



T.C.  
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TARIMSAL GENETİK MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YABANI SOYA (*Glycine*) TÜRLERİNDE CenH3 GENOMİK DNA  
DİZİLERİNİN KLONLANMASI

BİLGE ŞEVVAL YILDIRIM

Temmuz 2019



T.C.  
NİĞDE ÖMER HALİSDEMİR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TARIMSAL GENETİK MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YABANI SOYA (*Glycine*) TÜRLERİNDE CenH3 GENOMİK DNA  
DİZİLERİNİN KLONLANMASI

BİLGE ŞEVVAL YILDIRIM

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Doç. Dr. Ahmet Latif TEK

Temmuz 2019

**Bilge Şevval YILDIRIM** tarafından **Doç. Dr. Ahmet Latif TEK** danışmanlığında hazırlanan “**Yabani Soya (Glycine) Türlerinde CenH3 Genomik DNA Dizilerinin Klonlanması**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Tarımsal Genetik Mühendisliği** Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Hakan ÖZKAN  
Çukurova Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü



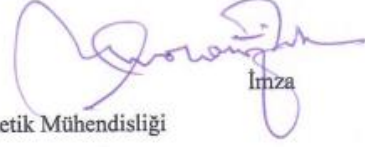
İmza

Üye : Prof. Dr. Mehmet Emin ÇALIŞKAN  
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tarımsal Genetik Mühendisliği



İmza

Üye : Doç Dr. Ahmet Latif TEK  
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tarımsal Genetik Mühendisliği



İmza

**ONAY:**

Bu tez, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenmiş olan yukarıdaki jüri üyeleri tarafından .../.../20... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun .../.../20... tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

...../...../20...

**Doç. Dr. Murat BARUT**  
**MÜDÜR**

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin bilimsel ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Bilge Şevval YILDIRIM

## ÖZET

### YABANİ SOYA (*Glycine*) TÜRLERİNDE CenH3 GENOMİK DNA DİZİLERİNİN KLONLANMASI

YILDIRIM, Bilge Şevval  
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Tarımsal Genetik Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman :Doç. Dr. Ahmet Latif TEK

Temmuz 2019, 75 sayfa

Ökaryotik organizmalarda hayati fonksiyonların sağlanması için gerekli olan hücre bölünmesi sırasında kromozomların doğru olarak ayrışması önemlidir. Bu işlevi kromozomlar üzerindeki sentromerler sağlamaktadır. Her ne kadar sentromerik DNA dizileri evrimsel olarak değişkenlik gösterse de, sentromeri oluşturan histon H3 varyantı olan sentromerik histon H3 (CENH3) proteini korunmuştur. Bu tez çalışmasında farklı soya türlerinde moleküler yöntemlerle CenH3 genomik DNA lokus dizi bilgisi tespit edilmiştir. Bu amaçla farklı soya türlerinin yapraklarından genomik DNA izole edilmiştir. PCR ile CenH3 genine özgü primer çiftleri kullanılarak, toplam CenH3 genomik lokusu çoğaltılmıştır. Çoğaltılan genomik DNA fragmentleri klonlanarak CenH3 genomik lokusunun dizi bilgisine ulaşılmıştır. Biyoinformatik yöntemler ile intron ve ekzon bölgeleri tespit edilerek, tür içi ve türler arasında DNA dizi hizalaması yapılmıştır. Ekzon bölgelerinde daha fazla dizi korunmuşluğu varken, intron bölgelerinde nükleotit uzunluk farkları tespit edilmiştir. Gelecekte soya ıslahında sentromer modifikasyonunu dayanan haploid hatların geliştirilebilmesi için farklı soya türlerinde CenH3 genomik DNA lokus dizi bilgisinin katkı sağlayacağı değerlendirilmektedir.

*Anahtar sözcükler:* CenH3, genomik DNA, haploid, soya, gen kaynakları

## SUMMARY

### MOLECULAR CLONING OF CENTROMERIC HISTONE H3 (CenH3) GENOMIC DNA SEQUENCES IN THE WILD SOYBEAN (*Glycine*) SPECIES

YILDIRIM, Bilge Şevval  
Niğde Ömer Halisdemir University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Agricultural Genetic Engineering

Supervisor :Assoc. Professor Dr. Ahmet Latif TEK

July 2019, 75 pages

Proper distribution of chromosomes during cell division is essential for maintaining vital functions in eukaryotic organisms. Centromeres provide such functions on chromosomes. Although centromeric DNA sequences vary evolutionarily, the centromeric histone H3 (CENH3) protein, a variant of the histone H3, is conserved throughout eukaryotes. In this thesis, CenH3 genomic DNA locus sequence information was determined by molecular methods in several soybean species. For this purpose, genomic DNA was isolated from the leaves of different soybean species. The complete CenH3 genomic loci were amplified by PCR using primers specific to the CenH3 gene. The amplified genomic DNA fragments were cloned and the sequence information of the CenH3 genomic locus was obtained. Intron and exon regions were determined by bioinformatics methods and DNA sequence alignment within and between species was performed. Nucleotide length differences were detected in intron regions, while exon regions had greater sequence conservation. In order to develop haploid lines based on centromere modification in soybean breeding, the sequence information of CenH3 genomic DNA locus from different soybean species will contribute significantly.

*Keywords:* CenH3, genomic DNA, haploid, soybean, genetic resources

## ÖN SÖZ

Öncelikle danışmanım Doç. Dr. Ahmet Latif TEK'e tezim boyunca değerli bilgi ve deneyimleriyle bana rehberlik ettiği ve desteklediği için çok teşekkür ederim. Ne zaman bir sorunum olsa kapısı her zaman açık olduğu ve değerli zamanını bana ayırdığı için minnettarım.

Tezimi okuyup değerlendiren, tavsiyelerde bulunan değerli jüri komitesi Prof. Dr. Hakan ÖZKAN ve Prof. Dr. Mehmet Emin ÇALIŞKAN hocalarıma teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca verdikleri burs sayesinde maddi ihtiyaçlarımı karşılamamda bana yardımcı olan Ayhan Şahenk Vakfı'na teşekkür ederim.

Bu zorlu yolda hem laboratuvar çalışmalarında hem bu süreçte her zaman yardımına koşan yol arkadaşım Hümeysra YILDIZ'a sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca Gizem SUNKAR, Ainura Adylbek KYZY, Sevim Döndü KARA, Esra KARAKAŞ ve Ainiwaer ZİNAİTİGULİ'ye laboratuvar çalışmalarımız boyunca sabırlı ve anlayışlı olmalarından dolayı teşekkür ederim.

Aileme her zaman maddi ve manevi yanımda oldukları, benimle ilgilendikleri ve asla yalnız bırakmadıkları için özel bir teşekkürü borç bilirim.

Üstesinden gelmem için beni cesaretlendiren, destekleyen ve pozitif enerjisini eksik etmeyen diğer arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Bilge Şevval YILDIRIM

Temmuz 2019

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
SUMMARY .....	v
ÖN SÖZ .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
SİMGE VE KISALTMALAR .....	xii
BÖLÜM I GİRİŞ .....	1
BÖLÜM II GENEL BİLGİLER .....	3
2.1 DNA'dan Kromozoma .....	3
2.1.1 Sentromer .....	5
2.1.2 Sentromere özgü histon H3 (CenH3) .....	6
2.1.3 CENH3 protein yapısı .....	7
2.1.4 Bitki ıslahında CENH3 proteinin yeri .....	10
2.2 Soya Türlerinin Taksonomik Sınıflandırılması ve Filogenisi .....	10
2.2.1 Soya türlerinin morfolojik ve genetik özellikleri .....	12
2.2.2 Soya türlerinde yapılan genom çalışmaları .....	13
2.3 Tez Çalışmasının Amaç ve Hedefleri .....	14
BÖLÜM III MATERYAL VE METOD .....	15
3.1 Materyal .....	15
3.1.1 Bitki materyali .....	15
3.2 Metod .....	16
3.2.1 Genomik DNA izolasyonu .....	16
3.2.2 Veritabanı taraması ve primer tasarımı .....	18
3.2.3 CenH3 genomik lokusunun çoğaltılması .....	19
3.2.4 Kompetent hücre hazırlama .....	20
3.2.5 Ligasyon .....	20
3.2.6 Transformasyon .....	21
3.2.7 Plazmid izolasyonu .....	22

3.2.8 Koloni PCR ve dizileme .....	23
3.2.9 Verilerin değerlendirilmesi ve biyoinformatik analizi .....	24
<b>BÖLÜM IV BULGULAR .....</b>	<b>25</b>
4.1 İş Akışı ve Planı .....	25
4.2 Farklı Soya Türlerinde Çimlendirme ve Yetiştirme .....	26
4.3 Farklı Soya Türlerinde Genomik DNA İzolasyonu .....	27
4.4 Soya CenH3 Genine Özgü Primerlerin Tasarımı .....	28
4.5 Yabani Soya Türlerinde CenH3 Genomik Lokusunun PCR Optimizasyonu.....	32
4.5.1 Farklı soya türlerinde total CenH3 genomik lokusunu içeren primerlerle yapılan PCR çalışmaları .....	35
4.5.2 Farklı soya türlerinde CenH3 genomik lokusunu kapsayan iki primer çifti ile yapılan çalışmalar .....	36
4.6 Yabani Soya Türlerinde CenH3 Genomik Lokusunun Klonlanması .....	38
4.7 Yabani Soya Türlerinde İnsert Genin Varlığının Saptanması .....	39
4.8 Yabani Soya CenH3 Gen Yapısının Analizi ve Biyoinformatik .....	41
<b>BÖLÜM V TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>59</b>
5.1 Farklı Soya Türlerinde CenH3 Genomik Lokusunun Tanımlanması.....	59
5.2 CenH3 Ekzon ve İtron Yapılarının Tanımlanması .....	59
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>62</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>70</b>
<b>ÖZ GEÇMİŞ .....</b>	<b>75</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Farklı organizmalara göre CenH3 genomik lokusunun büyüklüğü ve NCBI erişim numaraları.....	7
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan soya ve yabani türlerinin Latince isimleri ve temin yerleri (Avus.: Avustralya ABD: Amerika Birleşik Devletleri).....	15
Çizelge 3.2. CenH3 nükleotid dizisinin kodlama yapan bölgelerinden tasarlanan primerler, ifade şekilleri ve protein karşılıkları.....	18
Çizelge 3.3. Soya CenH3 genomik lokusundan geliştirilen primer çiftleri ve bu lokusdaki toplam uzunluklar.....	19
Çizelge 3.4. Koloni PCR için kullanılmış olan uygun primerlerin dizisi.....	23
Çizelge 3.5. Farklı soya türlerinde CenH3 genomik lokusunun x bölgesini içeren klonların adlandırılması.....	24
Çizelge 4.1. Genomik DNA örneklerinin NanoDrop ölçümleri.....	28
Çizelge 4.2. X bölgelerine göre klonların ekzon ve intron bölgelerinin uzunlukları.....	42

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. DNA'dan kromozoma genel bakış (Alberts vd., 2008'den uyarlanmıştır).....	4
Şekil 2.2. CenH3 N-terminal ve HFD bölgelerinin gösterilmesi. CenH3 bölgelerinin genel gösterimi (a), farklı çeltik türlerinde CenH3 kodlama yapan nükleotid dizilerinin karşılaştırılması (b). Pembe çubuklar dizilerin korunma alanlarını göstermektedir (Veriler Hirsch vd., 2009 makalesinden alınarak uyarlanmıştır.). Hizalamalar ClustalW'da (Larkin vd., 2007) yapılmıştır. CLC Genomics Workbench v. 8.0 programında uygulanmıştır (CLC, 2018). (L: loop, CATD: Sentromer hedeflenme alanı (Ekler C) .....	9
Şekil 2.3. Farklı soya türlerinin dünya üzerindeki dağılımı (Sherman-Broyles vd., 2014) .....	11
Şekil 2.4. Soyanın taksonomik sınıflandırılması (USDA PLANTS Database, 2018) .....	12
Şekil 3.1. Bitkinin yetiştirilmesi ve materyalin toplanması. Tohumların filtre kağıdında çimlendirilmesi (a), çimlenen tohumların küçük saksıya aktarılması (b), köklenenlerin büyük saksıya aktarılması (c), genç yaprakların buzda muhafaza edilerek toplanması (d) fotoğrafta gösterilmiştir.....	16
Şekil 3.2. Yapraktan genomik DNA izolasyonunu gösteren önemli aşamalar. Sıvı azotla materyalin ezilmesi (a), kloroform: izoamil alkol (24:1) ile DNA'nın alınması (b), izopropanol ile çöktürme (c), düşük tuzlu TE ile DNA'nın çözdürülmesi.....	18
Şekil 4.1. Genel metodolojiyi gösteren akış diyagramı.....	26
Şekil 4.2. Çimlendirme işlemi için oluşturulan ortamlar. Pamuk ile çimlendirilmesi (a), MS besiyerinde çimlendirilmesi (b), filtre kağıdında çimlendirilmesi (c).....	27
Şekil 4.3. Genomik DNA'sı izole edilen farklı soya türlerinin jel görüntüsü.....	27

Şekil 4.4. Glycine max CenH3 geninin cDNA ve gDNA nükleotid dizileri kıyaslanarak intron ve ekzon bölgelerinin belirlenmesi. Hizalamalar ClustalW'da (Larkin vd., 2007) yapılmıştır. Geneious sürüm 11.1.3'de uygulanmıştır (Kearse vd., 2012) .....	29
Şekil 4.5. G. max CenH3 genomik lokusu.....	32
Şekil 4.6. G.max, G. tabacina ve G. soja türlerinde 60-63 ve 65 °C primer bağlanma sıcaklıkları kullanılarak oluşturulan PCR jel görüntüsü.(M: markör, 1 kb) .....	33
Şekil 4.7. G. tabacina türünde primerlerin 1:0, 1:4, 1:10 (primer: ddH <sub>2</sub> O) oranlarında seyreltilmesi sonucu elde edilen PCR'ın jel görüntüsü.....	34
Şekil 4.8. G. tabacina türünde normal, primersiz ve primer+premixsiz PCR döngülerinin karşılaştırılması. A: 63 B: 65 C:68, 1: normal PCR (primer ve premixli), 2: primer yok ve 3: primer ve Premix Ex Taq yok.....	35
Şekil 4.9. Farklı soya türlerinde total CenH3 genomik lokusunun çoğaltılması.....	36
Şekil 4.10. Yabani soya türlerinde x ve y primerleri kullanılarak oluşan PCR fragmentlerinin jel elektroforezinde görüntüsü.....	37
Şekil 4.11. Glycine dolichocorpa türünde z, y ve x primerleri ile oluşan DNA fragmetlerinin jel görüntüsü.....	38
Şekil 4.12. Hazırlanan kompetent hücrelerinin kontrol tabakları. Ampisilinli tabakta CenH3 genomik lokusunu bulunduran bakterilerin üremesi (a), tetrasiklinli tabakta boş kompetent hücre üremesi (b), ampisilinli tabakta boş kompetent hücre (c), ampisilinli tabakta pUC 18 plazmid DNA üremesi (d) gösterilmiştir.....	39
Şekil 4.13. İnsert CenH3 genomik lokusu içerdiği düşünülen tek kolonilerin PCR sonuçlarının jel görüntüsü.....	40
Şekil 4.14. İnsert genomik lokusu içeren plazmidlerin izolasyon sonucu jel görüntüsü.....	41
Şekil 4.15. X bölgesine ait 1., 2., 3. ve 4. intronların gösterimi.....	43
Şekil 4.16. Dizilemesi gerçekleştirilen 11 türün x bölgesine ait ekzon ve intron	

yapılarının karşılaştırılması.....	52
Şekil 4.17. Dizilemesi gerçekleştirilen 11 türün x bölgesine ait ekzon yapılarının karşılaştırılması.....	58



## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
μ	Mikro
μg	Mikrogram
μm	Mikrometre
μl	Mikrolitre
bç	Baz çifti
dk	Dakika
g	Gram
kb	Kilobaz
Mbp	Mega baz çifti
M	Molar
mM	Milimolar
mg	Miligram
ml	Mililitre
ng	Nanogram
pg	Pikogram
pmol	Pikomol
rpm	Her dakikada dönme hızı
u	Ünite
V	Voltaj
vol	Volum (hacim)

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
CATD	Sentromer hedeflenme alanı
cDNA	Komplementer DNA
CenH3	Sentromere Özgü Histon H3 (nükleotid)
CENH3	Sentromere Özgü Histon H3 (protein)

ddH <sub>2</sub> O	Deionize distile su
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
EtOH	Etanol
HFD	Histon Katlanma Bölgesi
gDNA	Genomik DNA
H3	Histon 3
NCBI	National Center For Biotechnological Information
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyon



# BÖLÜM I

## GİRİŞ

Genomik DNA ökaryot organizmalarda kalıttan sorumlu, içerisinde intron ve ekzon bölgelerini bulunduran ve toplam genomu temsil eden kalıtımın en önemli bileşenidir. DNA molekülünün histon proteinler yardımıyla paketlenmesi sonucu nükleozom yapısı oluşmaktadır. Nükleozomların oluşturduğu kromatin, yoğun halde katlanarak kromozom formuna dönüşmektedir. Sentromer, tüm ökaryot organizmalarda mitoz ve mayoz bölünmeleri esnasında kromozomların doğru şekilde ayrışmasını sağlayan yapısal ve işlevsel bir bölgedir.

Ökaryot organizmalarda devamlılığını sürdürebilmesi için gerekli olan temel koşul hücre bölünmesinin meydana gelmesidir. Bu olayın nesillere aktarılması için gereken genetik bilgiyi içeren genomun sıkıştırılmış haline kromozom adı verilmektedir. Kromozomların hücre bölünmesi sırasında doğru şekilde ayrışmasından sentromer bölgesi sorumludur. Sentromerde bulunan ardışık DNA tekrar dizileri fonksiyonel olarak korundukları halde evrimsel olarak türden türe değişiklik gösterebilmektedir. Evrimsel değişiklikler sayesinde meydana gelen yeni sentromerik bölgeler aktivite kazanabilirler (Tek vd., 2011; Maheshwari vd., 2015). Yeni işlev kazanmış sentromerik bölgeleri tanımlayan yapısal proteinlerden biri sentromeri karakterize eden histon varyantı olan sentromere özgü histon H3 (CENH3) proteindir (Talbert vd., 2002; Maheshwari vd., 2015). Bitkiler üzerinde tüm genom dizilemeleri yapılsa da bu çalışmalar, bir genin karakterizasyonunu ve işlevsel önemini tanımlamamaktadır. Bitki sentromerinin yapı ve işlevini daha iyi anlamak için sentromerlerin ortak özelliğini barındıran CenH3 geni gibi önemli yapısal bir gen farklı organizmalarda ayrıntılı olarak incelenmektedir. *Arabidopsis thaliana* (Talbert vd., 2002), diploid *Gossypium* türleri (Masonbrink vd., 2014), *Medicago truncatula* (Neumann vd., 2015) ve *Musa acuminata* gibi birçok bitkinin CenH3 genomik DNA dizileri ayrıntılı olarak tespit edilmiştir.

Tarımda önemli bir yağ ve protein bitkisi olan soyanın akrabalarıyla olan ilişkileri hem allopoliploid geçmişi olması hem de dizi değişimleri göstermeleri sebebiyle araştırma odağı haline gelmiştir (Sherman-Broyles vd., 2014). Bu çalışmamızda farklı soya türlerini seçme nedenimiz tek yıllık ve çok yıllık türler arasındaki CenH3 geninin

evrimsel değişikliklerini tespit etmek ve bu türlerin sentromer yapı ve işlevlerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamaktır.

Bu tez çalışmasında CenH3 genomik lokusunun sentromer üzerindeki etkisini göz önünde bulundurarak farklı soya türlerinde moleküler yöntemlerle genomik DNA lokus dizi bilgisi tespit edilmiştir. *Glycine max* türünün Whole Genome Shotgun tekniğiyle elde edildiği genomunun dizi bilgisi bulunmaktadır (Schmutz vd., 2010). Bu veriye Phytozome ve NCBI veri tabanlarından ulaşılip verinin içinden CenH3 genomik dizi bilgisini veren nükleotid dizisi alınmıştır. Bu dizi diğer soya türlerinin CenH3 genomik lokusunu veren nükleotid dizilerinin tespit edilmesine referans olarak kullanılmıştır. Biyoinformatik yöntemler yardımıyla bu genomik dizi diğer yabancı türler ile hizalama yapılarak karşılaştırılmıştır. Böylece farklı soya türlerinde CenH3 geninin genomik DNA lokus dizileri ile ekzon ve intron bölgeleri ayrıntılı olarak tespit edilmiştir. Bu bölgelerde nükleotit uzunluk değişimlerinin intron ve ekzon bölgesinin neresinde meydana geldiği tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmada yabancı soya türlerinde CenH3 gen yapısını anlayabilmek ve bu gen hakkında temel bilgiler edinmek için ekzon-intron bölgeleri saptanmıştır.

Son zamanlarda keşfedilen ve bitki ıslahının önemli basamaklarından birisi olan haploid bitki geliştirilmesinde çığır açması beklenen sentromer yapısının anlaşılmasını gerektiren yeni genetik yaklaşımlar bir hayli ilgi uyandırmıştır. Sentromer modifikasyonuna dayanan, zigot oluşurken mutant sentromerlerin barındıran ebeveynlerden birinden gelen bir kromozom setinin tamamen elimine edilmesiyle haploid bitkiler elde edilebilmektedir (Ravi ve Chan, 2010). Ancak bunun için öncelikli olarak CenH3 geni tanımlanmalı ve fonksiyonel olarak sentromerdeki işlevsel konumu belirlenmelidir. Bu ilk çalışmalar haploid indükleyici hatlarının geliştirmek isteyen ıslahçılara değerli kaynaklar sunmaktadır. Bu bilgiler tarımsal açıdan önemli türlerin ıslah programlarına büyük ölçüde yardımcı olacaktır (Tek vd., 2014). Bu çalışma ile farklı soya türlerinin CenH3 genomik DNA lokus dizileri sistematik olarak ilk defa tanımlanmaktadır. Bu nedenle yabancı soya CenH3 dizileri haploid soya bitkilerin elde edilmesi için ciddi bir bilgi kaynağını oluşturmaktadır.

## BÖLÜM II

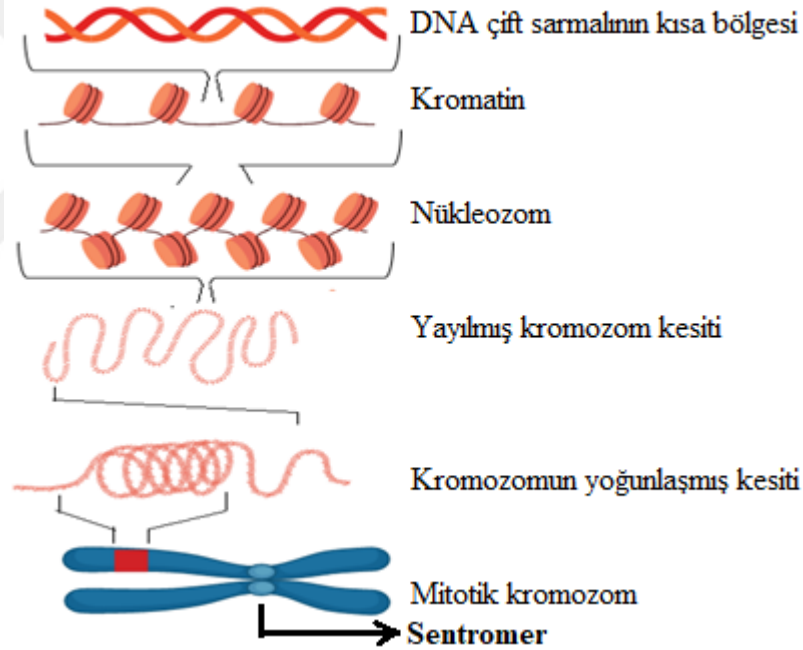
### GENEL BİLGİLER

#### 2.1 DNA'dan Kromozoma

Bir canlı organizmanın meydana gelmesi ve hayatını sürdürebilmesi için genetik bilgiye ihtiyaç vardır. Bu genetik bilgi hücre bölünmesi ile bir organizmanın bireyinden diğer bireyine aktarılmaktadır. DNA molekülü kalıp yapısıyla kendini kopyalanıp tamamlayıcı bir dizi oluşturmaktadır. Organizmayı temsil eden genetik bilgide proteinlerin sentezlenmesini içeren kodlar bulunmaktadır. Kopyalanan DNA molekülü formundaki genetik bilgi ise diğer nesile aktarılmaktadır (Alberts vd., 2008). Genom üzerinde bulunan genleri anlamak ve fonksiyonlarını bilmek, genetik bilginin nasıl aktarıldığı konusunda bilgi sahibi olmamızı sağlar. Genomların yapısını ve evrimini anlamak için genlerdeki genetik bilginin nereden geldiği gösteren yapılardan biri ekzon-intron bölgeleridir. Başka bir deyişle, genomik yapıları içeren bir araştırma için gen ve genomların genel özelliklerinin anlaşılması gerekmektedir. Aynı zamanda intron ve ekzon yapısının istatistiksel ifadeleri, ökaryot organizmaların genom dizilerinde genleri veya açık okuma çerçevelerini bulmak için temel düzeyde bilgi sağlamaktadır (Michael ve Manyuan, 1999). Ökaryot organizmaların genlerinde ve öncül mRNA moleküllerinde protein kodlayan dizilere ekzon, kodlamayan dizilere ise intron denir. İtron ve ekzon yapısını ayırt etmek için kısa konsensus dizi motifleri bulunmaktadır. Böylece intron yerleri doğru bir şekilde belirlenmekte ve mRNA molekülü olarak işlev görmesi için doğru ekzonların birleşmesi sağlanmaktadır. Ökaryot organizmaların çoğunluğunda GU-AG ve AU-AC nükleotitleri intron dizisinin ilk iki nükleotidini oluşturmaktadır. 5'-GU-3' ilk iki nükleotidi, 5'AG-3' ise son iki nükleotidi şeklinde gösterilmektedir (Brown, 2015).

Tüm ökaryot hücrelerin çekirdeğinde, genomik DNA molekülü kromatin adı verilen dinamik bir polimer formunda yüksek oranda paketlenmektedir. DNA molekülü sonra histon ve histon olmayan proteinler tarafından sıkıştırılmaktadır (Jenuwein ve Allis, 2001). Yani kromatin, DNA ve proteinlerin bir araya gelmesiyle oluşan kompleks bir yapıdır. Ortaya çıkan bu komplekste ana proteinler histonlardır. Buna ek olarak negatif yüklü DNA molekülüne bağlanmayı kolaylaştıran yüksek miktarda bazik amino asit

(arginin ve lizin) içeren küçük proteinlerde bulunmaktadır. Kromatinin temel tekrarlayan birimi nükleozom olarak tanımlanmaktadır (Cooper, 2000). Nükleozomların dinamik yüksek dereceli yapılanması, kromatin organizasyon seviyelerini belirlemektedir (Jenuwein ve Allis, 2001). Nükleozom çekirdeği histon proteinleri ve DNA çift sarmalının paketlenmesiyle oluşmaktadır. Bu nükleozom çekirdeği, histon proteinleri H2A, H2B, H3 ve H4 olmak üzere her birinden iki kopya halinde bulunur . Bu oktomer yapıya, 145-147 baz çiftinden oluşan çift DNA sarmalına sarılarak nükleozom çekirdeğini oluşturmaktadır (Luger vd., 1997; McGinty ve Tan., 2014; Penke vd., 2018). Histon H1 proteini her bir nükleozom çekirdek partikülüne girerken DNA molekülüne bağlanmakta ve DNA bu şekilde paketlenip yoğunlaştırılmaktadır. Kısalık yoğunlaşarak kromatin yapısını oluşturmaktadır (Cooper, 2000). Kromatin yapısının daha yoğun halde paketlenmesiyle de kromozom oluşmaktadır (Şekil 2.1).



**Şekil 2.1.** DNA'dan kromozoma genel bakış (Alberts vd., 2008'den uyarlanmıştır).

Histon proteinleri standart (canonical) histonlar ve histon varyantları olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Standart histonlar hücre döngüsünde S fazı sırasında ekspres olmaktadır (Zweidler, 1984). Histon varyantları ise bir veya iki gen tarafından kodlanmakta ve bütün hücre döngüsü boyunca sentezlenmektedir (Henikoff ve Ahmad, 2005). Bu iki histon fonksiyonel olarak farklılaşmıştır. Varyant histonlar kromozom ayrımı, transkripsiyonel düzenleme ve DNA onarımında görev almaktadır. Diğer taraftan önemli bir varyant olan CENP-A da kinetokor oluşumunda rol almaktadır

(Henikoff ve Ahmad, 2005; Talbert ve Henikoff, 2010). CenH3 içeren bir sentromer, ökaryot organizmaların kromozomlarının tanımlayıcı bir özelliğidir. Bu yüzden nükleozomların varyant histonların dahil edilmesiyle yapılarının farklılaşması, varyant histonların evrimsel geçmişinin ökaryot organizmaların geçmişi kadar eski olduğunu göstermektedir (Henikoff ve Ahmad, 2005). DNA paketleme proteinleri olarak bilinen standart histonlar kovalent modifikasyonlarla (asetilasyon, fosforilasyon, metilasyon, mono-ubikitinizasyon gibi) değişime uğramaktadır. Bu modifikasyonlar sonucu kromatinin yapısı değişerek çeşitli işlevleri olan nükleozomların işaretlenmesi sağlanmaktadır. Buna histon kodu denilmektedir (Jenuwein ve Allis, 2001).

### 2.1.1 Sentromer

Kromozomların üzerinde bulunan sentromerin ökaryot hücre bölünmesinde ve kromozom fonksiyonunun anlaşılmasındaki rolü büyüktür. Sentromer her kromozomun üzerinde sadece bir bölgede bulunur. Sentromere hücre bölünmesinde kromozomun doğru bir şekilde ayrışmasını sağlamaktadır. Mitoz ve mayoz sırasında kutuplara çekim hareketinden bağlanma bölgesi olarak sorumlu olan sentromer, bütün ökaryotlarda korunmuş önemli bir yapıdır (Burrack ve Berman, 2012; Henikoff vd., 2001). Kinetokorlar, motor proteinler ile etkileşime girerek kromozomların kopyalanması ve düzenlenmesinden sorumlu sentromere bağlanan büyük protein kompleksleridir (Yu vd., 2000).

Geleneksel karyotip çalışmaları metafaz kromozomu üzerindeki yapısal tanımlamalara yöneliktir. Kromozomlar üzerinde birincil boğum olarak adlandırılan sentromer bölgesine göre yapılan karyotip sınıflandırmalar nedeniyle bu bölge sitogenetik çalışmalarda önemli bir belirteç haline gelmektedir. Geçmişte yüksek ökaryotlarda kromozom yapısının karmaşık olmasından dolayı, sentromerin DNA ve protein ile ilişkisini anlamaya yönelik bilgi sınırlı kalmıştır. Günümüzde ise sentromerin fonksiyonel işareti olan histon H3 varyantı olan CENH3 proteininin tanımlanması, neosentromerlerin keşfi ve klonlanmış sentromerik DNA kullanarak yapay kromozomlar geliştirilmesi gibi sentromer üzerine yapılan kayda değer çalışmalar sentromer hakkındaki bilgiyi ciddi anlamda artırmıştır (Jiang ve Birchler, 2013).

### 2.1.2 Sentromere özgü histon H3 (CenH3)

Sentromer üzerinde bulunan yapısal anlamda tanımlanmasında kullanılan sentromerik DNA dizileri her ne kadar önemli olsa da, asıl belirleyici olan sentromerik histon H3 (CENH3) proteindir. Sentromer, ardışık satellit tekrar dizilerinden oluşmaktadır ve fonksiyonel olarak da korunmuş bir yapıya sahiptir. Ancak farklı türlerde evrimsel olarak sentromerik DNA tekrar dizileri değişiklik göstermektedir (Tek vd., 2011). Sentromerik DNA dizilerinin mutasyonal değişmesiyle kromozom üzerinde yeni sentromerik bölgeler aktivite kazanabildiği için satellit tekrarlar sentromer oluşumu için gerekli değildir (Maheshwari vd., 2015). Sentromerik DNA dizileri evrimsel olarak korunmuş olmasa da hayvanlarda, mantarlarda ve bitkilerde sentromeri karakterize eden eski ve yeni sentromerin ortak özelliği olarak kabul edilen, histon H3 varyantı olan sentromere özgü histon H3 (CenH3s ya da CENP-A) proteinin varlığı ile belirlenmektedir (Talbert vd., 2002; Maheshwari vd., 2015). Bu hızlı evrimleşme süreci sentromerik kararlılığın dinamik olarak muhafaza edildiğine işaret etmektedir (Henikoff ve Ahmad, 2005).

Memelilerde sentromer işlevini sağlamada en önemli bileşenlerden biri olan CENP-A proteini, insan sentromerinde kromatin paketleme ve fonksiyonunda önemli bir role sahip olmasıyla tespit edilmiştir. Skleroderma CREST semptomları bulunan hastanın serumlarında anti-sentromer antikorları bulunmasının dolaylı yoldan mitotik hücreleri etkilediği görülmüştür. Bu proteinler SENTromer Protein (CENP: CENtromere Protein) olarak adlandırılmış ve farklı moleküler ağırlıklarda oldukları için CENP-A (17 kDA), CENP-B (80 kDA) ve CENP-C (140 kDA) olarak adlandırılmıştır (Earnshaw ve Rothfield, 1985; Palmer vd., 1991).

Genel olarak yapısal anlamda kinetokor bölgesindeki proteinler iç ve dış yüzey olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Kinetokor iç yüzeyi, sentromerik DNA'yı tanır ve özel bir kromatin ortamı oluşturur, dış yüzey ise geçici ve kromozom ayrışmasında önemlidir (Jiang vd., 2003). CENP-A proteinin sentromer antijenleri ile eş zamanlı uyumuna bakıldığında aktif sentromerdeki iç kinetokor plaka bölgesinde yoğunlaştığı tespit edilmiştir (Warburton vd., 1997). Histon H3 protein ailesinin bir üyesi olan CENP-A'nın histon H3 ile C-terminal dizilerinin %60 oranında benzerlik gösterdiği ve ortak bir atadan kökenlenmiş olabileceği rapor edilmiştir (Palmer vd., 1991; Sullivan vd.,

1994). CENP-A proteininin nükleozom üzerinde merkezi lokalizasyonu C-terminal bölgesinde meydana geldiği için sadece bu bölge seçici sentromer birleşmesi yeterli olabilir. Bu seçici sentromerin birleşmesi nükleozom seviyesinde meydana gelmektedir (Sullivan vd., 1994). Ardından diğer birçok organizmada CenH3 homologları tespit edilmiştir. Örneğin *Saccharomyces cerevisiae*'da Cse4 (Meluh vd., 1998), *Drosophila melanogaster*'de cid (Malik ve Henikoff, 2001), *Arabidopsis thaliana*'da HTR12 (Henikoff vd., 2000), *Zea mays* (Zhong vd., 2002) ve *Oryza sativa* (Nagaki vd., 2004) bunlar arasında sayılabilmektedir (Çizelge 2.1). Her ne kadar, standart histonlarla kıyaslandığında CENP-A, amino asit dizisi seviyesinde zayıf bir şekilde korunsa bile, CENP-A proteininin yapısı veya aktif kimyasal işaretler (yani asetilasyon ve metilasyon) kromozom ayrışmasını kontrol eden epigenetik mekanizmaların belirlenmesi için spesifik özellikler barındırabilir (De Rop vd., 2012).

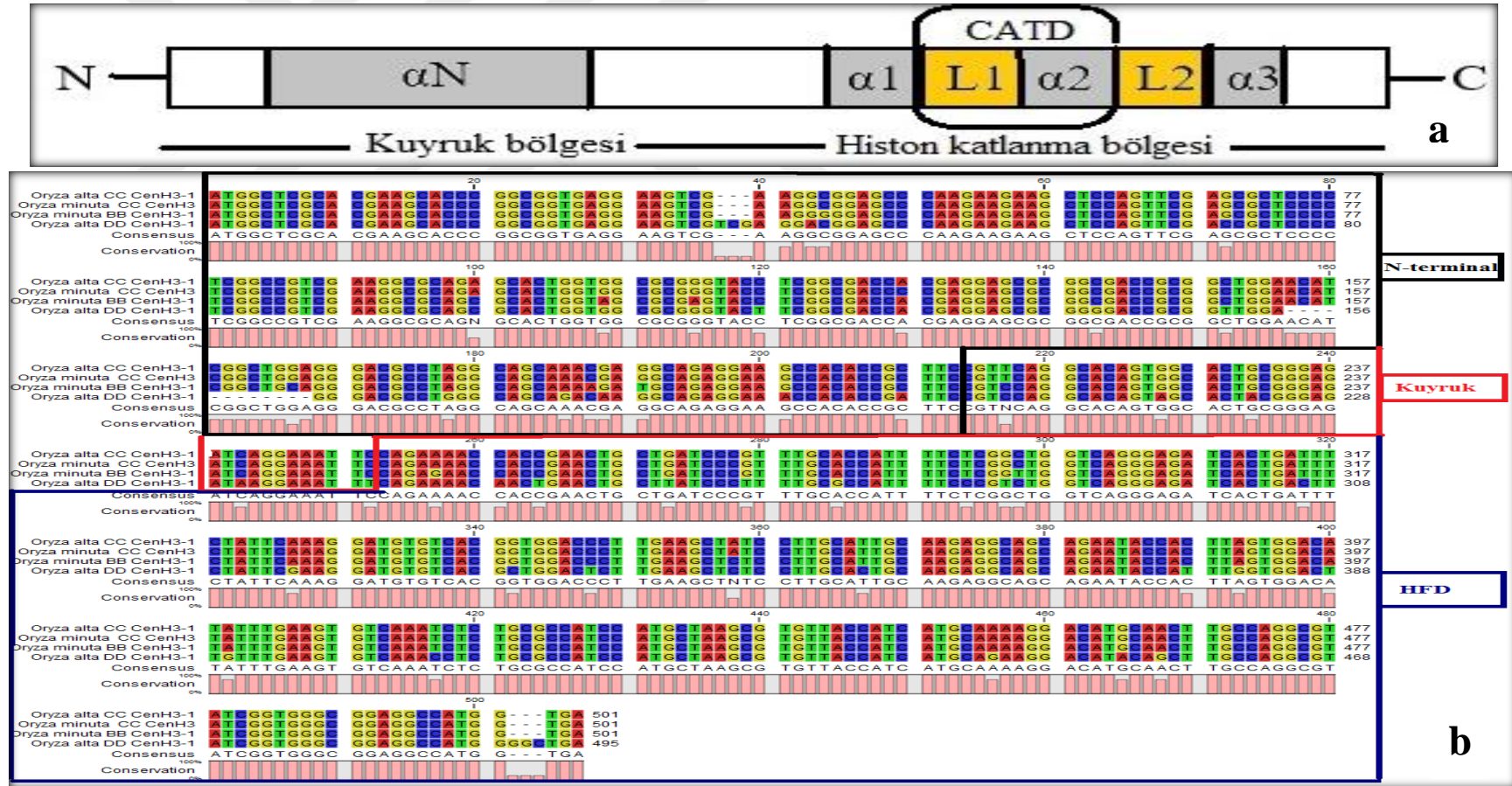
**Çizelge 2.1.** Farklı organizmalara göre CenH3 genomik lokusunun büyüklüğü ve NCBI erişim numaraları

Organizma	CenH3 geninin türlere göre isimlendirmesi	CenH3 genomik lokusunun büyüklüğü (bç)	NCBI Erişim numarası	Kaynaklar
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cse4	690	NC_001143.9	Meluh vd., 1998
<i>Drosophila melanogaster</i>	Cid	1015	NT_033778	Malik ve Henikoff, 2001; Malik vd., 2002
<i>Arabidopsis thaliana</i>	HTR12	2991	NC_003070.9	Talbert vd., 2002
Diploid <i>Gossypium</i> türleri	-	2565-2673	-	Masonbrink vd., 2014
<i>Cicer arietinum</i>		5529	KJ651155	Neumann vd., 2015
<i>Trifolium pratense</i>	-	4706	KJ651168	Neumann vd., 2015
<i>Melilotus albus</i>	-	5021	KM896215	Neumann vd., 2015
<i>Medicago truncatula</i>	-	4798	AC233680.1	Neumann vd., 2015
<i>Musa acuminata</i>	-	5538	CAIC01023700	Muiruri., 2017

### 2.1.3 CENH3 protein yapısı

Bitkilerde poliploidi düzeylerine göre CenH3 genleri farklı kopya sayısına sahiplerdir. Bu farklı kopya sayısından kaynaklanan formlar küçük dizi değişimleri gösterebilmektedir. CENH3 proteini genellikle diploid bitki türlerinin çoğunda tek

kopya olarak bulunmaktadır. Bazı durumlarda ise örneğin çavdarda olduğu gibi  $\alpha ScCENH3$  ve  $\beta ScCENH3$  olarak iki farklı ana formda bulunabilmektedir (Evtushenko vd., 2017). Bu kopyalar arasındaki farklılık CENH3 proteininin uzunluğundan, amino asit dizisi bakımından farklılık gösteren N-terminalinden ve genellikle korunmuş histon katlanma bölgelerindeki (histon fold domain, HFD) değişiklikten kaynaklanmaktadır (Morey vd., 2004). HFD amino asit dizileri türler arasında histon H3 proteininde benzer olmasına rağmen CENH3 amino asit dizilerinde farklılık göstermektedir (Neumann vd., 2015). CENH3 proteininde bulunan HFD dizisi sentromer özgünlüğünü sağlar ve bu özgünlük türlere göre değişir (Morey vd., 2004). CENH3 proteininin N-terminal ve HFD bölgelerinde farklılaşması doğal seçilimin altında yatan seçici adaptif (pozitif) evrimden kaynaklanmaktadır (Maheshwari vd., 2015). HFD bölgesindeki farklılıklar bazı türlerde CENH3 proteininin sentromerde nerede konumlandığını gösteren sentromer hedefleme alanı (CENP-A targeting domain, CATD) olarak adlandırılan alanda bulunmaktadır. Bu alan CENH3 proteini loop 1 bağlayıcı ve  $\alpha 2$ - sarmalından oluşmaktadır (Sanei vd., 2011; Evtushenko vd., 2017; Şekil 2.2). CATD nükleozom birleşmesi ve replikasyon olaylarına aracılık etmektedir. Böylece CENH3 proteininin sentomerik DNA'ya bağlanmasında rol oynamaktadır (Sanei vd., 2011). CENH3 proteini kromozom bölünmesinde etkin rol oynadığından dolayı mayoz bölünme sırasındaki herhangi bir değişiklik bu proteinin sentromere bağlanmasını olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Hirsch vd., 2009). Sentomerin amino asit dizisinde kromozomların ayrışmaması gibi sentromer oluşumunu etkileyen sorunlar oluşabilir. Bu sorunlara adaptif seleksiyon karşı koyarak CENH3 proteinin sentromer bozulması problemlerini önler. Mayotik dengenin yeniden oluşturulmasına da katkıda bulunabilir (Malik ve Henikoff, 2001). CENH3 proteininin kinetokor yapısındaki rolü düşünüldüğünde oluşan herhangi bir hata yanlış kromozom ayrışması ve sentromerde parça kaybı gibi sorunlara neden olabilir (De Rop vd., 2012).



**Şekil 2.2.** CenH3 N-terminal ve HFD bölgelerinin gösterilmesi. CenH3 bölgelerinin genel gösterimi (a), farklı çeltik türlerinde CenH3 kodlama yapan nükleotid dizilerinin karşılaştırılması (b). Pembe çubuklar dizilerin korunma alanlarını göstermektedir (Veriler Hirsch vd., 2009 makalesinden alınarak uyarlanmıştır.). Hizalamalar ClustalW'da (Larkin vd., 2007) yapılmıştır. CLC Genomics Workbench v. 8.0 programında uygulanmıştır (CLC, 2018). (L: loop, CATD: Sentromer hedeflenme alanı (Ekler C))

#### 2.1.4 Bitki ıslahında CENH3 proteinin yeri

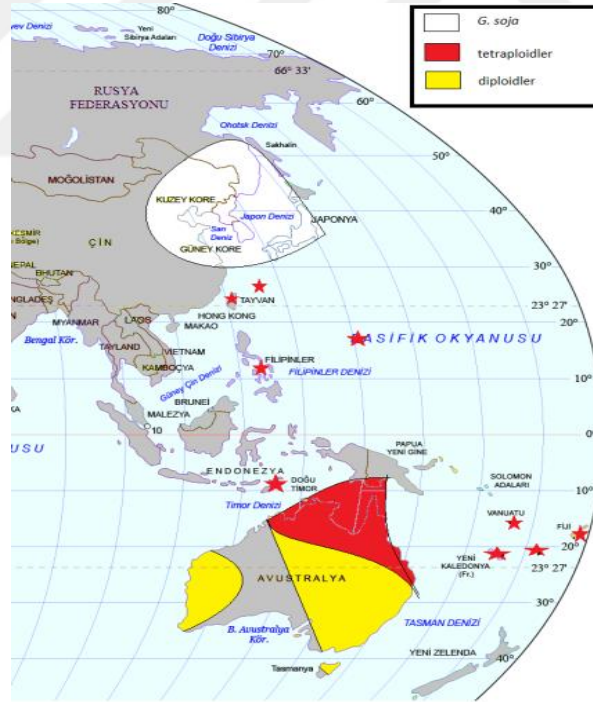
Haploid bitkiler, türler arası melezleme sonucunda nadir de olsa ebeveyn olarak seçilen türlerden birisinin döllenme sırasında genomunun elimine edilmesiyle oluşabilmektedir. Modifiye edilmiş CENH3 proteinlerini eksprese eden CenH3 mutantları, yabancı tür ile mezleldiğinde, mutanttan gelen kromozomlar elimine edilir ve haploid mutant olmayan kromozomlara sahip hatlar üretilir. Böylesi evrensel bir mekanizma başka türlere de uygulanarak haploid hatlar geliştirilebilir. CENH3 proteini sentromer modifikasyonu ile haploid bitki elde edilmesinde kullanılabilir (Ravi ve Chan, 2010). Böylece kısa sürede daha saf hatların elde edilmesine öncülük edilebilecektir. (Ravi ve Chan, 2010). Sentromer hedeflenme alanındaki (CATD) tek bir amino asit değişimi bile CENH3 proteininin sentromerik yüklenmesinin bozulmasına yol açabildiğinden bu proteinin yapısal olarak tanımlanması önemlidir. Bu yüzden bu polimorfizm ve değişimler diğer türlerde de tespit edilerek mutant CENH3 proteini oluşumu belirlenebilir. Bu durum, haploid hat oluşumunda belirleyici rol oynayabilir. CENH3 proteininin sentromer modifikasyonu ile başka bir kullanımı ise CRISPR-Cas9 teknolojisinin de yardımıyla CENH3 proteininin manipüle edilerek tarımsal önemi olan diğer türlerde haploid indükleyici ebeveynler oluşturulması için kullanılabilir (Watts vd., 2016).

#### 2.2 Soya Türlerinin Taksonomik Sınıflandırılması ve Filogenisi

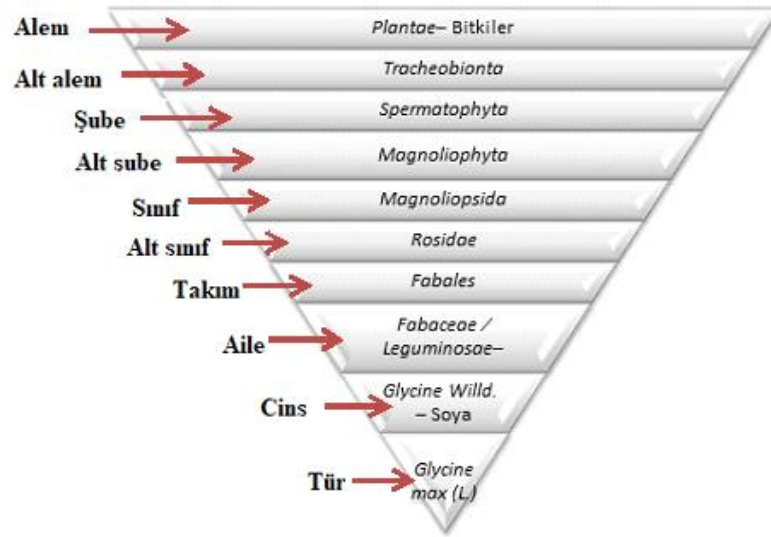
Soya tohumlarının endüstride kullanımının yaygınlaşması ve bitkiye olan talebin artmasıyla birlikte dünyanın farklı yerlerinde ıslah çalışmaları da artış göstermiştir. İlk olarak Çin'de kültüre alınan soyanın tatlı olmasından dolayı Yunanca glikozdan türeyen *Glycine* adını almıştır. Soya tohumları yağ ve çok değerli amino asitleri (lizin ve benzeri) bünyesinde barındırmasından dolayı beslenme değeri oldukça yüksek bir baklagildir (Hymowitz, 1970; Arıoğlu, 2010). Yağlı tohumlu bir yapıya sahip olduğu için sanayide işlenerek tohumlarından yağ elde edilmektedir (Hymowitz, 1970). Yağı çıkarıldıktan sonra elde edilen kısım olan küspe hayvan yeminde protein kaynağı olarak kullanılmaktadır (Arıoğlu, 2010). Soya proteini sekiz esansiyel amino asit içerdiğinden dolayı beslenme değeri yüksektir (Sherman-Broyles vd., 2014). Soyanın kök nodüllerinde yaşayan *Rhizobium japonicum* bakterisi atmosferik nitrojeni fikse ederek yaşadıkları simbiyotik ilişki sayesinde havadan aldığı serbest azotu toprağa

bağlamaktadır. Böylece hem kendi azot ihtiyacını karşılar hem de ekim nöbetindeki sonraki bitki için azotça zengin bir toprak bırakır (Jenks vd., 2007).

*Glycine* türlerinin evrimsel süreçleri boyunca bir tür kültüre alınıp diğer türler yabancı olarak farklı coğrafi dağılımlar göstermişlerdir. *Glycine* cinsi, *Glycine* ve *Soja* olmak üzere iki alt cinsi kapsamaktadır. *G. max* (Şekil 2.4) ve tek yıllık *G. soja* türü, *Soja* alt cinsinde bulunmaktadır. *G. max* türünün progenitörü olan *G. soja* türü, Doğu Asya'da (Çin, Japonya, Kore ve Rusya ülkelerinin bir kısmı) yetişmektedir (Şekil 2.3). Avustralya'da farklı coğrafi dağılım alanını kapsayan yaklaşık 30 çok yıllık türü içeren *Glycine* de ikinci alt cinstir (Şekil 2.3). *G. max*'ın yabancı progenitörü olan *G. soja*'dan yaklaşık 5000 ila 6000 yıl önce kültüre alındığı varsayılmaktadır (Sherman-Broyles vd., 2014). *G. max* Fabaceae familyasının bir üyesi, *Glycine* Willd cinsine ait ve 1100 Mbp boyutunda büyük bir genoma sahip diploid ( $2n=40$ ) bir bitkidir (Arumuganathan ve Earle, 1991).



Şekil 2.3. Farklı soya türlerinin dünya üzerindeki dağılımı (Sherman-Broyles vd., 2014)



**Şekil 2.4.** Soyanın taksonomik sınıflandırılması (USDA PLANTS Database, 2018)

*G. max* genetik özellikleri açısından progenitörü olan *G. soja* ile bazı farklılıklar göstermektedir. Soyanın kültüre alınması ve seleksiyon gibi insan aracılığıyla gerçekleşen durumlar genetik çeşitliliğini azaltmaktadır. Soyanın, kültüre alınma esnasında %50 oranında bir genetik çeşitlilik kaybı olduğu saptanmıştır (Hyten vd., 2006). Hyten vd., (2006) yaptığı çalışmada farklı soya çeşitlerinde düşük nükleotid çeşitliliğinin, temel olarak *G. soja*'daki alışılmadık derecede düşük bir genetik değişkenlik göstermesinden kaynaklandığını ve bu sayede *G. soja* türünde bulunan nadir allel kaybı gelecekte kültüre alınan soyanın verimli hale getirilmesine katkıda bulunabileceğini belirtmiştir. Yabani türlerde görülen bu yüksek genomik çeşitlilik, genomik verilerin daha detaylı incelenip geniş bir veri oluşturulmasına katkı sağlamıştır. Bu yüzden genomik dizileme verilerinin toplanması, soya genetik haritalarının oluşturulması için daha sağlıklı veri elde edilmesini hızlandıracaktır (Chan, 2012). *Glycine* cinsi içinde allopoliploid ve autopoliploid türlerin yaygın olduğu hakkındaki tartışmalar sonucunda Sherman-Broyles vd. (2014) *Glycine* cinsinin allopoliploid çalışmalara model gösterilebileceğini belirtmektedir.

### 2.2.1 Soya türlerinin morfolojik ve genetik özellikleri

Bitkilerin evrimsel ilişkisini anlamak için birçok morfolojik çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların doğruluğunu desteklemek için genetik çalışmalar da beraberinde yürütülmektedir. Yabani soya türleri morfolojik olarak kültüre alınan soyaya göre farklılıklar göstermektedir. Bunlar; daha çok çiçek açması, küçük siyah tohumlara sahip

olması, çoğu yan dalların sarmaşık şeklinde olması gibi farklılıklar olarak nitelendirilmektedir (Liu vd., 2007).

Fenotipik özelliklerin incelenmesinin yanı sıra genetik özellikler de incelenmektedir. İzoenzim ve DNA analizleriyle bireysel gen etkileri tespit edilmektedir. İzoenzim ve DNA filogenetik analizleri kullanılarak *Glycine* alt cinsinin sınıflandırılması yapılabilmektedir. İzoenzim varyasyonu ile bireysel gen etkileşimine bakarak *Glycine tomentella* türünün beş tetraploid (T1, T2, T3, T4, T5) ve yedi diploid (D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7) grubu olduğunu tespit edilmiştir (Doyle ve Brown, 1985). Bu çalışmayla *G. tomentella* türünün diploid veya tetraploid olmasının altında yatan genetik çeşitliliğin sadece coğrafi çeşitlilikle ilişkili olmadığı gösterilmektedir

### **2.2.2 Soya türlerinde yapılan genom çalışmaları**

Farklı soya türleri evrimsel geçmişlerinin altında yatan poliploidi düzeylerindeki farklılıklardan dolayı araştırmacıların çalışma odağı haline gelmiştir. Baklagiller içerisinde ilk tam genom dizilemesi 2010 yılında soyada yapılmıştır (Schmutz vd., 2010). Yapılan bu çalışma, soyanın ilk olarak 59 milyon yıl önce dublikasyona uğradığı ve daha sonra 13 milyon yıl önce tekrar dublikasyona uğradığı bulgulanmıştır. Bu dublikasyon olaylarının ardından gen çeşitlenmesi, gen kaybı ve çok sayıda kromozomun yeniden düzenlenmesi gibi genom değişikliklerinin meydana geldiği, antik bir poliploid olduğu saptanmıştır (Schmutz vd., 2010). Bu çalışmalara ek olarak soya ve 17 yabani soya türünün genomu yeniden dizilenmiştir (Lam vd., 2010). Bu çalışmada da farklı soya türlerinin genomlarına bakılarak tek nükleotid polimorfizimlerinin sinonim olmayan/sinonim olan nükleotid dizilerinin oranlarına göre bağlantı eşitsizliği (linkage disequilibrium, LD) hesaplanmıştır. Bu LD değerinin soyada yüksek olmasının soyanın kapalı kendine tozlaşma (kleistogami) özelliği ile bağlantılı olabileceği bu yüzden genetik çeşitliliğin azaldığına işaret etmektedir. Bu yüzden soya ıslah çalışmalarına harita bazlı klonlama yerine markör destekli seleksiyon yapılmasının ıslah çalışmalarını kolaylaştıracağını bildirilmiştir (Lam vd., 2010). Soyanın kültüre alınması genetik darboğazlar ve/veya insan seleksiyonundan etkilenmesinden dolayı genetik çeşitliliği azalmaktadır. Bu sınırlı genetik çeşitliliğin sonucu bir çok allelin soyada kaybolduğu, yabani soya türlerinde ise bu allellerin mevcut olduğu gözlemlenmiştir (Lam vd.,2010). Yabani soya türlerinde bulunan yararlı gen ve allellerin geri kazanılarak daha üstün

özelliklere sahip soya genotiplerinin geliştirilmesi sağlanabilecektir (Lam vd., 2010; Chan vd., 2012). Soya genomunun anlaşılması üzerine yapılan genomik çalışmalarda SSR, AFLP ve EST bazlı genetik markörler kullanılarak genetik haritalar (Song vd., 2004; Choi vd., 2007), bakteri yapay kromozomu (bacterial artificial chromosome, BAC) kullanarak fiziksel haritalar (Wu vd., 2004) oluşturulmuştur.

### **2.3 Tez çalışmasının amaç ve hedefleri**

Farklı soya türlerinde tüm genom dizilemesi için birçok çalışma yapılmıştır. Ancak bir genin tam anlamıyla bu bitkilerde nasıl ifade edildiğini ve nasıl bir yapıya sahip olduğunu bu çalışmalarla anlamak mümkün değildir. Bu tez çalışması bu açığı kapatmak için farklı soya türlerinde moleküler klonlama yöntemleri kullanarak CenH3 gibi özel bir genin genomik lokusunun ayrıntılı genomik DNA dizi bilgisini tespit etmek amacıyla hazırlanmıştır. CenH3 genomik lokusunun uzunluğu nedeniyle tamamının vektöre bağlanamamasından dolayı gen iki farklı uzunluktaki fragmentler şeklinde çoğaltılıp klonlaması yapılmıştır. Bu uzunluklar birbirinin devamı niteliğinde olup CenH3 genomik lokusunun bütünlüğünü bozmamaktadır. Bu iki fragment ayrı ayrı dizilenip CenH3 genomik DNA lokus dizileri elde edilmiştir. Tez içerisinde tür içi ve türler arası korunmuşluk seviyelerini tespit etmek için bu DNA dizileri birbirleriyle kıyaslanmıştır. Ekzon-intron bölgeleri ve bu bölgelerde gözlenen DNA dizi değişimleri tespit edilmiştir. İntron bölgelerinin nükleotid dizilerinin farklılık gösterdiği ve bu farklılığın türler arasında intron bölgelerinin az korunmuş olmasından kaynaklandığı anlaşılmıştır. CenH3 geninin farklı soya türlerinde anlaşılması modern ve klasik ıslahta önemli gelişmelere katkı sağlayacaktır. Sentromer modifikasyonu teknolojileri yardımıyla sentromer modifikasyonu mekanizması kullanarak homozigot soya çeşitleri oluşturulması için haploid hatlar elde edilebilecektir.

## BÖLÜM III

### MATERYAL VE METOD

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Bitki materyali

Bu çalışmada bitki materyali olarak U.S National Plant Germplasm System, USDA-Agricultural Research Service gen bankalarından temin edilen 16 yabancı soya türü ile kültürü yapılan soya türü (*Glycine max*) olmak üzere toplam 17 tür kullanılmıştır. Kültürü yapılan soya türüne ait Adasoy çeşidi Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Tüm türlere ait tohumlar büyüme kabinde (25°C) filtre kağıdına konularak çimlendirilmiştir. Ek olarak MS besiyeri (Murashige and Skoog medium, ¼ MS, %0.5 sukroz ve %0.8 agar) ve pamuk üzerinde çimlendirmeler yapılmıştır. Tohumlar için en uygun çimlendirme ortamını bulmak için çeşitli denemeler yapılmıştır. MS besiyeri ortamı için tohumlar 1 ml %70 etanol ile 1 dk, 1 ml ddH<sub>2</sub>O ile 30 sn 3 kez yıkama yapıp besiyeri üzerine düzenli aralıklarla yerleştirilmiştir. Steril tohumlar +4 °C sıcaklıkta bir gün bekletilip büyütme çemberine aktarılmıştır. Her türden gen bankasından 10 adet tohum temin edildiği için yaklaşık 3-5 adet tohum pamuk ve filtre kağıdına yerleştirilmiştir. Çimlenen tohumlar küçük saksılara alınıp köklendirilmiştir. Daha sonra bitkicikler büyük saksılara aktararak serada yetiştirilmiştir (Şekil 3.1).

**Çizelge 3.1.** Çalışmada kullanılan soya ve yabancı türlerinin Latince isimleri ve temin yerleri (Avus.: Avustralya ABD: Amerika Birleşik Devletleri)

PI Numarası	Türler	Genom sembolü	Menşei
Adasoy	<i>G. max</i>		Türkiye
PI 583946	<i>G. canescens</i>	A	ABD
PI 378870	<i>G. clandestine</i>	A1	ABD
PI 440962	<i>G. crytologa</i>	C	Avus.
PI 440962	<i>G.dolichocarpa</i>	AD3	ABD
PI 612234	<i>G. falcata</i>	F	Avus., ABD
PI 505184	<i>G. latrobeana</i>	A3	ABD
PI 378709	<i>G. latifolia</i>	B1	Avus., ABD
PI 505188	<i>G. microphylla</i>	B	ABD

**Çizelge 3.1. (Devamı)** Çalışmada kullanılan türlerin isim ve temin yerleri (Avus.: Avustralya ABD: Amerika Birleşik Devletleri)

PI Numarası	Türler	Genom sembolü	Menşei
PI 583966	<i>G. peratosa</i>	A5	ABD
PI 505195	<i>G. pescadrensis</i>	AB1	ABD
PI 653470	<i>G. pindanica</i>	H2	ABD
PI 653508	<i>G. stenophita</i>	B3	ABD
PI 505272	<i>G. syndetika</i>	A6	ABD
PI 483204	<i>G. tabacina</i>	BB2	ABD
PI 373988	<i>G. tomantella</i>	D3E	Avus., ABD
PI 100060	<i>G. soja</i>	G	Avus.



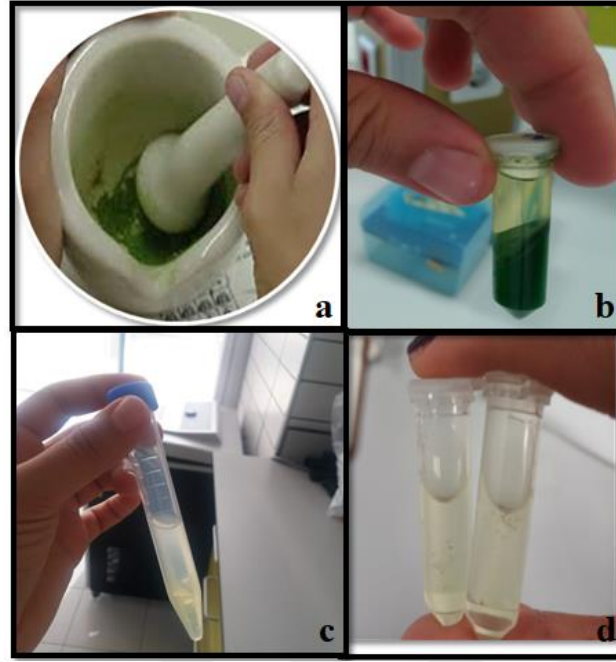
**Şekil 3.1.** Bitkinin yetiştirilmesi ve materyalin toplanması. Tohumların filtre kağıdında çimlendirilmesi (a), çimlenen tohumların küçük saksıya aktarılması (b), köklenenlerin büyük saksıya aktarılması (c), genç yaprakların buzda muhafaza edilerek toplanması (d) fotoğrafta gösterilmiştir.

## 3.2 Metod

### 3.2.1 Genomik DNA izolasyonu

Tüm soya türlerinin genç ve taze yaprakları toplanarak -80 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. Toplam genomik DNA'yı izole etmek için yüksek oranda bozulmamış DNA elde edilebilen standart CTAB metodu üzerinden uyarlamalar yapılarak aşağıdaki

protokol kullanılmıştır (Xin ve Chen, 2006). Dondurulmuş 1 gr yaprak örneği sıvı azot yardımıyla toz haline getirilene kadar havanda öğütülmüştür. Sonra elde edilen özüt iki 2 ml santrifüj tüpüne 0.5'er gram şeklinde ayrıldıktan sonra CTAB ayrıştırma tampon solüsyonu (pH 8, 20 mM EDTA, % 2 CTAB, 1.4 M NaCl, % 2  $\beta$ -merkaptoetanol, 100 mM Tris-HCl) eklenmiş ve karıştırıcı ile homojen hale getirilmiştir. Bu homojen karışım 60 dk 165 rpm hızında 65 °C su banyosunda 10-15 dk karıştırılarak bekletilmiştir. Sıcak su banyosundan alındıktan sonra tüp içerisine kloroform-izoamil alkol (24:1) eklenmiş protein gibi diğer ikincil metabolitlerin ayrışması sağlanmıştır ve solüsyon 63 rpm hızında 60 dk iyice karıştırılmıştır. 1300 rpm hızında 5 dk santrifüj yapılarak elde edilen her iki tüpteki en üstteki açık yeşil olan süpernatant yeni bir tüpte birleştirilmiştir. Sıvı faz üzerine CTAB çöktürme tampon solüsyonu (50 mM Tris-HCl, %1 CTAB, pH 8, 10 mM EDTA) (1.33 hacim) eklendikten sonra tekrar 1300 rpm hızında 5 dk santrifüj yapılmıştır. CTAB çöktürmesi solüsyonu santrifüjden sonra, tüpün üst kısmında kalan süpernatant atılarak kalan pelete %70 etanol eklenip 30 sn santrifüj yapıp etanol uzaklaştırılmıştır. Kalan etanolün kuruması için 10-15 dk beklendikten sonra pelet yüksek tuz oranına sahip TE (Tris-EDTA) içerisinde (1M NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl) çözülmüştür. Daha sonra 10  $\mu$ l RNase A (10 mg/ ml) eklenip pipetleme yapılarak 37 °C sıcaklıkta 45 dk inkübe edilmiştir. Üzerine soğuk izopropanol (0.6 hacim) eklenerek oda sıcaklığında 5 dk içinde belirli aralıklarla karıştırılarak bekletilmiştir. Daha iyi çökmesi için 15 dk santrifüj yapılmıştır. Üzerine %70 etanol eklenip 30 sn santrifüj yapıp etanol uzaklaştırılmıştır. Kalan etanolün kuruması için 10-15 dk beklendikten sonra pelet 500  $\mu$ l düşük tuz oranına sahip TE ile çözülmüştür (Şekil 3.2.). İzolasyon örnekleri %0.8'lik agaroz jele 10  $\mu$ l yüklenerek elektroforez cihazında (Takara, Mupid One Sistem) 1 $\times$  Tris-asetik asit-EDTA (TAE) solüsyonu içinde yürütülmüştür. Genomik DNA moleküler ağırlığının ve uzunluğunun tespit edilmesi için standart 1 kb markör (GeneRuler™, Thermo Scientific) kullanılmıştır. Agaroz jel EtBr (Etidyum Bromür) solüsyonunda 10 dk bekletilmiş ve jelin sonucu Bio-Rad UV Transilluminatör cihazı ile görüntülenmiştir. Ardından nanodrop cihazı (Quawell, V6.08 Q500) ile elde edilen 1 ml'deki  $\mu$ g DNA'nın miktarı hesaplanmış ve saflığı belirlenmiştir. Genomik DNA örnekleri -20 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.



**Şekil 3.2.** Yapraktan genomik DNA izolasyonunu gösteren önemli aşamalar. Sıvı azotla materyalin ezilmesi (a), kloroform: izoamil alkol (24:1) ile DNA'nın alınması (b), izopropanol ile çöktürme (c), düşük tuzlu TE ile DNA'nın çözündürülmesi

### 3.2.2 Veritabanı taraması ve primer tasarımı

Önceden yapılmış bir çalışma üzerinden (Tek vd., 2010) *G. max* CenH3 CDS (coding domain sequence, kodlama yapan dizi) bölgesinin nükleotid dizi bilgisine ulaşılmıştır (NCBI, FK014964). Bu bölge üzerinden 5', 3' ve internal ileri (F) ve geri (R) primerler tasarlanmıştır (Çizelge 3.1; Şekil 3.2). Primer sentezi Sentebiolab (Ankara) firması tarafından gerçekleştirilmiştir.

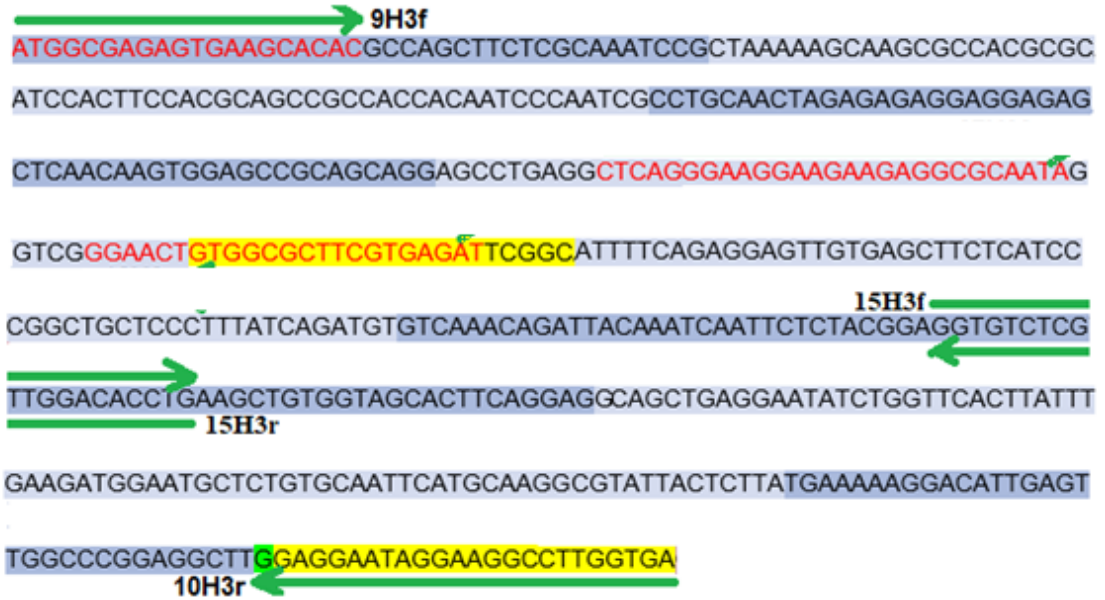
**Çizelge 3.2.** CenH3 nükleotid dizisinin kodlama yapan bölgelerinden tasarlanan primerler, ifade şekilleri ve protein karşılıkları.

Primer ismi	5'-3'	Uzunluk	F\R	İfade	Protein Karşılığı	Bağlanma Sıcaklıkları ( $T_m$ )
9H3f	ATG GCG AGA GTG AAG CAC	18	F	CenH3 spesifik 5' bölge CDS	MARVKH	55 °C
10H3r	TCA CCA AGG CCT TCC TAT TCC TCG	24	R	CenH3 spesifik 3' bölge CDS	GGIGRPW*	61 °C
15H3f	GGT GTC TCG TTG GAC ACC TG	20	F	CenH3 spesifik internal bölge CDS	EVSRWTPE	56 °C
15H3r	CAG GTG TCC AAC GAG ACA CC	20	R	CenH3 internal bölge CDS	EVSRWTPE	56 °C

Soya CenH3 CDS bölgesinden tasarlanan primer çiftlerinin CenH3 genomik lokusu üzerinde elde edilen fragment ve toplam uzunluklarına göre primer çiftlerinin kısaltmaları verilmiştir. (Çizelge 3.3).

**Çizelge 3.3.** Soya CenH3 genomik lokusundan geliştirilen primer çiftleri ve bu lokustaki toplam uzunluklar

Primer çiftlerinin adı	Primer çiftleri	Toplam uzunlukları	Elde edilen fragment adı
z	9H3f-10H3r	4372 bç	z
x	9H3f-15H3r	1514 bç	x
y	15H3f-10H3r	2878 bç	y



**Şekil 3.3.** Tasarlanan primerlerin cds üzerinde gösterimi.

### 3.2.3 CenH3 genomik lokusunun çoğaltılması

Tüm CenH3 genomik lokusu içeren x ve y primer çiftleri kullanarak farklı soya türlerinin CenH3 genomik lokusunun çoğaltılması sağlanmıştır. İzole edilen 1 µl (25 ng/µl) genomik DNA, 1 µl (20mM) tasarlanan ileri ve geri primerler, 0.25 µl (5U/µl) Premix Ex Taq polimeraz enzimi (Takara, RR001A), 4 µl dNTP (2.5mM) karışımı, 5 µl 10× Ex Taq tamponu (Mg<sup>+2</sup> içerir) ve 38.75 µl ddH<sub>2</sub>O kullanılarak toplam 50 µl olacak şekilde aşağıda belirtildiği gibi her bitki türü için aynı döngü ve sıcaklıklar ayarlanmıştır.

Her bir reaksiyon için 30 döngüden oluşan DNA amplifikasyonu (Sensoquest Thermocycler) gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyon için 6 basamaklı bir PCR programı hazırlanmıştır. İlk denatürasyon basamağı 94.0 °C sıcaklıkta 2 dk, ikinci denatürasyon 94.0 °C 30 sn, primerin bağlanması için 65.0 °C sıcaklıkta 30 sn, dizinin uzaması için 69.0 °C sıcaklıkta 5 dk ve son uzama olarak 69.0 °C 7 dk olarak programlandırılmıştır. Reaksiyonun muhafaza edilmesi için PCR programı 4°C sıcaklıkta tamamlanmıştır.

### 3.2.4 Kompetent hücre hazırlama

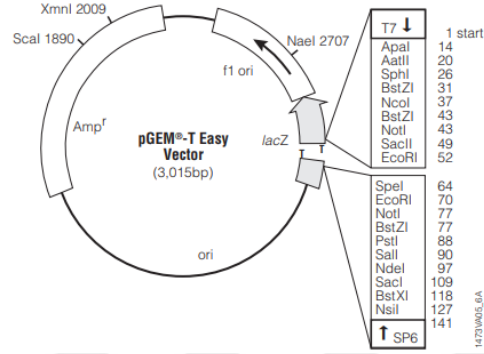
Biorad firmasının tavsiye ettiği *E. coli* bakterisinden elektrokompotent hücre hazırlama protokolüne göre aşağıda belirtildiği gibi hazırlanmıştır (Biorad, 2019). XL-1-blue suşunu içeren tetrasiklinli tabaklar oluşturulmuştur. Bakteriler tabaklarda 37°C sıcaklıkta 1 gece inkübatörde büyütülmüştür.

Tabaklardan seçilen kolonilerden bir gecelik LB (2.5 g NaCl, 5 g Tripton, 2.5 g maya özütü) sıvı besiyerine tetrasiklin 1:1 oranında eklenip *E. coli* mini kültürü hazırlanmıştır. Ayrıca *E. coli* kültürü içermeyen 100 ml LB besiyerine 100 µl tetrasiklin olacak şekilde 4 ayrı kültür hazırlanmıştır. Hazırlanan kültürler 37°C sıcaklıkta 165 rpm hızında 1 gece inkübatöre bırakılıp bakteriler üretilmiştir. Her bir mini kültürden 1 ml alınıp 4 ayrı hazırlanan büyük kültüre 30 dk aralıklarla eklenmiştir. OD<sub>600</sub> değeri 0.6 olana kadar 37°C sıcaklıkta bakteri üretilmiştir. Başlangıç ölçümü (blank) olarak LB kullanılmıştır. Üreyen 4 büyük kültür 20 dk buzda bekletilmiştir. Kültürler bekletildikten sonra 50 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. 4 °C sıcaklıkta 4000 xg hızda 15 dk santrifüj yapılmış ve süpernatantlar atılmıştır. Her bir tüpteki pelet 25 ml dH<sub>2</sub>O ile nazikçe çözdürülüp her bir tüpte 50 ml olacak şekilde tüpler birleştirilip total tüp sayısı yarıya indirgenmiştir. Kalan tüplerde işlem tekrarlanıp tüp sayısı bire düşene kadar işlem tekrarlanmıştır. Kalan son pelet %10'luk 1 ml gliserolle buzda çözdürülmüştür. Elektrokompotent hücrelerden 100 µl alınıp santrifüj tüplerine aktararak 80 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

### 3.2.5 Ligasyon

Ligasyon için pGEM-T easy vektör (Promega, A1360) kitinde yazılan protokole göre takip edilmiştir. İstenilen genomik lokusu taşıyan DNA fragmentlerinin vektöre

bağlanması için 0.5 µl (3 u/µl) T4 DNA ligaz enzimi, 2.5 µl 2× Rapid ligasyon tamponu, 0.5 µl 3015 bç büyüklüğünde pGEM-T easy vektör DNA (50ng) (Şekil 3.4), 1.5 µl (3×) DNA fragmenti kullanılarak toplam 5 µl olacak şekilde ligasyon karışımı pipetleme yapılarak hazırlanmıştır. Ligasyon reaksiyonun daha fazla transformant elde etmek için +4 °C sıcaklıkta 1 gün inkübe edilmiştir.



**Şekil 3.4.** pGEM-T easy vektörünün boyutu ve çoklu klonlama bölgesini kesen restriksiyon enzimlerini gösteren harita (Promega)

### 3.2.6 Transformasyon

Bakteri hücrelerine hedef DNA'nın aktarılması için elektrik akımıyla elektrotransformasyon yapılmıştır. Ligasyon sonucu hedef DNA'yı içeren karışım 5 dk buzda önceden erimesi sağlanan 100 µl'lik elektrokompotent hücrelerine aktarılmıştır. Ardından doğrudan 0.1 cm elektrot boşluklu (kahverengi kapak) transformasyon küvetine (Biorad, Gene Pulser®/MicroPulser™) aktarılmış ve elektroporasyon yöntemiyle transformasyon cihazı (Biorad, Gene Pulser Xcell™) kullanılarak hedef DNA bakteri hücrelerine transforme edilmiştir. Transforme edilen hücreler önceden hazırlanmış 1 ml'lik SOC besiyeri içeren tüplere (100 ml SOB besiyeri (10 g tripton, 2.5 g maya özütü, 0.25 g NaCl, 5 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>) ve 2 ml %20 glukoz) aktarılıp 37 °C sıcaklıkta 165 rpm hızında 45 dk inkübe edilmiştir.

Tryptone (10 g), maya özütü (5 g), NaCl (10 g) ve agardan (15 g) oluşan ampisilinli (1000 µg/ml) 1 litre LB (L-broth agar) tabaklarına 50 µl rekombinant plazmidler %70'lik etanolla steril edilmiş öze yardımıyla LB tabağına yayma preparat tekniğiyle ekim yapılmıştır. Ekim yapılan tabaklar 37 °C inkübatörde 1 gün boyunca büyümesi beklenip +4 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

### 3.2.7 Plazmid izolasyonu

Her bir tüpe 2 ml'lik LB besi ortamı içerisinde 2 µl ampisilin olacak şekilde sıvı kültür hazırlanmıştır. Ekimi önceden yapılmış rekombinant koloniden kürdan ile tek koloni seçimi yapıp sıvı kültür içeren tüpe bırakılmış 165 rpm hızında 1 gece inkübatörde plazmidlerin büyümesi sağlanmıştır.

Büyüyen kültürden ve %50 gliserolden 1:1 oranında tüplere aktarılıp -80 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. İleride karşılaşılabilecek muhtemel sorunları önlemek amaçlı stok hazırlanmıştır. Kalan kültür buza alınıp santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Kültürü pellet haline getirmek için 3 dk 13500 rpm hızda santrifüj yapılmıştır. Üzerine 100 µl resüspanسیون solüsyonundan (25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 50mM %20 glukoz, 100 µl RNase A(stok 10mg/ml), ddH<sub>2</sub>O) eklenmiş ve vorteks yardımıyla pelet solüsyonda çözdürülmüştür. Çözülen pelet üzerine 100 µl lizis solüsyonundan (10N NaOH,%10 SDS, ddH<sub>2</sub>O) eklenmiştir. Üzerine 100 µl potasyum asetat eklenmiş ve nazikçe karıştırılıp bekletilmiştir. Bu aşamada bulutsu bir yapı gözlenmiştir. Bulutsu yapı askıda kaldığı gözlemlendikten sonra 10 dk 1000 rpm hızında santrifüj yapılmıştır. Süpernatant yeni tüplere aktarılıp üzerine 500 µl sodyum iyodür (6 M NaI) eklenmiştir. DNA'nın çökmesini sağlayan silika matriks çözeltisinden 25 µl eklenerek 5 dk belirli aralıklarla tüp karıştırılarak oda sıcaklığına bırakılmıştır. DNA'nın matrikste iyice tutunması için 16 sn 12000 rpm hızda santrifüj yapılarak tüpün üst kısmında bulunan süpernatantın peletten uzaklaştırılması sağlanmıştır. Alt faz üzerine 500 µl yıkama solüsyonu eklenmiş (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA ve %50 EtOH) ve 16 sn hızlı santrifüj yapılarak yeniden süpernatantın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkama solüsyonu kullanılarak yapılan bu işlem iki kere gerçekleştirilmiştir. Hızlı santrifüj yapıp kalan sıvı mikropipetle çekilerek yıkama solüsyonu tamamen uzaklaştırılmıştır. Peletin kuruması beklenip üzerine 15 µl distile su eklenmiş ve 70 °C sıcaklıkta 2 dk boyunca arada belirli aralıklarla çözdürülerek silika matriks ve DNA'nın ayrıştırılması sağlanmıştır. Silikanın çökmesi için 2 dk santrifüj sağlanmıştır. Üst sıvıda kalan saf DNA alınarak yeni tüpe aktarılmıştır. Rekombinant DNA örnekleri %0.8'lik agaroz jele 5 µl yüklenerek elektroforez cihazında (Takara, Mupid One Sistem) 1× TAE solüsyonu içinde yürütülmüştür. Fragmentin moleküler ağırlığının ve uzunluğunun tespit edilmesi için standart 1 kb markör (GeneRuler™,

Thermo Scientific) kullanılmıştır. Agaroz jel sonucu Bio-Rad UV Transilluminatör cihazı ile görüntülenmiştir. Örnekler -20 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

### 3.2.8 Koloni PCR ve dizileme

Plazmid içinde insert DNA fragmentinin olup olmadığının saptanması için transforme olmuş tek koloni hücreler seçilerek pGEM-T easy vektörüne özgü M13 primerleri ile (Çizelge 3.4) uygun döngü ve sıcaklıkta PCR cihazında (Sensoquest Thermocycler) çoğaltma yapılmıştır. DNA örnekleri %0.8 agaroz jele 5 µl yüklenerek elektroforez cihazında 1× TAE solüsyonu içinde yürütülmüştür. Fragmentin moleküler ağırlığının ve uzunluğunun tespit edilmesi için standart 1 kb markör kullanılmıştır.

**Çizelge 3.4.** Koloni PCR için kullanılmış olan uygun primerlerin dizisi

Primer isimleri	5'-3' dizisi	Sıcaklık	Uzunluk
M13 F primer	5' TGTAACGACGGCCAGT 3'	55 °C	18 bç
M13 R primer	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'	55 °C	17 bç

PCR programı reaksiyon içeriğinde 0.25 µl (25 ng/µl) izole edilen plazmid örneği, 0.5 µl (2.0 mM) dNTP, 2.5 µl (10×) PCR tamponu, 0.5'er µl ileri ve geri M13 primerleri, 0.5 µl Taq DNA polimeraz enzimi ve 20.0 µl ddH<sub>2</sub>O eklenerek toplamda 25 µl olacak şekilde bir reaksiyon hazırlanmıştır. Bu reaksiyon için 6 basamaklı bir PCR programı hazırlanmıştır. İlk denatürasyon basamağı 94.0 °C sıcaklıkta 2 dk, ikinci denatürasyon 94.0 °C sıcaklıkta 30 sn, primerin bağlanması için 55.0 °C sıcaklıkta 30 sn, dizinin uzaması için 70.0 °C sıcaklıkta 5 dk ve son uzama olarak 70.0 °C sıcaklıkta 10 dk olarak programlandırılmıştır. Reaksiyonun muhafaza edilmesi için PCR programı 4 °C sıcaklıkta tamamlanmıştır. Toplam döngü sayısı 30 olacak şekilde düzenlenmiştir. Reaksiyonun muhafaza edilmesi için PCR programı 4 °C sıcaklıkta tamamlanmıştır. Insert DNA fragmentinin boyutunun tespit edilmesi için 1× TAE solüsyonunda %0.8 agaroz jel elektroforezi kullanılarak 1 kb markör DNA ile yürütmesi yapılmıştır. Agaroz jel EtBr solüsyonunda 10 dk bekletilmiş ve transillüminatör ile görüntülenmesi yapılmıştır. İçlerinden pozitif insert olan klonlar seçilmiştir.

DNA dizi bilgisinin elde edilmesi için 11 türün CenH3 genomik lokusunu içeren 48 insert klon ileri ve geri M13 primerleri ile toplam 96 okuma yapılması için MacroGen Europe firmasından hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir (Ek B). Seçilen klonlar türler arasında x bölgesine göre isimlendirilmiştir (Çizelge 3.5).

**Çizelge 3.5.** Farklı soya türlerinde CenH3 genomik lokusunun x bölgesini içeren klonların adlandırılması

<b>Türler</b>	<b>X'e göre klon isimlendirme</b>
<i>G. max</i>	max x6-1
<i>G. canescens</i>	can x3
<i>G. clandestine</i>	clan x3, clan x5
<i>G. crytologa</i>	cry x3, cry x4
<i>G. dolichocarpa</i>	doli x5, doli x10
<i>G. falcata</i>	fal x2, fal x3
<i>G. microphylla</i>	mic x8
<i>G. peratosa</i>	per x3, per x4
<i>G. stenophita</i>	st x1, st x5
<i>G. tomentella</i>	tom x1, tom x2

### 3.2.9 Verilerin değerlendirilmesi ve biyoinformatik analizi

M13 (Çizelge 3.4) ve spesifik x ileri ve geri primerlerin (Çizelge 3.2) nükleotid tanıma bölgelerinden arama yapılarak, gelen dizilerin CenH3 genomik DNA dizi bilgisine Geneious Prime 2019 (Kearse vd., 2012) programı kullanılarak ulaşılmıştır. Soya CenH3 genomik DNA (gDNA) (Phytozome) nükleotid dizileri x bölgesine, yani 1514 baz çiftinden oluşan kısım örnek alınarak yabancı soya intron ve ekzon bölgeleri belirlenmiş ve uzunlukları hesaplanmıştır.

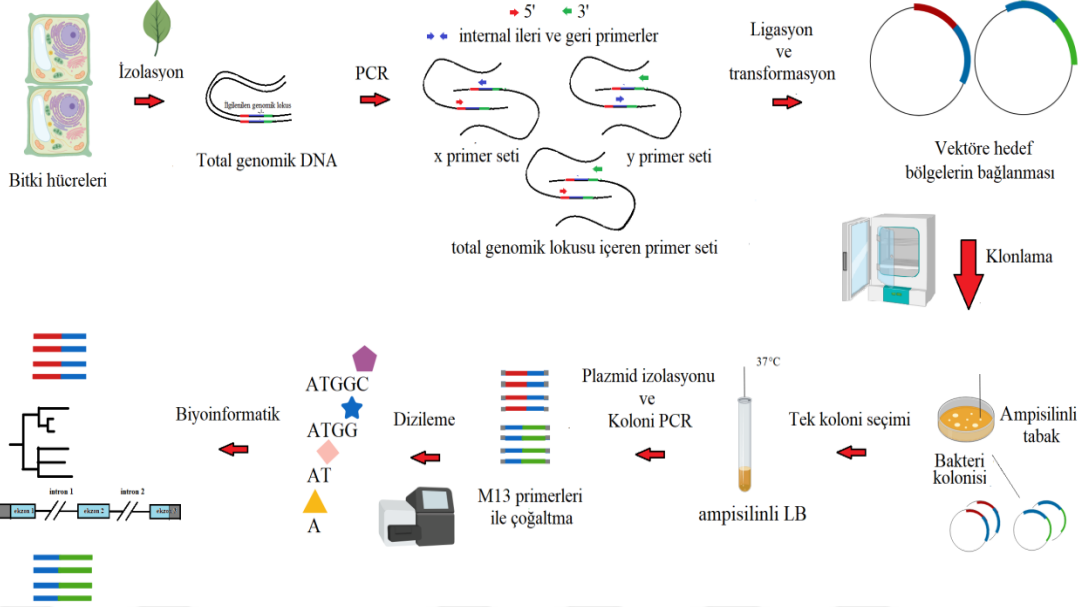
## BÖLÜM IV

### BULGULAR

#### 4.1 İş Akışı ve Planı

Bu tez sırasında çalışmanın nasıl yürütüldüğü ve sonuçların nasıl elde edildiğini gösteren bir iş akış diyagramı oluşturulmuştur (Şekil 4.1). Genel iş akışı özetlenecek olursa farklı soya türlerinin genç ve taze yaprakları kullanılarak genomik DNA izole edilmiştir. Soya CenH3 genomik lokusuna özgü *G. max* kodlama yapan dizilerine göre total lokusu içeren z primer çifti, genomik lokusu farklı iki parçaya bölen x ve y olmak üzere 3 primer çifti tasarlanmıştır. Klonlanan DNA fragmentlerinin büyüklüğünün, vektörün insert taşıma kapasitesini aşmasından dolayı doğrudan tüm genomik lokusu veren primer çifti ile klonlama çalışmaları yapılamamıştır.

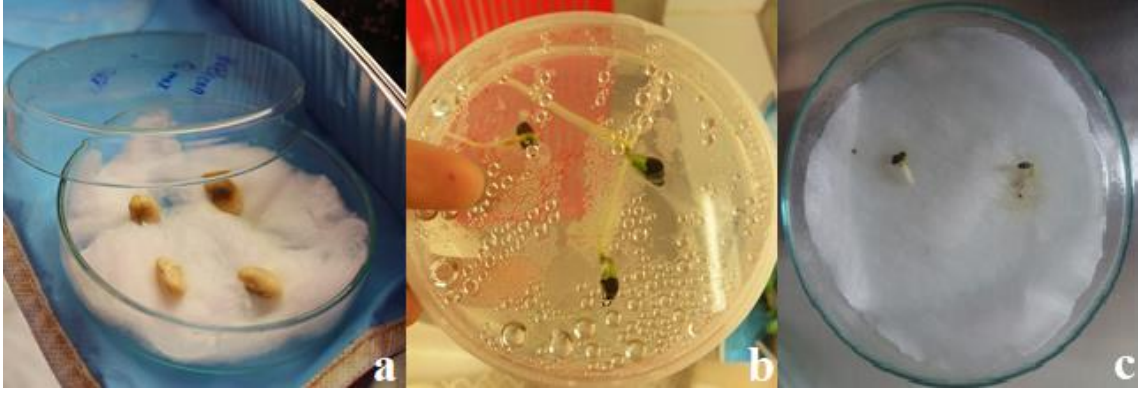
Genomik DNA izolasyonu başarılı olan tüm soya türleri bu primerlerle PCR yapılarak çoğaltılmıştır. Hedef DNA'yı içeren bölgelerin ayrı ayrı ligasyonları kurulmuş ve elektrotransformasyon yapılarak vektöre aktarılmıştır. Üreyerek klon oluşturmaları için ampisilinli tabağa ekilmiştir. Ekimi yapılan tabaklardan rekombinant olduğu düşünülen tek klonlar seçilerek inkübasyonu yapılmıştır. Plazmid izolasyonu yapılmış ve izole edilen plazmid içerisinde insert DNA fragmentinin olup olmadığının anlaşılması için koloni PCR yapılmıştır. İnsert olduğu düşünülen örneklerden her tür için 2 örnek seçilerek dizilemeye gönderilmiştir. Gelen dizi sonuçlarına göre CenH3 gen yapısı analizi yapıp biyoinformatik yöntemlerle tür içi ve türler arası kıyaslamalar yapılmıştır.



**Şekil 4.1.** Genel metodolojiyi gösteren akış diyagramı

## 4.2 Farklı Soya Türlerinde Çimlendirme ve Yetiştirme

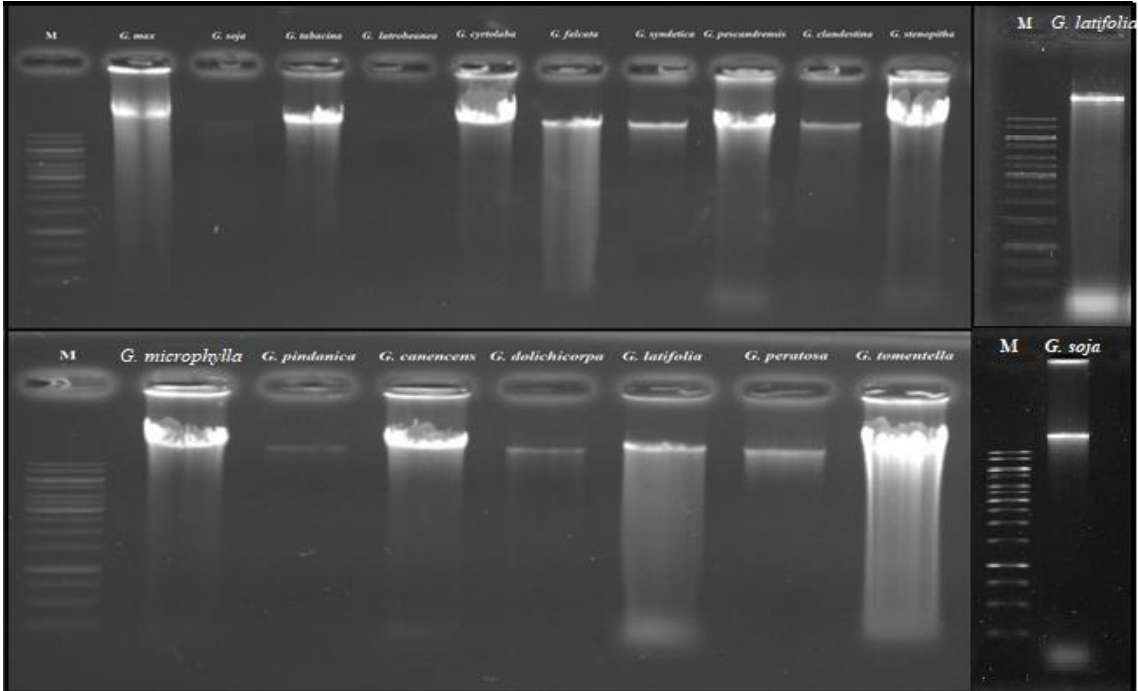
Bitki materyali çimlendirme ortamı olarak üç farklı ortam olmak üzere pamuk, MS besiyeri ve filtre kağıdı kullanılmıştır. Bazı yabancı türlerin (Çizelge 3.1.) tohumlarının daha kolay köklenmesi için kesici alet yardımıyla tohum kabuğu çizilmiştir. MS besiyeri üzerindeki tohumlar sterilizasyon yapıldığı halde kontaminasyon gözlenmiştir. Çimlenme oranı sırasıyla en iyi filtre kağıdında, sonra pamukta en son MS besiyeri ortamında olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). *G. argyrea*, *G. curvata* ve *G. rubiginosa* türlerinde filtre kağıdında çimlendirilen tohumların fizyolojik olarak canlı kalabilme süreleri düşük olduğundan toprağa aktarıldıktan sonra tutunamayıp gelişimleri durmuştur. Ayrıca elimizde bu türlere ait yeterli tohumun bulunmamasından dolayı bu türler ile çalışılamamıştır (Ekler A).



**Şekil 4.2.** Çimlendirme işlemi için oluşturulan ortamlar. Pamuk ile çimlendirilmesi (a), MS besiyerinde çimlendirilmesi (b), filtre kağıdında çimlendirilmesi (c)

### 4.3 Farklı Soya Türlerinde Genomik DNA İzolasyonu

CTAB metodu ile 17 *Glycine* türünde genomik DNA izolasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. İzole edilen genomik DNA %1.6'lık agaroz jelde 70 V'da 60 dk yürütülmüştür (Şekil 4.3). Jel sonucunda örneklerin PCR için uygun saflıkta, net bantlar verdiği görülmüştür. Çimlendirilip toprağa aktarılan ve taze yaprak elde edilen 18 farklı soya türünde genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Diğer üç türde çimlenme başarılı olmadığı ve yaprak elde edilemediği için izolasyon gerçekleştirilememiştir (Ekler A).



**Şekil 4.3.** Genomik DNA'sı izole edilen farklı soya türlerinin jel görüntüsü

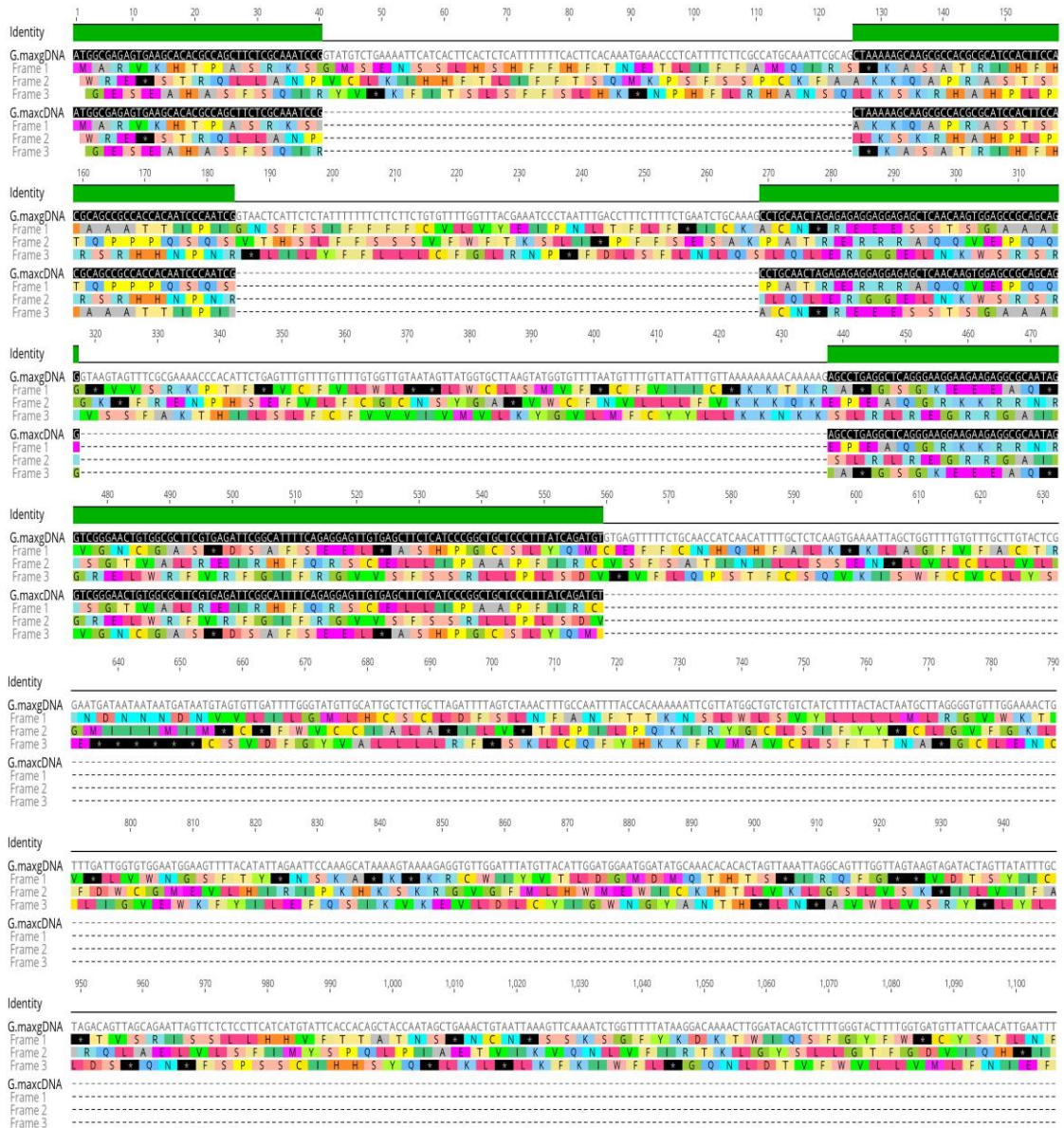
İzolasyonu yapılan örneklerin konsantrasyonunu NanoDrop cihazında ölçülmüştür. Sunulan konsantrasyon değerleri seyreltme yapılmadan önceki değerleridir. Değerlerin jel görüntüsünde gözlenen parlaklıklar ile orantılı bir sonuç olduğu gözlemlenmiştir. Örnekler PCR için yaklaşık 200 ng olacak şekilde seyreltilmiştir (Çizelge 4.1.).

**Çizelge 4.1.** Genomik DNA örneklerinin NanoDrop ölçümleri

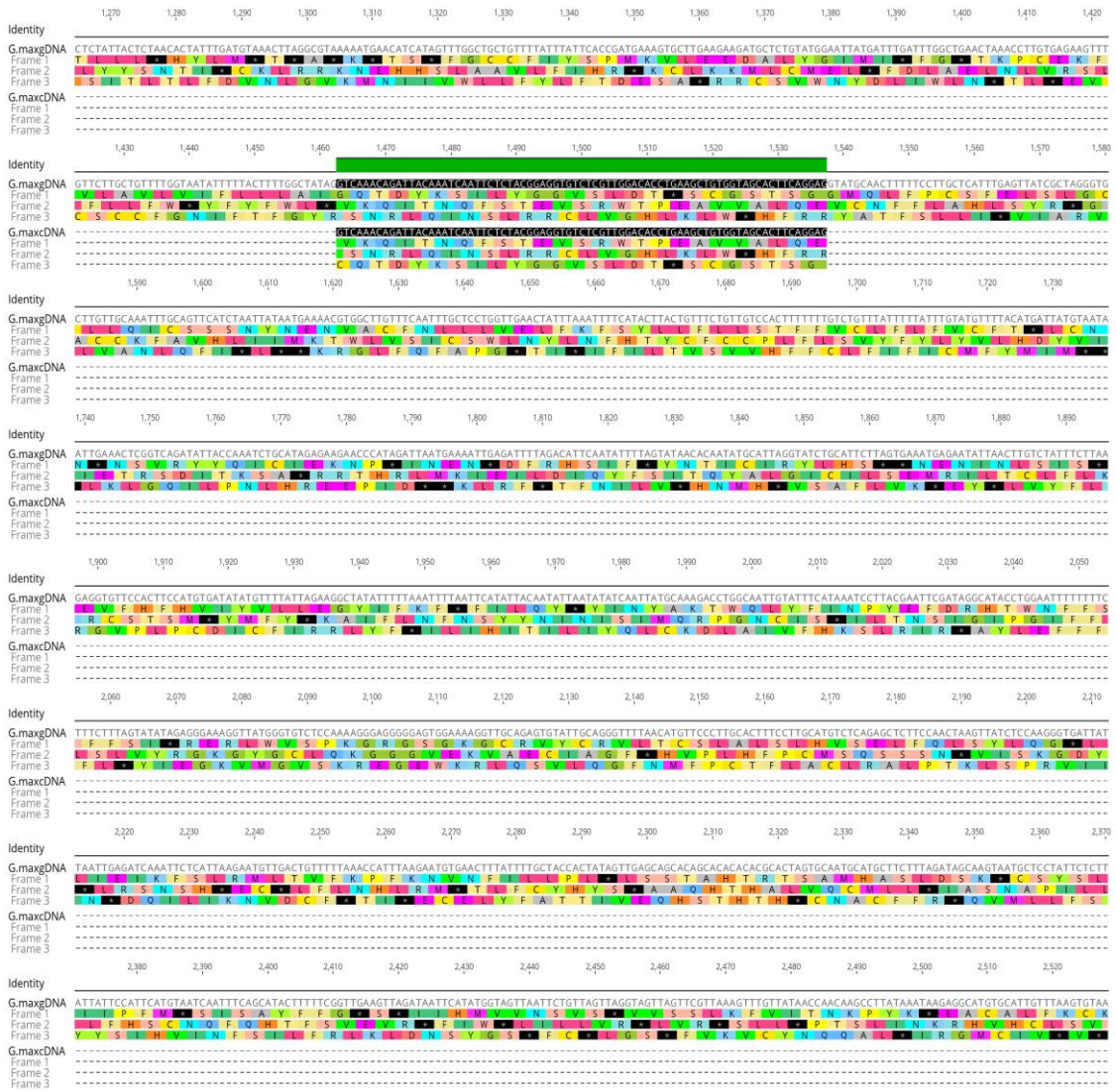
<b>Türler</b>	<b>Konsantrasyon (ng/ µl)</b>
<i>G. max</i>	1918
<i>G. canescens</i>	1587
<i>G. clandestine</i>	1240
<i>G. crytologa</i>	1205.
<i>G.dolichocarpa</i>	1953
<i>G. falcata</i>	1795
<i>G. latrobeana</i>	1278
<i>G. latifolia</i>	1247
<i>G. microphylla</i>	1194
<i>G. peratosa</i>	1747
<i>G. pescadrensis</i>	1514
<i>G. pindanica</i>	1693
<i>G. stenophita</i>	1744
<i>G. syndetika</i>	1518
<i>G. tabacina</i>	1802
<i>G. tomantella</i>	2314
<i>G. soja</i>	1753

#### 4.4 Soya CenH3 Genine Özgü Primerlerin Tasarımı

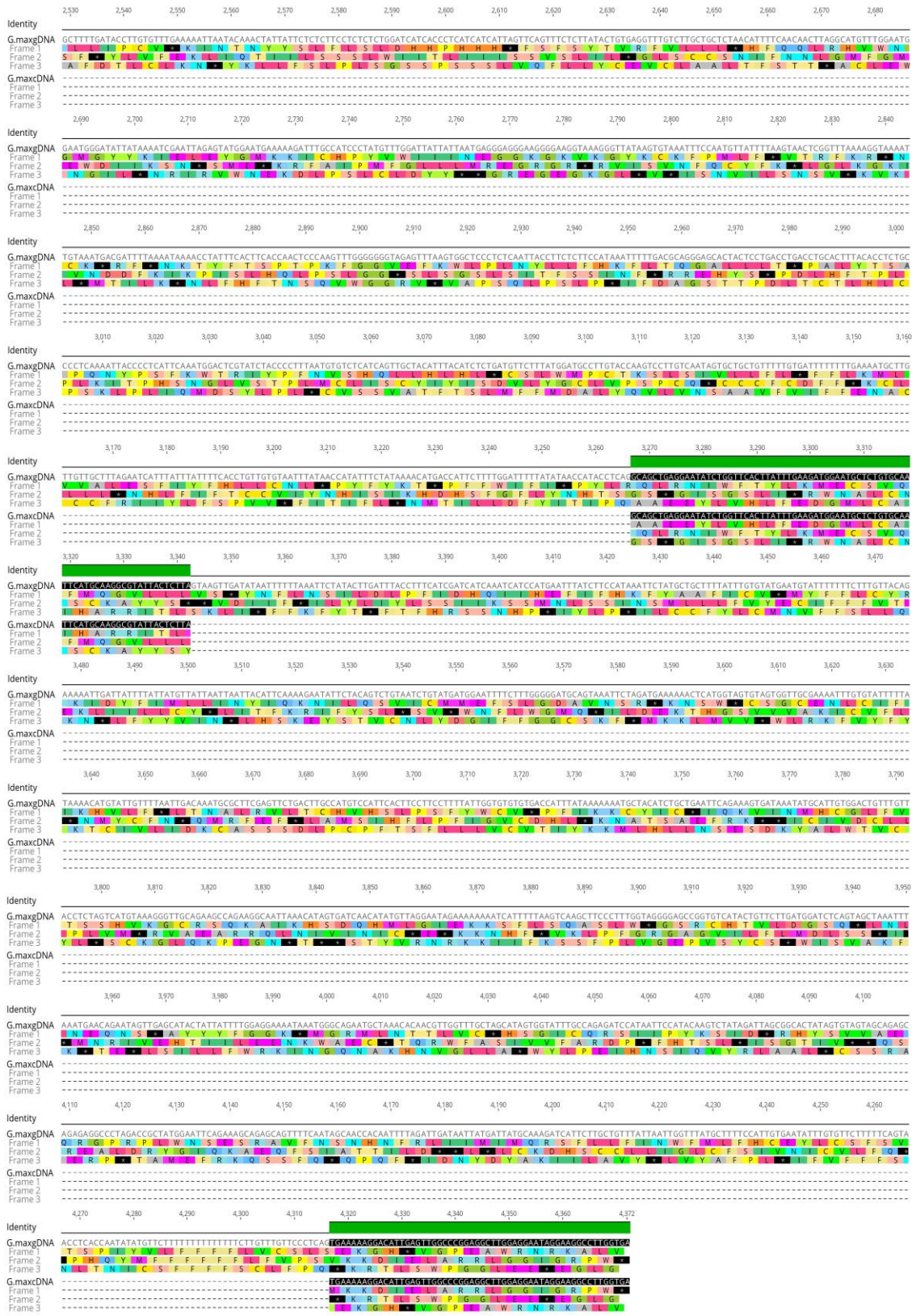
NCBI veritabanından alınan *G. max* CenH3 geninin genomik DNA ( Phytozome) ve komplementer DNA (cDNA) (NCBI, FK014964) dizi bilgileri hizalaması yapılmıştır. Nükleotid dizi benzerliği gösterdiği bölgelere göre ekzon (yeşil) ve intron bölgeleri belirlenmiştir. (Şekil 4.4). Toplamda 7 ekzon 6 intron bölgesi içermektedir. Bu ekzon bölgelerine bakılarak kodlayan bölgelerden genomik DNA molekülüne özgü primerler tasarlanmıştır.



**Şekil 4.4.** *Glycine max* CenH3 geninin cDNA ve gDNA nükleotid dizileri kıyaslanarak intron ve ekzon bölgelerinin belirlenmesi. Hizalamalar ClustalW'da (Larkin vd., 2007) yapılmıştır. Geneious sürüm 11.1.3'de uygulanmıştır (Kearse vd., 2012).

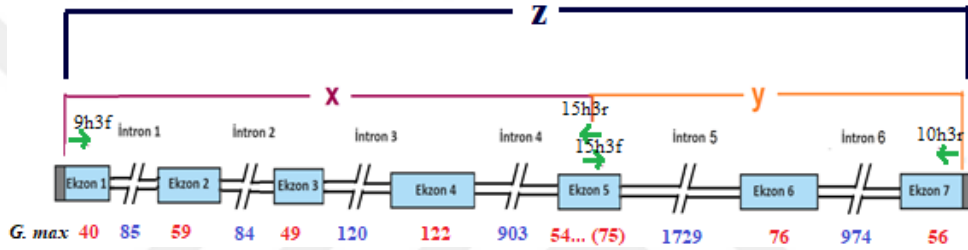


**Şekil 4.4. (Devamı) *Glycine max* CenH3 geninin cDNA ve gDNA nükleotid dizileri kıyaslanarak intron ve ekzon bölgelerinin belirlenmesi. Hizalamalar ClustalW'da (Larkin vd., 2007) yapılmıştır. Geneious sürüm 11.1.3'de uygulanmıştır (Kearse vd., 2012).**



Şekil 4.4. (Devamı) *Glycine max* CenH3 geninin cDNA ve gDNA nükleotid dizileri kıyaslanarak intron ve ekzon bölgelerinin belirlenmesi. Hizalamalar ClustalW'da (Larkin vd., 2007) yapılmıştır. Geneious sürüm 11.1.3'de uygulanmıştır (Kearse vd., 2012).

*G. max* CenH3 cds bölgesindeki nükleotid dizilerinden tasarlanan primerlerin adları ve hangi ekzon bölgesinde oldukları yeşil oklarla belirtilmiştir. Bu nükleotid dizisi üzerinden her ekzon ve intronun toplam uzunluğu şekilde gösterilmiştir. Ekzon bölgeleri seçilirken vektöre aktarılacak fragmentlerin uzunluklarının belirli uzunlukta (<3100 bp) olması gerektiği için x fragmenti sırasıyla 1. ve 5. ekzonun 54. nükleotid dizisine kadar olan kısmı kapsamaktadır. Y fragmenti ise 5. ekzonun 35. nükleotid dizisi ve 7. ekzon bölgesinin sonuna kadar olan kısmı kapsamaktadır. CenH3 genomik lokusunun toplamda 7 ekzondan oluştuğu esas alınarak başlangıç (1. ekzon) ve bitiş (7.ekzon) dizilerine dikkat edilerek primerler tasarlanmıştır. Z fragmenti dizinin tamamını 1. ekzondan 7. ekzona kadar olan nükleotid dizisini kapsamaktadır (Şekil 4.5).



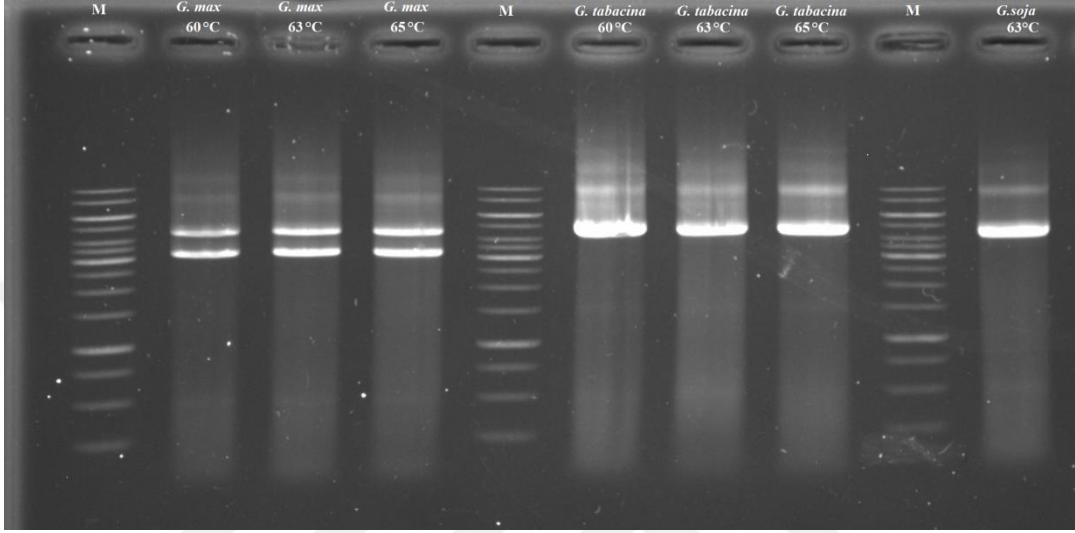
Şekil 4.5. *G. max* CenH3 genomik lokusu

#### 4.5 Yabancı Soya Türlerinde CenH3 Genomik Lokusunun PCR Optimizasyonu

PCR optimizasyon için ilk çalışmalar *G.max*, *G. tabacina* ve *G. soja* türleri üzerinde yapılmıştır. Primerler *G. max* CenH3 cds nükleotid dizine göre tasarlandığı için CenH3 genomik lokusunun total uzunluğu bilinmektedir. Bu yüzden *G. max* diğer türlerin fragment uzunluklarının belirlenmesi için kontrol olarak seçilmiştir. Yabancı türler ise tasarlanan primerin CenH3 genomik lokus amplifikasyonu için uygun olup olmadığını görmek amaçlı seçilmiştir. *G. tabacina* ve *G. soja* türlerinin izole edilen genomik DNA örnekleri saf olup jel görüntüsünde net bir bant gözlemlendiği için PCR optimizasyonunda kullanılmıştır (Şekil 4.3). Optimizasyon başarılı olunca diğer türler üzerinde de uygulamalar yapılmıştır.

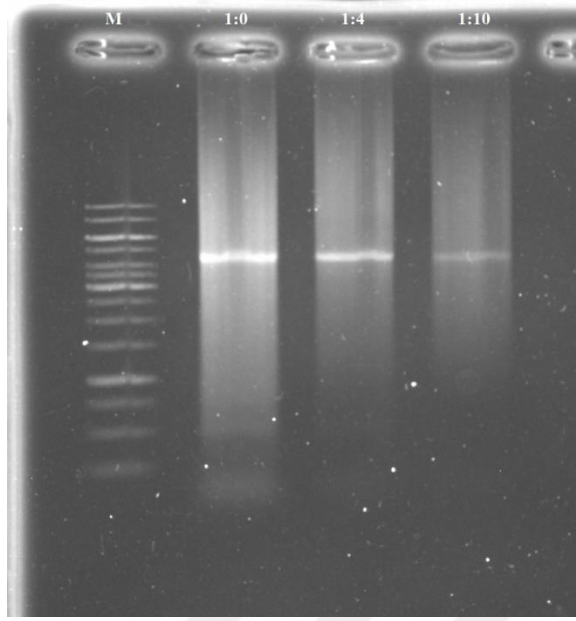
*G.max*, *G. tabacina* ve *G. soja* türlerinin genomik DNA örneklerinden alınarak primer bağlanma sıcaklıkları (3. basamak) 60-63 ve 65 °C olacak şekilde PCR yapıp uygun en optimum sıcaklık belirlenmek istenmiştir. DNA fragmentleri %0.8 agaroz jelde 100 V'da 25 dk yürütülmüştür. Optimizasyon için kullanılan türlerin PCR jel görüntülerine

bakıldığında denenen sıcaklıklar arasında primer bağlanma sıcaklığı en ideal 65 °C olduğunda PCR'ın net bir bant verdiği tespit edilmiştir. *G. tabacina* ve *G. soja* türlerinin CenH3 genomik lokusu fragment uzunluğu 4000 ila 4500 bp aralığında olduğu görülmektedir. *G.max* türünde ise yaklaşık 3000 ve 4500 civarı iki fragment olduğu tespit edilmiştir. (Şekil 4.6).



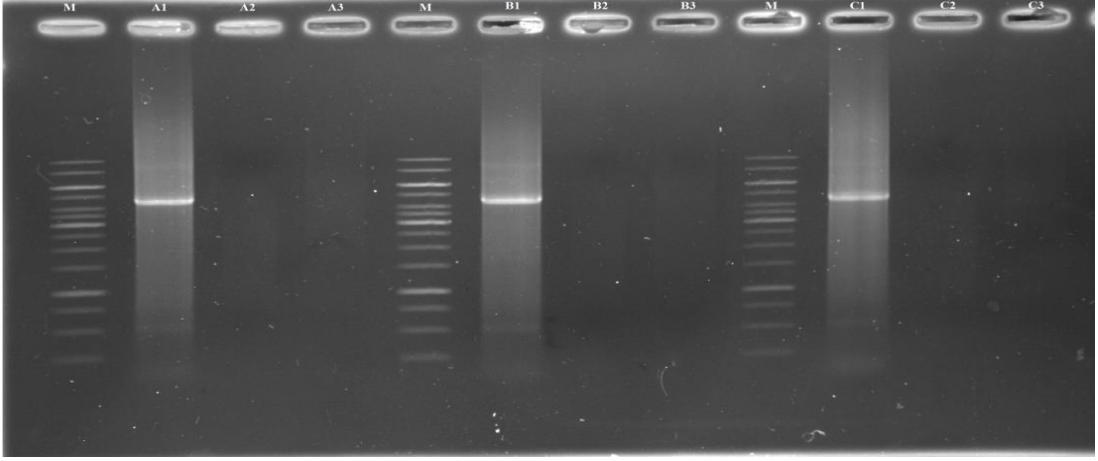
**Şekil 4.6.** *G.max*, *G. tabacina* ve *G. soja* türlerinde 60-63 ve 65 °C primer bağlanma sıcaklıkları kullanılarak oluşturulan PCR jel görüntüsü.(M: markör, 1 kb)

Jelin arka planında oluşan dağınık görüntünün primer konsantrasyonu ile bağlantılı olup olmadığının anlaşılması için *G. tabacina* türünde 1:0 (20mM), 1:4, 1:10 (primer: ddH<sub>2</sub>O) oranlarında primerler seyreltilerek (z primer çifti) içlerinden 1'er µl alınarak PCR kurulmuştur. DNA fragmentleri %0.8 agaroz jelde 100 V'da 25 dk yürütülmüştür. Sonucunda primer seyreltmenin dağınık görüntüyü ortadan kaldırmadığı hatta bant parlaklığını da azalttığı için net bir görüntü olmadığı gözlemlenmiştir. En uygun primer konsantrasyonunun 1:0 (20mM) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7.** *G. tabacina* türünde primerlerin 1:0, 1:4, 1:10 (primer: ddH<sub>2</sub>O) oranlarında seyreltilmesi sonucu elde edilen PCR'ın jel görüntüsü

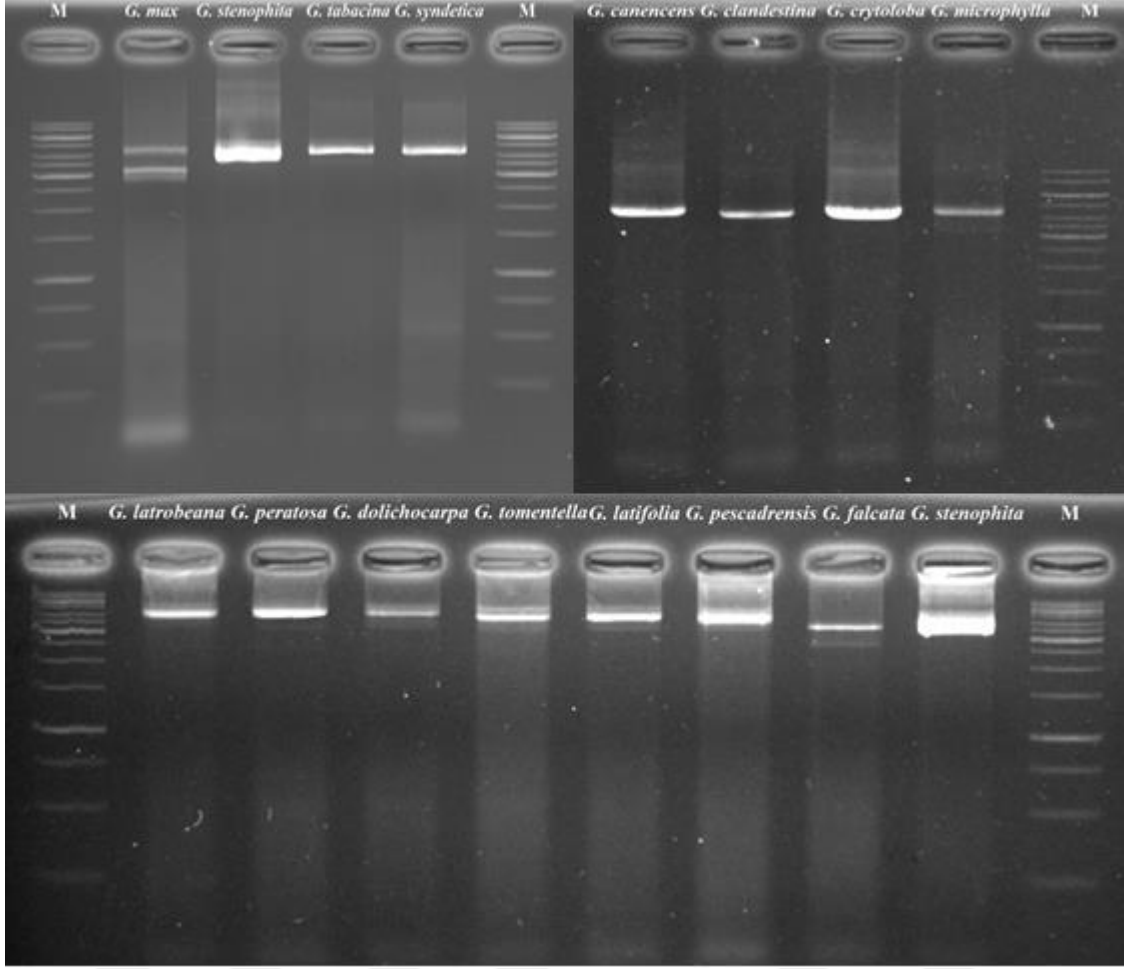
*G. tabacina* türünde arka planda oluşan spesifik olmayan dağınık görüntünün nedenini ve primer bağlanma sıcaklıklarının hangi sıcaklıkta uygun olduğunu tespit etmek için PCR reaksiyonları kurulmuştur. Bu reaksiyonlar, A, B ve C sırasıyla 63, 65 ve 68 °C primer bağlanma sıcaklıklarıyla 1 normal PCR karışımını, 2 sadece primer içermeyen karışımı, 3 ise primer ve Premix Ex Taq içermeyen karışımı oluşturmaktadır. DNA fragmenti %0.8 agaroz jelde 100 V'da 25 dk yürütülmüştür. Bu reaksiyonlardan A1, B1 ve C1 kontrol çalışma, A2, B2 ve C2 kullanılan enzimin PCR için etkisini görmek, A3,B3 ve C3 ise genomik DNA'nın PCR için yeterli saflıkta olup olmadığını tespit etmek amaçlıdır. A2, B2 ve C2 jel sonucuna bakıldığında enzim ve genomik DNA'nın birlikte olmasının spesifik olmayan ürünlerin oluşmasında bir etken yaratmadığını ve enzimin bu çalışma için sorun oluşturmadığını, A3,B3 ve C3 jel sonucunun aynı şekilde genomik DNA'nın spesifik olmayan dağınık görüntü oluşturmadığını ve PCR için yeterli saflıkta olduğunu göstermektedir. En uygun primer bağlanma sıcaklığı net ve parlak bant görüntüsünden dolayı 65 °C olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8.** *G. tabacina* türünde normal, primersiz ve primer+premixsiz PCR döngülerinin karşılaştırılması. A: 63 B: 65 C:68, 1: normal PCR (primer ve premixli), 2: primer yok ve 3: primer ve Premix Ex Taq yok

#### 4.5.1 Farklı soya türlerinde total CenH3 genomik lokusunu içeren primerlerle yapılan PCR çalışmaları

Arka planda bulunan spesifik olmayan dağınık görüntüyü kaldırmak için z primer çifti yeniden tasarlanmıştır. Primerler daha saf ve spesifik olarak tasarlandıktan sonra aynı karışımı içeren PCR tekrar oluşturulmuştur. *G. pindanica* hariç diğer 16 türün PCR'ı başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu PCR sonucu oluşan DNA fragmentleri %1.6'lık agaroz jelde 70 V'da 35 dk yürütülmüştür. *G. pindanica* türünde CenH3 genomik lokusunun amplifikasyonun başarılı olmamasının sebebi primerlerin bu tür için spesifik olmaması ya da genomik DNA'nın yeterli saflıkta olmamasından kaynaklanabilir (Ek A). Arkada planda bulunan spesifik olmayan dağınık görüntü bu spesifik primerler kullanıldığında azalmıştır. Ligasyon için uygun parlak ve net bir PCR jel görüntüsü gözlemlenmiştir. Genomik lokus uzunluğunun aynı uzunlukta olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9).

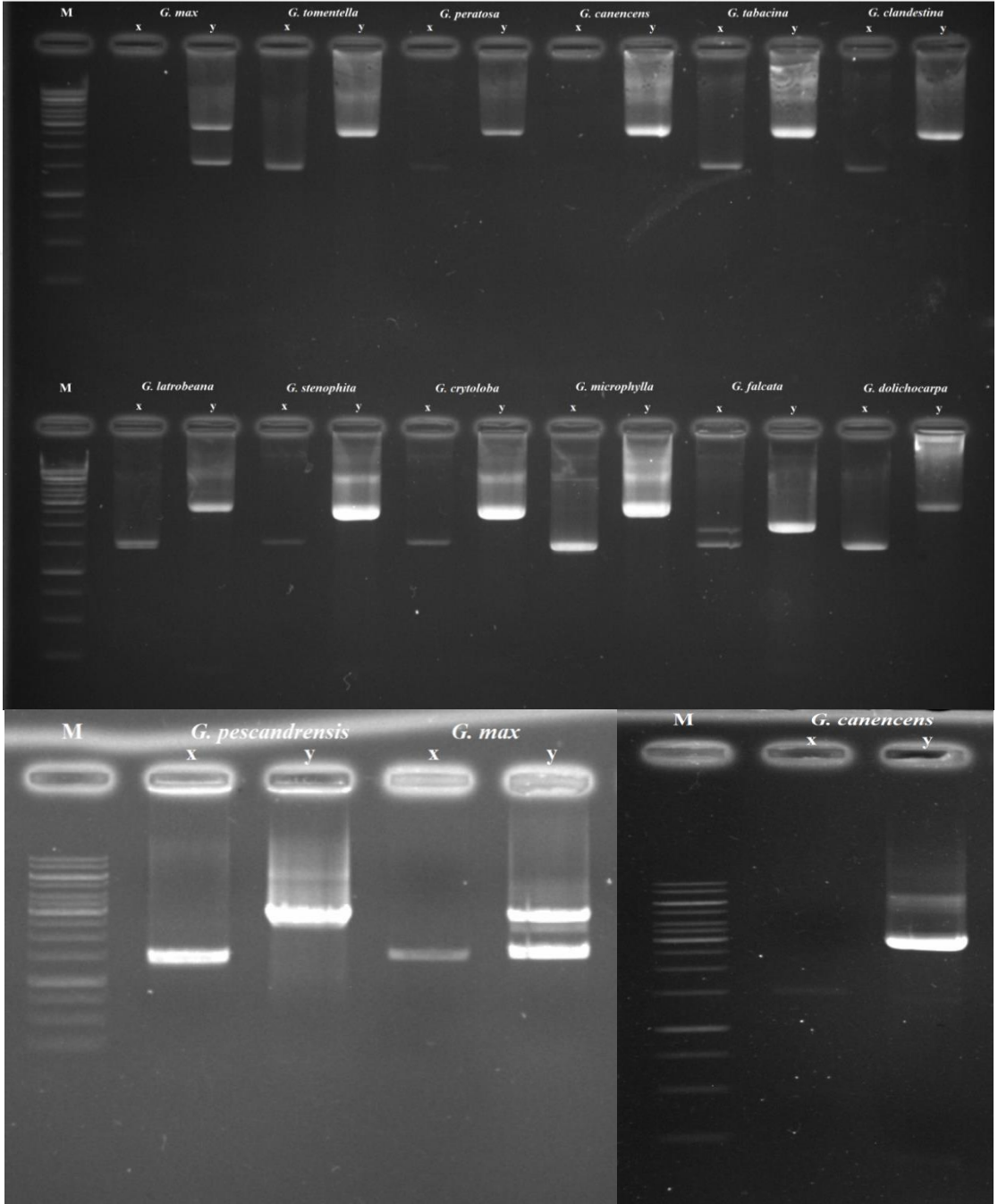


**Şekil 4.9.** Farklı soya türlerinde total CenH3 genomik lokusunun çoğaltılması

#### 4.5.2 Farklı soya türlerinde CenH3 genomik lokusunu kapsayan iki primer çifti ile yapılan çalışmalar

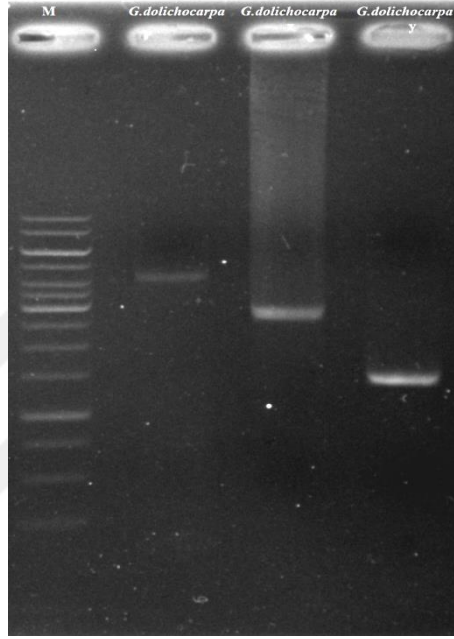
İlk klonlama çalışmaları *G. max* CenH3 genomik lokusunun kodlayan bölümünün tamamını çoğaltan PCR ürünü üzerinde yapılmıştır. Ancak klonlama aşamasında pGEM-T easy vektörünün insert alma kapasitesinin sınırlı (<3100 bp) olduğu gözlemlenmiştir. *G. max* türünün toplam CenH3 genomik lokusu ise 4372 bp uzunluğundadır. Bu uzunluk insert kapasitesinin çok daha üzerinde olmasından dolayı koloni PCR sonucu insert gözlemlenmemiştir. Diğer türler için bu işlem tekrarlandığında aynı sonuç ile karşılaşılmıştır. Bu yüzden PCR farklı uzunluktaki iki primer çifti ile kurulmuştur. Bu çiftler birbirinin devamı niteliğinde olup CenH3 genomik lokusunun tamamını içeren 2 fragment olacak şekilde sırasıyla x ve y olarak adlandırılmıştır. X primer çifti 1514 bp uzunluğunda x fragmentini, y primer çifti 2878 bp uzunluğunda y fragmentini oluşturmaktadır. Ancak bu uzunluklar türler arası CenH3

geni nükleotid dizi değişimlerinden dolayı farklı uzunlukta oldukları tespit edilmiştir. Bu x ve y fragmentlerinin amplifikasyonu soya ve 12 yabancı tür olmak üzere toplam 13 türde başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Ek A). Aynı PCR döngüsü ve reaksiyon bileşenlerini içerecek şekilde PCR çoğaltma reaksiyonları kurulmuştur. Bu PCR sonucu oluşan fragmentler %0.8 agaroz jelde 100 V'da 25 dk yürütülmüştür (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** Yabancı soya türlerinde x ve y primerleri kullanılarak oluşan PCR fragmentlerinin jel elektroforezinde görüntüsü

*G. dolichocarpa* türünde z, y ve x fragmentlerinin bir arada gösterilmesi için sırasıyla z, y ve x primer çiftleri kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuştur. Markörden sonra birinci sırada bulunan toplam CenH3 genomik lokusunu veren z fragmenti, 4000 ila 4500 bp arası uzunluğundadır. Markörden sonra ikinci sırada yer alan y fragmenti yaklaşık 3000 bp ve üçüncü sırada yer alan x fragmenti yaklaşık 1500 bp uzunluğundadır. x ve y fragmentleri toplamı CenH3 genomik lokusunun tamamını yani z fragmentini oluşturmaktadır (Şekil 4.11).

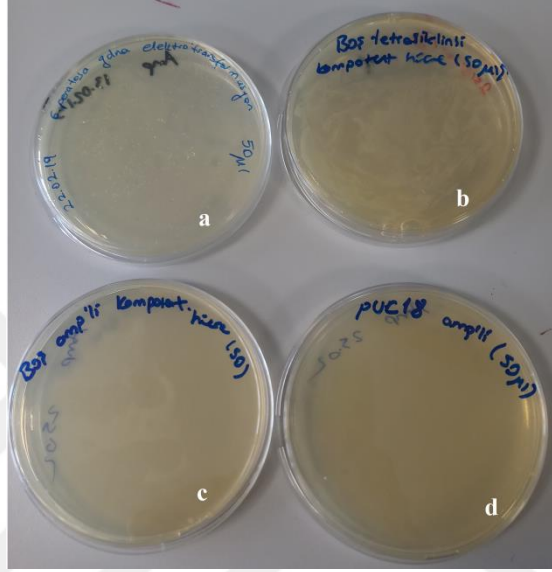


**Şekil 4.11.** *Glycine dolichocarpa* türünde z, y ve x primerleri ile oluşan DNA fragmentlerinin jel görüntüsü

#### 4.6 Yabani Soya Türlerinde CenH3 Genomik Lokusunun Klonlanması

*E. coli* XL-1 suşuna ait kompetent hücreler hazırlandıktan sonra uygun antibiyotiği seçmek için boş tetrasiklinli ve ampisilinli LB tabakları hazırlanmıştır. Hücreler küvetlere aktarılıp doğrudan transformasyon yapılmıştır. Transforme hücreler içinden 50 µl alınıp tabaklara yayılmıştır. Pozitif kontrol olarak da insert içermeyen pUC18 plazmidi ve *G. peratosia* türünün CenH3 genomik lokusunu içeren ligasyon reaksiyonu kompetent hücrelere aktarılmıştır. Transformasyon sonrası ampisilinli tabağa tek koloni gözlenmesi için drisgalski spatülü ile transforme plazmidler yayılmıştır. İnkübatörde 37 °C sıcaklıkta 1 gün boyunca tabaklar bekletilmiştir. Üreme sonucuna göre XL-1 suşunun tetrasikline dirençli olduğu ampisiline karşı direnç göstermediği görülmüştür.

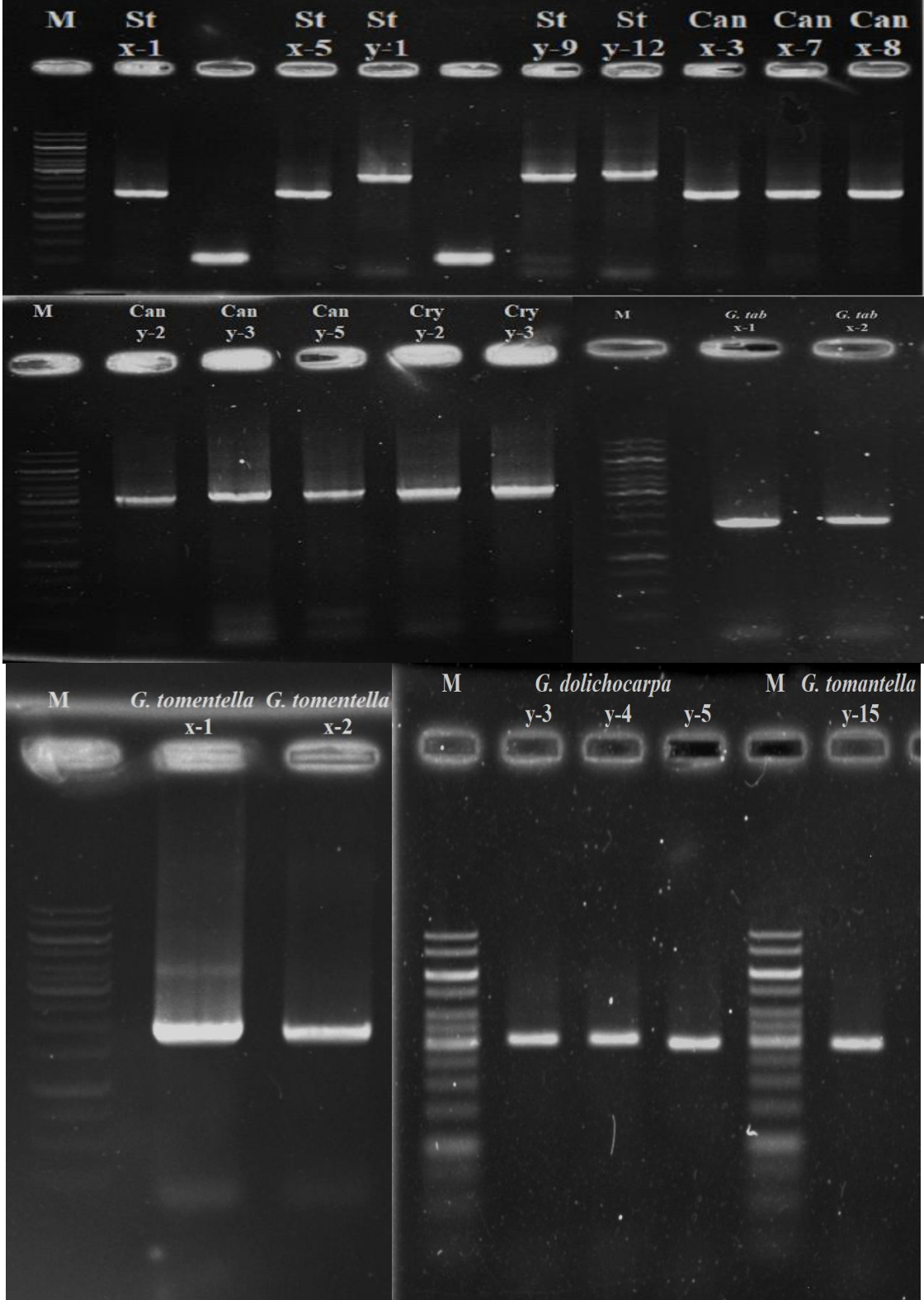
Bu yüzden bu hücelere aktarılan diğer bakterilerde in vitro üreme yani tek koloni oluşumu gözlemlenmiştir. Ampisilin kullanımı ile yabancı DNA'yı içermeyen dönüştürülmemiş bakterilerin üremesi engellenmiş ve ilgilenilen geni içeren rekombinant kolonilerin oluşması sağlanmıştır (Şekil 4.12). Yabani soya türünün 10 tanesi ve soya olmak üzere toplam 11 türde x ve y fragmenlerinin klonlanması başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Ek A).



**Şekil 4.12.** Hazırlanan kompetent hücrelerinin kontrol tabakları. Ampisilinli tabakta CenH3 genomik lokusunu bulunduran bakterilerin üremesi (a), tetrasiklinli tabakta boş kompetent hücre üremesi (b), ampisilinli tabakta boş kompetent hücre (c), ampisilinli tabakta pUC 18 plazmid DNA üremesi (d) gösterilmiştir.

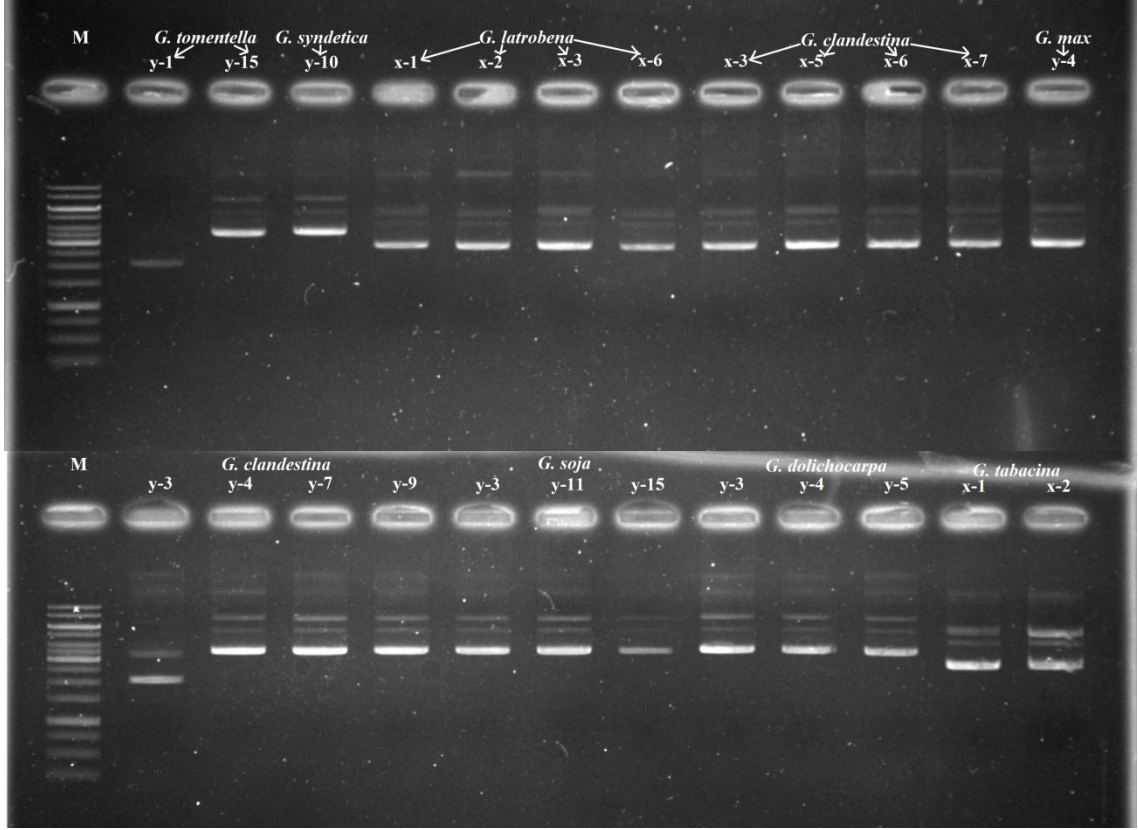
#### 4.7 Yabani Soya Türlerinde İnsert Genin Varlığının Saptanması

Seçilen koloni kültürlerinin kopyalanması için replika tabak tekniği kullanılmıştır. Bu teknik ile tek koloni seçilip yeni ampisilinli tabaklara kürdan ile aktarılmıştır. Kürdanda kalan kültür her bir reaksiyon tüpü içinde karıştırılarak M13 primerleriyle PCR yapılmıştır. Yeni tabaklara aktarılan koloniler 37 °C sıcaklıkta sıcaklıkta 1 gün üremesi beklenmiştir. İnsert genomik lokusu içeren koloniler plazmid izolasyonu yapılarak dizilemeye hazır hale getirilmiştir. Bazı koloniler de doğrudan plazmid izolasyonu yapılarak koloni PCR ile çoğaltılıp insert genomik lokusu içerip içermedikleri saptanmıştır. Koloni PCR'ı yapılan örneklerin boyutu M13 primer uzunluğunun yaklaşık 250 bp olmasından dolayı x fragmentinin uzunluğu 1514 bp'den daha uzundur. Y fragmenti de aynı nedenden dolayı 3000 bp üzerinde bir uzunluktadır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. İnsert CenH3 genomik lokusu içerdiği düşünülen tek kolonilerin PCR sonuçlarının jel görüntüsü.

İnsert genomik lokusu içeren plazmidlerin 11 türde izolasyonu yapılmıştır. Bazı türlerin izolasyon örnekleri aşağıda verilmiştir. *G. tomentella* y-1 hariç diğer örneklerin insert olduğu bantların y-1 örneğine göre yukarıda olmasından anlaşılmaktadır (Ek C; Şekil 4.14).



Şekil 4.14. İnsert genomik lokusu içeren plazmidlerin izolasyon sonucu jel görüntüsü

#### 4.8 Yabani Soya CenH3 Gen Yapısının Analizi ve Biyoinformatik

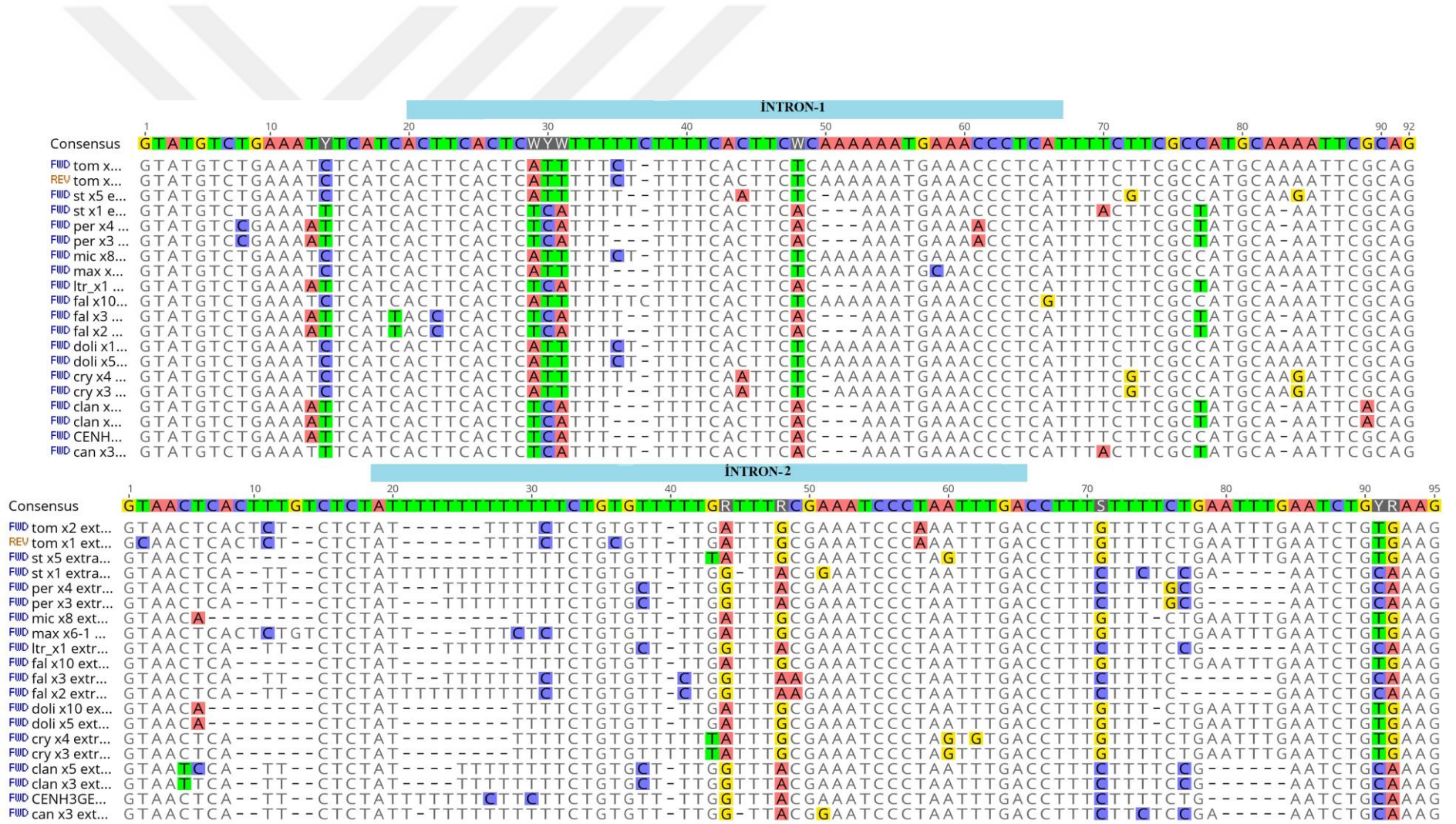
Her tür için insert geni içeren 2 örnek dizilemeye gönderilmiştir. Gönderilen örneklerden M13 geri primerinin pGEM-T easy vektörü üzerinde bağlanma bölgesi 176–197 bp arasındadır (Promega). Gelen hem ileri hem de geri okumalardan M13 primerleri ve vektörün kendi uzunluğu çıkarılmıştır. İleri ve geri CenH3 dizi bilgisini içeren okumalar Geneious Aligment ile hizalama yapılarak ortak dizilerin üst üste gelmesi (overlap) sağlanmıştır. Bu contigler birleştirilerek CenH3 genomik DNA nükleotid dizisinin x bölgesine ait dizi bilgisine ulaşılmıştır.

X bölgelerine göre klonların hem toplam ekzon-intron bölgesinin nükleotid uzunlukları hem de her bir ekzon bölgesinin introna göre nükleotid uzunlukları hesaplanmıştır. Bu değerlerin minimum ve maksimum değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.3).

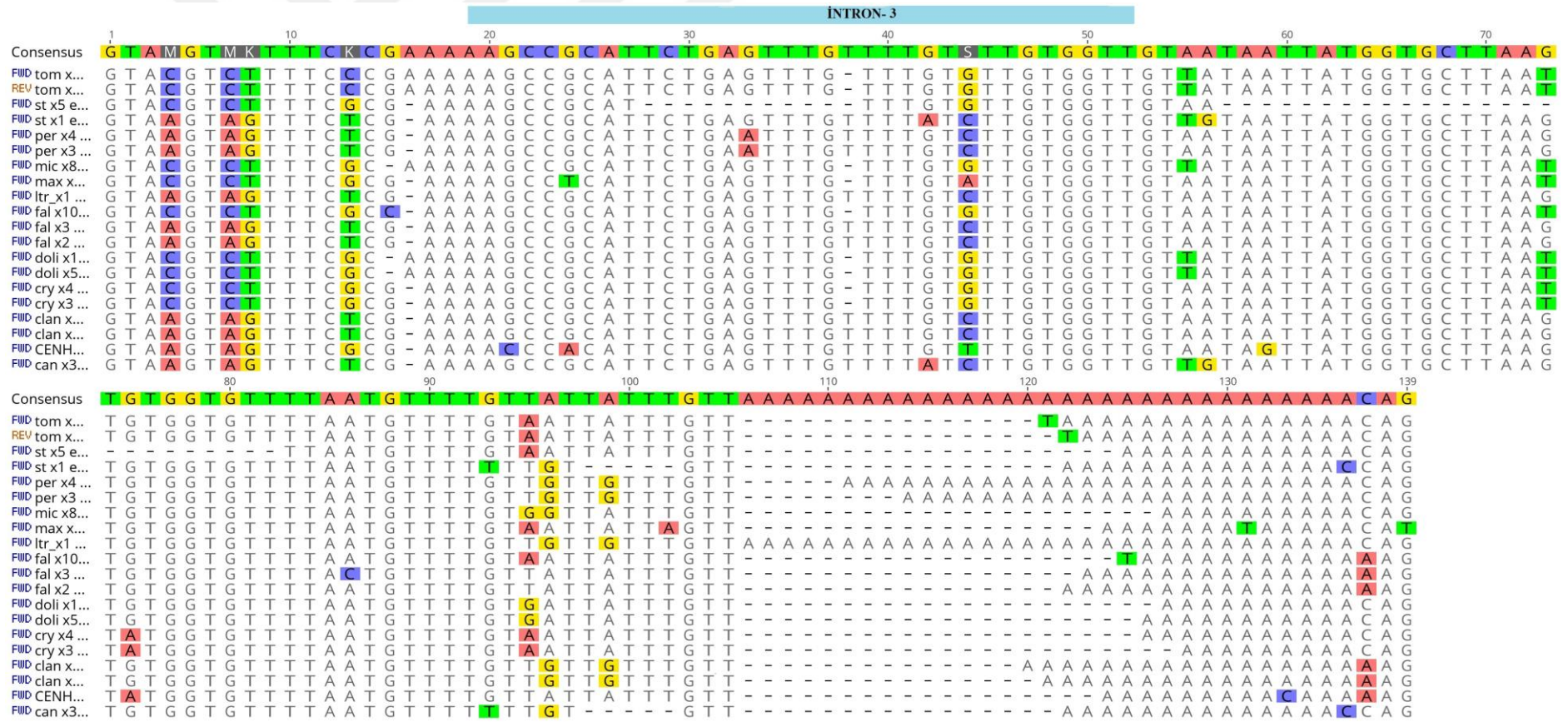
**Çizelge 4.2.** X bölgelerine göre klonların ekzon ve intron bölgelerinin uzunlukları

Klonlar	x Ekzon Uzunluk	x İtron Uzunluk	x Uzunluk	Ekzon 1	İntron 1	Ekzon 2	İntron 2	Ekzon 3	İntron 3	Ekzon 4	İntron 4	Ekzon x-5
<i>G. max</i>	324	1192	1516	40	85	59	84	49	120	122	903	54
<i>dolix10</i>	324	1139	1463	40	91	62	77	46	116	122	855	54
<i>mic x8</i>	324	1139	1463	40	91	62	77	46	116	122	855	54
<i>dolix5</i>	324	1140	1464	40	91	62	77	46	117	122	855	54
<i>tomx1</i>	324	1154	1478	40	91	62	86	46	122	122	855	54
<i>tomx2</i>	324	1069	1393	40	91	62	86	46	123	122	769	54
<i>cryx3</i>	324	1222	1546	40	89	62	81	46	115	122	937	54
<i>cryx4</i>	324	1097	1421	40	90	62	81	46	117	122	809	54
<i>stx5</i>	324	1002	1326	40	89	62	81	46	82	122	750	54
<i>maxx6-1</i>	305	1256	1561	40	89	62	90	27	119	122	958	54
<i>ltr x1</i>	324	1200	1524	40	85	59	81	49	138	122	896	54
<i>fal x10</i>	324	1552	1876	40	92	62	80	46	118	122	1262	54
<i>can x3</i>	324	1177	1501	40	87	59	83	49	117	122	890	54
<i>st x1</i>	324	1178	1502	40	87	59	84	49	117	122	890	54
<i>clan x3</i>	324	1184	1508	40	85	59	80	49	123	122	896	54
<i>clan x5</i>	324	1185	1509	40	85	59	80	49	124	122	896	54
<i>per x3</i>	324	1192	1516	40	85	59	81	49	130	122	896	54
<i>perx4</i>	324	1195	1519	40	85	59	81	49	133	122	896	54
<i>falx2</i>	327	1172	1499	40	86	62	83	49	122	122	881	54
<i>falx3</i>	327	1167	1494	40	86	62	81	49	121	122	879	54
			<b>Min.</b>	40	85	59	77	27	82	122	750	54
			<b>Maks.</b>	40	91	62	90	49	138	122	1262	54

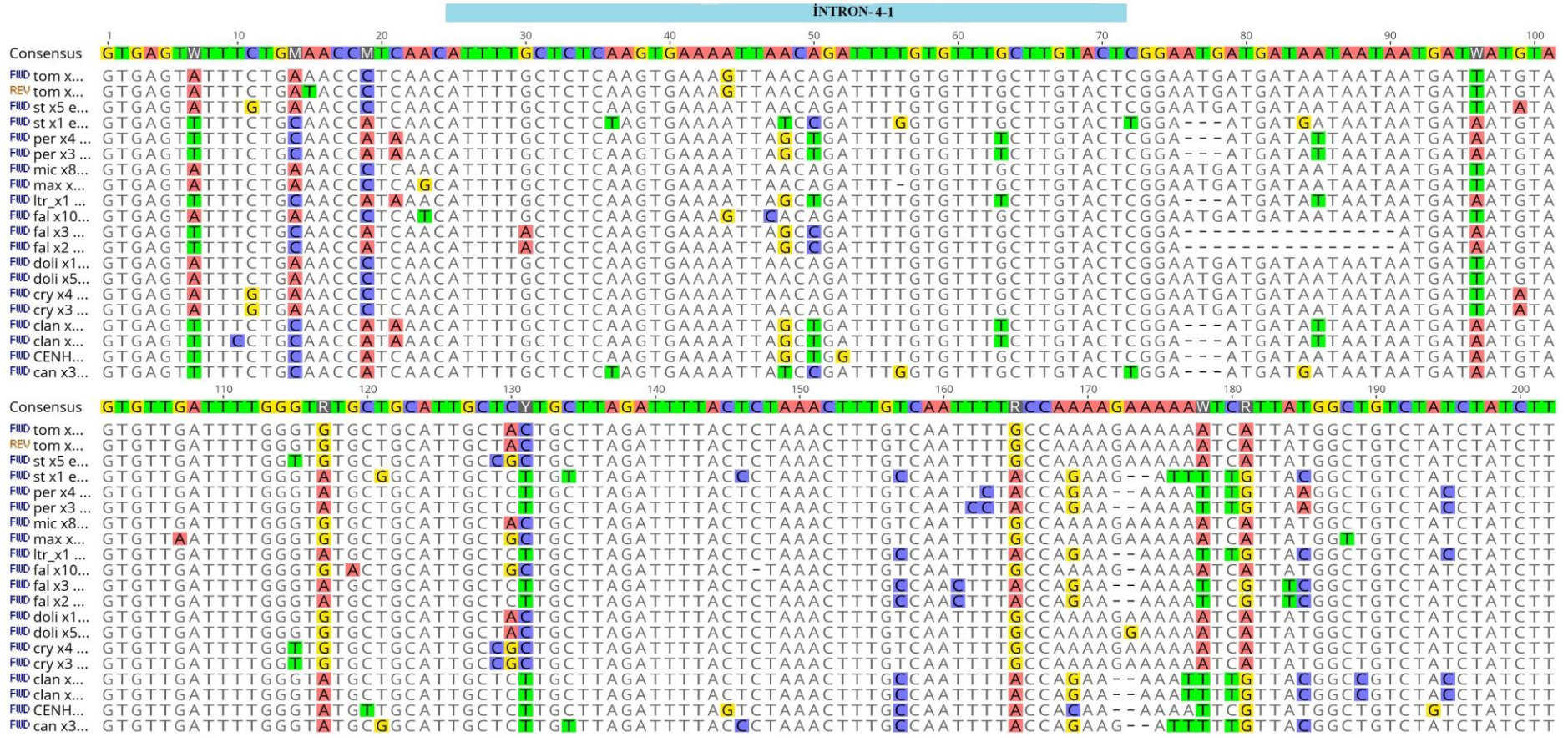
X bölgesi toplam 4 introndan oluşmaktadır. Bu 4 intron bölgesinin her biri ayrı ayrı 11 türün CenH3 dizileri ile *G. max* CenH3 genomik DNA (Phytozome) dizisi karşılaştırılmıştır (Şekil 4.15). X bölgesinin tamamını içeren (intron ve ekzon bölgeleri) CenH3 genomik DNA nükleotid dizileri 11 türde Geneious Prime 2019 programı (Kearse vd., 2012) kullanılarak çoklu dizi karşılaştırmaları için Geneious Aligment yapılarak diziler kıyaslanmıştır (Şekil 4.16). X bölgesi toplam 5 ekzondan (5. ekzonun 54. nükleotidine kadar) oluşmaktadır. Bu 5 ekzon bölgesinin her biri ayrı ayrı 11 türün CenH3 dizileri ile *G. max* CenH3 genomik DNA dizisi karşılaştırılmıştır (Şekil 4.17). Gri ile gösterilen diziler korunmuş bölgelerdir. Sarı, kırmızı, yeşil ve mavi ile gösterilen diziler ise türler arasında olan dizi değişikliklerini göstermektedir (Şekil 4.15; Şekil 4.16; Şekil 4.17).



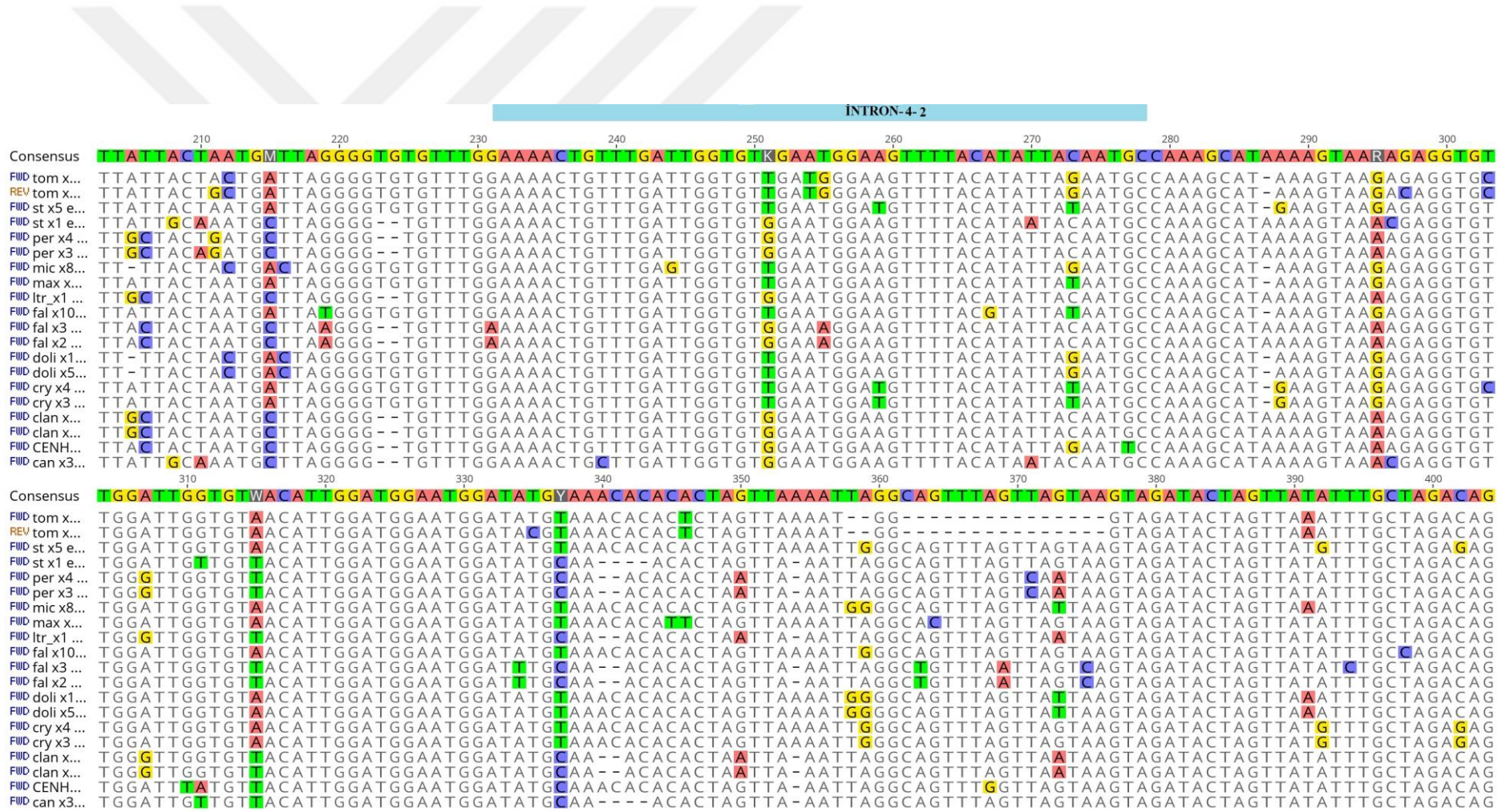
Şekil 4.15. X bölgesine ait 1., 2., 3. ve 4. intronların gösterimi



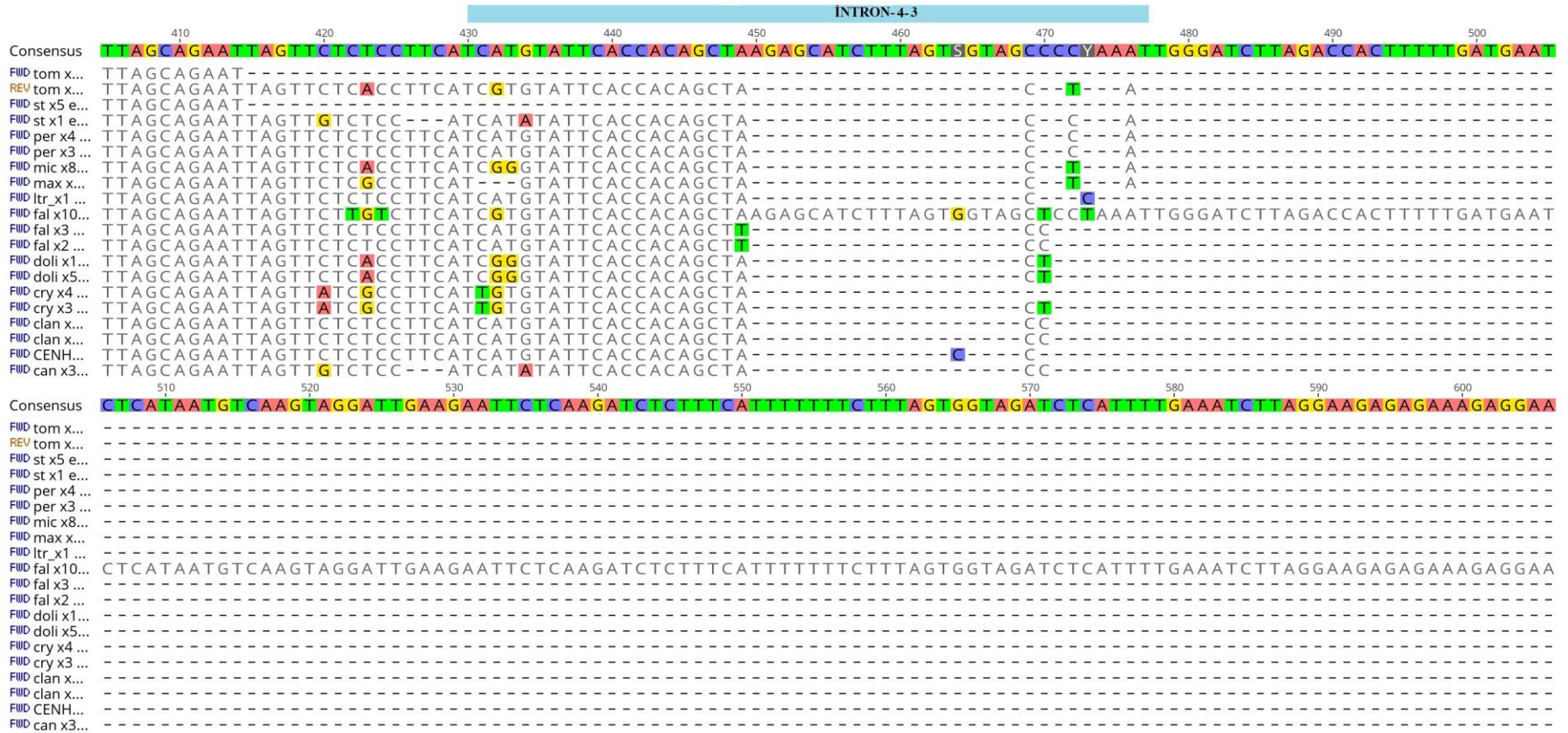
Şekil 4.15. (Devamı) X bölgesine ait 1., 2., 3. ve 4. intronların gösterimi



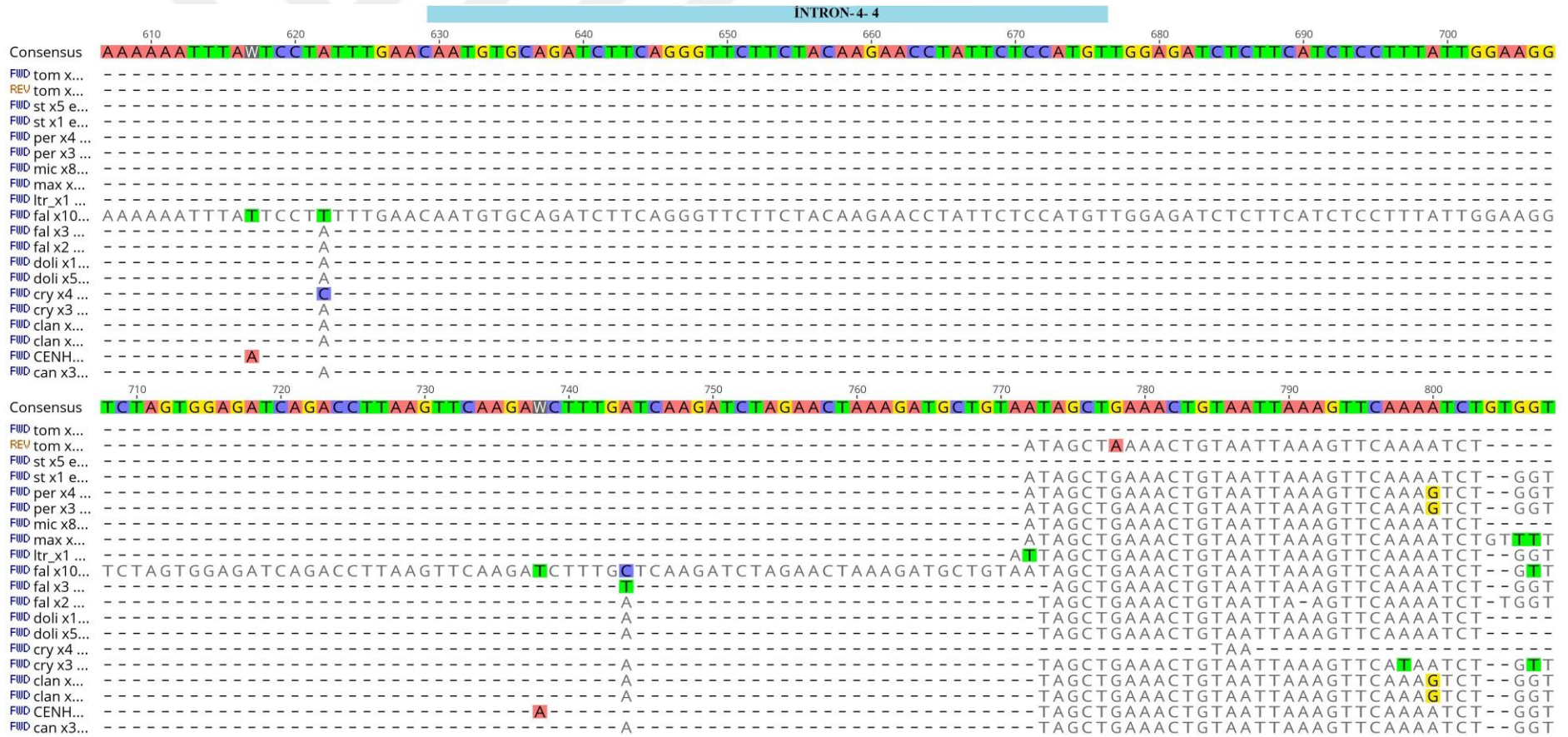
Şekil 4.15. (Devamı) X bölgesine ait 1., 2., 3. ve 4. intronların gösterimi



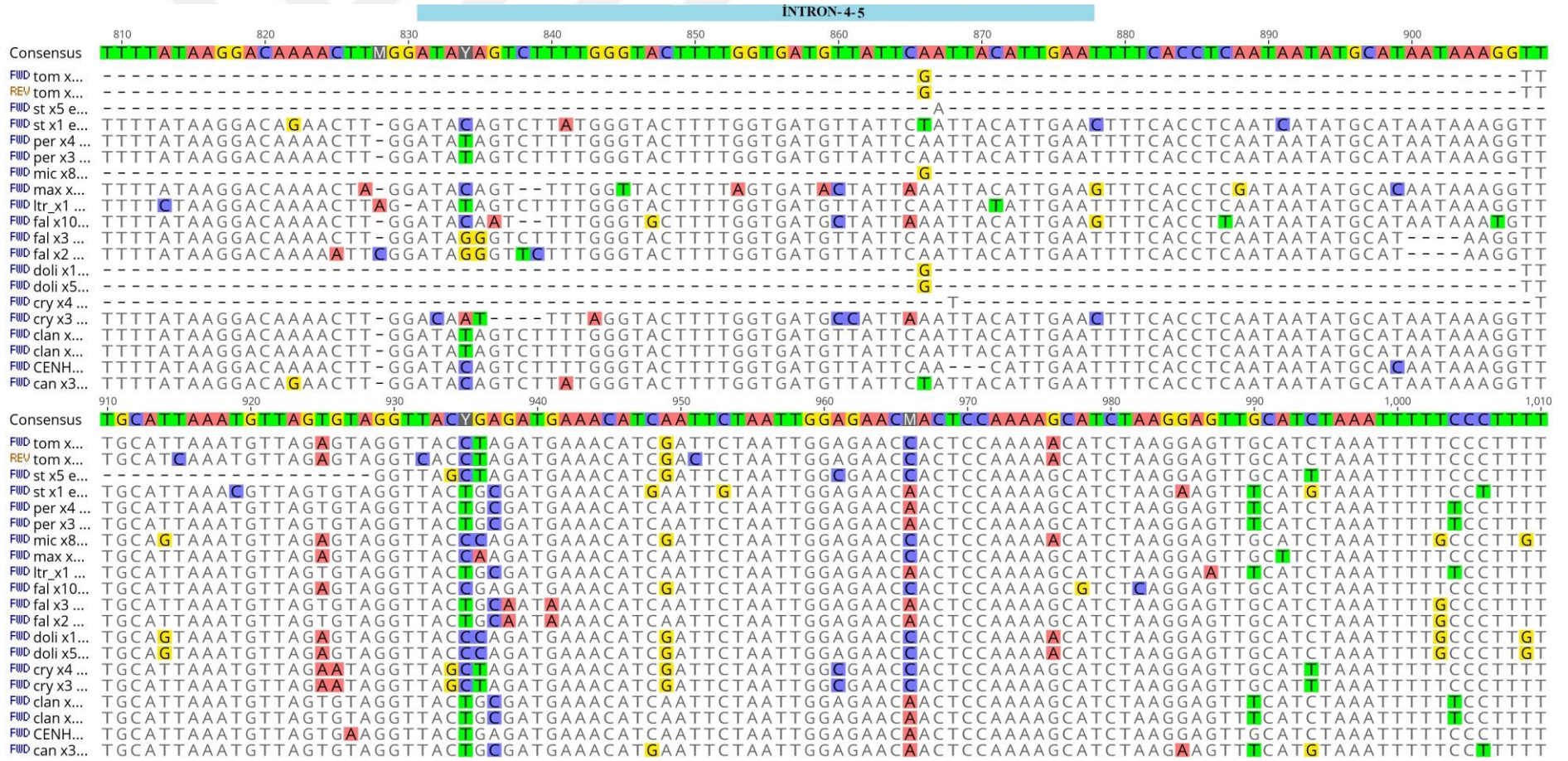
Şekil 4.15. (Devamı) X bölgesine ait 1., 2., 3. ve 4. intronların gösterimi



Şekil 4.15. (Devamı) X bölgesine ait 1., 2., 3. ve 4. intronların gösterimi

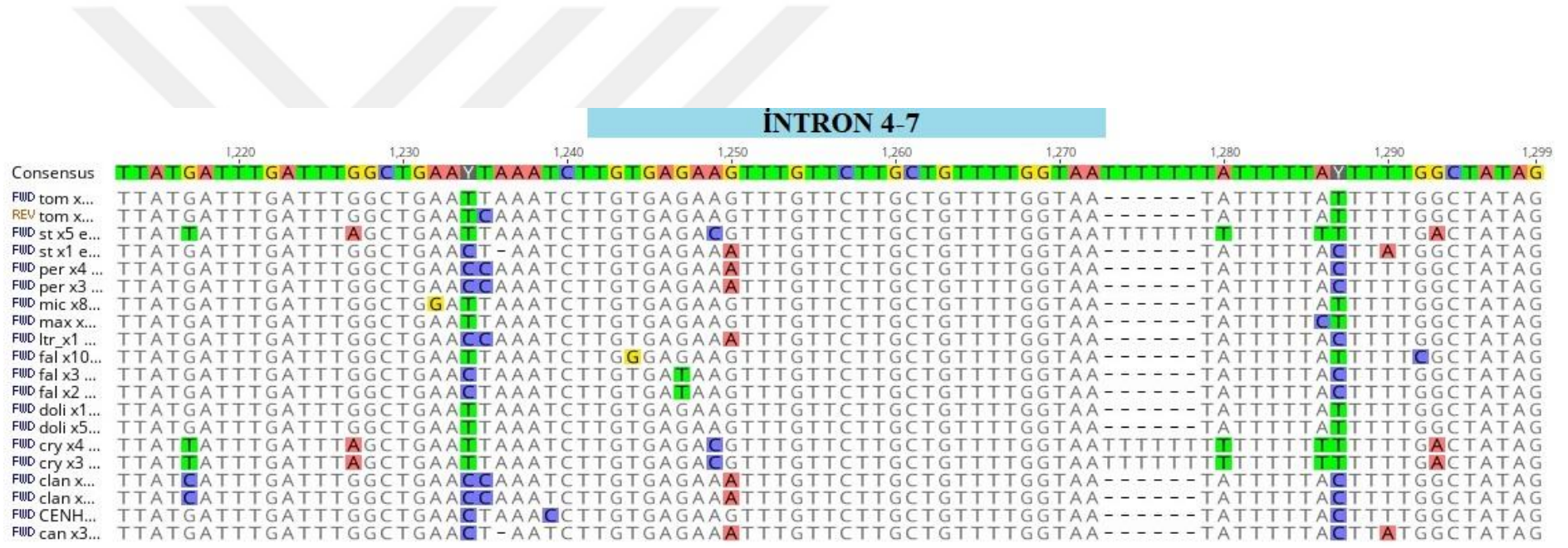


Şekil 4.15. (Devamı) X bölgesine ait 1., 2., 3. ve 4. intronların gösterimi

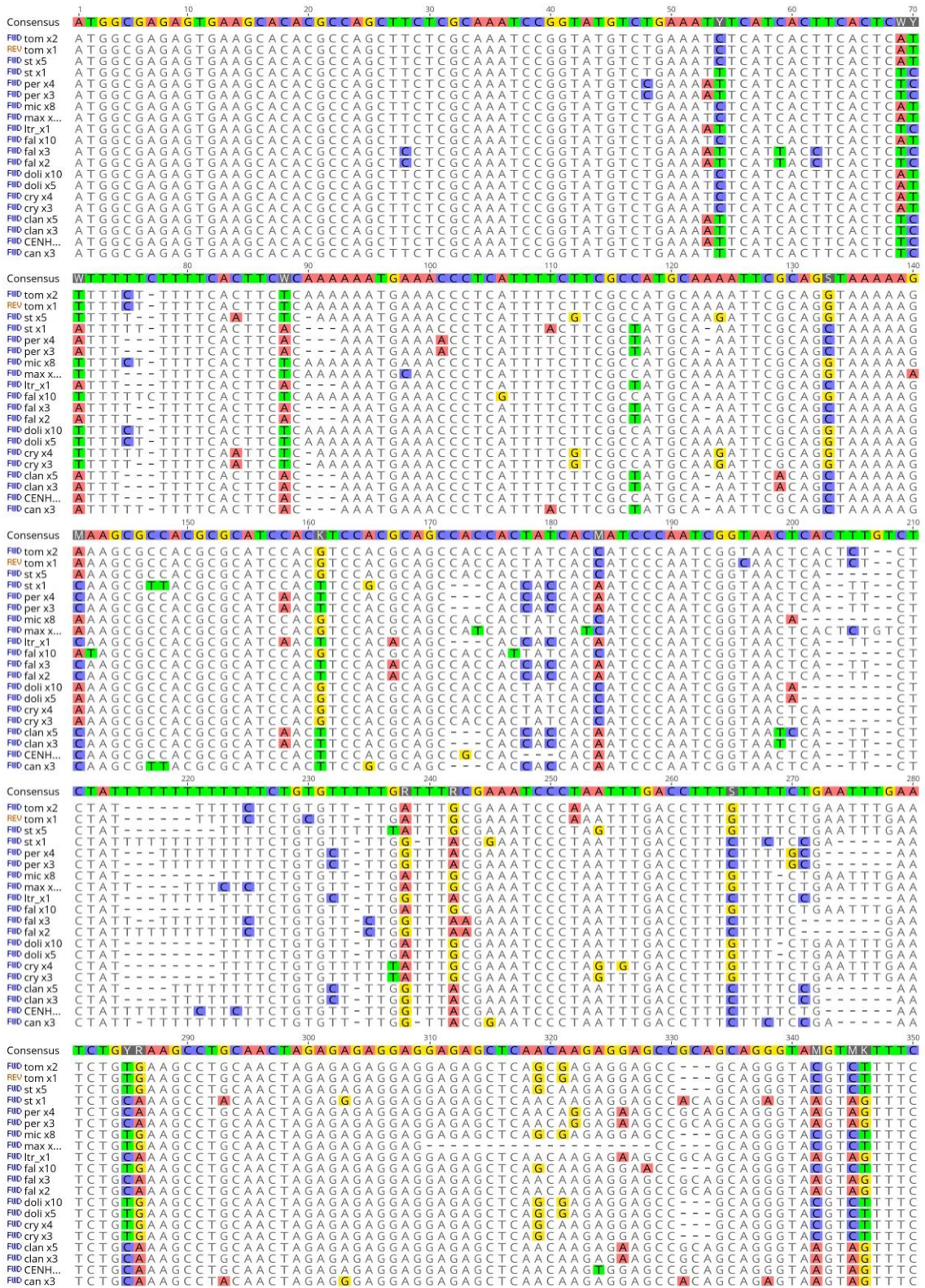


Şekil 4.15. (Devamı) X bölgesine ait 1., 2., 3. ve 4. intronların gösterimi

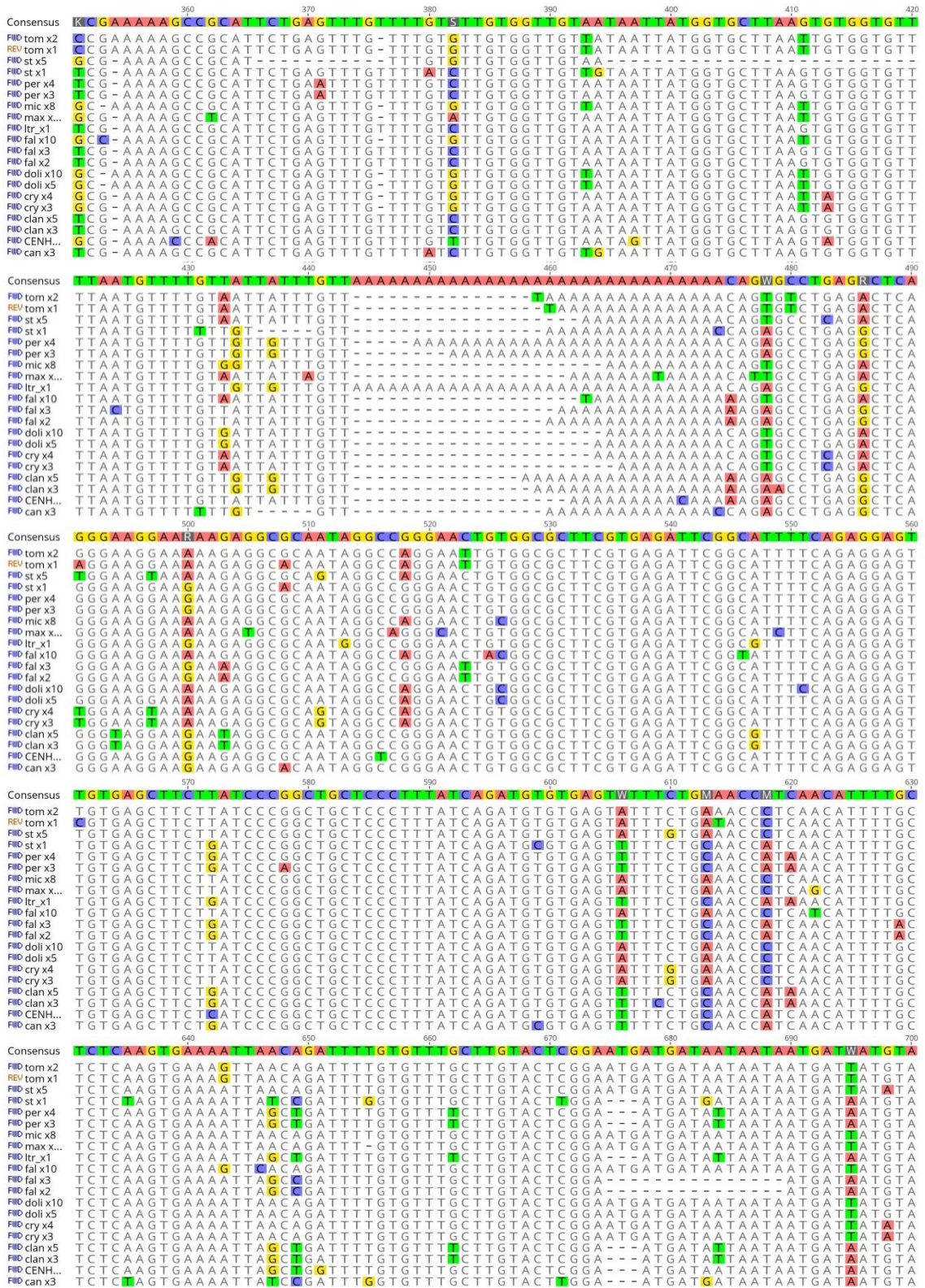




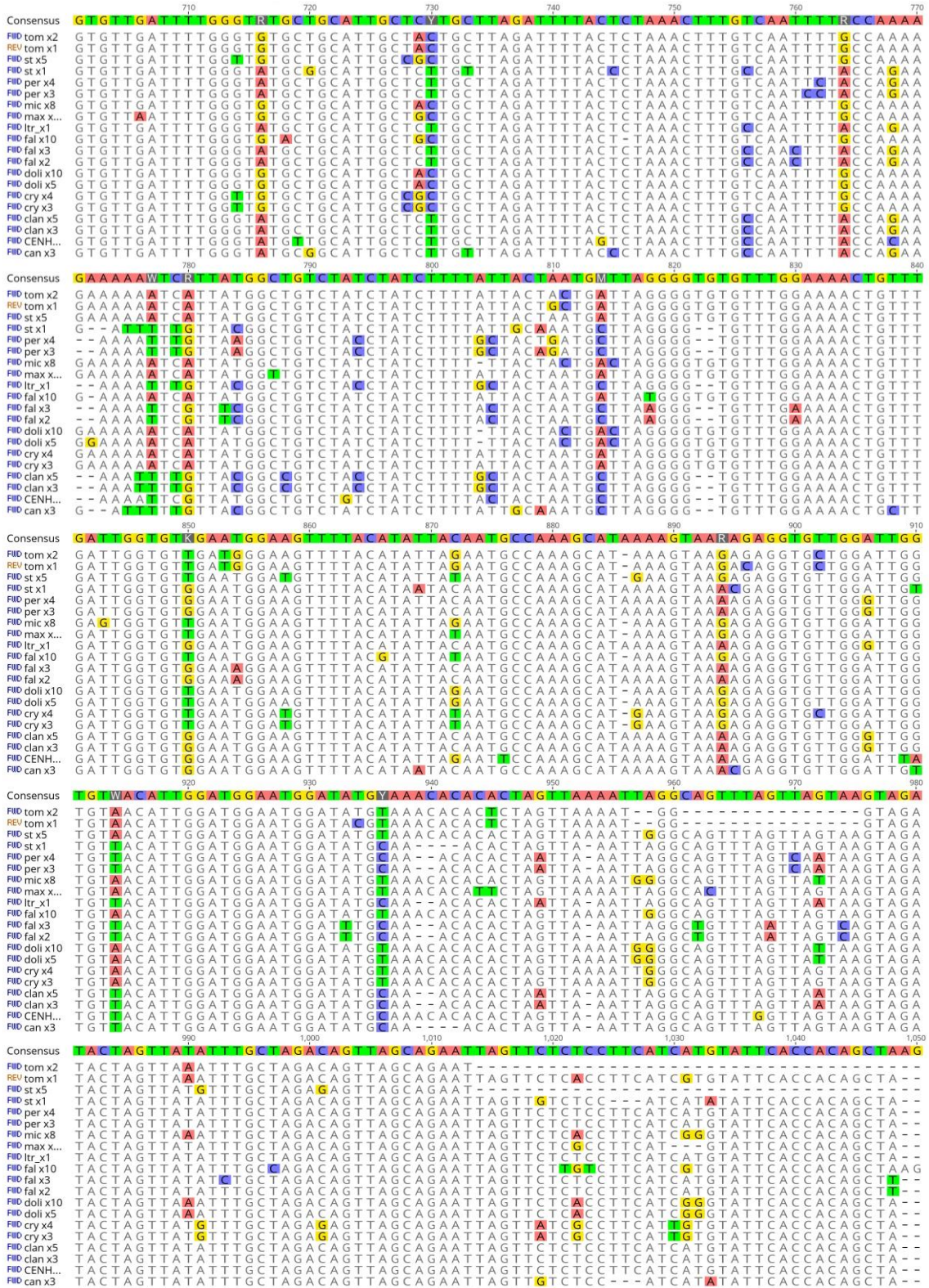
Şekil 4.15. (Devamı) X bölgesine ait 1., 2., 3. ve 4. intronların gösterimi



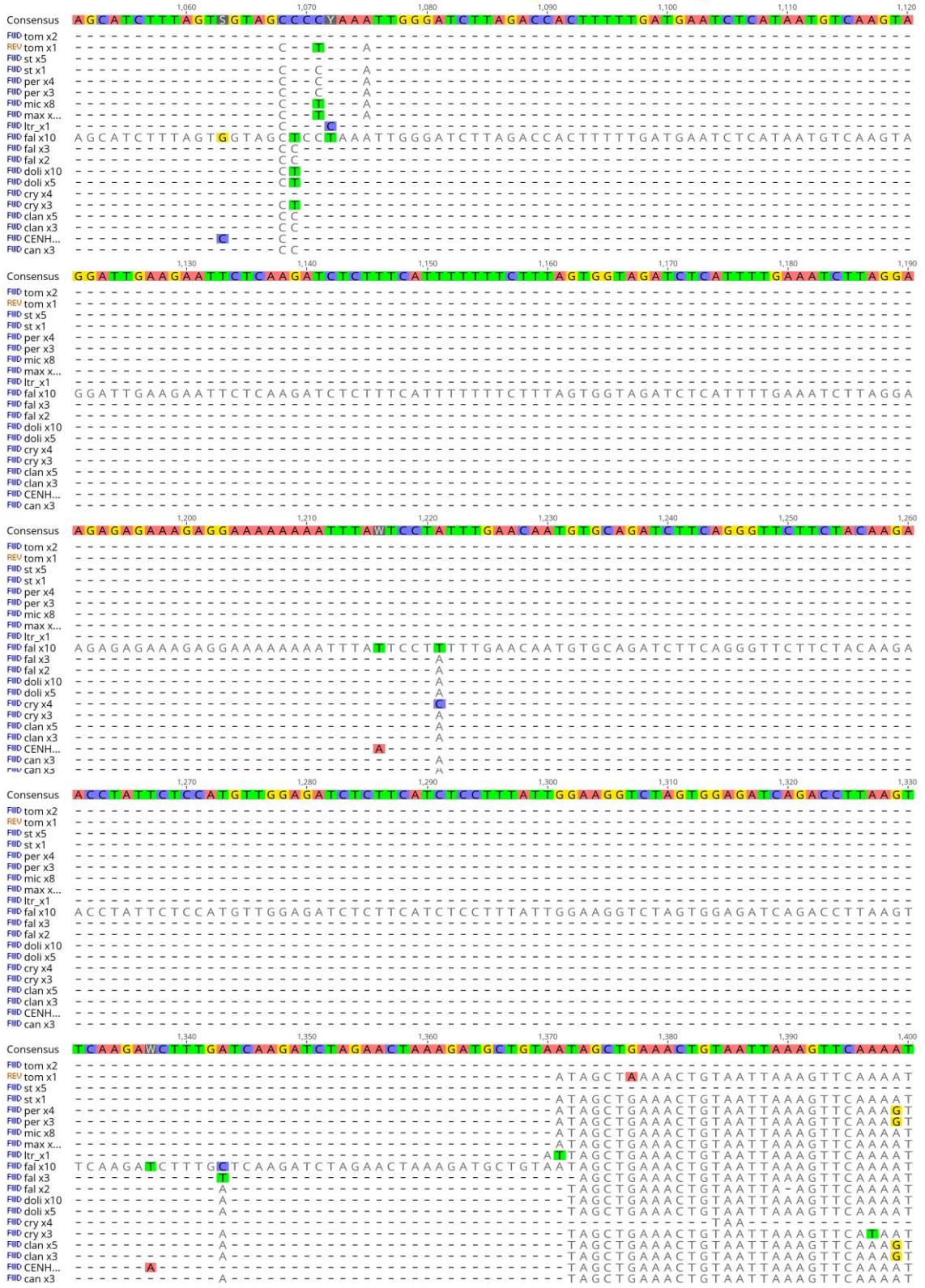
**Şekil 4.16.** Dizilemesi gerçekleştirilen l1 türün x bölgesine ait ekzon ve intron yapılarının karşılaştırılması



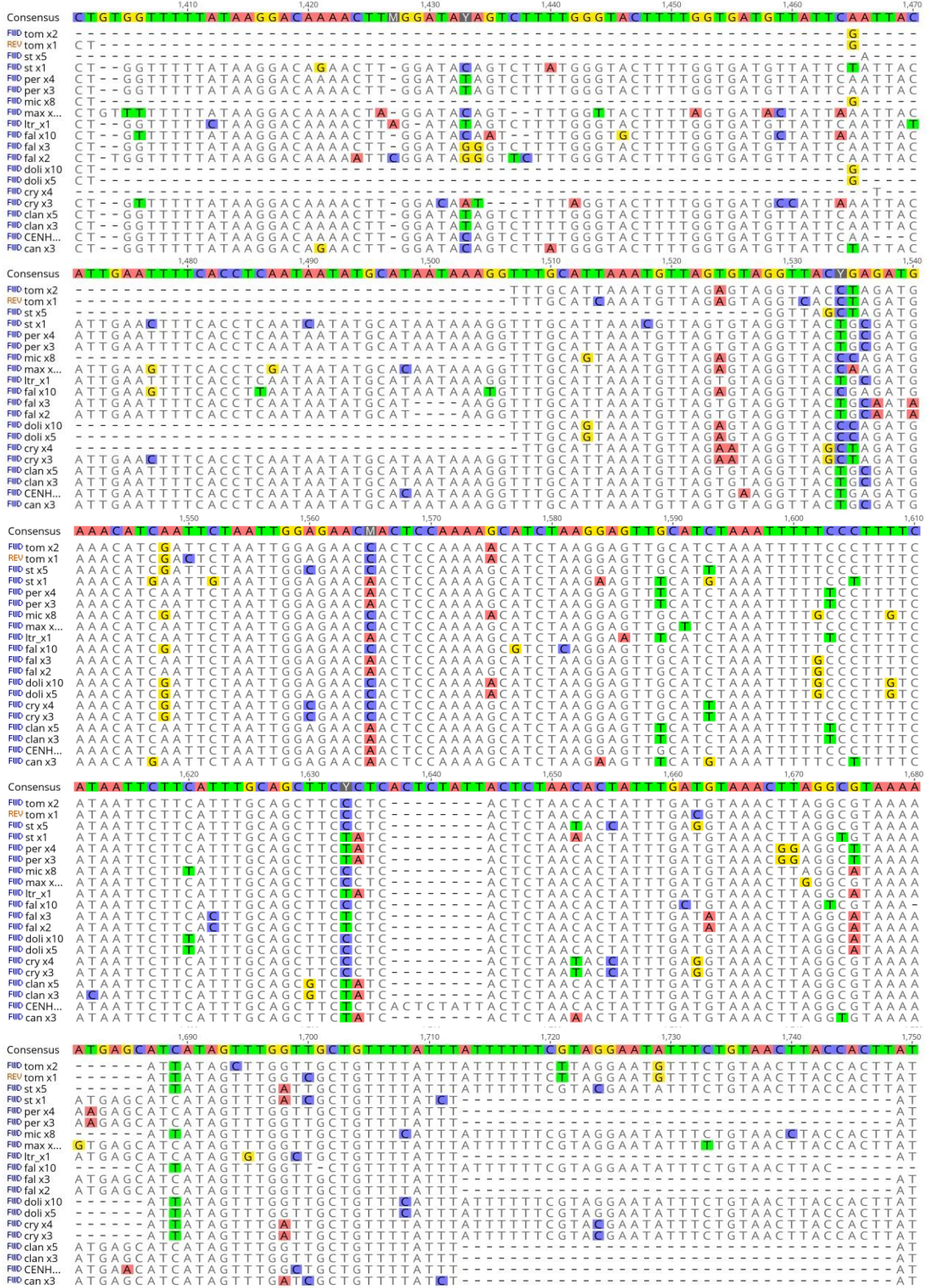
Şekil 4.16. (Devamı) Klonu bulunan 11 türün x bölgesine ait ekzon ve intron yapılarının karşılaştırılması



Şekil 4.16. (Devamı) Dizilemesi gerçekleştirilen 11 türün x bölgesine ait ekzon ve intron yapılarının karşılaştırılması

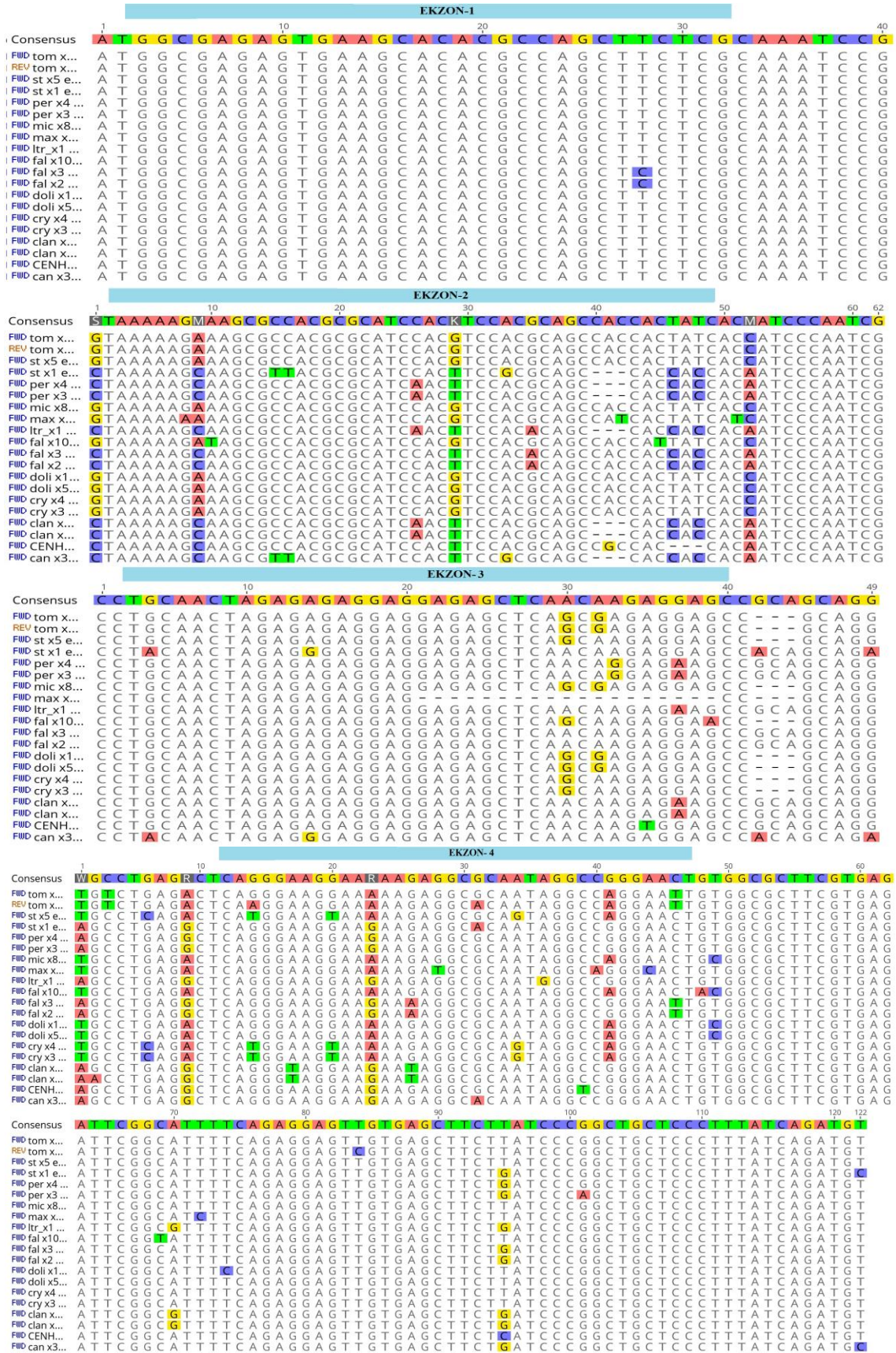


Şekil 4.16. (Devamı) Dizilemesi gerçekleştirilen 11 türün x bölgesine ait ekzon ve intron yapılarının karşılaştırılması



Şekil 4.16. (Devamı) Dizilemesi gerçekleştirilen 11 türün x bölgesine ait ekzon ve intron yapılarının karşılaştırılması





Şekil 4.17. Dizilemesi gerçekleştirilen 11 türün x bölgesine ait ekzon yapılarının karşılaştırılması

## BÖLÜM V

### TARTIŞMA ve SONUÇ

#### 5.1 Farklı Soya Türlerinde CenH3 Genomik Lokusunun Tanımlanması

Bitkilerde CenH3 geni önemli işlevi ve evrimsel dizi değişikliği göstermesi sebebiyle büyük ilgi görmüştür. Bunun üzerine genomik lokus üzerinde türler arası farklı uzunluklarda bulunan CenH3 geni araştırılmaya başlanmıştır. *Arabidopsis thaliana* türünde 2991 bç (Talbert vd., 2002), diploid *Gossypium* türleri 2565-2673 bç arasında (Masonbrink vd., 2014), *Medicago truncatula* 4798 bç (Neumann vd., 2015) ve *Musa acuminata* 5538 bç (Muiruri., 2017) uzunluğunda birçok bitkinin CenH3 genomik lokusu ayrıntılı olarak tanımlanmıştır.

Soya CenH3 cDNA transkript dizi bilgisinden faydalanarak 5' ve 3' uçlara ve internal bölgelere özgü tasarlanan primerler kullanılarak PCR ile genomik lokus bölgeleri çoğaltılmıştır. CenH3 gDNA lokusunun yaklaşık toplam 4372 bç büyüklüğünde olması vektörün insert kapasitesini aştığından dolayı ligasyon işlemi başarılı olmamıştır. Bu yüzden x ve y primerleriyle (1514 bç ve 2878 bç) 2 internal parçanın PCR çoğaltımı yapılmıştır. Bu parçalar ile klonlama yapılmış ve genomik lokus dizi bilgisi elde edilerek analiz edilmiştir.

#### 5.2 CenH3 Ekzon ve İntron Yapılarının Tanımlanması

Farklı soya türlerinde klonlama sonucu elde edilen CenH3 geni yakın akraba türler arasında benzerlik göstermektedir. Bu benzerlik ve nükleotit dizi korunmuşluğu ekzon bölgelerinden anlaşılabilir. *Fabaceae* familyasına ait *Fabaeae* türleri *Medicago truncatula*; yonca gibi türlerde 5 ekzon/4 intron yapısı bulunmaktadır (Neumann vd., 2015). Çavdarda (*Secale cereale*)  $\alpha$ ScCENH3 formu 7 ekzon/6 intron iken  $\beta$ ScCENH3 formu 4 ekzon/3 introndur (Evtushenko vd., 2017). Yabani havuçlarda (*Daucus* sp.) CenH3 geni 7 ekzon/6 intron (Dunemann vd., 2014), yabani muzlarda (*Musa* sp.) 6 ekzon/5 intron bazı türlerinde 7 ekzon/6 intron ve kültüre alınmış formu 5 ekzon/4

intronudur. Bu gibi ekzon intron değişimleri alternatif kırılmadan kaynaklandığı saptanmıştır (Muiruri vd., 2017). *G. max* genomik DNA ve kodlama yapan dizileri hizalandığında 7 ekzon ve 6 intron tespit edilmiştir. Dizilemesi yapılan 10 yabancı soya türünde de 7 ekzon bulunması CenH3 yapısının yüksek derecede korunduğunu göstermektedir.

X olarak adlandırılan CenH3 genomik lokusunun parçası 5. ekzonun 54. nükleotidine kadar gösterilen kısımdır. Yani 4 intron ve 5. ekzonun bir kısmına kadar olan bölgeyi kapsamaktadır. Phytozome'dan alınan soyanın toplam CenH3-x uzunluğu 1516 bç'dir. Çalışmamızda farklı soya türlerinin dizi bilgisi bu bölgeye kadar analiz edilmiştir. Bu kısmın toplam uzunluğu farklı soya türlerinde 1326-1876 bç arasında, intron uzunluğu 1002-1552 bç ve ekzon uzunluğu ise 305-327 bç arasında olduğu tespit edilmiştir. İtron 1 ile intron 4 arası bölgelerin çift (pairwise) benzerliği sırasıyla %89.8, %80.7, %84.4, %78.6 olduğu tespit edilmiştir. Ekzon 1 ile ekzon 5'in bir kısmına kadar olan bölgelerin çift (pairwise) benzerliği sırasıyla %99.5, %89.4, %88.2, %94.1 ve %95.7 olarak ortaya çıkmıştır. İtronların minimum ve maksimum değerleri intron 1 85-91, intron 2 77-90, intron 3 82-138 ve intron 4 750-1262 bç uzunluğundadır. Ekzon bölgelerinin % çift benzerliği ve uzunluklarına bakıldığında nükleotid değişimleri türler arası daha çok korunmuş olduğu tespit edilmiştir. İtron bölgelerinin nükleotid uzunlukları farklı olmasından dolayı ekzon bölgelerine göre daha az korunmuş olduğu ve CenH3 geninin toplam uzunluğunu değiştirmektedir.

Soya türleri üzerinde yapılan tüm genom dizileme çalışmaları CenH3 geninin ve yapısının tam olarak anlaşılması için yeterli düzeyde değildir. Bu yetersizlik elde ettiğimiz bulgular sonucunda CenH3 genomik lokusunun soya türlerinde tespit edilerek çözümlendirilmiştir. Bu nükleotid dizilerinden yola çıkarak CenH3 geni dizi korunmuşluk seviyelerine göre soya türleri ve diğer baklagillerin akrabalık seviyeleri ve evrimsel geçmişleri tespit edilebilmektedir. Bu genin uzunluğu diğer türlerle kıyaslanılabilmekte ve sentromer uzunluğu üzerinde etkisi araştırılabilmektedir. Soya türlerinde bu lokusun yapısını oluşturan intron ve ekzon bölgeleri tanımlanarak diğer çalışmalara örnek teşkil edebilmektedir. Yani tüm soya türleri üzerinde yapılan bu çalışma CenH3 geni üzerinden yapılacak olan çalışmalara veri tabanı bilgisi olarak kaynak oluşturabilecektir.

CenH3 genomik DNA dizi bilgisi gelecekteki çalışmalara kaynak oluşturacağı değerlendirilmektedir. Ravi ve Chan (2010), haploid bitki elde etmek için *Arabidopsis thaliana* bitkisinde cenh3-1 mutanrı oluşturarak yabancı genotiple melezlemiştir. Bu mutant, 161. nükleotidinin dizi değişimi ve ikinci introndaki korunmuş bir bölgenin mutasyona maruz bırakılmasıyla oluşturulmuştur. Yani CenH3 mutanrı oluşturmak için öncelikle CenH3 gDNA dizi bilgisine ihtiyaç duyulmaktadır. Farklı soya türlerinde CenH3 genomik DNA lokus dizi bilgisi, gelecekteki haploid soya hatlarının geliştirilmesine katkı sağlayacağı değerlendirilmektedir. Bu şekilde istenilen homozigotluk seviyesinde saf ışlah hatları elde edilebilecektir.



## KAYNAKLAR

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P., Hücrenin moleküler biyolojisi, Çeviri Editörleri, O. Altungöz, C. Akçalı, B. Çırakoğlu ve ark., *Kanser. Ankara: TÜBA*, 1313-62, 2008.

Arioğlu, H., “Türkiye’de Yağlı Tohum ve Ham Yağ Üretimi, Sorunlar ve Çözüm Önerileri”, *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi* 2, 12, 2016.

Arumuganathan, K. and Earle, E. D., “Nuclear DNA content of some important plant species”, *Plant Molecular Biology Reporter* 9(3), 208-218, 1991.

Biorad, “Section 5- High Efficiency Electro-transformation of *E. coli*”, <http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1652101C.pdf>, 8 Mayıs 2019

Brown T.A., *Genomlar 3*, 3<sup>rd</sup> ed., Çeviri Editörleri, Fevzi Bardakçı ve Celal Ülger, *Nobel Akademik Yayıncılık*, İstanbul, 2015.

Burrack, L.S. and Berman, J., “Neocentromeres and epigenetically inherited features of centromeres”, *Chromosome Research* 20(5), 607–619, 2012.

Chan, C., Qi, X., Li, M. W., Wong, F.L. and Lam, H.M., “Recent developments of genomic research in soybean”, *Journal of Genetics and Genomics* 39(7), 317-324, 2012.

Choi, I.Y., Hyten, D. L., Matukumalli, L.K., Song, Q., Chaky, J.M., Quigley, C.V. and Hwang, E.Y., “A soybean transcript map: gene distribution, haplotype and single-nucleotide polymorphism analysis”, *Genetics* 176(1), 685-696, 2007.

CLC, <http://www.qiagenbioinformatics.com/products/clc-genomics-workbench/>,

09.05.2019

Cooper G.M., *The Cell: A Molecular Approach*, 2<sup>nd</sup> ed., *Sunderland (MA): Sinauer Associates*, 2000.

De Rop, V., Padeganeh, A. and Maddox, P.S., “CENP-A: the key player behind centromere identity, propagation and kinetochore assembly”, *Chromosoma* 121(6), 527–538, 2012.

Doyle, M.J. and Brown, A.H., “Numerical analysis of isozyme variation in *Glycine tomentella*”, *Biochemical Systematics and Ecology* 13(4), 413–419, 1985.

Dunemann, F., Schrader, O., Budahn, H. and Houben, A., “Characterization of centromeric histone H3 (CENH3) variants in cultivated and wild carrots (*Daucus sp.*)”, *PLoS One* 9(6), e98504, 2014.

Earnshaw, W.C. and Rothfield, N., “Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma”, *Chromosoma* 91(3-4), 313–321, 1985.

Evtushenko, E.V., Elisafenko, E.A., Gatzkaya, S. S., Lipikhina, Y.A., Houben, A. and Vershinin, A.V., “Conserved molecular structure of the centromeric histone CENH3 in *Secale* and its phylogenetic relationships”, *Scientific Reports* 7(1), 17628, 2017.

Henikoff, S., Ahmad, K., Platero, J.S. and van Steensel, B., “Heterochromatic deposition of centromeric histone H3-like proteins”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(2), 716–721, 2000.

Henikoff, S., Ahmad, K. and Malik, H.S., “The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA”, *Science* 293(5532), 1098–1102, 2001.

Henikoff, S. and Ahmad, K., “Assembly of variant histones into chromatin”, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 133-153, 2005.

- Hirsch, C.D., Wu, Y., Yan, H. and Jiang, J., “Lineage-Specific Adaptive Evolution of the Centromeric Protein CENH3 in Diploid and Allotetraploid *Oryza* Species”, *Molecular Biology and Evolution* 26(12), 2877-2885, 2009.
- Hymowitz, T., “On the Domestication of the Soybean”, *Economic Botany* 24(4), 408-421, 1970.
- Hyten, D.L., Song, Q., Zhu, Y., Choi, I.-Y., Nelson, R.L., Costa, J.M. and Cregan, P.B., “Impacts of genetic bottlenecks on soybean genome diversity”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(45), 16666–16671, 2006.
- Jenks, M. A., Hasegawa, P.M. and Jain, S. M. (Eds.), “Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops”, *Springer* 261-283, 2007.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D., “Translating the histone code”, *Science* 293(5532), 1074-1080, 2001.
- Jiang, J. and Birchler, J.A., *Plant centromere biology*, **Wiley-Blackwell**, 2013.
- Jiang, J., Birchler, J.A., Parrott, W.A. and Dawe, R.K., “A molecular view of plant centromeres”, *Trends in Plant Science* 8(12), 570-575, 2003.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S. and Thierer., “T. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data”, *Bioinformatics* 28(12), 1647-1649, 2012.
- Kim, E.H., Ro, H.M., Kim, S.L., Kim, H.S. and Chung, I.M., “Analysis of isoflavone, phenolic, soyasapogenol and tocopherol compounds in soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] germplasm of different seed weights and origins”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(23), 6045-6055, 2012.

Lam, H.M., Xu, X., Liu, X., Chen, W., Yang, G., Wong, F.L. and Li, J., “Resequencing of 31 wild and cultivated soybean genomes identifies patterns of genetic diversity and selection”, *Nature Genetics* 42(12), 1053, 2010.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H. and Thompson, J. D., “Clustal W and Clustal X version 2.0”, *Bioinformatics* 23(21), 2947-2948, 2007.

Li, J.F., Li, L. and Sheen, J., “Protocol: a rapid and economical procedure for purification of plasmid or plant DNA with diverse applications in plant biology”, *Plant Methods* 6, 1-8, 2010.

Li, M.W., Muñoz, N.B., Wong, C.F., Wong, F.L., Wong, K.S., Wong, J.W.H. and Lam, H.M., “QTLs regulating the contents of antioxidants, phenolics and flavonoids in soybean seeds share a common genomic region”, *Frontiers in Plant Science* 7, 854, 2016.

Liu, B., Fujita, T., Yan, Z.H., Sakamoto, S., Xu, D. and Abe, J., “QTL mapping of domestication-related traits in soybean (*Glycine max*)”, *Annals of Botany* 100(5), 1027-1038, 2007.

Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J., “Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution”, *Nature* 389(6648), 251, 1997.

Maheshwari, S., Tan, E.H., West, A., Franklin, F.C.H., Comai, L. and Chan, S.W., “Naturally occurring differences in CENH3 affect chromosome segregation in zygotic mitosis of hybrids”, *PLoS Genetics* 11(1), e1004970, 2015.

Malik, H.S. and Henikoff, S., “Adaptive evolution of Cid, a centromere-specific histone in *Drosophila*”, *Genetics* 157(3), 1293–1298, 2001.

Malik, H.S., Vermaak, D. and Henikoff, S., “Recurrent evolution of DNA-binding motifs in the *Drosophila* centromeric histone”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(3), 1449–1454, 2002.

Masonbrink, R.E., Gallagher, J. P., Jareczek, J.J., Renny-Byfield, S., Grover, C.E., Gong, L. and Wendel, J.F., “CenH3 evolution in diploids and polyploids of three angiosperm genera”, *BMC Plant Biology* 14(1), 383, 2014.

McGinty R.K. and Tan S., “Histone, Nucleosome and Chromatin Structure”. In: Workman J., Abmayr S. (eds) Fundamentals of Chromatin. *Springer* New York, NY 2014 (BAk)

Meluh, P.B., Yang, P., Glowczewski, L., Koshland, D. and Smith, M.M., “Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*”, *Cell* 94(5), 607-613, 1998.

Michael, D. and Manyuan, L., “Intron—exon structures of eukaryotic model organisms”, *Nucleic Acids Research* 27(15), 3219-3228, 1999.

Morey, L., Barnes, K., Chen, Y., Fitzgerald-Hayes, M. and Baker, R.E., “The Histone Fold Domain of Cse4 Is Sufficient for CEN Targeting and Propagation of Active Centromeres in Budding Yeast”, *Eukaryotic Cell* 3(6), 1533-1543, 2004.

Muiruri, K.S., Britt, A., Amugune, N.O., Nguu, E.K., Chan, S. and Tripathi, L. “Expressed centromere specific Histone 3 (CENH3) variants in cultivated triploid and wild diploid bananas (*Musa* spp.)”, *Frontiers in Plant Science* 8, 1034, 2017.

Nagaki, K., Cheng, Z., Ouyang, S., Talbert, P.B., Kim, M., Jones, K.M. and Jiang, J., “Sequencing of a rice centromere uncovers active genes”, *Nature Genetics* 36(2), 138, 2004.

Nawaz, M.A., Golokhvast, K.S., Rehman, H.M., Tsukamoto, C., Kim, H.S., Yang, S.H. and Chung, G., “Soyisoflavone diversity in wild soybeans (*Glycine soja* Sieb. and

Zucc.) from the main centres of diversity”, *Biochemical Systematics and Ecology* 77, 16-21, 2018.

NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 8 Mayıs 2019

Neumann, P., Pavlíková, Z., Koblížková, A., Fuková, I., Jedličková, V., Novák, P. and Macas, J., “Centromeres Off the Hook: Massive Changes in Centromere Size and Structure Following Duplication of CenH3 Gene in Fabeae Species”, *Molecular Biology and Evolution* 32(7), 1862-1879, 2015.

Palmer, D.K., O’Day, K., Trong, H.L., Charbonneau, H. and Margolis, R.L., “Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demonstration that it is a distinctive histone”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(9), 3734-3738, 1991.

Penke, T.J., McKay, D.J., Strahl, B.D., Matera, A.G. and Duronio, R.J., “Functional redundancy of variant and canonical histone H3 lysine 9 modification in *Drosophila*”, *Genetics* 208(1), 229-244, 2018.

Phytozome, <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#!gene?search=1&crown=1&detail=1&method=0&searchText=transcriptid:30492049>, 25 Haziran 2018

Promega, <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/enotes/comparing-cloning-efficiency-of-pgemt-and-pgemt-easy-vectors-to-topo-ta-cloning-vectors/>, 10 Nisan 2019

Ravi, M. and Chan, S.W., “Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination”, *Nature* 464(7288), 615, 2010.

Sanei, M., Pickering, R., Kumke, K., Nasuda, S. and Houben, A., “Loss of centromeric histone H3 (CENH3) from centromeres precedes uniparental chromosome elimination in interspecific barley hybrids”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(33), E498-E505, 2011.

Schmutz, J., Cannon, S.B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W. and Cheng, J., “Genome sequence of the palaeopolyploid soybean”, *Nature* 463(7278), 178, 2010.

Sherman-Broyles, S., Bombarely, A., Powell, A.F., Doyle, J.L., Egan, A.N., Coate, J.E. and Doyle, J.J., “The wild side of a major crop: Soybean's perennial cousins from Down Under”, *American Journal of Botany* 101(10), 1651-1665, 2014.

Song, Q.J., Marek, L.F., Shoemaker, R.C., Lark, K.G., Concibido, V.C., Delannay, X. and Cregan, P.B., “A new integrated genetic linkage map of the soybean”, *Theoretical and Applied Genetics* 109(1), 122–128, 2004.

Sullivan, K.F., Hechenberger, M. and Masri, K., “Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere”, *The Journal of Cell Biology* 127(3), 581–592, 1994.

Takara, <https://www.takarabio.com/products/pcr/high-yield-pcr/ex-taq-products/ex-taq-polymerase>, 02 Nisan 2019

Talbert, P.B., Masuelli, R., Tyagi, A.P., Comai, L. and Henikoff, S., “Centromeric localization and adaptive evolution of an *Arabidopsis* histone H3 variant”, *The Plant Cell* 14(5), 1053-1066, 2002.

Talbert, P.B. and Henikoff, S., “Histone variants—ancient wrap artists of the epigenome”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11(4), 264, 2010.

Tek, A.L., Kashihara, K., Murata, M. and Nagaki, K., “Functional centromeres in soybean include two distinct tandem repeats and a retrotransposon”, *Chromosome Research* 18(3), 337-347, 2010.

Tek, A.L., Kashihara, K., Murata, M. and Nagaki, K., “Functional centromeres in *Astragalus sinicus* include a compact centromere-specific histone H3 and a 20-bp tandem repeat”, *Chromosome Research* 19(8), 969-978, 2011.

Tek, A.L., Stupar, R.M. and Nagaki, K., “Modification of centromere structure: a promising approach for haploid line production in plant breeding”, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 39(4), 557–562, 2014.

USDA PLANTS Database, “UNITED States Department of Agriculture Natural Resources Conservation”, <https://plants.sc.egov.usda.gov/core/profile?symbol=GLYCI>, 28 Kasım 2018.

Warburton, P E., Cooke, C.A., Bourassa, S., Vafa, O., Sullivan, B.A., Stetten, G. and Poirier, G.G., “Immunolocalization of CENP-A suggests a distinct nucleosome structure at the inner kinetochore plate of active centromeres”, *Current Biology* 7(11), 901-904, 1997.

Watts, A., Kumar, V. and Bhat, S.R., “Centromeric histone H3 protein: from basic study to plant breeding applications”, *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 25(4), 339-348, 2016.

Wu, C., Sun, S., Nimmakayala, P., Santos, F.A., Meksem, K., Springman, R. and Zhang, H.B., “A BAC-and BIBAC-based physical map of the soybean genome”, *Genome Research* 14(2), 319-326, 2004.

Xin, Z. ve Chen, J., DNA Sequencing II: Optimizing Preparation and Cleanup, *Jones and Bartlett Publishers* Kanada, 2006.

Yu, H.G., Dawe, R.K. and Hiatt, E.N., “The plant kinetochore”, *Trends in Plant Science* 5(12), 543-547, 2000.

Zhong, C.X., Marshall, J.B., Topp, C., Mroczek, R., Kato, A., Nagaki, K., ... Dawe, R.K., “Centromeric retroelements and satellites interact with maize kinetochore protein CENH3”, *The Plant Cell* 14(11), 2825–2836, 2002.

Zweidler, A., “Core histone variants of the mouse: primary structure and differential expression”, *Histone Genes: Structure, Organization and Regulation*, 339-371 1984

**EK- A** Hangi türlerin izolasyondan dizilemeye kadar yapıldığını gösteren tablo

Türler	İzolasyon	PZR z primeri	PZR		Ligasyon		Transformasyon		Dizileme Örnekleri	
			x	Y	x	y	x	y	x	y
<i>G. max</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
<i>G. arenaria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. argyrea</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	-	-
<i>G. canescens</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
<i>G. clandestina</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
<i>G. crytolaba</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
<i>G. curvata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. dolichocarpa</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
<i>G. falcata</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
<i>G. latifolia</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-
<i>G. latrobeana</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
<i>G. microphylla</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
<i>G. peratosa</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
<i>G. pescadrensis</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	-	-
<i>G. pindanica</i>	√	√	√	√	-	-	-	-	-	-
<i>G. rubiginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. soja</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	-	-
<i>G. stenophita</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
<i>G. syndetika</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	√	-
<i>G. tabacina</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√
<i>G. tomantella</i>	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√

**EK-B** y bölgesi (2878) için okuması yapılan kısa diziler

Tüp Adı	Plate (F ve R)	F	R	Uzunluk (Gelen)	Trim	Hit (Blast)	Açıklama
3	A3	x		1515	1515	16s rRNA	Reverse
	E3		+	1939	1097	CenH3	OK
4	A4	+		1523	906	CenH3	Kısa
	E4		+	1637	1262	CenH3	
5	A5	+		1550	1140	CenH3	Kısa
	E5		+	1599	1275	CenH3	
8	A8	+		1442	960	CenH3	Kısa
	E8		+	1666	1200	CenH3	
9	A9	+		1628	700	CenH3	Kısa
	E9		+	1491	1200	CenH3	
12	A12	+		1601	1218	CenH3	Kısa
	E12		+	1666	1173	CenH3	
13	B1	+		1587	1184	CenH3	Kısa reverse
	F1		+	1593	1026	CenH3	
16	B4	+		1570	1095	CenH3	Kısa
	F4		+	1626	1205	CenH3	
17	B5	+		1650	1216	CenH3	Kısa
	F5		+	1625	1151	CenH3	
20	B8	x		1607	1607	Cloning vector U6p-gRNA	İptal
	F8		x	1621	1621	Cloning vector pFH6	
21	B9	+		1632	1214	CenH3	Kısa
	F9		+	1610	1209	CenH3	

**EK-B (Devamı) y bölgesi (2878) için okuması yapılan kısa diziler**

24	B12	x		1212	1212	No results	İptal
	F12		x	1144	1144	No results	
25	C1	+		1661	1174	CenH3	Kısa
	G1		+	1571	1182	CenH3	
28	C4	+		1666	1218	CenH3	Kısareverse
	G4		+	1610	1199	CenH3	
29	C5	+		1678	1245	CenH3	Kısareverse
	G5		+	1595	1194	CenH3	
32	C8	+		1578	1230	CenH3	Kısa
	G8		+	1585	1171	CenH3	
33	C9	+		1658	1170	CenH3	Kısa
	G9		+	1531	1186	CenH3	
36	C12	+		1626	1189	CenH3	Kısa
	G12		+	1552	1175	CenH3	
37	D1	+		1667	1234	CenH3	Kısa
	H1		+	1555	1156	CenH3	
40	D4	x		1263	1263	Pseudo. 16S rRNA	reverse
	H2		+	1491	1199	CenH3	
41	D5	+		1627	1252	CenH3	Kısa
	H5		+	1460	1125	CenH3	
46	D10	+		1610	1194	CenH3	Kısa
	H10		+	1514	1154	CenH3	
47	D11	+		1627	1191	CenH3	Kısa
	H11		+	1567	1171	CenH3	
48	D12	+		1634	1274	CenH3	Kısa
	H12		+	1554	1135	CenH3	

**EK-B (Devamı)** x bölgesi için okuması kısa ya da insert olmayan diziler

Plate	Tüp Adı	F	R	Uzunluk(Gelen)	Trimden kalan uzunluk		Hit(Blast) CenH3/ H3
2	A2	+		1590	772	CenH3	MARVK
	E2		X	1616	772	CenH3	MARVK
7	A7	x		1278	1278	-	
	E7		+	1783	1068	CenH3	
11	A11	+		1578	521	CenH3	Kısa
	E11		+	2381	241	CenH3	
39	D3	x		1554	1252	No results	
	H3		+	1263	1554	CenH3	

## Analizi yapılan x bölgesi

Plate	Tüp Adı	F	R	Uzunluk (Gelen)	Trimden kalan uzunluk	Contig	Hit(Blast) CenH3/ H3
1	A1	+		1639	819	700	CenH3
	E1		+	1614	967	861	CenH3
6	A6	+		1534	1051	1051	CenH3
	E6		+	1682	928	473	CenH3
10	A10	+		1555	1042	566	CenH3
	E10		+	1634	973	934	CenH3
14	B2	+		1629	907	907	CenH3
	F2		+	1658	1017	557	CenH3
15	B3	+		1569	1032	1032	CenH3
	F3		+	1617	1015	429	CenH3
18	B6	+		1611	1038	1038	CenH3
	F6		+	1606	1020	471	CenH3
19	B7	+		1663	858	858	CenH3
	F7		+	1606	979	650	CenH3

**EK-B (Devamı) Analizi yapılan x bölgesi**

22	B10	+		1631	1025	540	CenH3	
	F10		+	1576	1030	963	CenH3	
23	B11	+		1576	727	396	CenH3	
	F11		+	1619	931	931	CenH3	
26	C2	+		1603	993	993	CenH3	
	G2		+	1599	931	554	CenH3	

**EK-C**

<b>Organizma ve genom sembolü</b>	<b>GenBank Erişim Numarası- CDS (kodlama dizisi)</b>
<i>Oryza alta</i> CC	>GQ849337.1
<i>Oryza alta</i> DD	>GQ849340.
<i>Oryza minuta</i> BB	>GQ849336.1
<i>Oryza minuta</i> CC	>GQ849338.1

## ÖZ GEÇMİŞ

Bilge Şevval YILDIRIM 10.03.1996 tarihinde Kayseri'nin Melikgazi ilçesinde dünyaya gelmiştir. İlk, orta eğitimini Ankara'da tamamlamıştır. Lise eğitimini Muğla'nın Datça ilçesinde tamamlamıştır. Daha sonra 2013 yılında Nevşehir Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünü kazanıp yataş geçişle 2014 yılında İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümüne geçip oradan 2017 yılında mezun olmuştur. Yükseköğrenimini Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tarımsal Genetik Mühendisliği bölümünde devam ettirmektedir.



