



Derleme
(Review)

Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg., 2025, 62 (1):133-149

<https://doi.org/10.20289/zfdergi.1426043>

Zeynel DALKILIÇ ^{1*}

¹ Aydın Adnan Menderes Üniversitesi,
Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü,
09970, Aydın, Türkiye

*Sorumlu yazar (Corresponding author):

zdalkilic@adu.edu.tr

Bahçe bitkilerinde önemli karakterlerle ilişkili moleküler belirteçlerin Küme Segregasyon Analizi (BSA) ile belirlenmesi

Determination of molecular markers reated with important characteristics using Bulk Segregant Analysis (BSA) in horticultural plants

Received (Alınış): 26.01.2024

Accepted (Kabul Tarihi):09.10.2024

ÖZ

Küme Segregasyon Analizi (BSA, Bulk Segregant Analysis), bir popülasyonda sadece belirli bir özelliğin birbirine zıt en üst ve en alt iki aşırı uçundaki bireylerin arasındaki farklılığı ortaya çıkaran güçlü bir yöntemdir. Hem üst hem de alt kümeyi oluşturmak için eşit sayıda birey kullanılır. Bir özellik için karşılaştırılan iki küme ve iki ebeveyn, onları birbirinden ayıran belirteçleri belirlemek için analiz edilir. En üst ve en alt uçtaki bireylerin her birinden DNA çıkartılır. Üst uçtaki bireylerin her birinden eşit miktarda DNA bir deney tüpünde ve alt uçtaki bireylerin her birinden eşit miktarda DNA başka bir deney tüpünde olmak üzere iki ayrı deney tüpünde karıştırılır. İki kümenin DNA örneği moleküler belirteçler yardımıyla karşılaştırılır. Her bir kümedeki bireyler, sadece ilgilenilen gen bakımından özdeştir. BSA yöntemi hem kalitatif (tek genli) hem de çok genli (kantitatif) kalıtım sergileyen özellikler konusunda başarılı sonuçlar vermektedir. Dominant (RAPD, ISSR, AFLP, SRAP) ve kodominant (RFLP, SSR, SCAR, CAPS, SNP, QTL-Seq) belirteç sistemleri kullanılabilir. Bu derlemenin amacı, BSA yönteminin oluşturulma stratejisini tanıtmak ve bahçe bitkilerindeki önemli karakterler ile ilişkili moleküler belirteçlerin belirlenmesindeki kullanımını ortaya koymaktır.

Anahtar sözcükler: Bitki büyüme ve gelişme özellikleri, fenotip, genotip, kalitatif ve kantitatif özellikler, moleküler belirteçler, PCR

Keywords: Plant growth and development characteristics, phenotype, genotype, qualitative and quantitative traits, molecular markers, PCR

ABSTRACT

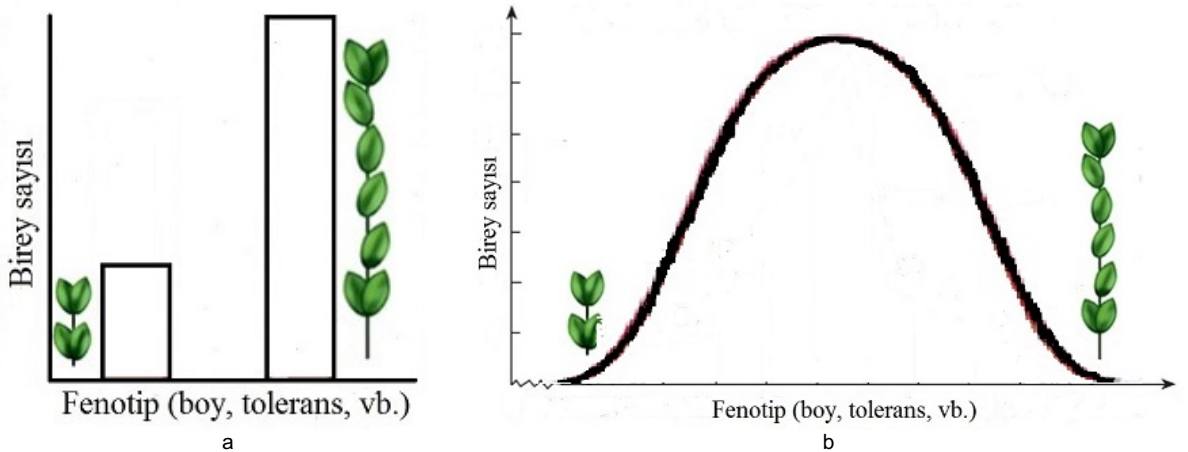
Bulk Segregant Analysis (BSA) is a powerful method reveals only the differences between individuals opposite to each other for a particular trait at the top and bottom two extremes of a population. Equal number of individuals are used to make up both the top and bottom cluster (bulk). The two bulks and the two parents compared for a trait are analyzed to identify the markers that distinguish them. DNA from each individual at both ends are extracted separately. Equal amounts of DNA from the individuals located at the top and bottom extreme are mixed in separate test tubes. The DNA samples from these two bulks are compared using molecular markers. Individuals in each bulk are identical only for the gene of interest. The BSA method gives successful results for traits exhibiting both qualitative (monogenic) and quantitative (multigenic) inheritance. Dominant (RAPD, ISSR, AFLP, SRAP) and codominant (RFLP, SSR, SCAR, CAPS, SNP, QTL-Seq) marker systems can be used. The objective of this review is to introduce the creation strategy of the BSA method and to reveal its functioning in determining important characters and comprehensive markers in horticultural plants.

GİRİŞ

İnsan popülasyonu 2000 yılında 6.2 milyarken 2022'de 8 milyar olmuş, 2050 yılında 9.7 milyar olması ve 2100'de 11 milyara yaklaşması beklenmektedir. Sağlıklı beslenmede kullanılan kültür bitkilerine olan talep ile tarımsal faaliyetlerle elde edilen ürün miktarı arasındaki fark gün geçtikçe açılmaktadır. Bu durum özellikle gelişmekte olan ve az gelişmiş ülkelerdeki nüfus üzerinde baskı oluşturmaktadır. Bitki ıslahı 1930'lardan beri beslenmede yararlanılan ürün miktarının artırılmasında benzeri görülmemiş katkı sağlamaktadır (Wallace et al., 2018; Wang et al., 2023).

Ürünlerin kültüre alınması ve ıslahın tarihi açısından bakıldığında, ıslah dört stratejik döneme ayrılabilir: İslah 1.0-4.0. İslah 1.0, insanlık tarihindeki atalarımızın orijinal ürünleri kültüre almasıyla başlamıştır. İslah 2.0, kendileme depresyonu (inbreeding depression) ile Mendel genetiğinin yeniden keşfi ve kantitatif genetiğin belirlenmesi aşamasıdır. İslah 3.0, bitki ıslahına moleküler belirteçleri dâhil etmesiyle önceki iki dönemden ayrılır. İslah 4.0 ile yüksek verimli ve çevreye iyi uyum sağlayan yeni çeşitlerin oluşturulması amacıyla, arzu edilen genlerin ve allellerin bir çeşide hassas ve verimli bir şekilde eklenmesi beklenmektedir (Wallace et al., 2018).

Bitki ıslahında ilerlemenin sağlanabilmesi için yeterli varyasyonun bulunması gerekir. Bir popülasyondaki belirli bir özellik için fenotipik (dış görünüş) olarak sergilenen varyasyon (bireyler arasındaki farklılık) gözlenerek (nitel) ya da ölçülerek (nicel) belirlenir (Majeed et al., 2022). Örneğin farklı ebeveyn hatları içeren su kabağı (*Lagenaria siceraria*) melezlerinin tuza karşı stresinin saptanması gibi (Aydın & Başak, 2023). Takip edilen özellikler kesintili (nitel, kalitatif, tek genli) ya da sürekli (nicel, kantitatif, çok genli) kalıtım sergileyebilir. Kalitatif özellikler var (1) veya yok (0) şeklinde değerlendirilir ve histogram ile gösterilir (Şekil 1a). Kalitatif özellikler etkisi güçlü bir genin kontrolü altında kalıtılır. Örneğin Gregor Mendel'in bezelyelerde izlediği tohum rengi ve şekli vb. Kalitatif özelliklerde organizmanın genotipi ile fenotipi arasında doğrudan bir ilişki vardır ve kalıtım mekanizması oldukça basittir. Her bir genotip belirli bir fenotip oluşturur. Kantitatif özellikler ise ikiden fazla formda gözlenebilir. Bitkilerin oluşturduğu popülasyon çan eğrisi şeklinde poligon görünümündedir (Şekil 1b). Kantitatif özellikler etkisi zayıf ve çevresel etmenlerden etkilenebilen çok sayıda genin kontrolü altında kalıtılır. Örneğin bitki boyu, kuru madde miktarı, olgunlaşma zamanı, verim vb. Kantitatif özellikler konusunda organizmanın fenotipini etkileyecek farklı genotipler bulunabilir ve kalıtım mekanizması oldukça karmaşıktır (Pierce, 2021).



Şekil 1. Fenotip özellikleri a) kalitatif, b) kantitatif (Pierce, 2021'den değiştirilerek).

Figure 1. Phenotypic traits a) qualitative, b) quantitative (modified from Pierce, 2021).

Moleküler belirteç (marker) sistemlerinden yararlanılarak yapılan haritalamada ve ilişkilendirmede temel alınan kavram, varsayılan bağlantı grubu (kromozomları temsil eder) üzerindeki lokus (genin bulunduğu bölge) ile elde edilen belirtecin veya belirteçlerin arasındaki mesafeye dayanır. Tahmini gen ile

bulunan belirteç arasındaki mesafe ne kadar uzaksa, ikisinin arasında rekombinasyon (crossingover) olma olasılığı da o kadar yüksektir (Quarrie et al., 1999). Bir başka deyişle, rekombinasyon oranı ne kadar düşükse, genin ve belirtecin birbirine yakın olma olasılığı o kadar yüksektir. Klasik ıslah ve geleneksel bağlantı haritası (linkage map) oluşturulması zor, pahalı ve zaman alıcıdır. Biyoinformatik ve yüksek verimli dizileme (high-throughput sequencing) teknolojilerinin gelişimi sayesinde genom haritalama çalışmaları hedefe yönelik olarak daha etkili, zaman tasarruflu ve ucuza yapılabilmektedir (Best & McSteen, 2022). Bu nedenle, belirteç yardımıyla seleksiyondan (**MAS, Marker-Assisted Selection**) yararlanılmaktadır.

Bitki ıslahında bireylerin karakterizasyonu başlıca iki yolla yapılabilir. Bireysel Segregasyon Analizi (**ISA, Individual Segregant Analysis**) yöntemi tek bireyleri genotiplerine göre nitel olarak moleküler belirteç(ler) ile ilişkilendirerek farklı gruplar halinde incelemektedir. Ancak bu yöntemde takip edilen fenotipik özelliğin, moleküler belirteçlerle bağlantılı olan genotip ile ilişkisi kolaylıkla gösterilememektedir. Çalışılan geniş ölçekli popülasyondaki her bir bireyin genotiplenmesi karmaşık, uzun, zahmetli ve pahalı bir süreçtir (Majeed et al., 2022). ISA'nin yukarıda bahsedilen olumsuz yönünün iyileştirilmesi için BSA yönteminin kullanılması daha çok yardımcı olmaktadır. BSA, organizma genomunun belirli bir bölgesindeki ya da bölgelerindeki özellikler ile ilişkili aday gen veya genlere bağlı belirteç belirleme yöntemidir.

Yapılan kaynak taraması sonucunda BSA konusunu detaylı şekilde açıklayan Türkçe kaynağa rastlanmamıştır. Bu derlemenin amacı, BSA yönteminin oluşturulma stratejisini tanıtmak ve bahçe bitkilerindeki önemli karakterler ile ilişkili moleküler belirteçlerin belirlenmesindeki kullanımını ortaya koymaktır.

BSA oluşturma stratejisi

Küme Segregasyon Analizi (**BSA, Bulk Segregant Analysis**) canlılar aleminde çalışılan bir popülasyon içinde sadece belirli bir özelliğin "birbirine zıt" en üst ve en alt iki aşırı uçundaki bireylerin arasındaki farklılığı ortaya çıkarmak amacıyla kullanılır. Bu yöntem, bir melezlemeden elde edilen segregasyon gösteren bir popülasyondan oluşturulan iki kümedeki bireylerin DNA örneklerinin karşılaştırılmasıyla yapılır. Her bir kümedeki bireyler, sadece ilgilenilen gen ya da özellik bakımından özdeştir (ortaktır). Ancak diğer genler veya özellikler için özdeş değildir. Bir başka deyişle, her bir grup içinde, incelenen özellik dışındaki diğer tüm özellikler bakımından bireyler arasındaki varyasyonun rastgele olduğu kabul edilir ve göz ardı edilir. Bir özellik için iki zıt kutbu içeren (örneğin belirli bir hastalığa dayanıklılık ve hassaslık) iki küme arasındaki farklılığı belirlemek amacıyla moleküler belirteçler ile analiz edilir. Kümeler arasında polimorfizm sergileyen belirteçlerin, ilgilenilen özelliği belirleyen lokus ile genetik olarak yakın bağlantıda olduğu düşünülür (Michelmore et al., 1991). BSA genetik, genomik ve ıslah çalışmalarında kullanılabilen oldukça güçlü bir yöntemdir. Hem üst hem de alt kümeyi oluşturan "eşit sayıda" bireylerden ayrı ayrı DNA çıkartılır. Bir özellik için karşılaştırılan iki küme ve varsa iki ebeveyn, onları birbirinden ayıran belirteçleri belirlemek için analiz edilir. BSA'nın temelinde öncelikle izlenecek özellik bakımından farklı uçlarda yer alan iki ebeveyn seçilir ve bunlar arasında kontrollü melezleme yapılır. BSA çalışması için F₂, çift (katlanmış) haploid (**DH, Doubled Haploid**) veya rekombinant kendilenmiş hat (**RIL, Recombinant Inbred Line**) popülasyonunda çeşitlilik gösteren bireyler kullanılabilir. Sonrasında bu özelliğin genom boyunca yayılmış moleküler belirteçlerle genotipik olarak ilişkilendirilmesi gerekir. Popülasyon içinde takip edilen özelliğin "birbirine zıt" en üst uçta ve en alt uçta olmak üzere iki durumunu sergileyen ve eşit sayıdaki bireyle iki ayrı küme (havuz, grup, bulk) oluşturulur. Her bir kümede eşit sayıda olmak şartıyla 14-20 (Michelmore et al., 1991) ya da 7-14 (Giovannoni et al., 1991) arasında birey kullanılabilir. Araştırmanın içeriğine bağlı olarak her kümede kullanılan birey sayısı değiştirilebilir. En üst uçtaki bireylerin her birinden eşit miktarda DNA bir deney tüpünde (Eppendorf®) ve en alt uçtaki bireylerin her birinden eşit miktarda DNA "başka" bir deney tüpünde olmak üzere iki ayrı deney tüpünde karıştırılır. Bu iki kümenin DNA örneği moleküler belirteçler yardımıyla karşılaştırılır. Örneğin, Mendel'in çalıştığı bezelyelerin uzun veya kısa olması, marulun hastalığa dirençli veya hassas olması vb (Quarrie et al., 1999; Vardar-Kanlıtepe et al., 2010).

DNA kümelerinin oluşturulduğu segregasyon gösteren bir popülasyon kullanılarak hedef lokus ile polimorfik moleküler belirteç arasındaki bağlantı (linkage) belirlenir. Dominant sistemler için primer ve

kodominant sistemler için probe kullanılır. Lokus için polimorfik olarak bulunan primerler ya da problemler, ilişkili gen veya bölgeyi tespit etmek amacıyla, kümeleri oluşturmada kullanılan bireyleri birbirinden ayırt etmek için test edilir. İlgilenilen gen ile ilişkili olmayan jel bantları her iki kümede de benzer yoğunlukta gözlenir. BSA herhangi bir yeni bant varyasyonu oluşturmaz. Buna karşın pek çok sayıda lokusun hızlı şekilde taranmasına imkân vererek hedef bölgede segregasyon sergileyen belirteçlerin tanımlanmasını sağlar (Michelmore et al., 1991). BSA yönteminde kullanılacak bireylerin geldiği kaynağa göre iki farklı uygulama şekli olabilir. Birincisinde kullanılacak bireyler herhangi bir melezlemeden oluşturulur. Bir başka deyişle, zıt özellikteki iki genotip ya da mutant ile yabancı bitki (wild type) melezlenerek açılım elde edilir. İkincisinde ise kullanılacak bireyler farklı geçmişe sahip karma bir popülasyondan gelir (Zou et al., 2016). BSA'nın birinci kullanım alanı, tercihen elde edilen F₂ açılım popülasyonu ile çalışmaktır. Bu popülasyona ulaşmanın zaman aldığı çok yıllık bitkilerde, takip edilecek özellik yönünden açılım sergileyen katlanmış haploid, rekombinant kendilenmiş hat (Quarrie et al., 1999) veya geri melezleme (**BC**, **Back-Crossing**) (Dalkılıç et al., 2005) popülasyonu gibi herhangi bir popülasyon da kullanılabilir. Dominant allel ile kontrol edilen kalıtım mekanizmasında F₂ popülasyonu tercih edilirken, resesif allel ya da QTL ile kontrol edilen kalıtım mekanizmasında katlanmış haploid veya rekombinant kendilenmiş hat kullanılması önerilir (Quarrie et al., 1999). BSA'nın ikinci kullanım alanı, araştırmada kullanılan bireylerin genetik olarak çok farklı olması ve büyük ihtimalle yabancı döllenmiş karma (mixture, composite) bir popülasyondan gelmesi durumudur. Bu ikinci durumdaki popülasyonlarda takip edilecek özelliğin çok fazla allelinin mevcut olması mümkündür (Quarrie et al., 1999).

Teknolojinin ilerlemesiyle polimeraz zincir reaksiyonu (**PCR**, **Polymerase Chain Reaction**) sayesinde ve ucuzlayan baz dizilimi (sequencing) maliyetleri, BSA'nın ikinci nesil baz dizilimi (**NGS**, **Next-Generation Sequencing**) yöntemine uyarlanmasıyla (Song et al., 2017; Best & McSteen, 2022; Li & Xu, 2022), bitki özelliği ile ilişkili genom analizleri ileri bir boyuta taşınmıştır (Majeed et al., 2022). BSA yöntemi hem tek genli (Dakouri et al., 2018) hem az sayıda genli (oligenik) (Song et al., 2017) hem de çok sayıda genli (**QTL**, **Quantitative Trait Loci**) (Liang et al., 2020; Zhang & Panthee, 2020; de la Fuente Cantó & Vigouroux, 2022) kalıtımın takip edilmesinde kullanılmaktadır.

Bahçe bitkilerindeki önemli karakterler ile ilişkili moleküler belirteçlerin belirlenmesinde BSA yönteminin kullanımı

Bahçe bitkilerinde BSA'da kullanılan dominant polimorfizm gösteren moleküler belirteçler

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA): Marulda (*Lactuca sativa*, $n=x=9$, Asteraceae) fungal (mantarî) bir hastalığa (*Bremia lactucae*) dayanıklılık/hassasiyet konusu RAPD moleküler belirteçleriyle çalışılarak ortaya konmuştur. Öncelikle takip edilecek fungal hastalığa dayanıklılık bakımından (*Dm3*, *Dm4*, *Dm5/8* genleri) Calmar (homozigot dayanıklı) × Kordaat (homozigot hassas) ebeveyn arasında yapılan melezlemeden elde edilen F₂ popülasyonundan 14-20 bitki dayanıklı ve hassas kümede 120 RAPD primeri (Operon A-F) ile test edilmiştir. Kümeler arasında polimorfizm sergileyen OPI11 primeri *Dm3* geni ile 2 cM, R62 primeri *Dm4* geni ile 15 cM uzaklıkta haritalanmıştır. OPH04₈₀₀, OPF12₁₄₀₀ ve OPH15₁₉₆₀ RAPD belirteçleri *Dm5/8* geni ile bağlantılı bulunmuştur. RFLP ve RAPD belirteçleri hedeflenen genin ön ve arka bölgesine 25 cM mesafede haritalanmıştır (Michelmore et al., 1991).

Elmada (*Malus floribunda*, *M. × domestica*, $n=x=7$, Rosaceae) uyuz (scab, *Venturia inaequalis*) hastalığına dayanıklılık lokusu (*V_j*) 15 dayanıklı ve 7 hassas genotipte çalışılmıştır. Her bir kümede altı dayanıklı ve altı hassas birey yer almış ve 59 RAPD primeri ile test edilmiştir. Bir RAPD belirtecinin (OPA15₉₀₀) hastalığa dayanıklılık konusunda *M.floribunda*'dan *M. × domestica*'ya geçmiş olduğu belirlenmiştir (Durham & Korban, 1994).

Domateste (*Lycopersicon esculentum* × *L. pennellii*, $n=x=12$, Solanaceae) yapılan melezleme ile F₂ popülasyonu oluşturulmuştur. Elde edilen haritalama popülasyonunda kromozom 11 üzerindeki çiçek

sapı (pedicel) absiyonu (*jointless*) lokusu (*j-1*) ve kromozom 10 üzerindeki meyve olgunlaşması (*non-ripening*) lokusu (*nor*) için 7'şer ve 14'er birey kullanılarak iki farklı grup DNA kümesi 200 RAPD primeri ile test edilmiştir. Verilerden 5 cM, 10 cM ve 15 cM bağlantı ihtimali tahmini için sırasıyla ≤ 40 , ≤ 10 ve ≤ 5 birey kullanılarak iki DNA kümesi yapılması tavsiye edilmiştir. 38D primerinden elde edilen 38J belirtecinin *j-1* geni ile yakın ilişkili olduğu ve 307N primerinden elde edilen 307N belirtecinin *nor* geni ile yakın ilişkili olduğu bulunmuştur. 148B primerinden elde edilen bir belirtecin kromozom 11 üzerindeki *j-1* genine 45 cM uzaklıkta olduğu belirlenmiştir (Giovannoni et al., 1991). Domateste lekeli solgunluk virüsü (TSWV, tomato spotted wilt virus) hastalığına dayanıklılık lokusunun (*Sw-5*) kalıtımı eksik dominant (heterozigot bitkiler, homozigot bitkilerden daha az dayanıklıdır) kalıtım ile kontrol edilmektedir. Stevens (dayanıklı) × Trend (hassas) melezlemesinden F₂ popülasyonu oluşturulmuştur. Her bir kümede 67 toleran ve 33 hassas birey yer almış ve 130 RFLP probu, 382 RAPD primeri ve 1 SCAR primeri ile test edilmiştir. Kromozom 9'daki *Sw-5* lokusuna bağlı bir RAPD belirteci (R2) SCAR belirteci (SC-R2) dönüştürülmüştür. Elde edilen SC-R2 SCAR belirtecinin domateste TSWV'nin test edilmesinde ve MAS'nda kullanılabileceği belirtilmiştir (Chagué et al., 1996).

Biberde (*Capsicum annuum*, $n=x=12$, Solanaceae) patates Y virüsü (PYV) hastalığına dayanıklılığın kalıtımı tek bir dominant gen (*Pvr4*) ile kontrol edilmektedir. KM1 (hassas) × CM334 (dayanıklı) melezlemesinden F₁, F₂ ve BC₁ popülasyonları oluşturulmuştur. Her bir kümede 12 dayanıklı ve 12 hassas birey yer almış ve 147 tek ve 46 ikili kombinasyon şeklinde toplam 193 RAPD primeri ile test edilmiştir. Çalışma sonucunda PR-13 primeri dayanıklı ve hassas kümeler arasındaki ilk PCR analizinde polimorfizm göstermesine rağmen tekrar edilememiştir. OPG12 primerinin ise biberdeki PYV hastalığının belirlenmesi için üzerinde daha fazla incelemeye değer olduğu bulunmuştur (Ekbiç et al., 1999).

Turunçgillerde, kök ve gövde çürüklüğüne neden olan *Phytophthora* spp. fungusuna tolerans, Pearl (hassas) × Flying Dragon (FD) (toleran) ve Sunki (hassas) × FD (toleran) melezlemelerinden elde edilen F₁ bitkilerinde incelenmiştir. Hastalığa toleransın çoklu gen kalıtımı izlediği bulunmuştur. Her bitki popülasyonunda ayrı ayrı her bir kümede 5 toleran ve 5 hassas birey yer almıştır. Toplam 492 RAPD primeri kullanılmıştır. Bunlardan 19 primer temiz ve tekrarlanabilir bant vermiştir. Pearl × FD popülasyonunda 44 polimorfik bant elde edilmiştir. Bunlardan C15₆₅₀ ile C15₇₀₀ 2.1 cM, AH6₈₀₀ ile AB1₉₀₀ 4.2 cM ve AC19₁₃₀₀ ile AM3₇₀₀ 4.4 cM mesafede hastalığa tolerans ile ilişkili olarak en yakın şekilde haritalanmıştır. Sunki × FD popülasyonunda 28 polimorfik bant elde edilmiştir. Bunlardan AA11₂₁₀₀ ile AA1₁₂₀₀ 2.4 cM, AJ18₁₀₀₀ ile X18₁₀₀₀ 4.9 cM ve AC19₁₃₀₀ ile E16₂₂₀₀ 5.7 cM mesafede hastalığa tolerans ile ilişkili olarak en yakın şekilde haritalanmıştır (Dalkilic, 1999).

Hindistan cevizinde (*Cocos nucifera*, $n=x=16$, Arecaceae) öldürücü sararma (LY, lethal yellowing) fitoplazma hastalığına dayanıklılığın kalıtımı çalışmasında 20'şer bireyden oluşturulan West African Tall (WAT, hassas), Malayan Yellow Dwarf (MYD, toleran) ve Atlantic Tall (AT, toleran) bitki popülasyonları kullanılmıştır. Her bir kümede 15 dayanıklı ve 15 hassas birey yer almış ve 80 RAPD primeri ile test edilmiştir. AT popülasyonunda 5 RAPD belirtecinin (B4₅₇₀, A11₉₉₀, B11₁₁₄₀, AL3₁₁₆₀ ve AL7₃₅₀) LY'ye dayanıklılık MAS çalışmalarında kullanılabileceği bulunmuştur (Cardeña et al., 2003).

'Minneola' tanjelosunda (*Citrus paradisi* cv. Duncan × *C. reticulata* cv. Dancy, $n=x=9$, Rutaceae) Alternaria kahverengi benek hastalığının (*Alternaria alternata*) Shinn izolatına dayanıklılık tek resesif allel (*aaM1*) ile kontrol edilmektedir. Çalışmada hastalığa dayanıklı Clementine mandarini (*C. reticulata*) × hassas LB#8-10 ('Clementine' × 'Minneola') geri melezleme (BC₁) popülasyonu kullanılmıştır. Her bir kümede 5 dayanıklı ve 5 hassas birey yer almış ve 492 RAPD primeri ile test edilmiştir. Bunlardan 9 primer 11 temiz ve tekrarlanabilir polimorfik bant vermiştir. Hastalığa hassasiyete neden olan *AaM1* alleli ile P12₈₅₀ (15.3 cM) ve AL3₁₂₅₀ (36.7 cM) belirteçleri arasında zayıf coupling (aynı kromozom üzerinde) ilişkisi bulunmuştur (Dalkilic et al., 2005).

Keçiboynuzunda (*Ceratonia siliqua*, $n=x=12$, Caesalpinoideae, Fabaceae) cinsiyetin kalıtımı açık tozlanan bitkilerle çalışılmıştır. Her bir kümede 5 dişi ve 5 erkek birey yer almış ve 130 RAPD primeri ile

test edilmiştir. Çalışmada kullanılan OPA17 primerinden elde edilen 750 bç uzunluğundaki bir bant dışı bireylerin hiçbirinde gözlenmezken, erkek bireylerin dördünde gözlenmiştir. OPA17₇₅₀ belirtecinin keçi boynuzu bitkilerinin gençlik kısırlığı döneminde erkek cinsiyetin belirlenmesi konusunda %80 güvenle kullanılabilceği bildirilmiştir (Kaya & Dalkılıç, 2021).

Narda (*Punica granatum*, $n=x=8$, Lythraceae) bitki boyu ile ilişkili RAPD belirteci bulunmasında bodur (*P. nana*) × normal boylu (*P. granatum*) F₁ melezleri kullanılmıştır. Her bir kümede 7 bodur ve 7 normal boylu birey yer almış ve 120 RAPD primeri ile test edilmiştir. OPM07 primerinden elde edilen 650 bç uzunluğundaki bant ana ebeveyn, bodur nar kümesi ve bodur kendilemesindeki bitkilerde gözlenmezken, baba ebeveyn, normal boylu nar kümesi ve dört normal boylu nar mezleğinde görülmüştür. OPM07₆₅₀ RAPD belirtecinin narda bitki boyu özelliği ile %57 ilişkili olduğu belirlenmiştir (Şimşek Uçkun & Dalkılıç, 2022). Narda tohum sertliği konusunda sert tohumlu (Ernar) ve yumuşak tohumlu (Fellahyemez) ebeveyn arasında yapılan karşılıklı melezlemeden elde edilen bireylerde çalışılmıştır. Her bir kümede 5-7 yumuşak tohumlu ve 5-7 sert tohumlu birey yer almış ve 260 RAPD primeri ile test edilmiştir. OPK12 primerinden elde edilen 571 bç uzunluğundaki bant yumuşak tohum oluşumu ve 608 bç uzunluğundaki bant sert tohumluluk özelliği ile ilişkili bulunmuştur. OPK12 RAPD primerinden elde edilen iki polimorfik banttan oluşturulan iki InDel (insersiyon-delesyon) primeri kullanılarak sert tohumlu bireylerde sadece 156 bç uzunluğunda bant gözlenirken yumuşak tohumlularda hem 156 bç hem de 123 bç uzunluğunda bantlar gözlenmiştir. OPAI08 primerinden elde edilen 700 bç uzunluğundaki bant yumuşak tohumlu bireylerde gözlenirken sert tohumlu bireylerde gözlenmemiştir. İki RAPD belirtecinin (OPK12 ve OPAI08) narda gençlik kısırlığı dönemindeki MAS ıslah çalışmalarında kullanılabilceği belirlenmiştir (Yazıcı et al., 2023).

ISSR (Inter Simple Sequence Repeat, basit dizi tekrarları arası): Börülcede (*Vigna unguiculata*, $n=x=11$, Fabaceae), *Colletotrichum lindemuthianum* fungusunun neden olduğu antraknoz hastalığına dayanıklılığın mekanizması araştırılmıştır. Yer tipi sürünücü 'Sharika' (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) (hassas) × arazi tipi yarı sürünücü 'Kanakamony' (*V. unguiculata* ssp. *cylindrica*) (dayanıklı) ile karşılıklı (resiprok) melezlenmiştir. Toplam 30 F₁ ve 163 F₂ bireyi elde edilmiştir. Her bir kümede F₂ bitkilerinden 10 dayanıklı (0 hastalık skoru) ve 10 hassas (5 hastalık skoru) birey yer almıştır. Test edilen 47 RAPD primerinden 12 adedi ve 43 ISSR primerinden 10 adedi polimorfizm göstermiştir. OPA02₈₅₀ RAPD belirteci hastalığa hassasiyetle, UBC810₁₄₀₀ ve UBC811₁₅₀₀ ISSR belirteçleri hastalığa dayanıklılıkla ilişkili bulunmuştur. Hastalığa dayanıklılıkta rol oynayan UBC811₁₅₀₀ belirteci jelden geri kazanılmış, klonlanmış ve çıkarılan baz diziliminin LRR reseptör benzeri serin/treonin protein kinaz geni le bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (Pradhan et al., 2018).

Çilekte (*Fragaria vesca*, $n=x=7$, Rosaceae) çiçeklenme mevsimi (seasonality) özelliği için (*F. vesca* (mevsimsel çiçeklenen) × *F. vesca semperflorens* (her zaman çiçeklenen)) × *F. vesca semperflorens* 168 BC₁F₁ bireylerinde çalışılmıştır. Her bir kümede 84 mevsimsel çiçeklenen ve 84 her zaman çiçeklenen birey yer almış ve 10 ISSR primeri tek başına ve kombinasyon halinde test edilmiştir. ISSR analizindeki tek başına kullanılan ISSR primerleri 85 (5'i *F. vesca*'ya özel) ve kombinasyon halinde kullanılan ISSR primerleri 493 (14'ü *F. vesca*'ya özel) polimorfik bant sergilemiştir. Elde edilen verilerle iki ISSR belirtecinin çiçeklenme mevsimiyle ilişkili olduğu bulunmuştur (Cekic et al., 2001). Çilekte çiçeklenme mevsimi (seasonality) ve kol verimliliği (runnering) özellikleri için (*F. vesca* (mevsimsel çiçeklenen ve kol veren) × *F. vesca semperflorens* (her zaman çiçeklenen ve kol vermeyen)) × *F. vesca semperflorens* BC₁F₁ bireylerinde çalışılmıştır. Her bir kümede 50'şer birey yer almış ve 23 tek ISSR primeri ve 45 ISSR primer kombinasyonu ile test edilmiştir. ISSR analizinde 14 tek primer ve 10 kombine primer polimorfizm sergilemiştir. Elde edilen verilerle 16 ISSR belirtecinin çiçeklenme mevsimiyle ve 7 belirtecinin de kol verimliliği ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Çekiç, 2015).

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi): Domateste geç yanıklık hastalığı etmeni (*Phytophthora infestans*) Pi-16 izolatu için CLN657 (*L. esculentum*) (hassas) × L3708 (*L. pimpinellifolium*) (dayanıklı) melezlemesinden elde edilen 72 F₂

popülasyonu kullanılmıştır. Her bir kümede 9 dayanıklı ve 8 hassas birey yer almış ve 120 AFLP primer çifti ile test edilmiştir. Beş AFLP primer çiftinden elde edilen DNA bantları dayanıklı ebeveyn ve dayanıklı birey kümesiyle ve bir AFLP primer çiftinden elde edilen DNA bandı hassas ebeveyn ve hassas birey kümesiyle ilişkili bulunmuştur (Chungwongse et al., 2002).

SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism, dizi ilişkili çoğaltılmış polimorfizm):

Domateste *Fusarium* kök ve kök boğazı çürüklüğü (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* (FORL)) etmenine karşı dayanıklılık sağlayan tek dominant gen (*Fr1*) ile ilişkili moleküler belirteçlerin belirlenmesi araştırılmıştır. Fla. 7781 (dayanıklı) ile 560 (hassas) ebeveyn arasındaki melezlemeden F₁, F₂ ve BC₁ elde edilmiştir. Ebeveyn bitkiler, F₂ ve BC₁ bitkileri FORL izolasyonu ile test edilmiştir. Her bir kümede 10 dayanıklı ve 10 hassas birey kullanılmıştır. SRAP analizi için 13 ileri (Me1-13) ve 19 geri (Em1-19) primer çift halinde test edilmiştir. Kullanılan 247 SRAP primer kombinasyonundan 161 adedi 644 polimorfik bant vermiştir. Ebeveyn bitkiler arasında 25, kümeler arasında ise 3 polimorfik bant elde edilmiş, ancak hem ebeveynler hem de bulklar arasında herhangi bir polimorfizme rastlanmamıştır (Kabaş Demirelli, 2008).

İncirde PCR analizi ile BSA'da test edilen toplam 366 primer 7 dişi ve 7 erkek bireyden oluşan DNA kümelerinde test edilmiştir. Kümeler arasında polimorfizm sergileyen 62 primer bireylerde tek tek analiz edilmiştir (kullanılan/toplam sırasıyla 28/208 SRAP, 24/58 MS-SRAP, 10/100 ISSR). Dişi ve erkek incir bireylerinde elde edilen toplam 353 banttan 149'u (66 MS-SRAP, 60 SRAP, 23 ISSR) polimorfizm sergilemiştir. İncirde cinsiyet ayrımında UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average), PCA (principal component analysis) ve STRUCTURE yöntemleri ile yapılan analizler, dişi ve erkek incir bireyleri arasındaki farklılığı belirlemede etkili olmuştur (İkten et al., 2023).

Bitki ıslahında özelliklerin kalıtımının izlenmesinde dominant polimorfizmi belirleyen belirteç sistemlerinden yararlanılabilir. Dominant polimorfizm (bant var ya da yok) veren sistemlerde her bir kümede göreceli olarak daha az birey kullanılabilir (Quarrie et al., 1999).

Bahçe bitkilerinde BSA'da kullanılan kodominant polimorfizm gösteren moleküler belirteçler

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, kesilmiş parça uzunluğu polimorfizmi):

Marulda *B. lactucae* fungal hastalığına dayanıklılık/hassasiyet konusunda RFLP ve RAPD moleküler belirteçleriyle çalışılarak ortaya konmuştur. Öncelikle takip edilecek fungal hastalığa tepki özelliği (*Dm5/8*) bakımından Calmar (homozigot dayanıklı) × Kordaat (homozigot hassas) ebeveyn arasında yapılan melezlemeden F₂ popülasyonu elde edilmiştir (Michelmore et al., 1991).

Mısırdada (*Zea mays*, $n=x=10$, Poaceae) kuraklığa tolerans çalışmasında toplam 223 S1 RIL bitki ailesinden, her birinde 50'şer bitki olacak şekilde dört popülasyon (TS C0, TS C8, DTP C2 ve DTP C6) oluşturulmuş ve RFLP yöntemi ile analiz edilmiştir. Kromozom 1 üzerinde yerleştirilen umc11 RFLP belirteci kurak şartlar altındaki yüksek verimlilik özelliğini taşıyan QTL'e 2 cM uzaklığında bulunmuştur (Quarrie et al., 1999).

SSR (Simple Sequence Repeat, basit dizi tekrarı):

Domateste yaprak kıvrıcıklığı virüsü (ToLCV) hastalığına dayanıklılığın mekanizması 'Punjab Chuhara' (PBC) (*S. lycopersicum*) (hassas) × 'EC-520061' (*S. habrochaites*) (dayanıklı) melezlemesinden elde edilen F₁ bireyi 386 SSR primer çifti ile test edilmiştir. Bu primerlerden polimorfizm sergileyen 8 adedi F₂ bireylerinin hastalığa dayanıklılık yönünden taranması için kullanılmıştır. Her bir kümede 10 dayanıklı ve 10 hassas F₂ bireyi yer almıştır. F₂ popülasyonunda 86 dayanıklı ve 14 hassas (13: 3) birey elde edilmesi, ToLCV hastalığına dayanıklılığın bir dominant engelleyici gen tarafından kontrol edildiğini göstermiştir. İki belirteç hastalığa dayanıklılıkla ilişkili bulunmuştur. SSR218₁₇₀₋₁₄₅ kromozom 10 üzerinde 15 cM ve SSR304₁₅₈₋₁₈₆ kromozom 7 üzerinde 35 cM mesafede yerleştirilmiştir (Singh et al., 2015).

Armutta (*Pyrus communis*, $n=x=17$, Rosaceae) bodur büyüme habitüsü 'Nain Vert' çeşidinden elde edilen *PcDw* dominant lokusu tarafından kontrol edilmektedir. 'Aihuali' (bodur) × 'Chili' (standart)

arasındaki melezlemeden elde edilen 107 bodur ve 108 standart (1: 1) toplam 215 F₁ bireyi ile '7-34' ('Aihuali' × 'Chili') (bodur) × 'Zhongxiang' (standart) arasındaki melezlemeden elde edilen 90 bodur ve 98 standart (1: 1) toplam 188 F₁ bireyi kullanılmıştır. Her bir kümede 10 bodur ve 10 standart birey yer almıştır. Çalışmada, elma ve armut bağlantı haritalarında yer alan 14 SSR primer çiftinden elde edilen belirteçler kromozom 16 üzerinde haritalanmıştır. scaffold00074: 137126-163908 içinde yer alan *PcDw* lokusunun CN993875 ve QauSSR36 SSR belirteçleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca çalışmanın sonucunda yeni 43 SSR ve 50 SNP belirteci veri bankasına kaydedilerek gen bölgesi belirteçlerce yoğunlaştırılmıştır (Wang et al., 2016).

İncirde 45 ilek (erkek) genotipi ve 2 dişi ('Bursa Siyahı', 'Sarılıp') çeşit incir ile 24 SSR primeri kullanarak yapılan çalışmada, genotiplerin cinsiyete göre birbirinden ayıramadığı; dişi ve erkek incir bireylerinin oluşturulan dendrogramda (soyağacı) aynı grupta yer aldığı bulunmuştur (Teoman et al., 2017).

Patateste (*Solanum tuberosum* grup *Phureja*, $n=x=12$, Solanaceae) patates virüs Y (PVY) çalışmasında DB375(1) (dayanıklı) × 84.2P.75 (hassas) ebeveyn arasında çaprazlama yapılmış ve SSR primerleri ile test edilmiştir. İki popülasyonun (05H1 ve 08H1) hastalığa karşı dayanıklılıkta iki SSR belirtecinin (STM1021 ve STM3012) kromozom 9 üzerindeki bir dominant allel ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Çalışmada 98 DaRT (Diversity Array Technology) belirteci dayanıklı ebeveyn ve dayanıklı kümedeki 10 bireyde bulunurken, hassas ebeveyn ve hassas kümedeki 10 bireyde bulunmamıştır. (Torrance et al., 2020).

Soya fasulyesinde (*Glycine max*, $n=x=20$, Fabaceae) fide safhasında kuraklığa tolerans özelliği için tolerant hatlar (PK 1180 ve SL 46) ile hassas hatlar (UPSL 298 ve PK 1169) arasındaki melezlemeden elde edilen F₂ popülasyonunda çalışılmış ve SSR primerleri ile test edilmiştir. Her bir kümede 10 tolerant ve 10 hassas birey kullanılmıştır. Bir SSR belirteci (Satt277) kromozom 6 üzerinde kuraklığa toleranslılıkta yakın ilişkili (3.4 cM) bulunmuştur (Sreenivasa et al., 2020).

Kavunda (*Cucumis melo*, $n=x=12$, Cucurbitaceae) çekirdek erkek sterilite (GMS) resesif geni *ms-1*'in kalıtım mekanizması MS-1 (erkek steril, *msms*) × KP4HM-15 (erkek fertil, *MsMs*) arasındaki melezlemeden elde edilen 150 F₂ bireyinde çalışılmıştır. Her bir kümede 10 homozigot erkek steril ve 10 homozigot erkek fertil birey yer almıştır. Çalışmada 498 SSR primer çifti test edilmiştir. DM0187, DM0038 ve TJ14 SSR belirteçleri kromozom 6 üzerinde *ms-1* gen bölgesine bağlı bulunmuştur. DM0187 belirtecinin *ms-1* genine 4.8 cM ile en yakın genetik mesafede olduğu belirlenmiştir (Singh et al., 2020).

Kavunda, *Fusarium oxysporum* Schlechtend f. sp. *melonis* (Leach & Currence) Snyder & Hans (Fom) tarafından meydana getirilen solgunluk hastalığına dayanıklılığın mekanizması için Punjab Sunehri (hassas) × KP4HM-15 (dayanıklı) melezlemesinden elde edilen 143 F₂ kendilenerek F₃ bireyleri oluşturulmuştur. Bunlardan elde edilen 32 homozigot dayanıklı, 75 heterozigot ve 36 homozigot hassas birey (1: 2: 1) sonucuna göre hastalığa dayanıklılığın bir dominant allel (*Fom-5^(t)*) ile kontrol edildiği belirlenmiştir. Her bir kümede 10 homozigot dayanıklı ve 10 homozigot hassas F_{2:3} bireyi yer almıştır. Kabakgiller Genom Veritabanından seçilen ve kavundaki 12 kromozoma yayılmış 527 SSR primer çifti kullanılmıştır. Bunlardan elde edilen 4 SSR belirtecinin (CMCTN35, DM0096, CSWCTT02, ve ECM181) kromozom 5 üzerindeki *Fom-5^(t)* geni ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Deol et al., 2022).

Bamyada (*Abelmoschus esculentus*, $n=x=20$, Malvaceae) YVMV (sarı damar mozaik virüsü) hastalığına dayanıklılığın mekanizması Punjab Padmini (hassas) × AUAcc-1 (dayanıklı, *A. manihot*) arasındaki melezlemeden elde edilen F₁, BC₁F₁ ve BC₁F₂ popülasyonlarında çalışılmıştır. Yapılan arazi ve yapay inokülasyon testlerinde toplam 168 BC₁F_{2:3} bireyinin fenotipik değerlendirmesinde 89 hassas ve 79 dayanıklı (9: 7) birey belirlenmiştir. YVMV etmenine dayanıklılığın iki resesif gen tarafından kontrol edildiği, genlerden en az birisindeki homozigot allel durumunun, diğer genin etkisini maskeleydiği (resesif epistasi) ve dayanıklı fenotipi ortaya çıkardığı bulunmuştur. BSA için her bir kümede 8 dayanıklı ve 8 hassas birey

yer almıştır. Test edilen 200 SSR primer çiftinden 61'inin dayanıklı ve hassas ebeveyn arasında polimorfizm sergilediği belirlenmiştir. Bu 61 primer çiftinden dördünün (Okra 032, Okra 049, Okra 129 ve Okra 270) YVMV hastalığına dayanıklılık ile ilişkili olabileceği belirlenmiştir (Singh et al., 2023).

SCAR (Sequence Characterized Amplified Region, dizisi karakterize edilmiş çoğaltılmış bölge):

Patlıcanda (*Solanum melongena*, $n=x=12$, Solanaceae) *Fusarium* çürüklüğü (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*) (FOM) hastalığına dayanıklılığın kalıtımı tek bir dominant allel ile kontrol edilmektedir. Çalışmada NSFB99 (hassas) × LS2436 (dayanıklı) melezlemesinden elde edilen F₁ kendilenerek F₂ ve NSFB99 (hassas) ile geri mezlenerek BC₃ popülasyonu oluşturulmuştur. F₂ popülasyonundaki her bir kümede 10 dayanıklı ve 10 hassas birey yer almış ve 1200 RAPD, 29 SRAP, 28 RGA (Resistance Gene Analogous), 812 SRAP-RGA kombinasyonu ve 2 SCAR primeri ile test edilmiştir. Geliştirilen iki SCAR (SCAR₄₂₆ ve SCAR₃₄₇) belirtecinin patlıcan bitkilerinin FOM'a karşı gösterdiği reaksiyonun test edilmesi için kullanılabilirliği bulunmuştur (Mutlu et al., 2008).

Domateste *Fusarium* çürüklüğü (FORL) hastalığına dayanıklılığın kalıtımı tek bir dominant allel ile kontrol edilmektedir. Fla.7781 (dayanıklı) × B560 (hassas) melezlemesinden elde edilen F₁ kendilenerek F₂-F₃ ve B560 (hassas) ile geri mezlenerek BC₁ popülasyonu oluşturulmuştur. Her bir kümede 10 dayanıklı ve 10 hassas birey yer almış ve 29 SRAP, 48 RGA, 216 RFLP-COSII kombinasyonu ve 15 SCAR primeri ile test edilmiştir. Geliştirilen SCAR_{FH} belirtecinin domates bitkilerinin FORL'a karşı gösterdiği reaksiyonun test edilmesi için kullanılabilirliği bulunmuştur (Mutlu et al., 2015).

Incirde (*Ficus carica*, $n=x=13$, Moraceae) popülasyonunda cinsiyetin kalıtımı çalışılmıştır. Her bir kümede 5 dişi ve 5 erkek birey yer almış ve 7 SCAR primeri ile test edilmiştir. MADF4₁₄₅₀ ve MADF6₁₃₀₀ primerleri erkek cinsiyeti ile %100 ilişkili olarak bulunmuştur. Kullanılan 110 RAPD primeri ve 154 SRAP primer kombinasyonu cinsiyet ile ilişkili hiçbir polimorfik bant oluşturmamıştır (Ağır & Dalkılıç, 2022).

CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence, kesilerek çoğaltılmış polimorfik dizi):

Karpuzda (*Citrullus lanatus*, $n=x=11$, Cucurbitaceae) meyve şeklinin kalıtımı üzerine *CIFS1* aday geni çalışılmıştır. 'Duan125' (uzun) × 'Zhengzhouzigua' (yuvarlak) melezlemesinden elde edilen 768 F₂, 120 BC₁P₁ (F₁ × 'Duan125') ve 238 BC₁P₂ (F₁ × 'Zhengzhouzigua') kullanılmıştır. Her bir kümede 30 uzun ve 30 yuvarlak birey yer almış ve BSA-seq yöntemiyle SNP'ler temel alınarak geliştirilen 298 CAPS primeri ile test edilmiştir. Karpuzda meyve şeklinin OO (uzun), Oo (oval) ve oo (yuvarlak) olmak üzere bir lokus tarafından kontrol edildiği belirlenmiştir. Kromozom 3 üzerinde CAPS0158 ve CAPS0165 belirteçleri ile aday gen (*CIFS1*) arasında 46 kb uzunluğu olduğu saptanmıştır. IQD proteinini kodlayan *CIFS1* genindeki 159 bç uzunluğundaki silinmenin karpuzda uzun meyve şeklinden sorumlu olduğu bulunmuştur. Silinen bölgeden geliştirilen InDel belirtecinin (Cla011257) karpuzda yuvarlak meyve şekli ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Dou et al., 2018).

Kavunda kısa boğumarası (SIL, short internode length) özelliği lokusu (*MD7*) için M1-32 (normal boylu) × X090 (bodur) melezlemesinden elde edilen 985 F₂ bireyinde çalışılmıştır. Her bir kümede 30 normal boylu ve 30 bodur birey yer almış ve 10 CAPS primer çifti ile test edilmiştir. Bu primerlerden 6'sı polimorfik bant vermiştir. Altı CAPS belirteci kromozom 7 üzerinde *MD7* lokusuna bağlı bulunmuştur (Zhang et al., 2019).

Mısırdada (*Zea mays*, $n=x=10$, Poaceae) B73 genotipinden EMS kimyasal mutajeni kullanılarak mutant bireyler elde edilmiştir. Mo17 (yabani tip) × *aladin1* (*ali1-1/ali1-1*, mutant tip) melezlemesinden elde edilen F₂ popülasyonu kullanılmış ve dCAPS primerleri ile test edilmiştir. Her bir kümede 60 yabani tip ve 60 *ali1-1/ali1-1* tipi bireyi yer almıştır. Mısır genomundaki çekirdek zarı kompleks bileşeni olan ALADIN1 bölgesinin normal bitki büyüme ve gelişmesi, sürgün mimarisi ve asimetric hücre bölünmesi için gerekli olduğu bulunmuştur (Best et al., 2021).

SNP (Single Nucleotide Polymorphism, tek nükleotid polimorfizmi):

Turunçgillerde (*Citrus* spp. $n=x=9$, Rutaceae) *Alternaria* kahverengi benek (ABS) hastalığına dayanıklılığın kalıtımı 'Fortune' (Aa,

hassas) × 'Willowleaf' (aa, dayanıklı) melezleme popülasyonundan elde edilen triploid melez bireyler ile çalışılmıştır. Her bir kümede 5 dayanıklı ve 5 hassas birey yer almıştır. İki küme ve iki ebeveyn 1536 SNP belirteci içeren Illumina GoldenGate™ array platformunda test edilmiştir. Bunlardan 677 SNP belirteci 'Clementine' referans genetik haritası üzerine yerleştirilmiştir. Sonra 93 triploid melez ve iki ebeveyni, daha önceki 'Clementine' referans genomu çalışmasında belirlenen SSR ve SNP belirteçleri kullanılarak genotiplenmiştir. ABS dayanıklılığının resesif allel ile kontrol edildiği triploid melez popülasyonda da teyit edilmiştir. Kromozom 3 üzerindeki sentromere yakın TTC8 ve CiC3248-06 belirteçleri arasındaki 3.3-Mb genom bölgesinin ABS hastalığına dayanıklılık ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Cuenca et al., 2013).

Marulda Apache, Yorvik, Sensai and Troubadour çeşitlerine EMS (ethyl methanesulfonate) kimyasal mutajeni uygulanmıştır. M5 homozigot mutantlardan (HTG) iki ırk (Yorvik TG01 ve TG10) ve yabancı tipten F₂-F₃ popülasyonu elde edilmiştir. Her bir kümede 30 mutant ve 30 yabancı tip kullanılmış ve homozigot SNP primerleri ile test edilmiştir. Marul genomundaki ABA1/ZEP genlerinde, TG01'deki mutasyonun amino asit değişikliğinden ve TG10'daki mutasyonun alternatif mRNA ayrılmasından (splicing) kaynaklandığı belirlenmiştir (Huo et al., 2016).

Şeftalide (*Prunus persica*, $n=x=8$, Rosaceae) tek/çift çiçek oluşturma özelliği üzerinde Juhuaao × Honggengansutao melezlemesinden elde edilen F₁ popülasyonu ile çalışılmış ve toplam 1.042.687 SNP kullanılmıştır. Her bir kümede 15 tek çiçek ve 15 çift çiçek açan birey yer almıştır. Genom çapında ilişkilendirme çalışmasıyla (GWAS, **Genome-Wide Association Study**) kromozom 2 üzerinde çift çiçek oluşturma özelliği ile ilişkili bir gen bölgesi belirlenmiştir (Meng et al., 2019).

Soya fasulyesinde mantarî *Macrophomina phaseolina* hastalığına dayanıklılığın mekanizması araştırılmıştır. PI 567562A (dayanıklı) × PI 567437 (hassas) melezlemesinden elde edilen 140 F₂₋₃ melez kullanılmıştır. Her bir kümede 10 dayanıklı ve 10 hassas birey yer almış ve QTL-seq analizi yapılmıştır. Kromozom 5, 8 ve 14 üzerinde üç pozisyonda SNP belirlenmiştir (da Silva et al., 2020).

Mısırdada yüksek verimli dizileme (high-throughput sequencing) yardımıyla yabancı (*wt*, wild type) ve mutant bireylerde ileri genetik yaklaşımıyla (forward genetics approach) BSA yöntemi kullanılmaktadır. EMS uygulanıp mutasyona tabi tutulan mutant (koçansız) × yabancı referans B73 (normal RIL) melezlemesinden elde edilen F₂ ve F₃ popülasyonu kullanılmış ve aday homozigot SNP primerleri ile test edilmiştir (Best & McSteen, 2022).

Biberde olgunlaşmamış meyve rengini tozlanmadan 40 gün sonra belirlemek amacıyla CSJ009 (açık sarı) × CSJ010 (yeşil) melezlemesinden F₂ popülasyonu elde edilmiş ve SNP analizi yapılmıştır. Her bir kümede 30 yeşil meyveli ve 30 açık sarı meyveli birey yer almıştır. CSJ009'daki açık sarı olgunlaşmamış meyve renginin tek bir resesif gen (*ly*) ile kontrol edildiği belirtilmiştir. Dört aday genin (*Capana09g000680*, *Capana09g000671*, *Capana09g000715* ve *Capana09g000692*) kromozom 9 üzerinde *ly* lokusu ile bağlantılı olduğu bulunmuştur (Song et al., 2022).

Tatlı patatestede (*Ipomoea batatas*, $n=x=15$, Convolvulaceae) Konaishin (*I. batatas*, hekzaploid, kısa kalın gövdeli) × K123-11 (*I. trifida*, hekzaploid, ince sarılıcı gövdeli) melezlemesinden 194 F₁ bireyi elde edilmiştir. Her bir kümede 20 sarılıcı gövdeli ve 20 sarılıcı olmayan gövdeli birey yer almıştır. BSA sonuçları, F₁ popülasyonu için değiştirilmiş PyBSASeq programı kullanılarak G-istatistiği ile değerlendirilmiştir. Kromozom 13'teki 13.090.703'üncü nükleotid bazına karşılık gelen QTL tepe noktasını temsil eden SNP için bir primer (Marker_13.09) çifti oluşturularak kullanılmıştır. Sonuçta kromozom 13 üzerinde 12.37-14.12 Mb aralığındaki bir QTL'in (*qSgh*) sarılıcı ya da sarılıcı olmayan sürgün büyüme özelliği ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Konaishin'in genom organizasyonunun dupleks (AA'aaaa) ve K123-11'in nullipleks (aaaaa) yapıda olduğu öne sürülmüştür (Suematsu & Tanaka, 2024).

Bitki ıslahında özelliklerin kalıtımının izlenmesinde kodominant polimorfizmi belirleyen belirteç sistemlerinden yararlanılabilir. Kodominant polimorfizm (çok allel mevcut olduğunda) sergileyen sistemlerde popülasyondaki frekansı temsil edebilecek kadar çok birey kullanılmalıdır (Quarrie et al., 1999).

QTL-seq (Quantitative Trait Locus-Sequencing, kantitatif özellik lokusu dizilemesi), BSA-seq (Bulked Segregant Analysis-Sequencing, küme segregasyon analizi dizilemesi) ve BSR-seq (Bulked Segregant RNA-Sequencing, küme segregasyon RNA dizilemesi): Hedefin haricindeki diğer QTL'lerin kafa karıştırıcı etkilerinden izole etmek amacıyla, sadece hedeflenen QTL'in elde edilmesi için başlangıç popülasyonunda tekrarlanan (recurrent) ebeveynle geri melezlemeyi sürdürmek gereklidir. Haritalamadaki belirteç yoğunluğunu belirleyen en önemli faktör baz dizilimi (sekanslama) kapsama alanıdır. Yapılan simülasyonlar, yüksek baz dizilimi kapsamının, aday gen için haritalama mesafesini kısalttığını ortaya çıkarmıştır. Yüksek yoğunluklu baz dizilimi kapsamının minimum derinliği, popülasyon ya da küme büyüklüğüne bağlıdır. Her rekombinasyon bloğu, baz dizilimi okumaları tarafından belirlenen birkaç SNP içermelidir. Ancak bir rekombinasyon bloğundaki bütün baz dizilimi okumalarına gerek yoktur. Hatta büyük küme için göreceli olarak daha düşük baz dizilimi kapsamı kullanılması önerilmektedir. SHOREmap, QTL-seq, MutMap, BSR-seq, MMAPPR, QTG-seq, DeepBSA, X-QTL, OutcrossSeq, GradedPool-seq, vb. BSA için kullanılan değişik yöntemlerdir (Wang et al., 2023).

Hıyarda (*Cucumis sativus*, $n=x=7$, Cucurbitaceae) 9930 (geççi) × Muromskij (erkenci) melezlemesinden elde edilen F₁'lerin kendilenmesiyle ilkbahar 2012, sonbahar 2012 ve ilkbahar 2013 denemelerinde sırasıyla 159, 232 ve 258 F₂ popülasyonu oluşturulmuştur. Sonbahar 2012 denemesinden elde edilen F₂ bireylerinden oluşturulan her bir kümede 10 erken çiçeklenen ve 10 geç çiçeklenen bireyin yer aldığı BSA oluşturulmuş ve SNP ile QTL-seq analizi yapılmıştır. Genom çapında yapılan geniş SNP taraması sonucunda erken çiçeklenme zamanı (F7) lokusuna bağlı başlıca QTL bölgesi belirlenmiştir (Lu et al., 2014).

Domateste, meyve ağırlığı (12S139 ve 12S143) ve meyve odacığı (locule) sayısı (12S75) özelliği için üç popülasyon oluşturulmuştur. 12S139 ve 12S75 *Solanum lycopersicum* var. *lycopersicum* × *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* ile 12S143 *Solanum lycopersicum* var. *lycopersicum* × *S. lycopersicum* var. *lycopersicum* melezlemesinden meydana gelmiştir. Her bir kümede 10 en hafif ve 10 en ağır ile 10 en az odacıklı ve 10 en fazla odacıklı birey yer almıştır. Elde edilen F₂ bireylerinde QTL-seq analizi yapılmıştır. Meyve ağırlığı ile ilişkili olan *fw11.2* geni kromozom 11'in uzak ucunda *fas* ile *fw11.3* lokuslarının üzerinde; *fw1.1* geni kromozom 1'in perisentrik bölgesinde ve *fw3.3* geni meyve ağırlığı geni *SIKLUH/FW3.2*'nin ~1.6 Mb aşağısında haritalandırılmıştır. Meyve odacığı ile ilişkili olan üç QTL (*lcn2.4*, *lcn5.1* ve *lcn6.1*) belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *fw11.2* geni, 66 aday gen içeren ~750 kb'lık bir QTL bölgesi ile ilişkilendirilmiştir (Illa-Berenguer et al., 2015).

Soğanda (*Allium cepa*, $n=x=8$, Amaryllidaceae) sitoplazmik erkek kısırılığının geri kazanılması mekanizmasında etkili olan aday genler (*Ms*) belirlenmeye çalışılmıştır. Melezleme 506L (sitoplazmik erkek kısır, MS) × H6 (erkek fertil, MF) arasında yapılmış ve F_{2.5} popülasyonu elde edilmiştir. Her bir kümede 10 MF ve 10 MS birey yer almıştır. Kümeler, daha önceki çalışmalardaki 4273 bireyde kullanılan ve *Ms* lokusuna bağlı olduğu bilinen *jnurf05* (CAPS belirteci) ve OPT (RFLP AOB272 belirtecinden türetilen PCR belirteci) ile test edilmiştir. RNA-seq analizinde 14 SNP kontig 251 yerel ve 124 ekzotik hat arasında *Ms* lokusu ile mümkünle yakın bağlantı dengesizliği (LD, linkage disequilibrium) sergilemiştir. Yapılan amino asit dizi analizinde MS ve MF arasında dört gende farklılık olduğu belirlenmiştir (Kim et al., 2015).

Mısırdada B73 genotipinden EMS kimyasal mutajeni kullanılarak mutant bireyler elde edilmiştir. B73 (yabani tip) × *ten* (mutant tip) ve B7 × *vns* (mutant tip) melezlemesinden F₂ popülasyonu oluşturulmuştur. Üç farklı kümede 101 *ten* mutanı, 9 *vns* mutanı ve 9 yabani tip bireyi yer almış ve SNP primerleri ile test edilerek BSA-seq analizine tabi tutulmuştur (Klein et al., 2018).

Brokolide (*Brassica oleracea* L. var. *italica*, $n=x=9$, Brassicaceae) çok genle kontrol edilen sıcaklığa tolerans üzerine yapılan çalışmada, orta derecede sıcaklığa tolerant USVL118 × USVL123 hatlarının melezlenmesinden elde edilen 83 F₁ hattından mikrospor kültürü ile katlanmış (çift) haploid bireyleri oluşturulmuş ve QTL-seq ile analiz edilmiştir. Her bir kümede 5 sıcaklığa tolerant (HT=7.0) ve 5 sıcaklığa hassas (HT=2.6) hat yer almıştır. Daha önce belirlenenlere ek olarak iki yeni QTL bulunmuştur. QHT_C09.2 bölgesinde çiçeklenme zamanı genleri ile ilişkili SNP'lerle baş olgunlaştırma zamanı ve sıcaklığa tolerans arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir (Branham & Farnham, 2019).

Şalgamda (*Brassica rapa*, $n=x=8$, Brassicaceae) erken çiçeklenme özelliği için 'CHOY SUM EX CHINA 3' (erken çiçeklenen) × 'Kohiki' (geç çiçeklenen) melezlemesinden 301 bireylik F_2 popülasyonu ve tüylülük özelliği için 'Nakajimana' (tüylü) × 'Akamaru' (tüysüz) melezlemesinden 286 bireylik F_2 popülasyonu oluşturulmuş ve QTL-seq ile analiz edilmiştir. Her bir kümede 20 erken çiçeklenen ve 20 geç çiçeklenen ile 20 tüylü ve 20 tüysüz birey yer almıştır. QTL-seq analizinin şalgamda kantitatif özelliklerin belirlenmesinde kullanılabileceği belirlenmiştir (Itoh et al., 2019).

Çayda (*Camellia sinensis*, $n=x=15$, Theaceae) Longjing 43 (LJ43, yeşil yapraklı) × BJK (sarı yapraklı) melezlemesinden F_1 popülasyonu elde edilmiştir. Her bir kümede 5 yeşil yapraklı ve 5 sarı yapraklı birey yer almış ve RNA-seq analizi yapılmıştır. Sarı ve yeşil yapraklı çay F_1 melezi kümelerinde toplam 359 farklı şekilde ifade edilen gen (DEGs, **d**ifferentially **e**xpressed **g**enes) keşfedilmiştir. Sarı yapraklı çay bitkilerinde baskılanan ışık toplayan klorofil a/b proteini (LHC, **l**ight-**h**arvesting **ch**lorophyll **a/b**-binding proteins) genlerinin anormal kloroplast gelişmesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Wang et al., 2020).

Elmada yerel genotipler (145) Jonathan × Golden Delicious (J × G) (1,773 melez), Zisai Pearl × Red Fuji (Z × F) (3,627 melez) ve Zisai Pearl × Golden Delicious (Z × G) (3,492 melez) F_1 melezleme kombinasyonu, tam çiçeklenmeden sonraki (DAFB, **d**ays **a**fter **f**ull **b**loom) 151. ve 179. günlerde meyve ağırlığı, olgunlaşma tarihi ve toplam kuru madde içeriği (Brix) yönünden incelenmiştir. Üç farklı melezleme kombinasyonundan oluşturulan her bir kümede 23-45 birey yer almış ve SNP yöntemi ile BSA-seq verileri Yabancı Döllenen Türler için BSA (BSATOS, **B**SA **T**ools for **O**utbreeding **S**pecies) bilgisayar yazılımı ile QTL analizi yapılmıştır. BSATOS yönteminin yabancı döllenene bitki türlerinin meyve özelliklerinin QTL analizinde kullanışlı olduğu bulunmuştur (Shen et al., 2019, 2022).

Kabakta (*Cucurbita pepo*, $n=x=20$, Cucurbitaceae) tüketici tercihlerinde önemli olan meyve kabuğu renginin kalıtımının moleküler mekanizması çalışılmıştır. RP16 (beyaz ve pürüzsüz kabuklu) ve RP38 (yeşil ve pürüzlü kabuklu) hatlar ebeveyn olarak kullanılmış ve 384 F_2 bireyi elde edilmiştir. F_2 bireylerinin 293'si beyaz ve 91'i yeşil kabuk renkli 3:1 oranında bulunmuştur. Böylece beyaz kabuk renginin dominant ve yeşil kabuk renginin resesif olduğu tespit edilmiştir. Kabakta yeşil meyve kabuğu renginin bir resesif allel (*cpgp*) ile kontrol edildiği belirlenmiştir. Her bir kümede 30 beyaz ve 30 yeşil kabuk renkli birey yer almıştır. İki küme, iki ebeveyn ile birlikte 17 InDel primer çifti kullanılarak DNA kütüphanesi oluşturulmak amacıyla BSA-seq analizi yapılmıştır. Daha sonra 699 F_2 bireyi kullanılarak yapılan detaylı genom haritalamasında, 23.90 kb kromozom bölgesi içinde, Arabidopsis'teki *Cp4.1LG05g02070* ve *Cp4.1LG05g02060* genleri bulunmuştur. APRR2 (**A**rabidopsis **P**seudo-**R**esponse **R**egulator **2**-benzeri) proteini kodlayan kromozom 5 üzerindeki *Cpgp* geninin (*Cp4.1LG05g02070*), meyve kabuğunun yeşil rengini kontrol ediyor olabileceği belirlenmiştir (Gebretsadik et al., 2024).

Soğanda, *Alternaria porri* (Ellis) Ciferi nekrotrofik fungusu tarafından oluşturulan mor leke (purple blotch) hastalığına dayanıklılığın kalıtım mekanizması, AK (**A**rka **K**alyan, dayanıklı) × AR (**A**grifound **R**ose, hassas) arasındaki melezlemeden elde edilen 153 RIL F_6 generasyonundaki 79 dayanıklı ve 74 hassas (1: 1) birey ile çalışılmıştır. Her bir kümede 10 dayanıklı ve 10 hassas birey yer almıştır. SNP verileri ile BSR-Seq yöntemi kullanılmıştır. Sonuçlar KASP (**K**ompetitive **A**llele **S**pecific **P**CR) primerleri ile teyit edilmiştir. Kromozom 6'nın uzun kolunda 7.3 Mb aralığında dayanıklılıkla ilişkili aday genom bölgesi belirlenmiştir. Bu bölgede, CC-NBS-LRR hastalık dayanıklılığı proteini sınıfına dahil olan ACCL_20794 (Chr6: 187,639,724-187,643,297) geni yer almış ve *ApR1* olarak isimlendirilmiştir (Sahoo et al., 2024).

Klasik BSA'nın öne çıkan en büyük dezavantajı, gen seviyesinde QTL haritalama yapmak için haritalama popülasyonunun ve küme büyüklüğünün çok küçük kalmasıdır. Ayrıca güncel BSA stratejileri her seferinde sadece bir geni haritalayabilmektedir. Bu durum da fonksiyonel gen klonlamanın etkinliğini önemli ölçüde sınırlandırmaktadır. Bu problemlere çözüm bulmak için HTP (**H**igh-**T**hroughput **P**henotyping, yüksek kapasiteli fenotipleme), BBD (**B**iological **B**ig **D**ata, biyolojik büyük veri) ve değişik makine öğrenmesi algoritmaları gibi NG-BSA (**N**ext-**G**eneration **B**SA, ikinci nesil dizileme BSA) yöntemlerinden yararlanılmaktadır (Wang et al., 2023). NGS-BSA, genom çapında tespit edilen SNP'leri kullanarak orijinal

BSA protokolüne kıyasla yüksek verimli ve yüksek çözünürlüklü analizlere olanak tanır. Son zamanlarda, NGS tabanlı BSA, aday genlerin tanımlanmasını hızlandırmak için referans genom dizilerine sahip çok sayıda bitki türünde başarıyla uygulanmıştır (Schneeberger, 2014). NGS-BSA işgücü tasarrufu sağlayan hızlı bir QTL haritalama yöntemidir. QTL-seq yönteminde, SNP indeksi (allel frekansı), NGS okumalarından hesaplanır. QTL zirveleri, Δ SNP indeksinden (kümeler arasındaki SNP indekslerinin farklılığı) belirlenir (Suematsu & Tanaka, 2024). Diploidlerle karşılaştırıldığında poliploidlerdeki SNP indeksindeki farklılıkların belirlenmesi daha zordur. Diğer bir BSA yöntemi olan G istatistiği yöntemi, G testi veya Fisher testi ile allel frekanslarını karşılaştırarak QTL tahmini yapar (Zhang & Panthee, 2020; Suematsu & Tanaka, 2024). Bu yöntem, otopoliploidlerin BSA'sı için tahminen uygundur. Çünkü Δ SNP indeksi kullanılmaz. BSA sonuçları ile RNA-seq tarafından yapılan gen ifadesinin birleştirilmesiyle, DEGs (Differentially Expressed Genes, farklılaştırılmış gen ifadeleri), QTL bölgesinde tanımlanmıştır. Bu sonuçlar poliploid türler için G istatistiği yönteminin uygulanabilirliğini göstermektedir ve bu yöntem tatlı patatesin sürgün fenotipinin evrimini açıklamak için yardımcı olacaktır (Suematsu & Tanaka, 2024).

SONUÇ

Bitki ıslahında BSA yönteminden yararlanılması zamansal, ekonomik ve kolay uygulanabilirlik anlamında oldukça yarar sağlamaktadır. Populasyon genetiği başta olmak üzere gençlik kısırlığı (tohum ekiminden ilk çiçek açıncaya kadar geçen süre) safhası uzun olan çok yıllık bitkilerde BSA, üzerinde çalışılan özelliği taşıyan bitkilerin ayırt edilmesinde kısa zamanda sonuç vermektedir. BSA yöntemi öncelikle bitkilerde yapılan çalışmalarla ortaya çıkmasına rağmen son yıllarda hayvan, maya, *Chlamydomonas* spp. vb. diğer organizmalarda da kullanım alanı bulmuştur. Gelecekte moleküler biyoloji alanındaki gelişmelerle birlikte yapılacak genetik ve ıslah araştırmalarında BSA yönteminden yararlanılabilecektir.

Bitkilerin abiyotik ve biyotik stres etmenlerine karşı toleransının artırılması konusunda gen klonlama etkinliğini artırmak ve düzenleyici genler ağının şifresini çözmek için NG-BSA yöntemlerinden yararlanılması, Islah 4.0 ile birleştirilebilecektir. Genom baz dizilimi ve BSA'nın birlikte ele alınmasıyla kalitatif ve kantitatif karakterleri kontrol eden pek çok gen tanımlanmış olmasına rağmen, başta QTGs (quantitative trait genes, kantitatif karakter genleri) olmak üzere, genlerin klonlanmasının yüksek yoğunlukta ve doğrulukta yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır. HTP, BBD ve makine öğrenmesi ile güçlendirilen NG-BSA yöntemleri ucuz ve zamandan tasarruf eden Islah 4.0 için gelecekte kullanılabilecektir.

Veri Kullanılabilirliği

Veriler makul talep üzerine sağlanabilmektedir.

Yazar Katkıları

Çalışmanın konsepti ve tasarımı: ZD; örnek toplama: ZD; verilerin analizi ve yorumlanması: ZD; görselleştirme: ZD; makalenin yazımı: ZD.

Etik Beyan

Bu araştırma için etik kurula ihtiyaç olmadığını beyan ederiz.

Finansal Destek

Bu araştırma için herhangi bir dış finansman desteği alınmamıştır.

Makale Açıklaması

Bu makale Konu Editörü Dr. Emrah ZEYBEKOĞLU tarafından düzenlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Ağır, A.R. & Z. Dalkılıç, 2022. Identification of sex in *Ficus carica* with RAPD, SRAP and SCAR markers. In: *Ficus carica: Production, Cultivation and Uses* (Ed. Z. Dalkılıç). Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY, USA, 246 pp. <https://doi.org/10.52305/TPCS5872>.
- Aydın, A. & H. Başak, 2023. Farklı melez kombinasyonları ile elde edilmiş su kabağı (*Lagenaria siceraria*) melezlerinin su kültürü koşullarında tuz stresine morfolojik ve fizyolojik olarak tolerans düzeylerinin belirlenmesi. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 60 (4): 665-678. <https://doi.org/10.20289/zfdergi.1284786>.
- Best, N.B. & P. McSteen, 2022. Mapping maize mutants using bulked-segregant analysis and next-generation sequencing. *Current Protocols*, 2: e591. <https://doi.org/10.1002/cpz1.591>.
- Best, N.B., C. Addo-Quaye, B.-S. Kim, C.F. Weil, B. Schulz, G. Johal & B.P. Dilkes, 2021. Mutation of the nuclear pore complex component, *aladin1*, disrupts asymmetric cell division in *Zea mays* (maize). *G3 Genes, Genomes, Genetics*, 11 (7): jkab106. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab106>.
- Branham, S.E. & M.W. Farnham, 2019. Identification of heat tolerance loci in broccoli through bulked segregant analysis using whole genome resequencing. *Euphytica*, 215: 34. <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2334-9>.
- Cardeña, R., G.R. Ashburner & C. Oropeza, 2003. Identification of RAPDs associated with resistance to lethal yellowing of the coconut (*Cocos nucifera* L.) palm. *Sci. Hortic.*, 98 (3): 257-263. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00162-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00162-0).
- Cekic, C., N.H. Battey & M.J. Wilkinson, 2001. The potential of ISSR-PCR primer-pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria vesca* as a model. *Theor. Appl. Genet.*, 103: 540-546. <https://doi.org/10.1007/PL00002907>.
- Chagué, V., J.C. Mercier, M. Guénard, A. Courcel & F. Vedel. 1996. Identification and mapping on chromosome 9 of RAPD markers linked to *Sw-5* in tomato by bulked segregant analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 92: 1045-1051. <https://doi.org/10.1007/BF00224047>.
- Chungwongse, J., C. Chungwongse, L. Black & P. Hanson, 2002. Molecular mapping of *Ph-3* gene for late blight resistance in tomato. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77 (3): 281-286. <https://doi.org/10.1080/14620316.2002.11511493>.
- Cuenca, J, P. Aleza, A. Vicent, D. Brunel, P. Ollitrault & L. Navarro, 2013. Genetically based location from triploid populations and gene ontology of a 3.3-Mb genome region linked to *Alternaria* Brown Spot resistance in citrus reveal clusters of resistance genes. *PLoS ONE*, 8 (10): e76755. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076755>.
- Çekiç, Ç., 2015. Bulk segregant analysis technique to target seasonality and runnering loci in diploid strawberries. *Journal of New Results in Science*, 9: 92-98. <http://jnrs.gop.edu.tr>.
- da Silva, M.P., A.Z. Zaccaron, B.H. Bluhm, J.C. Rupe, L. Wood, L.A. Mozzoni, R.E. Mason, S. Yingling & A. Pereira, 2020. Bulked segregant analysis using next-generation sequencing for identification of genetic loci for charcoal rot resistance in soybean. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 109: 101440. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2019.101440>.
- Dakouri, A., X. Zhang, G. Peng, K.C. Falk, B.D. Gossen, S.E. Strelkov & F. Yu, 2018. Analysis of genome-wide variants through bulked segregant RNA sequencing reveals a major gene for resistance to *Plasmodiophora brassicae* in *Brassica oleracea*. *Sci. Rep.*, 8: 17657. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36187-5>.
- Dalkilic, Z. 1999. Identification and Mapping of genes for *Alternaria* and *Phytophthora* Disease Resistance in Citrus Hybrids. University of Florida (Unpublished) Ph. D. Dissertation, Gainesville FL, USA, 107 pp.
- Dalkilic, Z., L.W. Timmer & F.G. Gmitter, Jr, 2005. Linkage of an *Alternaria* disease resistance gene in mandarin hybrids with RAPD fragments. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 130 (2): 191-195. <https://doi.org/10.21273/JASHS.130.2.191>.
- de la Fuente Cantó, C. & Y. Vigouroux, 2022. Evaluation of nine statistics to identify QTLs in bulk segregant analysis using next generation sequencing approaches. *BMC Genomics*, 23: 490. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08718-y>.
- Deol, J.K., S.P. Sharma, R. Rani, A. Kalia, P. Chhuneja & N.K. Sarao, 2022. Inheritance analysis and identification of SSR markers associated with fusarium wilt resistance in melon. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 97 (1): 66-74. <https://doi.org/10.1080/14620316.2021.1948360>.
- Dou, J., S. Zhao, X. Lu, N. He, L. Zhang, A. Ali, H. Kuang & W. Liu, 2018. Genetic mapping reveals a candidate gene (CIFS1) for fruit shape in watermelon (*Citrullus lanatus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 131 (4): 947-958. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3050-5>.

- Durham, R.E. & S.S. Korban, 1994. Evidence of gene introgression in apple using RAPD markers. *Euphytica*, 79: 109-114.
- Ekbic, E. K. Abak, S. Büyükalaca & M.A. Yılmaz, 1999. Biberlerde patates Y Virüsü'ne (PVY) dayanıklılık özelliği için RAPD Markırlarının araştırılması. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Ankara, pp.459-463.
- Gebretsadik, K., W. Chen, Y. Duan, Y. Sun, Y. He, Q. Liao, C. Wang & K. Bo, 2024. Map-based cloning reveals *Cpqp* gene encoding an APRR2 protein to regulate the green fruit peel formation in *Cucurbita pepo*. *Mol. Breed.*, 44: 53. <https://doi.org/10.1007/s11032-024-01492-7>.
- Giovannoni, J.J., R.A. Wing, M.W. Ganai & S.D. Tanksley, 1991. Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping populations. *Nucleic Acids Res.* 19 (23): 6553-6568.
- Huo, H, I.M. Henry, E.R. Coppoolse, M. Verhoef-Post, J.W. Schut, H. de Rooij, A. Vogelaar, R.V.L. Joosen, L. Woudenberg, L. Comai & K.J. Bradford, 2016. Rapid identification of lettuce seed germination mutants by bulked segregant analysis and whole genome sequencing. *The Plant Journal*, 88: 345-350. <https://doi.org/10.1111/tpj.13267>.
- Ikten, H., O. Gulsen, N. Mutlu, I. Polat & U. Aksoy, 2023. Genetic diversity, population structure, and association analysis of female and male fig genotypes (*Ficus carica* L.). *Erwerbs-Obstbau*, 65: 1603-1616. <https://doi.org/10.1007/s10341-023-00844-5>.
- Illa-Berenguer, E., J. Van Houten, Z. Huang & E. van der Knaap, 2015. Rapid and reliable identification of tomato fruit weight and locule number loci by QTL-seq. *Theor. Appl. Genet.*, 128: 1329-1342. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2509-x>.
- Itoh, M., T. Segawa, M. Tamiru, A. Abe, S. Sakamoto, A. Uemura, K. Oikawa, H. Kutsuzawa, H. Koga, T. Imamura, R. Terauchi & H. Takagi, 2019. Next-generation sequencing-based bulked segregant analysis for QTL mapping in the heterozygous species *Brassica rapa*. *Theor. Appl. Genet.*, 132: 2913-2925. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03396-z>.
- Kabaş Demirelli, A., 2008. Domateste *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*'ye karşı dayanıklılık için moleküler işaretleyicilerin belirlenmesi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı (Basılmamış) Doktora Tezi, İzmir, 128 s.
- Kaya, D. & Z. Dalkılıç, 2021. Determination of a sex-related RAPD marker in carob (*Ceratonia siliqua* L.). *Genetica*, 53 (2): 575-582. <https://doi.org/10.2298/GENSR2102575K>.
- Kim, S., C.-W. Kim, M. Park & D. Choi, 2015. Identification of candidate genes associated with fertility restoration of cytoplasmic male-sterility in onion (*Allium cepa* L.) using a combination of bulked segregant analysis and RNA-seq. *Theor. Appl. Genet.*, 128: 2289-2299. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2584-z>.
- Klein, H. & Y. Xiao, P.A. Conklin, R. Govindarajulu, J.A. Kelly, M.J. Scanlon, C.J. Whipple & M. Bartlett, 2018. Bulk-segregant analysis coupled to whole genome sequencing (BSA-Seq) for rapid gene cloning in maize. *G3-Genes Genomes Genetics*, 8 (11): 3583-3592. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200499>.
- Li, Z. & Y. Xu, 2022. Bulk segregation analysis in the NGS era: a review of its teenage years. *Plant Journal*, 109: 1355-1374. <https://doi.org/10.1111/tpj.15646>.
- Liang, T., W. Chi, L. Huang, M. Qu, S. Zhang, Z.-Q. Chen, Z.-J. Chen, D. Tian, Y. Gui, X. Chen, Z. Wang, W. Tang & S. Chen, 2020. Bulk segregant analysis coupled with whole-genome sequencing (BSA-Seq) mapping identifies a novel pi21 haplotype conferring basal resistance to rice blast disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 21: 2162. <https://doi.org/10.3390/ijms21062162>.
- Lu, H., T. Lin, J. Klein, S. Wang, J. Qi, Q. Zhou, J. Sun, Z. Zhang, Y. Wenig & S. Huang, 2014. QTL-seq identifies an early flowering QTL located near *Flowering Locus T* in cucumber. *Theor. Appl. Genet.* 127: 1491-1499. <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2313-z>.
- Majeed, A., P. Johar, A. Raina, R.K. Salgotra, X. Feng & J.A. Bhat, 2022. Harnessing the potential of bulk segregant analysis sequencing and its related approaches in crop breeding. *Frontiers in Genetics*, 13: 94450. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.944501>.
- Meng, G., G. Zhu, W. Fang, C. Chen, X. Wang, L. Wang & K. Cao, 2019. Identification of loci for single/double flower trait by combining genome-wide association analysis and bulked segregant analysis in peach (*Prunus persica*). *Plant Breeding*, 138: 360-367. <https://doi.org/10.1111/pbr.12673>.
- Michelmore, R.W., I. Paran & R.V. Kesseli, 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9828-9832.

- Mutlu, N., A. Demirelli, H. İlbi & C. İkten, 2015. Development of co-dominant SCAR markers linked to resistant gene against the *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Theor. Appl. Genet.*, 128: 1791-1798. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2547-4>.
- Mutlu, N., F.H. Boyacı, M. Göçmen & K. Abak, 2008. Development of SRAP, SRAP-RGA, RAPD and SCAR markers linked with a *Fusarium* wilt resistance gene in eggplant. *Theor. Appl. Genet.*, 117: 1303-1312. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0864-6>.
- Pierce, B. A., 2021. *Genetics Essentials: Concepts and Connections*. 5th Ed. W. H. Freeman and Company, New York, NY, 2106 pp.
- Pradhan, D. D. Mathew, S. K. Mathew & P. A. Nazeem, 2018 Identifying the markers and tagging a leucine-rich repeat receptor-like kinase gene for resistance to anthracnose disease in vegetable cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 93 (3): 225-231. <https://doi.org/10.1080/14620316.2017.1362962>.
- Quarrie, S.A., V. Lazić-Jančić, Dragan Kovačević, A. Steed & S. Pekić, 1999. Bulk segregant analysis with molecular markers and its use for improving drought resistance in maize. *Journal of Experimental Botany*, 50 (337): 1299-1306. <https://doi.org/10.1093/jxb/50.337.1299>.
- Sahoo, J., R. Mishra & R.K. Joshi, 2024. Bulk Segregant RNA Sequencing (BSR-Seq) combined with SNP genotyping towards mapping and characterization of a purple blotch resistance gene in onion (*Allium cepa* L.). *Plant Mol Biol Rep.*, (ön izleme). <https://doi.org/10.1007/s11105-024-01466-1>.
- Shen, F., L. Bianco, B. Wu, Z. Tian, Y. Wang, T. Wu, X. Xu, Z. Han, R. Velasco, P. Fontana & X. Zhang, 2022. A bulked segregant analysis tool for out-crossing species (BSATOS) and QTL-based genomics-assisted prediction of complex traits in apple. *Journal of Advanced Research*, 42: 149-162. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.03.013>.
- Shen, F., Z. Huang, B. Zhang, Y. Wang, X. Zhang, T. Wu, X. Xu, X. Zhang & Z. Han, 2019. Mapping gene markers for apple fruit ring rot disease resistance using a multi-omics approach. *G3*, 9: 1663-1678. <https://doi.org/10.1534/g3.119.400167>.
- Singh, G., M. Pathak, D. Pathak & N.K. Sarao, 2023. Identification of SSR markers through bulk segregant analysis and inheritance of resistance to yellow vein mosaic disease in okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench). *Virus Dis.*, 34: 498-503. <https://doi.org/10.1007/s13337-023-00844-9>.
- Singh, M., S.P. Sharma, N.K. Sarao, S. Kaur & P. Chhuneja, 2020. Molecular mapping of nuclear male-sterility gene *ms-1* in muskmelon (*Cucumis melo* L.), *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 95(2): 162-168. <https://doi.org/10.1080/14620316.2019.1652119>.
- Singh, R. K., N. Rai, J. M. Lima, M. Singh, S. N. Singh & S. Kumar, 2015. Genetic and molecular characterisations of *Tomato leaf curl virus* resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 90 (5): 503-510. <https://doi.org/10.1080/14620316.2015.11668706>.
- Song, J., Z. Li, Z. Li, Y. Guo & L.J. Qiu, 2017. Next-generation sequencing from bulked-segregant analysis accelerates the simultaneous identification of two qualitative genes in soybean. *Front. Plant Sci.*, 8: 919. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00919>.
- Song, Z., J. Zhong, J. Dong, F. Hu, B. Zhang, J. Cheng & K. Hu, 2022. Mapping immature fruit colour-related genes via bulked segregant analysis combined with whole-genome re-sequencing in pepper (*Capsicum annuum*). *Plant Breeding*, 141 (2): 277-285. <https://doi.org/10.1111/pbr.12997>.
- Sreenivasa, V., S.K. Lal, P.K. Babu, H.K.M. Swamy, R.R. Yadav, A. Talukdar & D.R. Rathod, 2020. Inheritance and mapping of drought tolerance in soybean at seedling stage using bulked segregant analysis. *NIAB Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*: 1-8. <https://doi.org/10.1017/S1479262120000052>.
- Suematsu, K. & M. Tanaka, 2024. Mapping of a major locus involved in shoot growth habit in hexaploid sweetpotato using bulked-segregant analysis. *Euphytica*, 220: 48. <https://doi.org/10.1007/s10681-024-03308-3>.
- Şimşek Uçkun, M. & Z. Dalkılıç, 2022. Nar (*Punica granatum* L.)'da bitki boyu ile ilişkili bir RAPD belirteci. *ADÜ Ziraat Derg.*, 19 (2): 199-205. <https://doi.org/10.25308/aduziraat.1096352>.
- Teoman, S., M. Ipek, U. Erturk, N. Tangu, E. Durgut, E. Barut, S. Ercisli & A. Ipek, 2017. Assessment of genetic relationship among male and female fig genotypes using simple sequence repeat (SSR) markers. *Not. Bot. Horti. Agrobot. Cluj Napoca*, 45: 172-178. <https://doi.org/10.15835/nbha45110756>.
- Torrance, L., G.H. Cowan, K. McLean, S. MacFarlane, A.N. Al-Abedy, M. Armstrong, T.-Y. Lim, I. Hein & G.J. Bryan, 2020. Natural resistance to Potato virus Y in *Solanum tuberosum* Group Phureja. *Theor. Appl. Genet.*, 133: 967-980. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03521-y>.

- Vardar-Kanlıtepe, Ç., S. Aras & D. Cansaran-Duman, 2010. Bitki ıslahında moleküler belirteçlerin kullanımı ve gen aktarımı. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 67 (1): 33-43.
- Wallace, J. G., E. Rodgers-Melnick & E. S. Buckler, 2018. On the road to Breeding 4.0: unraveling the good, the bad, and the boring of crop quantitative genomics. *Annu. Rev. Genet.*, 52: 421-444. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120116-024846>.
- Wang, C. H., W. Li, Y. K. Tian, D. L. Hou & M. D. Bai, 2016. Development of molecular markers for genetic and physical mapping of the *PcDw* locus in pear (*Pyrus communis* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 91 (3): 299-307. <http://dx.doi.org/10.1080/14620316.2016.1155319>.
- Wang, J.-Y., J.-D. Chen, S.-L. Wang, L. Chen, C.-L. Ma & M.-Z. Yao, 2020. Repressed gene expression of photosynthetic antenna proteins associated with yellow leaf variation as revealed by bulked segregant RNA-seq in tea plant *Camellia sinensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 8068-8079. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01883>.
- Wang, X., L. Han, J. Li, X. Shang, Q. Liu, L. Li & H. Zhang, 2023. Next-generation bulked segregant analysis for Breeding 4.0. *Cell Reports*, 42 (9): 113039. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113039>.
- Yazıcı, K., B. Gönülkırılmaz & M. Şahin Çevik, 2023. Development of molecular marker linked to seed hardness in pomegranate using bulked segregant analysis. *Life*, 13: 1123. <https://doi.org/10.3390/life13051123>.
- Zhang, J. & D.R. Panthee, 2020. PyBSASeq: a simple and effective algorithm for bulked segregant analysis with whole genome sequencing data. *BMC Bioinformatics*, 21: 99. <https://doi.org/10.1186/s12859-020-3435-8>.
- Zhang, T., J. Liu, S. Liu, Z. Ding, F. Luan & P. Gao, 2019. Bulked-segregant analysis identified a putative region related to short internode length in melon. *HortScience*, 54 (8): 1293-1298. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI14052-19>.
- Zou, C., P. Wang & Y. Xu, 2016. Bulk sample analysis in genetics, genomics and crop improvement. *Plant Biotechnol. J.*, 1941-1955. <https://doi.org/10.1111/pbi.12559>.