kabul edildiğinde 15-20 cm aralıklarla oluşturulan belirteç yoğunluğu idealdir (14). Bundan daha düşük yoğunluklar başarı şansını artırmaz. SNP gibi fazla miktarda allele sahip olmayan dolayısıyla bilgi verme yeteneği az olan belirteçlerin çok daha yoğun bir şekilde kullanılması gerekir. Bunun için geliştirilen SNP çipleri yardımıyla türlere göre tek seferde 60.000-500.000 belirteç noktası incelenebilmektedir (19). Bugün sığırlar için Illumina® Bovine SNP50 v2. çipi 54.609 SNP noktasını, yüksek çözünürlüklü Illumina Infinium® BovineHD BeadChip 777.000 noktayı, tavuklar için geliştirilen Illumina® 60K Chicken iSelect 352.303 noktayı, 600 K Affymetrix® Axiom® HD ise 580.954 noktayı tek seferde inceleyebilmektedir (20-23).

C. Gen Bileşikliği (Linkage)

Aynı kromozom üzerinde bulunan genler bileşiktir. Bu genlerin bileşikliği ancak her iki gen arasında bir yerde olacak bir KO ile bozulabilir. QTL tespitinde genlerin bu özelliğinden yararlanılır. Moleküler belirteç hedef QTL bölgesi ile bileşikse bu belirteçlere sahip bireylerde sahip olmayanlara göre fenotipik değer daha yüksek çıkacaktır (24). Belirteç ve gen arasında KO oluşan bireylerde ise, yüksek fenotipik değerle belirteçlerin alleli arasında ilişki görülecektir. Aynı kromozom üzerinde aktarılan belirteç ve genler KO bölgesinden itibaren homolog kromozomdakiler ile yer değiştirecektir. KO ile meydana gelen bu sapma normal dizilen belirteçlerden daha az oranda popülasyonda görüleceğinden dolayı normal kromozomlar, KO taşıyan kromozomlar ve hangi belirteçler arasında KO olduğu bilgisi tespit edilebilecektir. Belirteçlerin diziliş sırası bilinirse az olanların oranını saymaya gerek kalmaz. İki belirteç birbirine bileşik ise beraber kalıtılma ihtimalleri 1 olur. Eğer bağımsızlarsa beraber kalıtılma ihtimalleri 0.5 olur (25). Başka bir deyişle iki gen arasında birlikte kalıtılma oranı 0.5'e kadar olursa iki genin bağımsız olduğu ve rekombinasyon ile bu oranın yükseldiği, 0.5'ten büyük olursa aslında bağımsız olduğu ve yine rekombinasyon ile bu orana yaklaştığı kabul edilir. Fakat pratikte oran 0.5'e çok yaklaşılmadığı için karışmaz.

D. Rekombinasyon Ve Haritama Fonksiyonları

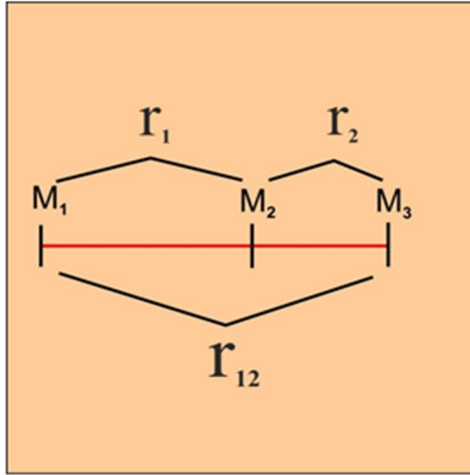
KO ile birlikte gen ve belirteçlerin sırasının değişmesi rekombinant kromozomların oluşması ile sonuçlanır. Rekombinasyon oranı rekombinant bireylerin, genotipi incelenen toplam bireylere oranıdır (Şekil 1). İki gen arasındaki rekombinasyon oranı ile bu iki gen arası uzaklık cm birimi ile tahmin edilebilir. Çünkü iki gen arasında ne kadar fazla mesafe bulunursa bu iki gen arasında KO ile oluşan rekombinasyon sayısı o kadar artacaktır (26). Bu yöntem gen haritalamanın temelidir. Fakat bu yöntem fiziksel haritalar ile aynı değildir (27). Çünkü rekombinasyonlar eklemeli etkiye sahip değildir ve bazı kromozom bölgelerinde ise rekombinasyon oranı daha fazladır. Fiziksel haritada ise bütün bölgelerde baz sayısının kullanıldığı tek ölçü vardır. Şekil 2'ye baktığımızda $r_1+r_2=r_{12}$ olması beklenirken, pratikte rekombinasyon etkileşiminden (interference) dolayı bu pek mümkün olmamaktadır. Bunun yerine şöyle bir model kullanılır: " $r_{12}=r_1+r_2-2r_1*r_2$ ". Bunun sebebi oluşan bir KO olayının, yakınında oluşacak bir KO ihtimalini düşürmesindedir. Daha sonra haritalama fonksiyonları ile rekombinasyon değerini (r_{12}) cm birimli uzaklık (u) değerine dönüştürülür. Bu haritalama fonksiyonları ise;

1) Tam etkileşim olduğu varsayılırsa (complete interference) $u=r$,

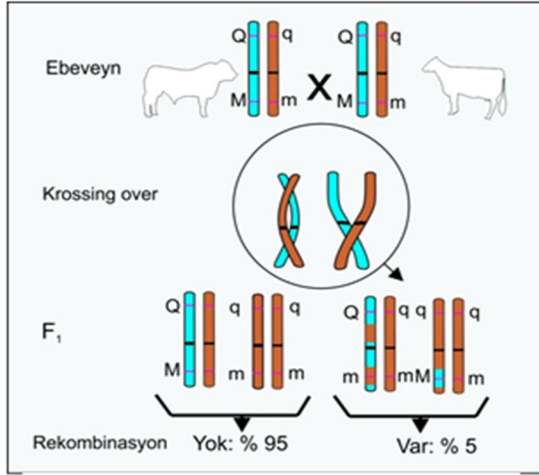
2) Haldane haritalama fonksiyonu: $u = -\frac{1}{2} \ln(1-2r)$ ve

3) Kosambi haritalama fonksiyonu $u = \frac{1}{4} \ln \frac{1+2r}{1-2r}$ şeklindedir (Şekil 3) (28).

Burada hesaplanan “u” değeri iki gen veya belirteç arasındaki uzaklıkları hesaplamada ve ileride anlatılacak olan aralık haritalaması metodlarında kullanılır.



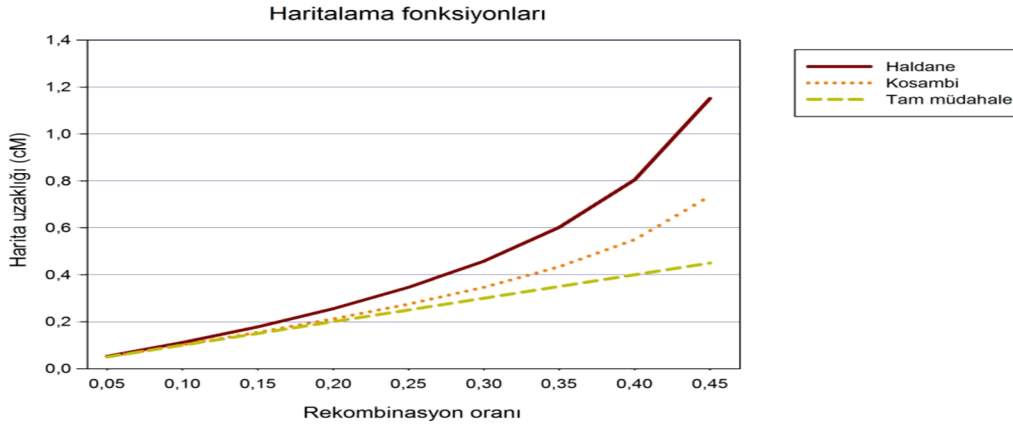
Şekil 1: Markır Dizilişlerini Ve Oluşan Aralıkları Gösterir



Şekil 2: QTL Bölgesinin Ortalama Üzerine Yaptığı Additif (E) Ve Dominans (H) Etkisini Gösterir.

E. Additif Ve Dominans Etki

Populasyonda ilgilenilen fenotipik değere bir QTL bölgesinin yaptığı katkı iki şekilde olabilir. Bireyler QTL bölgesini homozigot olarak taşırlar (QQ) ki bu bireylerin additif etki aldıkları için fenotipik değerleri en yüksektir. QTL bölgesini heterozigot olarak bulunduranlarda (Qq) ise heterozigot etkide denilen dominans etki gösterirler. Şekil 4’de “e” additif etkiyi, “h” dominans etkiyi gösterir. Q geni q geni üzerine baskınsa dominans etki görülebilir, aksi halde yalnızca additif etki görülür (29). İntermediyer kalıtımda QQ ve qq fenotiplerinin arasında bir yerde bulunması gereken fenotip bir miktar yükselmiştir. Şekil 4’de görüleceği üzere $QQ=\mu+e$, $Qq=\mu-e$ ve $qq=\mu+h$ değerlerini alır. Böylece t ve q sırasıyla Q ve q genlerinin frekansı olsun, Q geninin etkisi ise a_1 olsun; $a_1= t[e+h(t-p)]$ ve q geninin etkisine a_2 dersek $a_2=-p[e+h(t-p)]$ olacaktır. Q ve q genleri arasındaki fark bize QTL bölgesinin ortalama etkisini verecektir. Yani $a=e+h(t-p)$ olacaktır. Olası genotiplerin ortalaması ise $QQ=2ta$, $Qq=(t-p)a$, $qq=-2pa$ olarak bildirilmiştir (30).

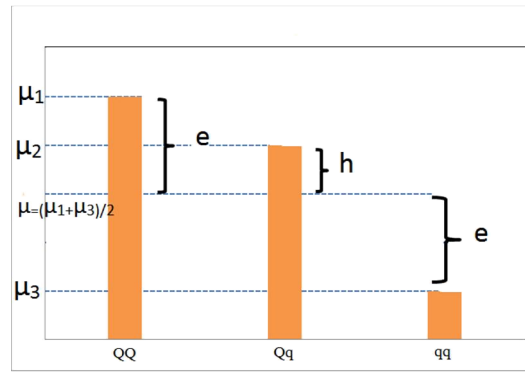


Şekil 3: Haldane, Kosambi Ve Tam Etkileşim (Müdahale) Metodlarına Göre Hesaplanan Uzaklık Değerlerinin Değişimini Gösterir Tablo. Tabloda Rekombinasyon Oranlarına Göre Uzaklık Artışının En Çok Olduğu Yöntem Haldane Yöntemidir.

II. HARİTALAMA POPÜLASYONLARI (MAPPING POPULATIONS)

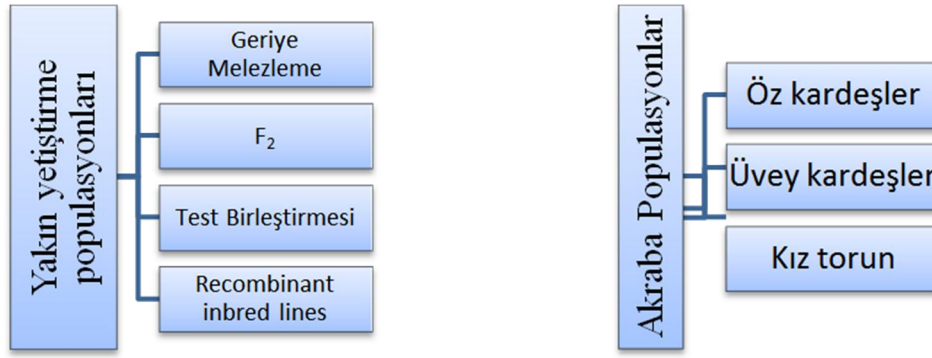
QTL tespitinde kullanılan popülasyonun büyüklüğünün fazla olması çalışmanın güvenilirliğini artırır, fakat maliyet hesaplarından dolayı böyle sürülerin oluşturulması özellikle sığır gibi bazı hayvan türleri için ve et kalitesi gibi bazı karakterler için zordur. Haritalama popülasyonları için bir diğer önemli konu, kullanılacak popülasyonların mümkün olduğunca homozigot olmasıdır. Bunun için yakın yetiştirilmiş (inbreed) popülasyonlarının geliştirilmesi en iyisidir. Çiftlik hayvanlarında yakın yetiştirilmiş hatlar bulmak zordur. Bunun yerine daha az varyasyon gösteren aile içi bireyler kullanılır. Çünkü bunlar daha fazla ortak allel paylaşırlar. Bunlar nispeten heterozigot popülasyonlardır. Yakın yetiştirilmiş popülasyonların heterozigot popülasyonlara avantajı bireylerin homozigot olup hangi alleli aktardığının bilinmesi, aynı bağlantı sırasını taşımaları ve fenotipik karakterlerin daha büyük bir varyasyon göstermeleri olarak sayılabilir. Kanatlılarda yakın yetiştirme, generasyon süresinin kısalığı, yetiştirme maliyet ve işgücünün azlığı gibi nedenlerden dolayı daha kolaydır (31). Hayvanlarda QTL tespitinde kullanılan popülasyon yapıları şekil 5’de gösterilmiştir. Bunlardan akraba popülasyon oluşturulması sığır ve koyun gibi geç generasyon aralığına sahip türler için uygunken, yakın yetiştirme ise tavuk gibi kanatlılar ve laboratuvar hayvanları için uygundur. Popülasyonların oluşturulmasında üçüncü şart ise yakın yetiştirilmiş popülasyonları oluştururken ortaya çıkar. Popülasyonda inceleyeceğimiz karakterleri fenotipik olarak uç değerlerde taşıyan bireylerin seleksiyonu gerekir. Aksi halde yeterli varyasyon oluşmayacağı için QTL etkisi belirlenmez. Fenotipik olarak uzak iki

populasyon oluşturulması için her iki gruba 10-20 jenerasyon zıt yönde seleksiyon yapılmalıdır. Popülasyonların çiftleştirilmesiyle elde edilen F_1 'lerin heterozigot ve bir örnek olması istenir. F_1 neslinde belirteçlerin bağlantı sırası aynı olması gerekir (32). F_2 neslinde ise varyasyon beklenir. Lokuslar bazında geriye melezleme (GM) popülasyonlarında beklenen fenotipler MM veya mm şeklinde iken F_2 popülasyonlarında MM, Mm, mm şeklindedir. Örneğin tavuklarda canlı ağırlık yönünden 20 jenerasyon pozitif ve negatif yönde yapılacak bir seleksiyonla elde edilecek iki hat birbirinden çok uzak fenotipik değerlere sahip olacaktır. Böylece bu hatlarda fenotipi belirleyen önemli QTL'ler pozitif seleksiyon uygulanan popülasyonda homozigotlaşmış olacak, diğer popülasyonda ise QTL olmayan alleller homozigotlaşacaktır.



Şekil 4: QTL Bölgesinin Ortalama Üzerine Yaptığı Additif (E) Ve Dominans (H) Etkisini Gösterir.

Bunlar dışında bitkilerde kullanılan çeşitli haritalama popülasyonları vardır ki bu popülasyonların bazıları yapıları gereği hayvanlar için uygun değildir (DH hatları), bazıları ise hayvanlar için ender olarak kullanılırlar (NIL, RIL). Çekirdeklerinde iki set kromozom içeren double haploid hatlar (DH), yaklaşık 7 nesil boyunca kendilenme ile veya öz kardeş çiftleştirmeleri ile elde edilen rekombinant inbred lines (RIL), 8-9 nesil geriye melezleme ile oluşturulan near isogenic lines (NIL), türler içi ve türler arası melezlemenin kullanılmasıyla oluşturulan Four-Way Cross gibi popülasyonları içerir (33). RIL ve NIL uzun zaman ve emek gerektiren popülasyonlardır. Büyük projelerde kullanılırlar.



Şekil 5: QTL Tespiti İçin Dizayn Edilebilecek Yetiştirme Yöntemleri.

A. Akraba Popülasyonlar (Outbreeding Populations)

Bu tip yetiştirme aile seçkisyonunda kullanılmak için yapılır. Kızların verimine göre yapılan yetiştirmeye projeni test adı verilir. Baba-kız metodu (Daughter design) veya Kız torun dizaynı (Granddaughter design) şeklinde olabilir. Baba-kız dizaynı öz (full-sib) veya üvey (half-sib) kardeş verimlerinin ölçülmesine dayanır . Büyükbaş hayvanlarda bir hayvandan çok yavru alınmadığı için üvey kardeş dizaynı tercih edilir.

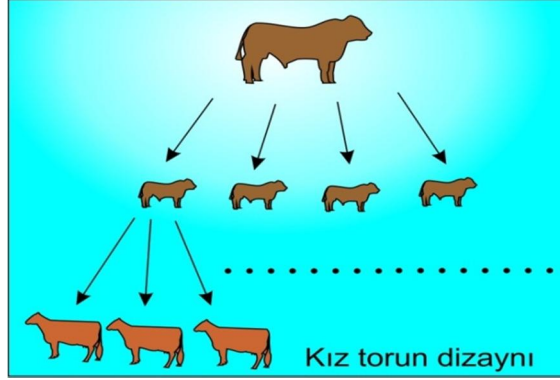
1. Baba-Kız Dizaynı (Daughter Design)

Bu dizaynda kurgu, babadan alınan alleller ile değişik annelerden olan 50-200 kızının verim ortalamalarının karşılaştırılmasına dayanır (34). Aynı babaya sahip üvey kız kardeşlerin fenotipleri düzenli olarak tespit edilir ve belirteçlere ait allel dağılımları ile karşılaştırılır. Daha sonra QTL tespitinde kullanılan istatistik metotlardan birisi ile belirteç ve fenotip arasındaki bağlantı incelenir.

2. Kız Torun Dizaynı (Granddaughter Design)

Bu dizaynda (Şekil 6) ise babaların oğulları genetik belirteçler ile skorlanır ve oğullardan doğan kızların ise fenotipik ortalamaları incelenir (34). İncelenecek karakter damızlık değer tahmini veya gerçek verim kabiliyeti olabilir. Baba-kız ve kız torun metodları genellikle büyükbaş hayvanlarda kullanılan bir metod olup pedigr ve verim kayıtlarının düzenli olarak tutulduğu ülkelerde bu dizayn şekliyle sığırlarda çok sayıda QTL belirlenmiştir (35). Düzenli kayıt tutulan ülkelerde bu analizleri gerçekleştirmek araştırmacıların fazla zamanını almaz. Pedigr ve verim kayıtları yetiştiriciler tarafından sağlandığı için araştırmacıların tek yapmaları gereken bu hayvanların belirteç genotiplerini çıkarmak ve istatistiksel analizlerini yapmaktır. Hayvanların seleksiyonu, yetiştirilmesi ve verim ölçümleri gibi işler projelere dahil olmadığı için QTL araştırılması daha kolay olmaktadır. Bir diğer

avantajı ise suni tohumlama uygulamalarıyla bir boğanın bazen 200.000 tane kızının bulunmasından doğar.

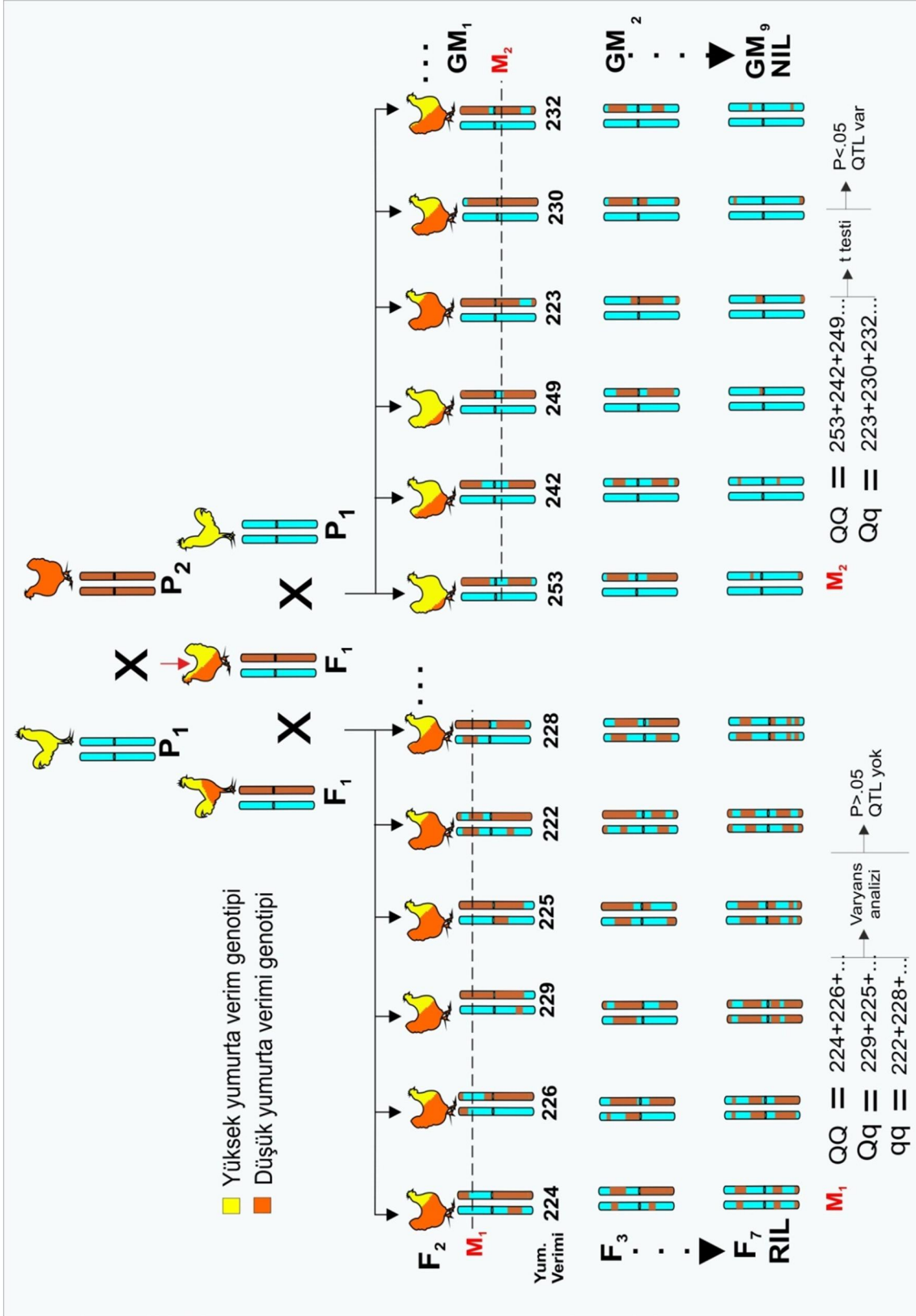


Şekil 6: Kız Torun Dizaynını Gösterir.

B. Yakın Yetiştirme Popülasyonları (Inbreeding Populations)

1. F₂ Popülasyonları

Anderson et al. (36) tarafından önerilen bu yetiştirme metodunda, araştırılan karakter yönünden birbirine zıt yönde selekte edilmiş iki popülasyonun çiftleştirilmesi ile F₁ nesli elde edilir. Burada temel kurgu pozitif yönde selekte edilmiş popülasyonun QTL bölgeleri taşıdığı, negatif yönde selekte edilenin ise QTL bölgesi taşımadığı varsayılan ve genleri farklı alleller yönünden homozigotlaşmış popülasyonlar elde edilmesidir. F₁ nesli ise Mendelin bir örneklik kuralına uyar ve aynı fenotipik yapıyı barındırır. Oluşturulan F₁ neslinin kendi arasında çiftleştirilmesi ile de F₂ nesli elde edilir. F₂ nesli ise Mendelin dağılım kuralına göre ve rekombinasyon ile birlikte geniş bir varyasyon ortaya çıkar (37). Belirteçlerin (MM, Mm, mm) dağılımı kodominant olanlar için 1:2:1 iken dominant olanlar için 3:1 şeklindedir. Büyükbaş ve küçükbaş hayvanlarda ekonomik nedenlerden dolayı tercih edilmeyen bu popülasyonlar kanatlı hayvan çalışmaları için uygundur. 200 adet F₂ ile çalışılması yeterlidir (14). Bu popülasyonların avantajları; yakın yetiştirme baskısından (inbreeding depression) uzak olmaları, 2 jenerasyon gibi kısa bir yetiştirme süresi ve genetik varyasyon oluşturmak için yeterli olmalarıdır. Dezavantajları ise popülasyon tek bir mayoz bölünmeden sonra oluşacak bağlantı dengesizliklerinin (linkage disequilibrium) saptanması üzerine kurulmuştur. Dolayısıyla varyasyon dağılımının geniş perspektifte olmasından dolayı sonuçların tekrarlanabilirliği yoktur ve GxE etkileşimi tespit edilemez (38).



Şekil 7: GM, F₂ Ve Yakın Yetiştirme Populasyonlarında Kromozomların Kalıtım Şekli Ve Linear Modeller İle Yumurta Verimi Örneğinde Temsili QTL Hesaplama.

2. Geriye Melezleme (Backcross)

Zıt yönde seleksiyona tabi tutulmuş iki popülasyonun çiftleştirilmesinden elde edilen F_1 'lerin her iki ebeveyn hattından biri ile tekrar çiftleştirilmesi ile Geriye Melezleme (GM), bunların tekrar aynı ebeveyn popülasyonu ile çiftleştirilmesi ile de GM_2 ve GM_3 'ler elde edilir. Bu popülasyonlara ileri geriye melezler (advanced backcross) adı verilir ve Tanksley ve Nelson (39) tarafından zararlı allelerin frekansını azaltmak için geliştirilmiştir. Çiftleştirmenin 8-9 nesil devam ettirilmesi ile NIL popülasyonları elde edilir. Şekil 7'de F_2 ve GM popülasyonlarını oluşturma gösterildi. GM popülasyonlarının avantajları; iki jenerasyonda oluşturulmaları, GM'lerin resesif karakterleri % 50 oranında taşırken F_2 popülasyonları %25 oranında taşmaları dolayısıyla resesif karakterlerin tespitinde bu popülasyonların üstün oluşudur. Lokuslarda sadece iki genotipik sınıf (MM, Mm) olduğundan skorlama kolaydır. Dezavantajları ise sadece geriye melezlenen ebeveyn hattına ait resesif karakterlerin belirlenebilmesi ve üç genotipin ikisi görüldüğünden dolayı gen interaksiyonlarının belirlenememesidir (40).

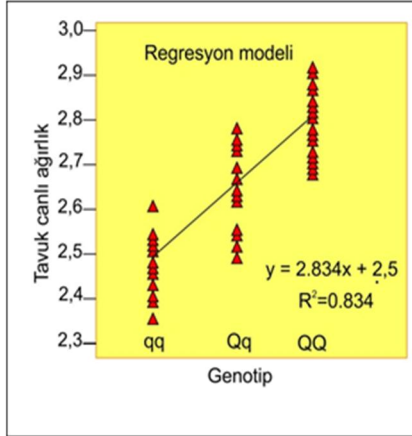
III. VERİ ANALİZİNDE KULLANILAN İSTATİSTİKSEL METODLAR

QTL tesbit etmek için kullanılan metodlar tek veya çoklu belirteç metodlarıdır. Tek belirteç metodu nispeten daha basit ve hızlı sonuç vermesine rağmen QTL bölgesinin belirteçlere uzaklığı ve etki derecesi hakkında bilgi vermez. Yalnızca belirteçlere bağlı bir QTL olup olmadığı hakkında bilgi verir. Çoklu belirteç kullanılması ise kromozom haritalamasının çözünürlüğünü ve QTL bulgusunun güvenilirliğini artırır (41).

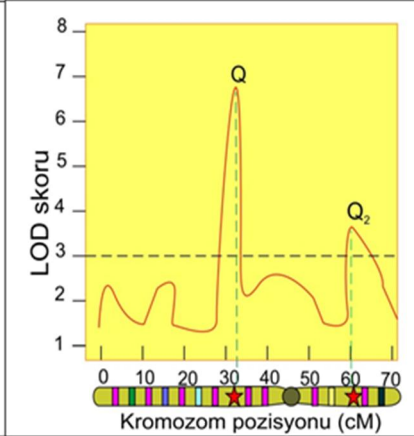
A. Tek belirteç Analizi (Single Marker Analysis)

Bu analizde her belirteç tek tek ele alınarak herhangi bir QTL ile bağlantılı olup olmadığı araştırılır (42). Yakın yetiştirme ve akraba popülasyonların her ikisi için de uygundur. Bunun için bireylere ait elde edilen fenotipik değerler ve belirteçler birkaç test yardımıyla analiz edilebilirler. Bunlardan varyans analizi, t testi, regresyon yaklaşımı, ihtimal oranı (likelihood ratio) veya en yüksek ihtimal (maximum likelihood) metodları yardımı ile analiz edilebilir (41). İstatistiksel olarak anlamlı farklılığın bulunması ($P < .05$) QTL varlığına işaret eder. Şekil 7'de tavukların yumurta verimlerine ait değerler ile sahip oldukları belirtece ait veriler varyans analizi ile temsili olarak karşılaştırıldı. Şekil 8'de ise regresyon analizi yöntemi temsili bir grafik ile gösterildi. Tek belirteç analizinin dezavantajları QTL pozisyonunu vermemesi, belirtece sıkı bağlı zayıf bir QTL veya hafif bağlı büyük bir QTL

lokusunu tespit edememesi, hipotez testlerinde yanlış pozitif sonuç verebilmesidir. Avantajları ise, data analizinin basit olması, herhangi bir istatistik yazılımı ile yapılabilmesi, bağlantı haritası ve tüm genom boyunca belirteçler gerektirmemesidir (14). Eğer varyasyon analizi kullanılacaksa residual error değerleri normal dağılmalıdır.



Şekil 8: Kullanılan İstatistiksel Linear Model Yöntemlerinden Olan Regresyon Analizini Tanıtmak İçin Temsili Şekildir .



Şekil 9: Aralık Haritalaması Yöntemini LOD Skoru Hesaplamalarıyla Gösterir Şekildir. LOD Skoru 3 Çizgisini Geçtiği Noktalarda Var Olan QTL Bölgeleri Yıldız İşareti İle Gösterilmiştir

Bir örnek olması bakımından GM popülasyonu kullandığımızı varsayalım ve istatistiksel metotları ikili karşılaştırmaların yapılabildiği t testi için açıklayalım. QTL genotipleri MM ve MN olacaktır. Populasyon ortalamalarına sırasıyla p1 ve p2, birey sayılarına n1 ve n2 diyelim,

$$t = \frac{p1-p2}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{n1} + \frac{1}{n2} \right)}} \quad (\text{Denklem 1})$$

$$s^2 = \frac{(n1 - 1)s_1^2 + (n2 - 1)s_2^2}{n1 + n2 - 2} \quad (\text{Denklem 2})$$

t değeri bu şekilde hesaplanır ve önemlilik değerine t tablosundan bakılır. Bulunan değer t tablosu değerinden yüksek olması bu bölgede QTL olduğunun delilidir (43). Aynı populasyon için regresyon testi ise y=m+nx+e linear modeli ile kurgulanır. Formülde “y” değeri aynı belirtece sahip bireyler ortalamasıdır ve her lokus için ayrı ayrı hesaplanır. “m” ve “n” değerleri sabit değerlerdir, “x” ise QTL genotipi MM olduğunda “1” değerini MN olduğunda ise “0” değerini alır. Hipotez “x” değerinin “1” veya “0” olduğu üzerine kurulur, “m” ve “n” değerleri ise istatistik programları ile hesaplanabilir. “1” değerini alan lokuslar

QTL olarak kabul edilir. Regresyon metodunun tespit ettiği QTL'lerin güvenilirliği fazla olmasına karşılık, QTL tespit gücü azdır. Ayrıca QTL etkisi ve rekombinasyon oranlarını ayrı ayrı tespit edemez (28). Tek belirteç analizi için en çok kullanılan yazılımlar QTL Cartographer, MapManager QTX ve QGene olarak sıralanabilir. Bunun dışında istatistik analiz yapabilen SPSS, SAS veya Microsoft Excel programlarında kullanılabilir.

B. Aralık Haritalaması (Interval Mapping)

Bu haritalamada birbirini takip eden iki belirteç arasında beklenen QTL'nin varlığı araştırılır (44). Rekombinasyon oranlarını tek belirteç analizinden daha iyi kullanır ve daha güvenilir bir metod olduğu kabul edilir. Genom boyunca yerleri ve uzaklıkları bilinen belirteç haritası gerektirir. Bunun için tüm genom 1 cm aralıklarla bağlantı dengesizliği oluşturabilecek KO olgusu ihtimali yönünden istatistiksel olarak değerlendirilir. Bir noktada oluşabilecek bir crossing overin QTL noktasının her iki belirteç tarafında kalma ihtimalleri fenotipik değerlerle karşılaştırılarak ayrı ayrı hesaplanır. Böylece QTL'nin hangi noktada olması gerektiği bulunur. Bu uygulanan metoda en yüksek olasılık (maximum likelihood) metodu denir. Bu metodun ana mantığı şu şekilde formülize edilmiştir .

$$LR = 2 \ln \frac{\max L(x)}{\max_{H_0} L(x)} \quad (\text{Denklem 3})$$

$$LOD = \log_{10} \frac{\max L(x)}{\max_{H_0} L(x)} = \frac{LR}{4.61} \quad (\text{Denklem 4})$$

Burada LR (Likelihood ratio), bölgede QTL olma ihtimalinin olmama ihtimaline oranıdır. Elde edilen değer oldukça büyük bir rakam olduğundan anlaşılır bir seviyeye indirmek için bu değer onluk tabanda logaritması alınır veya LR değeri 4.61 rakamına bölünerek LOD skoru hesaplanır (45). Bu skorun 3 üzerinde olması genelde QTL kanıtı olarak kabul edilir ve 1/1000 düzeyinde bir hata olabileceği düşünülür. Bunun dışında Maksimum beklenti algoritmasında (Expectation-maximization algorithm) (46) aralık haritalamasında kullanılır. Grafik üzerinde x ekseninde belirteç grubu gösterilirken, y ekseninde ise LOD değerleri pikler halinde gösterilir ve referans 3 çizgisinin üstünde (47) bulunan pikler dikkate alınır (Şekil 9). Pik ne kadar yüksekse QTL olma ihtimali o kadar fazladır fakat her zaman yanlış pozitif sonuçların da alınabileceği göz önüne alınmalıdır. Avantajı QTL pozisyonunu vermesidir. Dezavantajı ise iki belirteç arasındaki çoklu QTL noktalarını tespit edemez. Bir QTL başka QTL bölgelerinden de etkilenebileceği için aralık

haritalama yöntemi belirteçler ile QTL arasında bir hayalet (ghost) QTL oluşturabilir. Bu da yanılma riski doğurur (48). 1 cm aralıkla tüm genomu taramak ve bu hesaplamaları binlerce defa yapmak bilgisayar programları haricinde bu metodu olanaksız kılar. LOD skora ait P değerinin güvenilirliğini artırmak için varsayılan olarak 1000 kere permutasyon (43) veya bootstrap (Jansen, 1993) yapılması gerekir. Bilgisayar programları bu işlemleri yaparlar. Bu iş için de yine en çok kullanılan QTL Cartographer, MapManager QTX ve QGene yazılımlarıdır.

C. Kompozit Aralık Haritalaması (Composite Interval Mapping-CIM)

Kompozit aralık haritalaması metodunu Jansen (49) ve Rodolphe et al. (50) birbirlerinden bağımsız olarak önererek aralık haritalaması tekniğini bir adım daha öteye götürmüşlerdir. Bu yöntemde çoklu regresyon metodu ve aralık haritalaması metodu birleştirilmiştir (51). Birbirini izleyen belirteçler arasında birden fazla QTL bulunabilme olasılığı göz önüne alınarak ayrı ayrı analiz yapılır. Bir aralıkta birden fazla QTL'nin konumları ve etki dereceleri gösterilir. Böylece genetik varyasyonun residual error değeri azaltılmış olur (15).

D. Multiple QTL Mapping

Bu yöntem sadece birbirini takip eden belirteçlerin değil bütün belirteçler arasında aralık tahminlemesi yaparak kompozit aralık haritalamasında olduğu gibi çoklu QTL bölgelerini tespit edebilir (52). Şu ana kadar bahsedilen yöntemler içinde en güçlü olanıdır. QTL'ler arasında epistazisi, genotipik değerleri ve kantitatif karakterlerin kalıtılabilirliğini hesaplar. Donanımsal olarak iyi bilgisayarlar gerektirir.

E. Bayesian Yaklaşımı

Beklenen QTL bölgelerinin değişen noktalarda değişen derecelerde bulunması ihtimalini ele alan bu analiz kuvvetli bir yaklaşımdır fakat iyi bilgisayarlar ve zaman gerektirir. Çoklu QTL haritalama için çeşitli Bayesian yöntemleri mevcuttur. Bayesian QTL haritalamada hangi yöntemin kullanılacağı ise incelenen lokus sayısı ile alakalıdır. QTL lokus sayısını belirlemede kullanılan dört değişik Bayesian QTL haritalama yöntemlerini geliştirildi (53).

Tablo 1: QTL Analiz Yazılımları

Bağımsız yazılımlar	
1. JoinMap	http://www.kyazma.nl/
2. Mapmaker	http://www.broad.mit.edu/ftp/distribution/software/mapmaker3/
3. THREaD Mapper	http://cbr.jic.ac.uk/dicks/software/threadmapper/index.html
4. WinQTLCart	http://statgen.ncsu.edu/QTLcart/WQTLCart.htm
5. MULTIMAPPER	http://www.maxforlive.com/library/device/1791/multimapper
6. MCQTL	https://carlit.toulouse.inra.fr/MCQTL/
7. Meta-QTL	http://www.bioinformatics.org/mQTL/wiki/
8. CarthaGene	http://www.inra.fr/mia/T/CarthaGene/
9. Map Manager QTX	http://www.mapmanager.org/
10. QGene	http://www.qgene.org/
11. MST MAP	http://alumni.cs.ucr.edu/~yonghui/mstmap.html
12. AntMap	http://cse.naro.affrc.go.jp/iwatah/antmap/index.html
13. QTL IciMapping	http://www.isbreeding.net/oldweb/download_software_ICIM.aspx
14. QTL Cartographer	http://statgen.ncsu.edu/QTLcart/
R Paket Programı İle Çalışan Yazılımlar	
1. R/QTL	http://www.rQTL.org
2. R/QTLbim	http://www.ssg.uab.edu/QTLbim/
3. dlmap	http://CRAN.R-project.org/package=dlmap
4. wgaim	http://CRAN.R-project.org/package=wgaim
5. QTLNetworkR	http://CRAN.R-project.org/web/packages/QTLNetworkR/index.html

SONUÇ ve ÖNERİLER

Kantitatif karakterler hayvanlarda verimi belirlediği için yetiştirme açısından çok önemli olarak kabul edilir. Kantitatif karakterleri belirleyen lokusların ortaya konulması ise daha az zamanda daha ekonomik seleksiyonların yapılabilmesi açısından önemlidir. Genetiğin karışık şifrelerini akılcı istatistik yöntemlerle çözmeye çalışan istatistik biliminin önemi, şu ana kadar yüzlerce QTL bölgesini ortaya çıkarmasıyla daha iyi anlaşılmıştır. Bu sebeplerden dolayı Türkiye hayvancılığında şu ana kadar ihmal edilmiş bir konu olan QTL haritalama ve yeni istatistiksel metodlar geliştirme işi önümüzde kaldırılması gereken bir yük olarak

durmaktadır. Bugün Dünya’da kullanılan kolay genotipleme sistemleri (SNP chip gibi), kullanımı kolay yazılımlar ve araştırmacılarımıza sağlanan geniş mali imkanlar ise işi kolay hale getirmiştir. Bu konuya gereken önem verilmeli ve araştırmacıların bu alanı geliştirmeleri teşvik edilmelidir. Türkiye, QTL uygulamaları dahil, genetik veritabanlarını oluşturmadan geri durmamalı ve bu işte Dünya da yerini almalıdır.

KAYNAKLAR

1. Georges, M. Mapping, Fine Mapping, And Molecular Dissection Of Quantitative Trait Loci In Domestic Animals. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2007; 8: 131-162.
2. Crosses E. Review Of Statistical Methods For QTL Mapping In Experimental Crosses. *Lab Animal* 2001; 30(7).
3. Yang J, Hu C, Hu H, Yu R, Xia Z, Ye X & Zhu J. QTLNetwork: Mapping And Visualizing Genetic Architecture Of Complex Traits In Experimental Populations. *Bioinformatics* 2008; 24(5): 721-723.
4. Ferreira A, Silva MFD, & Cruz CD. Estimating The Effects Of Population Size And Type On The Accuracy Of Genetic Maps. *Genetics and Molecular Biology* 2006; 29(1): 187-192.
5. Wang B, Guo W, Zhu X, Wu Y, Huang N & Zhang T. QTL Mapping Of Fiber Quality In An Elite Hybrid Derived-R11 Population Of Upland Cotton. *Euphytica* 2006; 152(3): 367-378.
6. Wang J, Li ZJ, Lan XY, Hua LS, Huai YT, Huang YZ, Wang JQ. Two Novel SNPs In The Coding Region Of The Bovine Prdm16 Gene And Its Associations With Growth Traits. *Molecular Biology Reports* 2010; 37(1): 571-577.
7. Han R, Wei Y, Kang X, Chen H, Sun G, Li G, Huang Y. Novel SNPs In The PRDM16 Gene And Their Associations With Performance Traits In Chickens. *Molecular Biology Reports* 2012; 39(3): 3153-3160.
8. Nuzhdin SV, Harshman LG, Zhou M, & Harmon K. Genome-Enabled Hitchhiking Mapping Identifies QTLs For Stress Resistance In Natural Drosophila. *Heredity* 2007; 99(3): 313-321.
9. De Koning DJ, Dekkers JCM, & Haley CS. Designs For QTL Detection In Livestock And Their Implications For Mas. In *Proceedings Of An International Workshop*

Organised By The Fondazione per le Biotechnologie, the University of Turin and FAO. 2003; 17-18.

10. Eathington SR, Crosbie TM, Edwards MD, Reiter RS, Bull JK. Molecular Markers In A Commercial Breeding Program. *Crop Science* 2007; 47(3): 154.
11. Morjan CL, Rieseberg LH. How Species Evolve Collectively: Implications Of Gene Flow And Selection For The Spread Of Advantageous Alleles. *Molecular Ecology* 2004; 13(6): 1341-1356.
12. Yakir B, Pisanté A, Darvasi A. Statistical Theory in QTL Mapping. In *Computational Genetics and Genomics*. Humana Press. 2005. ss:33-50
13. Visscher P, Whittaker J, & Jansen R. Mapping Multiple QTL Of Different Effects: Comparison Of A Simple Sequential Testing Strategy And Multiple QTL Mapping. *Molecular Breeding* 2000; 6(1): 11-24.
14. Boopathi, NM. Genetic Mapping And Marker Assisted Selection: Basics, Practice And Benefits. Springer Science & Business Media. 2012.
15. Camp NJ, Cox A. (Ed.). *Quantitative Trait Loci: Methods And Protocols* (Vol. 195). Springer Science & Business Media. 2002.
16. Wenzl P, Li H, Carling J, Zhou M, Raman H, Paul E, Kilian A. A High-Density Consensus Map Of Barley Linking DArT Markers To SSR, RFLP And STS Loci And Agricultural Traits. *Bmc Genomics* 2006; 7(1): 206.
17. Gürses M, Bayraktar M. Moleküler Markerlerin Hayvan Yetiştiriciliği ve Genetiğinde Kullanımı. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi* 2014; 28(2): 99-106.
18. Harris BL, Johnson DL. The Impact Of High Density SNP Chips On Genomic Evaluation In Dairy Cattle. *Interbull Bulletin* 2010; (42): 40.
19. Zhao Q, Li T, Zhao X, Huang K, Wang T, Li Z, Shi Y. Rare CNVs And tag SNPs At 15q11. 2 Are Associated With Schizophrenia In The Han Chinese population. *Schizophrenia bulletin* 2013; 39(3): 712-719.
20. Cho KH, Oh JD, Kim HB, Park KD, Lee JH. Genome Wide Association Studies Using Multiple-lactation Breeding Value In Holsteins. *Asian-Australasian journal of animal sciences* 2015; 28(3): 328.
21. Venturini GC, Cardoso DF, Baldi F, Freitas AC, Aspilcueta-Borquis RR, Santos DJ, Tonhati H. Association Between Single-Nucleotide Polymorphisms And Milk

- Production Traits In Buffalo. *Genetics and molecular research: GMR* 2014; 13(4): 10256.
22. Groenen, MA, Megens, HJ, Zare Y, Warren WC, Hillier LW, Crooijmans RP, Cheng, HH. The Development And Characterization Of A 60K SNP Chip For Chicken. *BMC genomics* 2011; 12(1): 274.
23. Kranis, Gheyas AA, Boschiero C, Turner F, Yu L, Smith S., Burt DW. (). Development Of A High Density 600K SNP Genotyping Array For Chicken. *BMC genomics* 2013; 14(1): 59.
24. Li H, Bradbury P, Ersoz E, Buckler ES & Wang J. Joint QTL Linkage Mapping For Multiple-Cross Mating Design Sharing One Common Parent. *PLoS One* 2011; 6(3): 17573.
25. Dapper AL & Lively CM. Interlocus Sexually Antagonistic Coevolution Can Create Indirect Selection For Increased Recombination. *Evolution* 2014; 68(4): 1216-1224.
26. Campos JL, Halligan DL, Haddrill PR & Charlesworth B. The Relation Between Recombination Rate And Patterns Of Molecular Evolution And Variation In *Drosophila Melanogaster*. *Molecular biology and evolution* 2014; 31(4): 1010-1028.
27. Ellegren H. Genome Sequencing And Population Genomics In Non-Model Organisms. *Trends in Ecology & Evolution* 2014; 29(1): 51-63.
28. Wu R, Ma C, & Casella G. *Statistical Genetics Of Quantitative Traits: Linkage, Maps And QTL*. Springer Science & Business Media. 2007.
29. Carlborg Ö, Kerje S, Schütz K, Jacobsson L, Jensen P, Andersson L. A Global Search Reveals Epistatic Interaction Between Qtl For Early Growth In The Chicken. *Genome research* 2003; 13(3): 413-421.
30. Falconer DS, & Mackay TF. *Introduction To Quantitative Genetics*. Harlow. UK: Longman. 1996.
31. Nadaf J, Berri C, Dunn I, Godet E, Le Bihan-Duval E, & De Koning DJ. An Expression QTL of Closely Linked Candidate Genes Affects pH of Meat in Chickens. *Genetics* 2014; 196(3): 867-874.
32. Bovenhuis H, Van Arendonk, JAM, Davis G, Elsen JM, Haley CS, Hill, WG, Nicholas, FW. Detection And Mapping Of Quantitative Trait Loci In Farm Animals. *Livestock Production Science* 1997; 52(2): 135-144.

33. Boopathi NM. Mapping Population Development. In Genetic Mapping and Marker Assisted Selection. Springer India. 2013, ss. 23-37.
34. Weller JI, Weller H, Kliger D, & Ron M. Estimation Of Quantitative Trait Locus Allele Frequency Via A Modified Granddaughter Design. *Genetics* 2002; 162(2): 841-849.
35. Wang X, Wurmser C, Pausch H, Jung S, Reinhardt F, Tetens J, Fries R. Identification And Dissection Of Four Major QTL Affecting Milk Fat Content In The German Holstein-Friesian Population. *PloS one* 2012; 7(7): 40711.
36. Andersson L, Haley CS, Ellegren H, Knott SA, Johansson M, et al.. Genetic Mapping Of Quantitative Trait Loci For Growth And Fatness In Pigs. *Science* 1994; 263:1771–74.
37. Darvasi A. Experimental Strategies For The Genetic Dissection Of Complex Traits In Animal Models. *Nat. Genet.* 1998;18:19–24.
38. Kole C, Abbott AG (Ed.). Principles and Practices of Plant Genomics: Advanced Genomics (Vol. 3). CRC Press. 2010
39. Tanksley SD, Nelson JC. Advanced Backcross QTL Analysis: A Method For The Simultaneous Discovery And Transfer Of Valuable QTLs From Unadapted Germplasm Into Elite Breeding Lines. *Theor Appl Genet* 1995; 92: 191-203.
40. Schulthess A, Schwember AR. Improving Durum Wheat (*Triticum Turgidum* L. Var Durum) Grain Yellow Pigment Content Through Plant Breeding. *Ciencia e Investigación Agraria* 2013; 40(3): 475-490.
41. Siegmund D, & Yakir B. The Statistics Of Gene Mapping. Springer Science & Business Media. 2007.
42. Edwards MD, Stuber CW, Wendel JF. Molecular Marker Facilitated Investigation Of Quantitative Trait Loci In Maize. I. Numbers, genomic distribution and types of gene action. *Genetics* 1987; 116:113–125
43. Churchill GA and Doerge RW. Empirical Threshold Values For Quantitative Trait Mapping. *Genetics* 1994; 138:963–971.
44. Lander ES, Botstein D (1989) Mapping Mendelian Factors Underlying Quantitative Traits Using Rflp Linkage Maps. *Genetics* 121:185–199
45. Haldane JBS, Smith CAB. A New Estimate Of The Linkage Between The Genes For Colour-Blindness And Haemophilia In Man. *Ann Eugen* 1947;14:10–31

46. Dempster AP, NM Laird, and DB Rubin. Maximum Likelihood From Incomplete Data Via The EMalgorithm. J. Roy. Statist. Soc.,Ser.B. 1977; 39:1-38.
47. Özşensoy Y, Kurar E. Genetik Bağlantı Analizi ve Uygulama Alanları. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2013; 10(1): 53-62.
48. Martinez O. and Curnow RN. Estimating the locations and the size of the effects quantitative trait loci using flanking markers. Theor. Appl. Genet. 1992; 85: 480-488.
49. Jansen RC. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. Genetics 1993; 135: 205–211
50. Rodolphe F, Lefort M. A Multi-Marker Model For Detecting Chromosomal Segments Displaying QTL Activity. Genetics 1993;134:1277–1288
51. Zeng ZB. Theoretical Basis For Separation Of Multiple Linked Gene Effects In Mapping Quantitative Trait Loci. Proc Natl Acad Sci 1993; 90:10972–10976
52. Kao CH et al. Multiple Interval Mapping For Quantitative Trait Loci. Genetics 1999;152:1203–1216.
53. Maraghı AO. Farelerde Bir Batında Doğan Yavru Sayısının Kantitatif Özellik Lokusu (QTL) Belirlenmesinde Bayesyan Genelleştirilmiş Doğrusal Model Yaklaşımı. Doktora Tezi. Ankara üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, 2011