



Tek Nükleotid Farklılıkları (Snp) ve Buğdayda Kullanımı

Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU^{1*}

Ahmet YILDIRIM²

Tuğba ESERKAYA GÜLEÇ¹

¹Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Moleküler Biyoteknoloji Laboratuvarı, TOKAT

²Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdağ Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, KARAMAN

*Sorumlu Yazar

e-posta: ozlemsonmezoglu@gmail.com

Özet

Bu çalışma son yıllarda kullanımı giderek artmakta olan Tek Nükleotid Farklılığı (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) markörlerinin tanımının yapılarak, sınıflandırılması, analiz metotları ve buğdayda kullanım alanlarının ortaya konulması amacıyla yapılmıştır. Ayrıca SNP markörünün diğer DNA markör tipleriyle karşılaştırılması da verilmiştir.

Anahtar kelimeler: Tek Nükleotid Farklılıkları, SNP, Markör, Buğday.

Abstract

This study is presented for defining and classifying of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) markers which increasingly used in recent years and for explaining the analysis methods and the use areas in wheat. In addition, comparison of SNPs with other marker types is also giving.

Key words: Single Nucleotide Polymorphism, SNP, Marker, Wheat.

GİRİŞ

Kalıtım şekilleri morfolojik, biyokimyasal ve DNA düzeyinde izlenebilen karakterlere genetik markör denir. Çalışılan organizmadaki ilgilenilen diğer özelliklerin genetiği hakkında bilgi sağlamaları nedeniyle bu karakterler markör olarak adlandırılmaktadır. DNA düzeyinde izlenebilen karakterlere DNA markörleri ya da moleküler markörler denir. Moleküler markörler DNA'nın aktif bölgelerinden (genler) veya herhangi bir genetik kodlama fonksiyonuna sahip olmayan DNA dizilerinden geliştirilebilirler.

DNA markörleri farklı mutasyon sınıflarının bir sonucu olarak ortaya çıkarlar. Bunun en basit örneği iki genotipi birbirinden ayıran tek bir nükleotidin (bazın) yer değiştirmesi kadar küçük bir farklılıktır. Tek bir bazın yer değişerek bir enzimin kesim noktasını değiştirmesi, DNA parçasının uzunluğunu değiştirerek ilgili gözlem metodunda direkt olarak bir bireyin genotipini temsil eden farklı bir markör ortaya çıkarır. Markörlerin gelecekteki jenerasyonlarıyla ilgili en önemli aday en sık rastlanan genetik varyasyon olan DNA dizini içindeki Tek Nükleotid Farklılığı'dır. Bu tip farklılıklar genellikle fenotipe yansızdır. Bazıları hastalıklara eğilim gibi çeşitli fenotipik farklılıklarla bağlantılı olabilir.

Dna Markörlerinin Sınıflandırılması

Bitki genomu çalışmalarında yaygın olarak kullanılan moleküler markörler şunlardır: RFLP, CAPS, STS, RAPD, SCAR, AFLP, SSAP, SSR, ISSR ve SNP. Bu markörler tekniğin temel ilkeleri, kullanım amaçları ve polimorfizm tipleri gibi çeşitli faktörler göz önünde bulundurularak sınıflandırılabilir. DNA markörlerinin mevcut tipleri Gupta ve ark. [20] tarafından aşağıdaki şekilde gruplandırılmıştır.

Hibridizasyona dayalı DNA markörleri (RFLP)

Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (Polymerase Chain Reaction, PCR) dayalı DNA markörleri (CAPS, STS, RAPD, SCAR, AFLP, SSAP, SSR, ISSR)

DNA çip ve sekanslamaya dayalı DNA markörleri (SNP)

Bu sınıflandırma markörlerin analizleri için kullanılan temel yöntem baz alınarak yapılmıştır. Gupta ve arkadaşları tarafından ileri sürülen bu sınıflandırma DNA markörlerinin gelişimini de yansıtmaktadır. Birinci grup markörler ilk geliştirilen ve çoğunlukla 1980'lerde kullanılan DNA markörleridir. 1990'larda PCR'ye dayalı markörler (ikinci grup) önem kazanmıştır. 2000'lerden bu yana mikroarray teknolojisine dayalı yeni bir generasyon olan SNP markörleri

(üçüncü grup) yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

DNA markörleri bireysel bir lokusu etiketlemek için (RFLP, CAPS, SCAR, STS, SSR, SNP) veya genom parmak izi çalışmalarında (RAPD, AFLP, SSAP, ISSR, southern hibridizasyonuna dayalı multilokus markörler) kullanılan markörler şeklinde kullanım amacına göre de sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırma da markörler, tek lokus (diploid genom başına tek lokus vardır kuralına dayalı olarak) ve çok lokus için (genomik DNA'nın sayısız fragmenti çoğaltılır) olmak üzere de ayrılmaktadır.

Üçüncü sınıflandırmaya göre (saptanan polimorfizm yoluyla), markörler mini ve mikrosatelit lokusunun peş peşe gelen tekrarlarının sayısında saptanan polimorfizm ile nükleotid ekleme, çıkarma ve delesyonlarını içeren DNA sekansları arasında saptanan polimorfizme göre sınıflandırılabilir [59].

Son yıllarda, sekanslanan cDNA kütüphanelerinde geliştirilen programlara bağlı olarak, ifade edilmiş dizi etiketlerinin (EST) 16.000 lokusdan fazlası delesyon ve aneuploid buğday hatları kullanılarak haritalanmıştır. Böylece buğday genomlarındaki fonksiyonel çalışmalar için temel oluşturulmuştur. Genetik markör analizleri için southern blot hibridizasyonuna dayalı EST uygulaması oldukça pahalı ve zaman alıcıdır. Bu nedenle EST'nin temelinde daha uygun olan SNP, STS ve SSR markörleri geliştirilmiştir. Son 20 yılda bitki genom analizlerinde moleküler DNA markörlerini kullanan tekniklerle ilgili daha detaylı bilgiler elde edilmiştir.

SNP markör tiplerinin analizleri özellikle DNA mikroarray kullanımı gibi yüksek işlem hacimli modern yaklaşımlara dayanmaktadır. Diğer DNA markör tipleriyle karşılaştırıldığında, SNP'nin kullanımı bu analizleri otomatikleştirebilmekte ve genotip analizlerinin etkinliğini artırmaktadır.

SnP'nin Tanımı ve Orijini

SNP en basit tanımla iki birey arasındaki belli bir DNA parçasındaki tek baz farklılıklarıdır. Bir popülasyondaki örnek bireyler arasında yüksek yer değiştirme (substitüsyon) oranı gösteren, bir nükleotid olarak da tanımlanabilir [60]. Brookes [7] tarafından yapılan farklı bir tanımlamaya göre SNP, (allel sıklığı en az % 1 veya daha fazla olan) bazı popülasyonlardaki normal bireylerde bulunan farklı sekans alternatifleri (alelli) genomik DNA'lardaki tek baz değişimidir.

Sıklıkla ortaya çıkan bu durum SNP'yi nadir nokta mutasyonlarından ayırır ve genetik markör olarak kullanımını daha uygun yapar. Bazı araştırmacılar bu tanımlamaya dayanarak SNP terimi altında bu iki polimorfizm tipini tek nükleotid substitüsyonu ile kombine etse de, SNP markörleri biçimsel olarak tek nükleotid ekleme veya çıkarımlarını içermez [14].

SNP'ler transisyonlar (bir pürin bazın "A, G" diğer bir pürin bazıyla veya bir pirimidin bazın "C, T" diğer pirimidin bazıyla değişmesi) ve transversiyonlar (bir pürin bazının bir pirimidin bazına değişimi veya tersi) gibi baz değişimlerini içermektedir. Transversiyonun farklı biçimlerinin sayısı (varyantlarının sayısı) transisyonun sayısının iki katından fazla olduğu halde, transisyon sıklığı (1.5-2.5 faktörü) transversiyonun sıklığından daha yüksektir. G>A ve C>T transisyonları, insan genomundaki SNP'lerin % 25'ini oluşturmaktadır. Tek nükleotid pozisyonundaki varyasyon terminolojisi allel frekansı ile açıklanmaktadır. Bir popülasyondaki tek baz değişiminin frekansı % 1'den büyük ise bu değişim SNP, % 1'den küçük ise mutasyon olarak adlandırılır.

Çok yakın akraba çeşitlerde SNP gibi markörlerin potansiyeli oldukça büyüktür. İnsan STMS (dizi tanımlı minisatelitler) lokusunun ortalama her birkaç 10 kb'de meydana geldiği hesaplanırken, SNP sıklığı ortalama her 100-300 bp (baz çifti)'de birdir. İnsan genomu yaklaşık 2.91 milyar baz çiftine ve 35.000 gene sahiptir. Tüm insanların baz diziliminin % 99.9'u birbirinin aynıdır. Gen dizilimindeki % 0.1'lik farklılık, yani varyasyon insanlar arasındaki çeşitliliğin genetik kökenini açıklar. İnsanlardaki % 0.1'lik farklılık bir insanı eşsiz kılar. Bu değişiklikler; zararsız (fenotipteki değişiklikler), zararlı (diyabet, kanser, kalp hastalığı, kansızlık) ya da gizli olabilir (kodlanan ve düzenleyici bölgelerde bulunan değişiklikler). Buldukları kişiye zarar vermezler. Her bir gendeki değişim belli koşullar altında görünür şekilde ortaya çıkabilir. Örneğin, kişinin akciğer kanserine dayanıksız olması gibi. İki akraba olmayan birey arasındaki 1250 bp'deki 1 farklılık toplam 2.3 milyon farklılık demektir. İnsan genomunda 10-30 milyon arasında SNP vardır.

SnP'nin Sınıflandırılması

Genomik DNA'nın yapısal elementleri ve fonksiyonel etkinlikleri göz önünde bulundurularak SNP'ler birkaç farklı sınıfa ayrılabilir. Bir gendeki SNP pozisyonuna bağlı

olarak, SNP'ler ekzon (eSNP), intron (iSNP) ve promotor SNP (pSNP¹) olarak sınıflandırılır (Şekil 1). Gen tezahürünü kontrol eden düzenleyici bölgeleri içeren oligonükleotid substitüsyonlar düzenleyici SNP ve rSNP olarak adlandırılır. Bunlar promotor SNP'leri ve bazı intron SNP'leri kapsar. Kodlanan bölgelerdeki SNP'ler proteinin yapısını değiştirebilirler.

Tek nükleotid substitüsyonunun fonksiyonel etkisi hakkındaki verilerin varlığına dayalı olarak SNP'ler anonim SNP (fonksiyonel etkisi bilinmiyor), aday (candidate) SNP (muhtemelen bir fonksiyonel etkiye sahip) ve protein SNP'leri (pSNP², protein fonksiyonunda ve ekspresyonunda bir değişime neden olan tek nükleotid substitüsyonları) olarak sınıflandırılır.

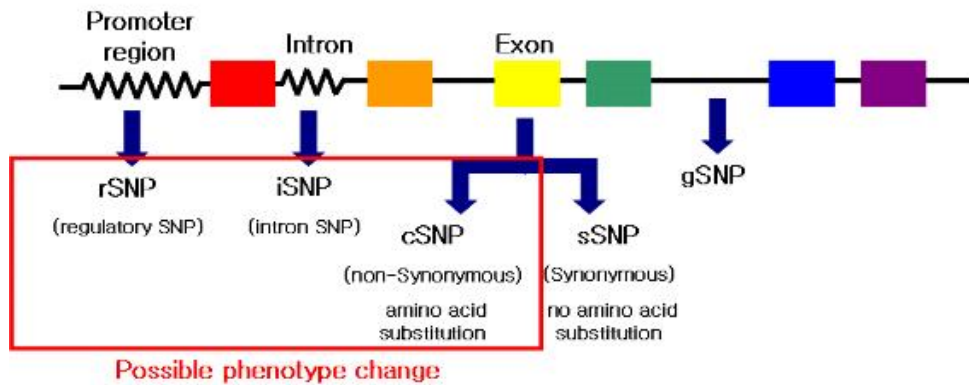
SNP'ler kodlanan ve çoğunlukla kodlanmayan bölgelerde bulunur. Örneğin; PCR ürünlerinin doğrudan sekanslanması kodlanmayan mısır bölgelerinde her 31 bç'de bir SNP keşfi ile sonuçlanmıştır. Bu sıklığın kodlanan bölgelerde daha düşük olduğu (124 bç'de 1) saptanmıştır [12]. Buğdayın kodlanan bölgelerinde ise her 540 bç'de bir SNP bulunmuştur [1].

SNP Markörlerinin Avantajları

Tek nükleotid polimorfizmi en yaygın DNA polimorfizm tipidir. Çok yüksek sıklıkla meydana gelirler (1/1000 baz- 1/100-300 baz). Örneğin buğday genomunda, SNP yoğunluğu 370 bç'de 1'den [45] 540 bç'de 1'e kadar [1, 53]. değişir. SNP'nin bu kadar çok olması ve kolay ölçülebilmesi, bu genetik farklılıkları önemli yapar. SNP lokusunun genomdaki yüksek varlığı, diğer genomik açıdan önemli bitki genleri yanında çeşitli hastalıklara dayanıklılık genlerinin

izolasyonu ve çalışılması için gerekli yüksek yoğunluklu temel moleküler genetik haritalar geliştirme imkanı sunar. Belli genlere yakın SNP'ler bu genler için bir markör olarak hareket ederler. SNP markörleri bu avantajlarından dolayı çeşitlerin ve hatların sertifikalandırılması için de yaygın olarak kullanılabilir. SNP'lerin temel avantajları iki başlık altında toplanabilir. Bunlardan ilki SNP'lerin sınırsız sayıda olmasıdır. Çok yüksek sıklıkla meydana gelirler. İnsan SNP veri tabanı dört milyondan fazladır. Mısırdaki her 104 bç'de ortalama bir SNP'nin olduğu [56], kendine döllen bir tür olan soya fasulyesinde ise her 273 bç'de bir SNP bulunduğu belirlenmiştir [63]. SNP'ler yüksek sıklığa sahip markörler olduğu için büyük potansiyele sahiptir. Örneğin markör destekli seleksiyonda (MAS) bir SNP lokusunda bulunan polimorfizm olasılığı düşük olsa bile, herhangi bir açılım durumunda doğru bölgede bilgi verici bir markör bulmak mümkündür. SNP'lerin ikinci temel avantajı ise analizlerinin jele dayalı olmaması ve otomasyona uygun olmasıdır. SNP analizleri için elektroforez gereksizdir. Markör analizlerinde hızı en sınırlayan aşama elektroforezle örneklerin koşulmasıdır. Bir SNP lokusundaki allelik varyasyon kalitatif ve allel sekanstaki belli bazların tespit edilmesi yoluyla belirlenir. Diğer moleküler markör tiplerinin çoğundaki varyasyon kantitatif ve amplikon büyüklüğündeki farklılık ile tespit edilebilir. SNP'lerin diğer DNA markörleriyle daha detaylı karşılaştırılması Tablo 1 ve 2'de verilmiştir [27].

Alternatif olarak jele dayalı olmayan analizler standart PCR primerine, sekansları SNP'nin etrafını saran flüoresan işaretli oligonükleotid problemlerinin eklenmesi aracılığıyla düzenlenebilir.



Şekil 1. Gendeki pozisyonuna bağlı olarak farklı SNP çeşitleri

Bu durumda, bir primer standart tipi tanıırken diğer primer değişiklik gösteren sekansı tanımak için dizayn edilir. Eğer bu iki primer farklı florokromlar (floresan boyalar) ile işaretlenirse o zaman başka kalıplardan (template) elde edilen ampliconlar flüoresan renkleriyle ayırt edilebilir. SNP'nin belirlenmesi pahalı bir işlemdir ve bitkilerde buğdayda başlamıştır. Potansiyeli çok büyük ve gerçekte sınırsız sayıdadır. Bir SNP lokusundaki allelik varyasyon kalitatif ve sekanstaki belli bazların tespit edilmesi yoluyla

belirlenir [28]. Ancak, doğru bir SNP için olası allellerin sayısı sınırlıdır. A T dönüşümü, A G dönüşümünden çok daha sıktır.

Snp Markörlerinin Analiz Metodları

1980 yılından bu yana beri SNP'lerin taranmasını kolaylaştırmak için pek çok karmaşık metod geliştirilmiştir. SNP analiz metodları enzimatik bölünmeye, allel spesifik problemlerin oligonükleotid bağlanmasına ve tek nükleotid primer ilavesi ile hibridizasyonuna

Tablo 1. Bazı DNA polimorfizm analizlerinin karşılaştırılması

Markör	Bireysel bir lokusu işaretleme	Multilokus markörler	Asıl analiz metodu	Analiz maliyeti	Çeşitli arası polimorfizmi	Buğday genomundaki sıklığı
RFLP	+	-	Hibridizasyon	Yüksek	Düşük	Yüksek
SSR	+	-	PCR	Orta	Yüksek	Yüksek (1/10000 bc)
SNP	+	-	20 farklı yöntem	Değişken	Yüksek	Çok yüksek (1/500 bc)
RAPD	Dönüşümden sonra	+	PCR	Düşük	Düşük	Çok Yüksek
AFLP	Dönüşümden sonra	+	PCR	Orta	Orta	Yüksek
ISSR	Dönüşümden sonra	+	PCR	Düşük	Nispeten yüksek	Yüksek

Tablo 2. Bazı DNA markör tiplerinin karşılaştırılması

Markör	Sayılabilir bant	Otomasyona uygunluk	Kodominant	Aktif genleri bulma	Karşılaştırmalı haritalama
RFLP	1-2	-	+	+/-	+
RAPD	5-15	-	-	-	-
SSR	1-15	+	+	+/-	-
AFLP	30-70	+	-	-	-
SNP	1-1500	+	+	+	+

bağlıdır. Farklı tanıma ve çözünürlük metotları kullanılabilir. Allel spesifik amplifikasyonlar, ligaz zincir reaksiyonu, heterodupleks analizler, dideoksi sekanslama, pyrosekanslama, tek nükleotid primer ekleme, Real-time PCR analizleri ve mikroarray tarama pratikte uygulanan SNP analizi seçeneklerinden bazılarıdır [39, 55].

Model bitki türleri ve az sayıda bitki türü haricindeki bitkiler için mevcut SNP sayısı hala düşüktür [6]. Son yıllarda yüksek teknolojiye sahip SNP genotipleme methodu *Arabidopsis* [17, 52], grapevine (*Vitis vinifera*) [33, 44], spruce (*Picea glauca* and *Picea mariana*) [42] ve soya fasulyesinde (*Glycine max*) [24] kullanılmıştır. Buğdayda SNP veritabanı vardır [21], ancak henüz sınırlı sayıda çalışma vardır.

Multiallelik markörlerin aksine biallelik SNP markörleri pratik olarak tamamen otomatikleştirilebilir. Birkaç bin SNP, DNA mikroarray uygulamasıyla eş zamanlı olarak analiz edilebilir. Bu yüzden modern teknoloji kullanan SNP analizlerinin etkinliği, çok fazla zaman alan diğer DNA analizi metotlarından çok daha yüksektir. Ayrıca diğer DNA polimorfizm çeşitlerinin hiçbiri, SNP gibi çeşitli ve çok sayıda analiz metoduna sahip değildir (Tablo 3). Bundan dolayı, SNP markörleri farklı finansal seviyedeki projelerde kullanılabilir. Çok sayıda analiz metoduna sahip olan SNP markörleri çoğunlukla; dizi analizi, dHPLC (denatüre eden yüksek performanslı sıvı kromatografisi), *Cell* enzimi, Mass spektrofotometre ve mikroarray ile izlenmektedir. SNP analiz yöntemleri bilinen ve bilinmeyen SNP'lerin tespiti için kullanımına göre sınıflandırılabilir.

1) Bilinen SNP'leri tespit etme teknikleri;

Hibridizasyona dayalı teknikler

a) Mikroarray

b) Real time PCR

Enzime dayalı teknikler

a) Nükleotid ilavesi

b) Kesme (Cleavage)

c) Bağlanma (Ligation)

d) Reaksiyon ürünü saptama ve gösterim

2) Yeni (bilinmeyen) SNP'leri saptama teknikleri;

2.1. Direk DNA Sekanslaması

2.2. Mikroarray

2.3. Kesme / Bağlanma

2.4. Konformasyona dayalı mutasyon tarama

2.5. Elektroforetik hareket analizleri

PCR-RFLP, CAPS, CFLP, AS-PCR (allel spesifik PCR), AS RT-PCR (allel spesifik RT-PCR), Oligonükleotid bağlanma analizleri (OLA), Kolorimetrik OLA, Mikroçipde OLA, Padlock, RCA (Rolling circle amplification), Mini sekanslama, ReadIt, Mikroarray miniseq, Good asay, Pyrosequencing, SSCP (Tek iplik konformasyon polimorfizmi), DHPLC-TMHA, Invader, TaqMan, Oligonükleotid çiplerinde hibridizasyon, DASH, Moleküler işaret ışığı gibi çok sayıda farklı SNP analiz metotları mevcuttur [27]. Bu analiz yöntemlerinin gerekli teçhizatlar, işlem hacmi ve maliyet açısından farklılık göstermektedir.

Bitkilerde Snp Markörü Geliştirme Stratejileri

Genetik varyasyon SNP'ler ile kolaylıkla belirlenebilmektedir. Bu insanda yaklaşık 1:1000 bç frekansı ile en bol bulunan polimorfizmdir. SNP'ler genellikle iki allel içerir, ancak yüksek işlem hacimli otomatik ve güvenilir teknolojilere fazlasıyla uygundur. SNP analizlerinin ilk aşaması, direkt olarak sekanslamaya (DNA sekansları mevcut olmayan türlerde) veya slico (bilgisayar ortamında) karşılaştırmalara dayalıdır. İkinci aşama ise çeşitli teknolojilerle (mikroarray) yürütülen genotiplerin belirlenmesi işlemidir [48].

Temel olarak, tek nükleotid alanlarındaki DNA polimorfizm analizlerinde tamamen yeni bir şey yoktur. Örneğin; sınırlandırılmış parçacık uzunluğu polimorfizmi (RFLP) de tek nükleotid substitüsyonuna dayanmaktadır. Genomik ve cDNA kütüphanelerinde (EST sekansları) çıkan DNA sekansları slicoda tek nükleotid substitüsyonunun tespiti için olanak sağlamaktadır. Bu olasılık SNP markörlerinin geniş skalada geliştirilmesini kolaylaştırmaktadır. Genellikle SNP markörlerinin geliştirilmesi aşağıdaki aşamaları içermektedir.

Genomik DNA sekanslarının örtüşmesine dayalı olarak SNP markörü geliştirme [37]: Bu metot ekstra DNA sekanslaması gerektirmez, bu nedenle büyük çaplı SNP markörü üretiminde avantajlıdır. Ancak, şu andaki kullanımları sadece *Arabidopsis* ve çeltik gibi genomu tamamen ya da neredeyse tamamen sekanslanan sınırlı sayıda model organizma için mümkündür.

EST sekanslarının örtüşmesine dayalı olarak SNP markörü geliştirme [43]: Bu yaklaşım mısır [5, 58], arpa [29, 30], buğday [53] ve domatesi

[54] içeren belli organizmalarda geniş çapta SNP markörü üretmede (ekstra DNA sekanslaması yapmadan) kullanılır. Bazı durumlarda, örnek olarak *Arabidopsis* için yapıldığı gibi [50] EST'ye dayalı SNP üretmeden önce örtüşen cDNA kütüphaneleri geliştirilir. Bu yaklaşımın püf noktası, diğer SNP'ler arasında cSNP'nin (kodlanan SNP) tespit edilmesini büyük oranda mümkün kılmıştır.

Örtüşmeyen genomik ve EST sekanslarına dayalı olarak SNP markörü geliştirme: İlk iki yaklaşımın aksine bu metod birkaç çeşitte ekstra DNA sekanslaması gerektirdiği için hızlı ve geniş çaplı SNP markörü üretiminde kullanılamaz. Ancak, veri tabanlarındaki eksik veriler bazı sekanslarla örtüştüğünde, tamamlanmış genom sekansı bulunmayan organizmalar için SNP geliştirmede yardımcı olarak kullanılabilir. EST sekanslarının kullanımı kodlanmayan genom bölgelerinde meydana gelen çok sayıda anonim SNP'yi bir tarafa bırakarak kodlanan SNP'lerin bulunmasını sağlar.

RFLP, STS, CAPS ve diğer markörlerin temelinde dayalı olarak SNP markörü geliştirme: Bu yaklaşım belirli genleri etiketlemek için hedeflenen SNP markörlerinin üretimini amaçlamaktadır. Tek nükleotid polimorfizmi moleküler markörlerin (tekrarlanan sekans polimorfizmine dayalı olanlar hariç) pek çok bilinen çeşidinin temelinde vardır. Örneğin, restriksiyon tanıma alanlarındaki tek nükleotid ekleme ya da çıkarımı RFLP ve CAPS gibi DNA polimorfizmlerini oluştururken, restriksiyon alanlarına çok yakın (bitişik) nükleotidlerin yer değiştirmesi AFLP polimorfizmlerine neden olur. PCR primerlerinin yapışma alanlarındaki tek nükleotid değişimi, eklemesi ya da çıkarımı rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA'yı (RAPD) meydana getirir. Bu nedenle yukarıda sayılan polimorfizm tiplerinin hepsine (AFLP, CAPS, RFLP, RAPD) tek bir nükleotid çiftindeki polimorfizm neden olur. Yalnızca analiz yöntemleri farklıdır. Bu metodlardan hiçbirinin otomatikleştirilememesi bu moleküler markörlerin geniş çaplı pratik uygulamalarını kısıtlar. Ancak bu markörlerin SNP'ye dönüştürülmesi zaman alıcı ve pahalı işlemler gerektirir. Bu nedenle RFLP, CAPS ve diğer markörlerin SNP'ye dönüştürülmesine gerek yoktur. Ancak, belli genlerle sıkıca bağlı belirli DNA markörlerinin temelinde dayalı olarak SNP'ler geliştirmek mantıklıdır. AFLP'ye dayalı SNP markörü geliştirilmesi patates için

gerçekleştirilmiştir [9]. STS markörlerinin SNP'ye dönüşüm olasılığı *Arabidopsis* [50] ve arpada [26] incelenmiştir.

Domates genomunda polimorfizmin saptanması ve haritalama için AFLP, SSR ve SNP markörleri kullanılmaktadır. *Lycopersicon esculentum* ve *L. pennellii*'nin DNA sekanslarının (EST ve genler) slico karşılaştırmalarında 312 adet SNP elde edilmiştir. *L. pennellii* genomik parçasının sekanslanarak *L. esculentum* ile karşılaştırılması 22 SNP vermiştir. *L. pennellii* genomik DNA'sının *L. esculentum*'un SSR'lerini içeren DNA parçacıkları ile karşılaştırılması ve sekanslanması ile diğer 19 SNP bulunmuştur. Domateste SNP'lerin tespit edilmesi üç yöntemle gerçekleştirilmiştir. İlk olarak *L. esculentum*'un (Curagene.com'da mevcut Blast yazılımı kullanılarak) sekans verileri ile *L. pennellii*'den elde edilen EST'lerin silico karşılaştırılması ile en az % 98 homoloji ile 100 bç'lik bölgede bir SNP tanımlanmıştır. Bu prosedürde, 50 EST'nin analizi 1:61 bç sıklıkla 312 SNP vermiştir. İkinci yöntemde *L. pennellii*'nin genomik DNA parçacıkları *L. pennellii*'nin EST'lerinden elde edilen primerlere dayalı olarak direkt sekanslanmış ve *L. esculentum* verileriyle karşılaştırılması ile 1:92 bç sıklıkla 22 SNP elde edilmiştir. Kullanılan başka bir metod da ise mikrosatelit içerdiği bilinen bir *L. esculentum* sekansının primer kaynağı olarak kullanımı ile *L. pennellii*'nin genomik DNA'sı sekanslanmış ve *L. pennellii* DNA'sı ile 17 parçacık başarılı bir şekilde çoğaltılmıştır. Bu parçacıkların beşinin *L. esculentum* ile yeterli homolojiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu yöntem ile 1:22 bç'lik sıklıkla 19 SNP bulunmuştur [48].

Buğdayda SNP Markörü Geliştirme

SNP'nin tahıllardaki bolluğu, bu markör tipini yüksek yoğunluktaki genetik haritalar yapmada oldukça önemli yapmaktadır. Veri tabanları ilgilenilen genlerin veya frekansların SNP analizlerinin tasarlanmasını mümkün kılmaktadır. SNP'nin bulunması ve değerlendirilmesi ile ilgili projeler mısır (<http://www.agron.missouri.edu/>) ve buğdayda (<http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/wheatSNP>) devam etmektedir. Buğday EST sekanslarından SNP'lerin tespiti Uluslararası Buğday SNP Birliğinde yaygın biçimde yapılmaktadır. Pyrosekanslama tahıllarda sık sık kullanılmaktadır [1, 12, 41]. Bu metod çoğunlukla mikrosatelit markörlerini

çevreleyen bölgelerdeki SNP'lerin keşfi ve genomlar ya da varyeteler arasındaki polimorfizmin saptanmasına öncülük eden EST veri tabanlarındaki SNP'lerin saptanması için kullanılmaktadır [1]. g-gliadin genlerinde çok sayıda SNP tespit edilmiş [62] ve allel spesifik amplifikasyon yaklaşımı kullanılarak araştırılmıştır. Bölünerek çoğaltılmış polimorfik diziler (CAPS) metodu [40] ekmeçlik buğday geni *Wx-D1* [61] için SNP bulmada kullanılmıştır. Bununla birlikte doğrudan sekanslama yöntemi ise, arpa P450 sitokrom geninde SNP tespitinde kullanılmıştır [10]. Genlerdeki SNP fenotipteki bir değişim ile sonuçlanabilir. Bu nedenle bitkinin kodlanan sekanslarındaki SNP'lerin bulunması, otomasyona dayalı bir teknik olmasından ötürü moleküler ıslahı önemli derecede hızlandırabilir [28].

Belirli bir fenotip ile ilgili lokusları tanımlamada başarı ile kullanılan SNP'ler DNA polimorfizminin bol bir kaynağı olmayı sürdürmektedir. Bununla birlikte böyle markörler ıslah programlarının etkinliğini geliştirmek için double haploid teknolojileriyle birlikte etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Ancak bitkilerde bu tip markörlerle ilgili hala oldukça az çalışma mevcuttur [47]. Buğdayda SNP ile ilgili çalışmalarda yetersizlik buğdayın geniş genom büyüklüğünden ve poliploid yapısından kaynaklanmaktadır. Ayrıca SNP'nin keşfinin buğdayda zor olmasının nedenlerinden biri de allelik sekans varyasyonları, homoeolog (A, B ve D genomlarındaki gen kopyaları arasında bulunan farklılıklar) ile paralog varyasyonların (belli bir genomda bulunan duplike kopyalardaki farklılıklar) karıştırılabilmesidir [47].

Pirinç genomundan yaklaşık 40 kat, insan genomundan yaklaşık 5 kat büyük olan hekzaploid buğdayın (*Triticum aestivum*, AABBDD) genom büyüklüğü 16×10^9 (16 milyar) bç'dir [4]. Büyük ticari önemine rağmen buğday genomunun tam sekanslanması halen tamamlanamamıştır. Bu nedenle genomik sekans örtüşmesine dayalı olarak SNP markörü üretme buğday için şimdilik çok zordur. Shotgun aracılığıyla SNP geliştirme buğday genomunun çok büyük olmasından dolayı askıdadır [2]. Yinede buğday genomu konusunda çok sayıda çalışma yürütüldüğü için buğdayın fazla miktarda EST sekansları toplanmıştır. Buğdayda SNP geliştirme yöntemlerinden biri örtüşen EST sekanslarının silico analizlerine dayalı ve ilave yöntem olarak eşsiz EST sekanslarına

(örtüşmeyen) dayalı metottur. Ayrıca çok sayıda çalışma, bilinmeyen nükleotid sekansları veya hedef genle sıkı bir şekilde bağlı olduğu bilinen RFLP, CAPS, RAPD ve diğer DNA markörlerine dayanarak belli buğday genleri için SNP markörleri üretme hedefine odaklanmıştır.

Şimdiye kadar ekmeçlik buğday (*T. aestivum*) için 1,109,486 EST sekansı tanımlanmıştır [3]. Bu veri tabanının bulunması mikrosatelit (SSR) [17, 18] ve SNP [45, 53] gibi moleküler markörlerin geliştirilmesini kolaylaştırmıştır. Böylece kodlanan genom bölgelerine ait markörler büyük oranda saptanmıştır. Bundan dolayı, EST'ye dayalı SSR ve SNP'lerin haritalanması doğal olarak ekstra fenotipik veya biyokimyasal analizler olmaksızın belli genlerin haritalanmasına öncülük etmektedir. Farklı buğday genotiplerinden elde edilen veri tabanlarındaki buğday EST sekansları hem tek (eşsiz) EST'leri hem de örtüşen EST'leri kapsamaktadır. Her ikisi de SNP markörü elde etmede kullanılmaktadır [32, 53]. Buğdayda SNP markörü geliştirmeye yönelik uluslararası bir proje 2002 yılında başlamıştır. SNP markörlerine ait veriler bu projenin web sitesinde mevcuttur (<http://wheat.pw.usda.gov/ITMI/wheatSNP/index.html>).

Örtüşen EST sekanslarına dayalı olarak slicoda SNP üretiminin ilk aşamasında farklı genotiplerden elde edilen sekanslar sıraya dizilir. Sıralama doğru SNP'lerin bulunması (farklı genotipler arasındaki farklı nükleotid farklılıkları) yanında cDNA kütüphanesi oluşturmada kullanılan örneklerin heterozigot olmasından kaynaklanan bir polimorfizmin veya genom içindeki paralog sekansların polimorfizminin saptanmasına da izin verir. Hekzaploid buğdayda, durum bir genotipte 3 homoeolog (homolog olmayan) genom varlığı ve dolayısıyla çok sayıda homolog sekansın bulunması nedeniyle karmaşıktır. Bu nedenle poliploid bir genomun EST sekanslarının sıralanması ile bulunan tek nükleotid polimorfizmlerinin yalnızca bazıları doğru SNP'yi verir. Kalanları homoeolog sekans varyantlarıdır (HSV). Ekmeçlik buğdayda HSV ve SNP oranı sırasıyla 24 bç'de bir ve 540 bç'de birdir (Somers ve ark., 2003). Benzer EST sekansları homoeolog ve paralog gruplara sınıflandırılmıştır. SNP'nin karşılığı olanın 3' ucuyla, HSV'ye en yakın olanın 3' ucunun bir primer çifti oluşturması için yapılan amplifikasyon SNP'nin HSV'den

ayrıt edilmesini sağlar. Somers ve ark [53]'a göre EST buğday sekanslarını temel alarak SNP geliştirmenin etkinliği 10-60 EST başına bir SNP markörüdür. Bu nedenle, mevcut buğday veri tabanlarındaki EST sekanslarına dayalı olarak, 10.000-40.000 SNP markörü geliştirilebilir.

Mochida ve ark. [38] yaptıkları çalışmada pyrosekanslama ve nullitetrazomik hatlar kullanarak bulunan SNP'lerin bazılarını (270) belirli kromozomlara yerleştirmişlerdir. Araştırmacılar pyrosekanslamanın poliploid genomların SNP analizlerinde çok yararlı olduğu sonucuna varmışlardır.

EST örtüşmesinin slicoda tespit edilmesiyle SNP elde edilmesi konusundaki çalışmalar, benzersiz (unique) EST sekanslarına dayalı olarak üretilen SNP markörleriyle tamamlanır. Farklı çalışmalarda bulunan SNP'ler mini sekanslama yapılarak onaylanmıştır [32, 45]. Bu SNP'lerden 85'i Invader analiz sistemi aracılığıyla 15 buğday aksesyonunun genotiplerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları bu metodun işlem hacminin oldukça yüksek olduğunu ve SNP'nin heksaploid buğday aksesyonları genotiplerinin belirlenmesi için çok uygun olduğunu göstermiştir [45].

Ravel ve ark. [46], ekmeklik buğdayda SNP'nin keşfi için yeni bir metod geliştirmişlerdir. Yüksek derecede spesifik PCR primerlerinin geliştirilmesine dayalı strateji için 27 hattın sekansları kullanılmış ve SNP'ler sekans dizi verileriyle bulunmuştur. Çalışma sonunda yaklaşık 200 kbç içinde 89 SNP (ortalama her 223 bç'de 1 SNP) bulunmuştur.

Son yıllarda buğdayda SNP'lerin tespit edilmesi amacıyla kullanılan tekniklerin başında SnuPE (tek nükleotid primer uzaması) metodu gelmektedir. Bu teknikte öncelikle spesifik primerler kullanılarak PCR aracılığıyla SNP içeren genom bölgeleri çoğaltılır. Bu kalıp daha sonra tek bir baz uzama reaksiyonuna maruz bırakılır. Bir tespit edici primer 3' ucundaki nükleik asit sekansına yapışır. Daha sonra bu primer ddNTP floresan boyası katılan tek bir baz tarafından uzatılır. Her bir ddNTP için farklı etiketler kullanarak birleşen spesifik nükleotidler tespit edilir. DNA sekanslama ajanları floresan ddNTP ile sonlandırılmış SnuPE primerlerinin hassas bir şekilde tespit edilmesini sağlar. Kapilary jel elektroforezi kullanılarak analiz gerçekleştirilir.

Buğdayda Snp Markörü Kullanım Alanları

Tek nükleotid farklılıkları ve küçük ekleme/ çıkarmalar pek çok organizmanın genomundaki DNA sekans değişikliklerinin içinde en bol bulunanlarıdır. Bu nedenle SNP'ler genetik haritalama, popülasyon genetiği ve genotip/fenotip bağlantı çalışmaları için oldukça faydalı markörlerdir. Ayrıca bu markörler yüksek işlem hacimli otomatik analiz metodlarıyla birlikte kullanılabilir. Bu nedenle bu yeni markör, bitki ıslahında markör destekli seleksiyon (MAS) protokollerinde seleksiyon etkinliğini geliştirmek için çok ümitvar bir araçtır. Ancak *Arabidopsis*, mısır ve soya fasulyesi dışındaki bitki genomlarındaki SNP verileri oldukça sınırlıdır. Her 104 bç'de ortalama bir SNP'ye sahip mısırın yüksek derecede polimorfik olduğu düşünülmektedir [56]. Kendine döllen bir tür olan soya fasulyesinde ise her 273 bç'de bir SNP vardır [63].

SNP'ler özellikle insanlarda kompleks genetik hastalıklardan sorumlu genlerin bulunması ile ilgili bağlantı çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır [64]. Ayrıca insan evrim araştırmalarında [22], bağlantı çalışmalarında [16, 36] ve farmogenetikte [19] yoğun olarak kullanılmaktadır. SNP haritaları günümüzde özellikle insan hastalıklarıyla ilgili projelerde yoğun olarak kullanılmaktadır.

SNP'lerin bitkilerdeki yaygın kullanım alanları ise şunlardır:

- Gen keşfi ve haritalanması
- Bağlantı temelli aday polimorfizm testi
- Tanısal / risk profillemesi
- Tepki tahmini
- Homojenite testi
- Genin fonksiyonunun tanımlanması
- Markör destekli seleksiyonBağlantı / ilişkilendirme çalışmaları
- Genotiplerin belirlenmesi
- Heterozigotluğun kaybı
- DNA kopya sayısının belirlenmesi
- Genetik haritalama, popülasyon genetiği ve genotip/fenotip bağlantı çalışmaları
- Önemli kalite kriterlerinin tespitinde SNP markörleri kullanılmaktadır.

Belli bir gen veya gen dizisi için SNP kullanımı ile ilgili çalışmaların bir örneği, tek nükleotid yer değiştirmesine bağlı olarak geliştirilen, γ -gliadin genlerinde (*Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1*) bulunan SNP markörleridir.

Bunlar buğdayda ekmek kalitesinden sorumlu ve gliadin genlerine sıkı bir şekilde bağlı olan glutenin genleri (*Glu-A3*, *Glu-B3*, *Glu-D3*) allellerinin etiketlenmesi için kullanılabilir [62]. Clarke ve ark. [15], buğdayda düşük moleküler ağırlıklı gliadin alt ürünlerini kodlayan genlerin haritalanması için SNP'ler geliştirmiş ve kullanmışlardır. Farklı araştırmacılar da buğdaydaki glutenin genleri için SNP markörlerini bildirmişlerdir [51]. SNP'ler HMW glutenin alt ünitelerinin saptanmasında [51] ve tane sertliğini belirleyen puroindoline geninin saptanmasında kullanılmaktadır [23]. Yanagisawa ve ark. [61] yaptıkları araştırmada buğdayda waxy karakterini kontrol eden genlerle ilgili SNP markörleri tespit ederek kullanmışlardır.

SNP'ler hastalıklara dayanıklılığın tespitinde de oldukça kullanışlıdır. Brooks ve ark. [8], ekmeklik buğdayda büyük ekonomik zarara neden olan yaprak pasına (*Tilletia indica mitra*) dayanıklılığın tespit edilmesinde SNP markörlerini kullanmışlar ve SNP'ye dayalı olarak geliştirilen tek bir mikrosatelit markörü kullanarak dayanıklı genotipleri belirlemişlerdir. Scherrer ve ark. [49], haploid bir buğdayda yaprak pasına direnci kontrol eden, *Lr10* geninin amplifikasyonu için bir SNP markörü kullanmıştır. Bir diğer araştırmada mini sekanslama kullanılarak *Lr1* yaprak pasına dayanıklılık genine sıkıca bağlı SNP markörleri gözlemlenmiştir [57].

Pek çok durumda, belli bir geni işaretlemek için kullanılabilen tek bir nükleotid polimorfizminin bulunması RFLP ve CAPS analizlerine dayanmaktadır. Örneğin; birbirine sıkıca bağlı RFLP ve CAPS markörleri geliştirilmiş ve buğday yaprak pasına dayanıklılık geni *Lr19* ve *Lr47* [11, 35], buğday küllemesine dayanıklılık geni *Pm4a* [34], buğday vernalizasyonuna hassaslık geni *Vrn-B1* [25] ve buğday waxy karakteri *Wx-B1* [61] için kullanılmıştır.

Kozlova ve ark. [31], ekmeklik buğday ve yakın akraba türlerinin genetik kaynaklarının analizleri için SNP markörlerinin etkinliğini belirlemek amacıyla yürüttükleri çalışma sonucunda, SNP markörlerinin karşılaştırmalı haritalamaya oldukça uygun olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca ekmeklik buğday için geliştirilen SNP markörlerinin Tetraploid buğday (*T. timopheevii* ve *T. militinae*) ve çavdar gibi yakın akraba türlerde de kullanılabileceğini

bildirmişlerdir. SNP markörleri genetik farklılıkların tespit edilmesinde de yaygın olarak kullanılmaktadır [13, 39].

SONUÇ

Bu çalışmada SNP markörlerinin genel özellikleri ve diğer markörlerle karşılaştırmaları verilmiştir. Günümüzde insan genetiğinde oldukça yaygın bir kullanım alanına sahip olan SNP markörlerinin kullanımı bitkilerde de giderek artmaktadır. SNP'nin tahıllardaki bolluğu bu markör tipini oldukça kullanışlı ve avantajlı yapmaktadır. SNP'nin avantajlarının başında çok sayıda analiz seçeneğine sahip olması gelmektedir. Böylece bu analiz teknikleri içerisinden yapılacak olan çalışmalarda işgücü ve maliyet açısından uygun olanı seçilerek kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Ablett GA, Karakousis A, Banbury L. 2003. Application of SSR Markers in the Construction of Australian Barley Genetic Maps. Australian Journal of Agricultural Research, 54: 1187-1195.
- [2] Altshuler D, Pollara VJ, Cowles CR. 2000. An SNP Map of the Human Genome Generated by Reduced Representation Shotgun Sequencing. Nature, 407: 513-516.
- [3] Anonymous. 2009. Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) GenBank dbEST database. <http://wheat.pw.usda.gov/genome>.
- [4] Arumuganathan K and Earle ED. 1991. Estimation of Nuclear DNA Content of Plants by Flow Cytometry. Plant Mol. Biol. Rep., 9: 208-218.
- [5] Batley J, Barker G, O'Sullivan H. 2003. Mining for Single Nucleotide Polymorphisms and Insertions/Deletions in Maize Expressed Sequence Tag Data. Plant Physiol., 132: 84-91.
- [6] Bérard A, Le Paslier MC, Dardevet M, Exbrayat-Vinson F, Bonnin I, Cenci A, Haudry A, Brunel D and Ravel C. 2009. High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping in wheat (*Triticum* spp.). Plant Biotechnology Journal, 7(4): 364-374.

- [7] Brookes A. 1999. The Essence of SNPs. *Gene*, 234: 77-186.
- [8] Brooks SA, See DR, Guedira GB. 2006. SNP Based Improvement of a Microsatellite Marker Associated with Karnal Bunt Resistance in Wheat. *Crop Science*, 46(4): 1467-1470.
- [9] Brugmans B, van der Hulst RGM, Visser RGF. 2003. A New and Versatile Method for the Successful Conversion of AFLP Markers into Simple Single Locus Markers. *Nucl. Acids Res.*, 31: 55-57.
- [10] Bundock PC, Christopher JT, Eggler P. 2003. Single Nucleotide Polymorphisms in Cytochrome P450 Genes from Barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(4): 676-682.
- [11] Chelkowski J, Golka L and Stepień L. 2003. Application of STS Markers for Leaf Rust Resistance Genes in Near-Isogenic Lines of Spring Wheat Cv. Thatcher. *J. Appl. Genet.*, 44: 323-338.
- [12] Ching A and Rafalski A. 2002. Rapid Genetic Mapping of ESTs Using SNP Pyrosequencing and Indel Analysis. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 7(2B): 803-810.
- [13] Chao S, Zhang W, Akhunov E, Sherman J, Ma Y, Luo MC and Dubcovsky J. 2009. Analysis of gene-derived SNP marker polymorphism in US wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Molecular Breeding*, 23: 23-33.
- [14] Cho RJ, Mindrinos M, Richards DR. 1999. Genome-Wide Mapping with Biallelic Markers in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.*, 23: 203-207.
- [15] Clarke BC, Phongkham T, Gianibelli MC. 2003. The Characterisation and Mapping of a Family of LMW-Gliadin Genes: Effects on Dough Properties and Bread Volume. *Theor. Appl. Genet.*, 106: 629-635.
- [16] Colomb E, Nguyen TD, Bechetoille A. 2001. Association of a Single Nucleotide Polymorphism in the TIGR/MYOCILIN Gene Promoter with the Severity of Primary Open-Angle Glaucoma. *Clinical Genetics*, 60(3): 220-225.
- [17] Drouaut J, Mercier R, Chelysheva L, Bérard A, Falque M, Martin O, Zanni V, Brunel D and Mézard C. 2007. Sex-specific crossover distributions and variations in interference level along *Arabidopsis thaliana* chromosome 4. *PLoS Genet.*, 3: 1096-1107.
- [17] Gandon B, Cerrutti L, Chiquet V. 2002. Development of Microsatellite Markers from Annotated-EST-Sequences Database in Wheat. ITMI Publ. Workshop, Winnipeg, p. 4.
- [18] Gao LF, Jing RL, Huo NX. 2004. One Hundred and One New Microsatellite Loci Derived from ESTs (EST-SSRs) in Bread Wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 108: 1392-1400.
- [19] Goldstein DB, Tate SK, Sisodiya SM. 2003. Pharmacogenetics Goes Genomic. *Nat. Rev. Genet.* 4: 937-947.
- [20] Gupta PK, Varshney RK, Sharma PC and Ramesh B. 1999. Molecular Markers and Their Applications in Wheat Breeding. *Plant Breeding*, 118: 369-390.
- [21] Gupta PK, Mir RR and Kumar J. 2008. Wheat genomics: present status and future prospects. *Int. J. Plant Genomics*, 896451.
- [22] Hammer MF, Karafet TM, Redd AJ, Jarjanazi H, Santachiara-Benerecetti S, Soodyall H, Zegura SL, Hammer MF. 2001. Hierarchical Patterns of Global Human Y-Chromosome Diversity. *Mol. Biol. Evol.* 18: 1189-1203.
- [23] Huang XQ and Röder MS. 2005. Development of SNP Assays for Genotyping the Puroindoline b Gene for Grain Hardness in Wheat Using Pyrosequencing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 2070-2075.
- [24] Hyten DL, Song Q, Choi IY, Yoon MS, Specht JE, Matukumalli LK, Nelson RL, Shoemaker RC, Young ND and Cregan PB. 2008. High-throughput genotyping with the GoldenGate assay in the complex genome of soybean. *Theor. Appl. Genet.*, 116: 945-952.
- [25] Iwaki K, Nishida J, Yanagisawa T. 2002. Genetic Analysis of *Vrn-B1* for Vernalization Requirement by Using Linked DCAPS Markers in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 104: 571-576.
- [26] Kanazin V, Talbert H, See D. 2002. Discovery and Assay of Single-Nucleotide Polymorphisms in Barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Mol. Biol.*, 48: 529-537.
- [27] Khlestkina EK and Salina EA. 2006. SNP

- Markers: Methods of Analysis, Ways of Development, and Comparison on an Example of Common Wheat. *Genetika*, 42(6): 725-736.
- [28] Koebner R and Summers R. 2002. The Impact of Molecular Markers on the Wheat Breeding Paradigm. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 7(2B): 695-702.
- [29] Kota R, Varshney RK, Thiel T. 2001. Generation and Comparison of EST-Derived SSRs and SNPs in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Hereditas*, 135: 145-151.
- [30] Kota R, Rudd S, Facius A. 2003. Snipping Polymorphisms from Large EST Collections in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Mol. Genet. Genomics*, 270: 24-33.
- [31] Kozlova SA, Khlestkina EK and Salina EA. 2009. Specific Features in Using SNP Markers Developed for Allopolyploid Wheat. *Genetika*, 45(1): 92-96.
- [32] Liakat AM, Zhou Yi, Gray M and Procunier JD. 2002. Single Nucleotide Polymorphism: A Powerful Tool for Variety Identification in Wheat. ITMI Publ. Workshop, Winnipeg, p. 3.
- [33] Lijavetzky D, Cabezas JA, Ibáñez A, Rodríguez V and Martínez-Zapater JM. 2007. High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by combining a re-sequencing approach and SNPlex technology. *BMC Genomics*, 8: 424.
- [34] Ma ZQ, Wei JB and Cheng SH. 2004. PCR-Based Markers for the Powdery Mildew Resistance Gene *Pm4a* in Wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 109: 140-145.
- [35] Marais GF, Marais AS and Groenewald JZ. 2001. Evaluation and Reduction of *Lr19-149*, a Recombined Form of the *Lr19* Translocation in Wheat, *Euphytica*, 121: 289-295.
- [36] Martin ER, Scott WK, Nance MA, Watts RL, Hubble JP, Koller WC, Lyons K, Pahwa R, Stern MB, Colcher A. 2001. Association of Single-Nucleotide Polymorphisms of the Tau Gene with Late-onset Parkinson Disease. *Journal of the American Medical Association*. 286: 2245-2250.
- [37] Miller TP, Gu Z, Li Q. 1998. Overlapping Genomic Sequences. A Treasure Trove of Single Nucleotide Polymorphisms. *Genome*, 8: 748-754.
- [38] Mochida K, Yamazaki Y and Ogihara Y. 2003. Discrimination of Homoeologous Gene Expression in Hexaploid Wheat by SNP Analysis of Contigs Grouped from a Large Number of Expressed Sequence Tags, *Mol. Genet. Genomics*, 270: 371-377.
- [39] Mohler V. 2004. SNP Genotype Determination in Hexaploid Wheat. In: *Microscopic Fungi-Host Resistance Genes, Genetics and Molecular Research*. (Chelkowski J. and Stepien L. Eds.), 53-58.
- [40] Neff MM, Neff JD, Chory J. 1998. dCAPS, a Simple Technique for the Genetic Analysis of Single Nucleotide Polymorphisms: Experimental Applications in *Arabidopsis thaliana* Genetics. *Plant Journal*, 14: 387-392.
- [41] Pacey-Miller T and Henry R. 2003. Single Nucleotide Polymorphism Detection in Plants Using a Single Stranded Pyrosequencing Protocol with a Universal Biotinylated Primer. *Analytical Biochemistry*, 317(2): 165-170.
- [42] Pavy N, Pelgas B, Beauseigle S, Blais S, Gagnon F, Gosselin I, Lamothe M, Isabel N and Bousquet J. 2008. Enhancing genetic mapping of complex genomes through the design of highly-multiplexed SNP arrays: application to the large and unsequenced genomes of white spruce and black spruce. *BMC Genomics*, 9: 21.
- [43] Picoult-Newberg L, Ideker TE, Pohl MG, Taylor SL, Donaldson MA, Nickerson DA, Boyce-Jacino M. 1999. Mining SNPs from EST Databases. *Genome Res.*, 9, 167-174.
- [44] Pindo M, Vezzulli S, Coppola G, Cartwright DA, Zharkikh A, Velasco R and Troglio M. 2008. SNP high-throughput screening in grapevine using the SNPlex genotyping system. *BMC Plant Biol.*, 8: 12.
- [45] Procunier JD, Gray M, Liakat AM. 2003. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Hexaploid Wheat and High Throughput SNP Detection by Invader Operation System. *Proc. Plant and Animal Genomes 11th Conf.*, San-Diego, p. 251.
- [46] Ravel C, Praud S, Murigneux A, Canaguier A, Sapet F, Samson D, Balfourier F, Dufour P, Chalhoub B, Brunel D. 2006. Single Nucleotide Polymorphism Frequency in a Set of Selected Lines of Bread Wheat

- (*Triticum aestivum* L.). Genome, 49: 1131-1139.
- [47] Ravel C, Praud S, Canaguier A, Dufour P, Giancola S, Balfourier F, Chalhou B, Brunel D, Linossier L, Dardevet M, Beckert M, Rousset M, Murigneux A, Charmet G. 2007. DNA Sequence Polymorphisms and Their Application to Bread Wheat Quality. *Euphytica*, 158: 331-336.
- [48] Saskia SP, Khalil K, Hadas S, Jossi H and Uri L. 2002. Generation and Mapping of AFLP, SSRs and SNPs in *Lycopersicon Esculentum*. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 7: 583-597.
- [49] Scherrer B, Keller B and Feuillet C. 2002. Two Haplotypes of Resistance Gene Analogs Have Been Conserved During Evolution at the Leaf Rust Resistance Locus *Lr10* in Wild and Cultivated Wheat. *Funct. Integr. Genomics*, 2: 40-50.
- [50] Schmid KJ, Sorensen TR, Stracke R, 2003. Large Scale Identification and Analysis of Genome Wide Single Nucleotide Polymorphisms for Mapping in *Arabidopsis Thaliana*, *Genome Res.*, 13: 1250-1257.
- [51] Schwarz G, Sift A, Wenzel G, Mohler V. 2003. DHPLC Scoring of a SNP Between Promoter Sequences of HMW Glutenin x-type Alleles at the *Glu-D1* Locus in Wheat. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 4263-4267.
- [52] Simon M, Loudet O, Durand S, Bérard A, Brunel D, Sennesal FX, Durand-Tardif M, Pelletier G and Camilleri C. 2008. Quantitative trait loci mapping in five new large recombinant inbred line populations of *Arabidopsis thaliana* genotyped with consensus single-nucleotide polymorphism markers. *Genetics*, 178: 2253-2264.
- [53] Somers DJ, Kirkpatrick R, Moniwa M and Walsh A. 2003. Mining Single Nucleotide Polymorphisms from Hexaploid Wheat ESTs. *Genome*, 49: 431-437.
- [54] Suliman-Pollatschek S, Kashkush K, Shats H, Hillel J, Lavi U. 2002. Generation and mapping of AFLP, SSRs and SNPs in *Lycopersicon esculentum*. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 7(2A): 583-597.
- [55] Syvanen AC. 2001. Accessing Genetic Variation: Genotyping Single Nucleotide Polymorphisms. *Nature Rev.*, 2: 930-942.
- [56] Tenailon MI, Sawkins MC, Long AD, Gaut RL, Doebley JF, Gaut BS. 2001. Patterns of DNA Sequence Polymorphism Along Chromosome 1 of Maize (*Zea mays ssp mays* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(16): 9161-9166.
- [57] Tyrka M, Blaszczyk L, Chelkowski J. 2004. Development of the Single Nucleotide Polymorphism Marker of the Wheat *Lr1* Leaf Rust Resistance Gene. *Cell Mol. Biol. Lett.*, 9: 879-889.
- [58] Useche FJ, Gao G, Harafey M and Rafalski A. 2001. High-Throughput Identification, Database Storage and Analysis of SNPs in EST Sequences. *Genome Inform.*, 12: 194-203.
- [59] Vienne D. 2003. *Molecular Markers in Plant Genetics and Biotechnology*. Institute National de la Recherche Agronomique, Versailles, France.
- [60] Wang DG, Fan JB, Siao CJ. 1998. Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. *Science*, 280: 1077-1082.
- [61] Yanagisawa T, Kiribuchi-Otobe C, Hirano H. 2003. Detection of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Controlling the Waxy Character in Wheat by Using a Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (DCAPS) Marker. *Theor. Appl. Genet.*, 107: 84-88.
- [62] Zhang W, Gianibelli MC, Ma W. 2003. Identification of SNPs and Development of Allele-Specific PCR Markers for Gamma-Gliadin Alleles in *Triticum aestivum*. *Theor. Appl. Genet.*, 107: 13-138.
- [63] Zhu YL, Song QJ, Hyten DL, Van Tassell CP, Matukumalli LK, Grimm DR, Hyatt SM, Fickus EW, Young ND, Cregan PB. 2003. Single Nucleotide Polymorphisms in Soybean, *Genetics*, 163(3): 1123-1134.
- [64] Xu H, Simon G, Gregory ER, Hauser JE, Stenger A, Pericak V, Jeffery M and Michael AH. 2005. SNP Selector: A Web Tool for Selecting SNPs for Genetic Association Studies. *Bioinformatics*, 15(22): 4181-4186.