



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

PELEMİR (*Cephalaria syriaca*) GENOMUNDA YER ALAN
TEKRARLAYAN DNA DİZİLERİNİN
MOLEKÜLER KLONLANMASI

SEVİM DÖNDÜ KARA

Haziran 2018

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

PELEMİR (*Cephalaria syriaca*) GENOMUNDA YER ALAN
TEKRARLAYAN DNA DİZİLERİNİN
MOLEKÜLER KLONLANMASI

SEVİM DÖNDÜ KARA

Yüksek Lisans Tezi

Danışman
Doç. Dr. Ahmet Latif TEK

Haziran 2018

Sevim Döndü KARA tarafından **Doç. Dr. Ahmet Latif TEK** danışmanlığında hazırlanan “**Pelemir (*Cephalaria syriaca*) Genomunda Yer Alan Tekrarlayan DNA Dizilerinin Moleküler 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

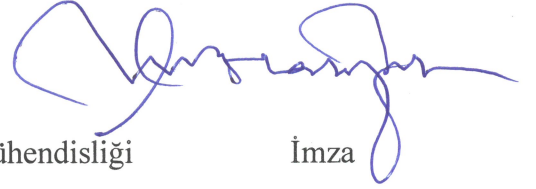
Çukurova Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü



İmza

Üye: Doç.Dr. Ahmet Latif TEK

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tarımsal Genetik Mühendisliği



İmza

Üye: Dr. Öğretim Üyesi Emre AKSOY

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 V.

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.

İmza

Sevim Döndü KARA

ÖZET

PELEMİR (*Cephalaria syriaca*) GENOMUNDA YER ALAN TEKRARLAYAN DNA DİZİLERİNİN MOLEKÜLER KLONLANMASI

KARA, Sevim Döndü

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Genetik Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman:

Doç. Dr. Ahmet Latif TEK

Haziran 2018, 92 sayfa

Yeryüzündeki yaşamın sürekliliği için bitkiler mutlak gereklidir. Bir bitkinin hücre çekirdeğindeki haploid kromozom setini oluşturan DNA miktarının tamamı, o bitkinin genomunu oluşturur. Genellikle bitki genom büyüklüğü, genom yapısı ve bu yapının özellikleri türe özgüdür. Genom büyüklüğündeki değişkenliklerin temelini genomda farklı yaygınlıkta ve farklı özellikleriyle yer alan tekrarlayan DNA dizileri oluşturmaktadır. Bu çalışmada yeni kültüre alınıp çeşit tescili yapılan pelemir (*Cephalaria syriaca* L.) bitkisinin genomunu oluşturan ve genom içinde yaygın olarak bulunan tekrarlayan DNA elementlerinin tanımlanması hedeflenmiştir. Bu amaca sistematik olarak ulaşmak için pelemir bitkisinin genom ve kromozom özelliklerinin analizine yönelik ribozomal DNA'ların kromozom üzerindeki yerlerinin tespit edilmesi, rekombinant klon temelli tekrar dizilerinin izolasyonu, yeni nesil dizileme verilerinin biyoinformatik analizi ve elde edilen satelit tekrarların FISH yöntemiyle haritalanması gerçekleştirilmiştir. Bu tanımlamalar, pelemir genom yapısını oluşturan DNA elementlerinin içeriğine ve dinamiklerine ışık tutan ilk kapsamlı çalışmayı oluşturmaktadır.

Anahtar sözcükler: *Cephalaria syriaca*, tekrarlayan DNA, satelit DNA, rDNA, FISH, dot blot, genom,

YND

SUMMARY

MOLECULAR CLONING OF REPETITIVE DNA SEQUENCES IN THE GENOME OF CEPHALARIA (*Cephalaria syriaca*)

KARA, Sevim Döndü

Niğde Ömer Halisdemir University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Agricultural Genetic Engineering

Supervisor: Assoc. Professor Dr. Ahmet Latif TEK

June 2018, 92 pages

Plants are necessary for the continuity of life on Earth. The amount of DNA that makes up the haploid chromosome set in the cell nucleus of a plant is called the genome. Generally, plant genome size, genome structure, and features of this structure are species specific. The basis of variability in genome size is the repetitive DNA sequences present in the genome with different abundance and different characteristics. In this study, we aimed to identify the repetitive DNA elements, which are common in the genome of *Cephalaria syriaca* L.. In order to systematically achieve this goal, mapping of ribosomal DNA sites on chromosomes, isolation of recombinant clone-based repeat sequences, and bioinformatics analysis of next generation sequencing data were performed for analysis of genomic and chromosomal characteristics of *Cephalaria syriaca* L.. Our results constitute the first comprehensive study that sheds light on the content and dynamics of the DNA elements forming the *Cephalaria* genome structure.

Keywords: *Cephalaria syriaca*, repetitive DNA, satellite repeats, rDNA, FISH, dot blot, genome, NGS

ÖNSÖZ

Bugüne kadar benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen ve bana her zaman güvenen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ahmet Latif TEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim sırasında aldığım Ayhan Şahenk bursu için ve yurtdışına gidebilmemi sağlayan Erasmus programı ve oradan aldığım burs için emeği geçen herkese teşekkürlerimi sunarım.

Erasmus programı aracılığıyla gittiğim ve tezimi tamamlamamda yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Andreas HOUBEN'a, orada kaldığım süre boyunca benden yardımını esirgemeyen Yi Tzu KOU ve flow sitometri çalışmalarımdayanımdayan Sayın Dr. Jörg FUCHS başta olmak üzere tüm IPK (Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research) çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında dot blot için prob hazırlamamdayardımcı olan Sayın Dr. Allah BAKHSH hocama teşekkür ederim.

Arazi çalışmamdayardımcı olan arkadaşım Hasan AĞRI'ya, laboratuvar çalışmalarımdayanımda olan arkadaşlarım Ainura Adylbek KYZY, Ainiwaer ZİNAİTİGULİ, Hümeıra YILDIZ ve Bilge Şevval YILDIRIM'a çok teşekkür ederim.

Son olarak bana her zaman sonsuz güvenen biricik aileme minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
SUMMARY	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGE VE KISALTMALAR	xv
BÖLÜM I GİRİŞ	1
BÖLÜM II GENEL BİLGİLER	4
2.1 Genom Büyüklüğü ve Yapısı	4
2.2 Tekrarlayan DNA elementleri	8
2.2.1 Ardışık tekrarlar	11
2.2.1.1 Satelit DNA	11
2.2.1.2 Minisatellitler ve mikrosatellitler	16
2.2.1.3 Ribozomal DNA	17
2.2.2 Transpozon elementler	18
2.3 Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyonu	19
2.4. Dizileme ve Biyoinformatik	22
2.4.1 Yeni nesil dizileme (YND) teknikleri kullanılarak yapılan çalışmalar	23
2.4.2 Tekrar dizilerinin tespit edilmesine yönelik biyoinformatik çalışmalar	24
2.5 <i>Cephalaria</i> Cinsinin Genel Özellikleri	25
2.5.1 <i>Cephalaria</i> türlerinin taksonomik ve filogenetik özellikleri	25
2.5.2 <i>Cephalaria</i> türlerinin kullanım alanları	27
2.5.3. Pelemir (<i>Cephalaria syriaca</i> L.) türünün genel özellikleri	29
2.5.3.1 Pelemir (<i>Cephalaria syriaca</i> L.) türünün yabancı ot olarak varlığı	30
2.5.3.2 Pelemir (<i>Cephalaria syriaca</i> L.) türünün yeni bir kültür bitkisi olarak kullanımı	31
2.6 Tez Çalışmasının Amaç ve Hedefleri	33
BÖLÜM III MATERYAL VE METOD	34

3.1 Materyal	34
3.1.1 Bitki materyali	34
3.1.2 Kimyasal malzemeler	34
3.2 Metod	34
3.2.1 Genom büyüklüğünün ölçülmesi	34
3.2.2 Genomik DNA izolasyonu.....	35
3.2.3 Restriksiyon enzimleriyle kesme	36
3.2.4 DNA parçalarının agaroz jel elektroforezi kullanılarak ayrıştırılması ve saflaştırılması	37
3.2.5 PCR.....	37
3.2.6 Ligasyon ve bakteriyel transformasyon.....	38
3.2.7 Klon seçimi ve dot blot	38
3.2.8 Dizi sonuçlarının biyoinformatik analizi	40
3.2.9 Yeni nesil dizileme ve biyoinformatik analizi	41
3.2.10 TAREAN programı sonuçlarına göre primer tasarımı ve PCR	41
3.2.11 Kromozomların hazırlanması	42
3.2.12 Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon	43
BÖLÜM IV BULGULAR	45
4.1 Pelemir (<i>C. syriaca</i>) Türünün Genom Büyüklüğünün Ölçülmesi	45
4.2 Pelemir (<i>C. syriaca</i>) Kromozomlarında Ribozomal Genlerin (5S ve 45S) ve Telomerik DNA Dizilerinin FISH ile Haritalanması.....	47
4.2.1 5S ve 45S ribozomal genlerin haritalanması	47
4.2.2 Telomerik DNA dizilerinin haritalanması	48
4.3 Pelemir (<i>C. syriaca</i>) Türünün <i>Bam</i> HI Restriksiyon Enzimiyle Düşük Çözünürlüklü Genom DNA Kütüphanesinin Kurulması	49
4.3.1 <i>Bam</i> HI restriksiyon enzimiyle pelemir (<i>C. syriaca</i>) genomik DNA'sının kesilmesi	49
4.3.2 Restriksiyon fragmentlerinin klonlanması.....	50
4.3.3 Klonlanan fragmentlerin dot blot yöntemiyle taranması	50
4.3.4 Yüksek kopya içerikli klonların seçimi	50
4.3.5 Aday klonların dizilenmesi ve dizi analizi	52
4.4 Pelemir (<i>C. syriaca</i>) Genomunun Yeni Nesil Dizilemesi (YND)	56

4.4.1 Yeni nesil dizileme sonuçlarının biyoinformatik analizi	56
4.4.2 Yaygın DNA elementlerinin klonlanması	64
4.4.3 FISH yöntemi ile yaygın DNA elementlerinin haritalanması	65
BÖLÜM V TARTIŞMA VE SONUÇ	71
5.1 Sonuç	74
KAYNAKLAR	76
EK-A	92
ÖZ GEÇMİŞ	93



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bazı çiçekli bitki türleri arasında görülen genom büyüklüklerindeki farklılıklar	5
Çizelge 2.2. Dipsacaceae familyasının genom büyüklüklerinde görülen farklılıklar.....	5
Çizelge 2.3. Tekrarlayan DNA elementlerinin genel sınıflandırması	8
Çizelge 2.4. Ardışık tekrar sınıfları	11
Çizelge 2.5. Retrotranspozonların genel sınıflandırması.....	18
Çizelge 2.6. Bazı bitki genomlarında görülen tekrar dizilerinin FISH analiz sonuçları.	21
Çizelge 2.7. Pelemir (<i>C. syriaca</i>) türünün taksonomik açıdan genel gösterimi	30
Çizelge 3.1. Satelit tekrarların amplifikasyonu için kullanılan primerlerin listesi	41
Çizelge 4.1. Pelemir bitkisinin flow sitometrik analizi sonucunda elde edilen 1C ve 2C değerleri.....	46
Çizelge 4.2. Aday klonların Blast programı kullanılarak analizi	54
Çizelge 4.3. Pelemir (<i>C. syriaca</i>) genomunda bulunan tekrar elementlerinin RepeatExplorer programı aracılığıyla analiz edilmesi	59
Çizelge 4.4. RepeatExplorer programından alınan raporda pelemir (<i>C. syriaca</i>) genomunda bulunan tekrar elementlerinin kümelendirilmesi ve bunların satelit tekrar dizisi olma olasılıkları.....	60
Çizelge 4.5. TAREAN programından alınan raporda pelemir (<i>C. syriaca</i>) genomunda bulunan tekrar elementlerinin kümelendirilmesi ve bunların satelit tekrar dizisi olma olasılıkları	62
Çizelge 4.6. TAREAN programı sonucunda elde edilen satelit tekrar dizileri.....	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1. Kromozom üzerinde tekrarlayan DNA elementlerinin dağılımının genel bir görüntüsü (Schmidt ve Heslop-Harrison, 1998 makalesinden uyarlanmıştır) 9
- Şekil 2.2. Sentromerin bulunduğu konuma göre kromozomların sınıflandırılması. Metasentrik (a), Submetasentrik (b), Akrosentrik (c), Telosentrik (d)..... 14
- Şekil 2.3. FISH tekniğinin genel aşamaları. Florokrom moleküllerinin bağlandığı prob DNA ve kromozomal DNA denatüre edildikten sonra ilgili kısımları hybridize olurlar. DAPI ile boyanan kromozom ve prob DNA'nın bağlandığı bölge floresan mikroskopu aracılığıyla gözlemlenir..... 20
- Şekil 2.4. Dipsacaceae familyasının filogenetik ilişkisi (Carlson vd., 2009)..... 27
- Şekil 2.5. Pelemir türünün Türkiye üzerindeki dağılımı. (Gaziantep, İstanbul, Amasya, Ankara, Burdur, Diyarbakır, Erzincan, Erzurum, Hatay, Kocaeli, Konya, Kahramanmaraş, Muş, Şanlıurfa, Uşak; TÜBİVES, 2018)..... 29
- Şekil 2.6. Pelemir (*C. syriaca*) türünün Dünya üzerindeki dağılımı (Verlaque, 1980) 29
- Şekil 2.7. Pelemir bitkisinin genel bitki morfolojisi (a), yaprak (b), çiçek (c), çiçek tomucuğu (d), tohum ve kök ucu (e) görüntüsü 31
- Şekil 3.1. *Bam*HI, *Bsu*RI, *Dra*I restriksiyon enziminin kesim dizisi (a) *Bam*HI, (b) *Bsu*RI, (c) *Dra*I 36
- Şekil 4.1. *C. syriaca* (pelemir, *C. s*) türünün genç yapraklarında çekirdek DNA içeriğinin flow sitometrik analizi 46
- Şekil 4.2. 45S rDNA'nın *C.syriaca* kromozomları üzerinde lokalizasyonu (2n=10). DAPI ile boyanmış metafaz kromozomları (a), 45S rDNA sinyalleri kırmızı ile gösterilmektedir (b), kromozom üzerinde 45S rDNA sinyalleri birleştirilmiş (merge) resminde (c) gösterilmektedir. Bar=10µm..... 47
- Şekil 4.3. 5S rDNA'nın *C.syriaca* kromozomları üzerinde lokalizasyonu (2n=10). DAPI ile boyanmış metafaz kromozomları (a), 5S rDNA sinyalleri yeşil ile gösterilmektedir (b), kromozom üzerinde 5S rDNA birleştirilmiş (merge) resminde (c) gösterilmektedir. Bar=10µm..... 48
- Şekil 4.4. *C.syriaca* kromozomlarının 45S rDNA ve 5S rDNA sinyallerine göre ideogramı..... 48

- Şekil 4.5. Telomerik tekrarın *C.syriaca* kromozomları üzerinde lokalizasyonu ($2n=10$). DAPI ile boyanmış kromozomlar (a), telomer sinyalleri (b), kromozomlar ve telomer sinyallerinin birleştirilmiş (merge) görseli (c). Bar= $10\mu m$ 48
- Şekil 4.6. Pelemir (*C. syriaca*) genomik DNA (a), BamHI restriksiyon enzimi kullanılarak genomik DNA'nın kesilmesi (b), DraI ve BsuRI restriksiyon enzimi kullanılarak genomik DNA'nın kesilmesi (c). Markör=1 kb 49
- Şekil 4.7. Agaroz jel elektroforezi kullanılarak süpersarmal plazmitlerin analizi. T1-T10 (a), T2-1-T2-14 (b), T11-T22 (c), T2-15-T2-27 (d), T23- T30 (e), T2-28-T2-41 (f) arasını göstermektedir (T4, T5, T10, T2-1, T2-30, T2-31, T2-38, T2-39, T2-40 dizileme için gönderilmiştir). Markör= 1 kb..... 51
- Şekil 4.8. Agaroz jel elektroforezi kullanılarak süpersarmal plazmitlerin analizi. T2-42-T3-5 (g), T3-34-T3-43 (h), T3-6-T3-19 (i), T3-20- T3-33 (i), T3-44-T3-50 (j) arasını göstermektedir (T3-44, T3-49 dizileme için gönderilmiştir). Markör= 1 kb 52
- Şekil 4.9. Dot blot kullanılarak yüksek kopya içeriklerin belirlenmesi S1-S11 arası klonlar dizilemeye gönderilmiştir. 1a: S1, 6a: S2, 8a: S3, 2b: S4, 3b: S5, 1c: S6, 4d: S7, 5d: S8, 6d: S9, 9d: S10, 1e: S11 53
- Şekil 4.10. S6 klonunun pelemir (*C. syriaca*) kromozomları üzerinde dağılımı. DAPI ile boyanmış pelemir (*C. syriaca*) kromozomu (a), yeşil renkte gösterilmiş S6 klonunun sinyalleri (b), S6 klonu sinyalleri ve kromozomların birleştirilmiş (merge) görseli (c). Bar= $10\mu m$ 55
- Şekil 4.11. S8 ve S10 klonlarının pelemir (*C. syriaca*) kromozomları üzerinde dağılımı. Yeşil renk ile gösterilen S8 klonu (a-c), kırmızı renk ile gösterilen S10 klonu. (d-e), S8 ve S10 klonlarının lokalizasyonu birleştirilmiş (merge) resimde (c,f) gösterilmektedir. Bar= $10\mu m$ 55
- Şekil 4.12. Pelemir (*C. syriaca*) kromozomlarının satelit tekrar bölgelerine göre hazırlanmış ideogramı. Cl45 satelite tekrar bölgesi kırmızı ile CL34 ve Cl42 tekrar bölgeleri yeşil ile gösterilmektedir 56
- Şekil 4.13. S11 klonunun pelemir (*C. syriaca*) kromozomları üzerinde dağılımı. DAPI ile boyanmış pelemir (*C. syriaca*) kromozomu (a), kırmızı renkte gösterilmiş S11 klonunun sinyalleri (b), S11 klonu sinyalleri ve kromozomların birleştirilmiş (merge) görseli (c). Bar= $10\mu m$ 56

Şekil 4.14. Yeni Nesil Dizileme sonucu elde edilen dizilerin RepeatExplorer programı tarafından pelemir (<i>C. syriaca</i>) genomun kümelerinin analiz sonucu. X eksenini kümelerin kapsadığı genom yüzdesini, Y eksenini her kümedeki yeni nesil dizileme okumalarının sayısını göstermektedir	57
Şekil 4.15. RepeatExplorer programına göre pelemir (<i>C. syriaca</i>) genomunda bulunan tekrar elementlerinin yüzdeleri.....	58
Şekil 4.16. RepeatExplorer programına göre genom içerisinde satelit olma olasılığı yüksek tekrar elementleri kümesinin gösterimi. CL67 (a), CL81 (b), CL184 (c), CL187 (d), CL200 (e), CL203 (f), CL205 (g), CL241 (h), CL256 (i)..	58
Şekil 4.17. Yeni Nesil Dizileme sonucu elde edilen dizilerin TAREAN programında in silico analizinin gösterimi. X eksenini kümelerin kapsadığı genom yüzdesini, Y eksenini her kümedeki yeni nesil dizileme okumalarının sayısını gösterir	61
Şekil 4.18. TAREAN programı sonucu elde edilen 4 satelit tekrar kümesinin gösterimi. CL34 (a) CL36 (b) CL42 (c) CL45 (d)	62
Şekil 4.19. TAREAN programından elde edilen CL34 ve RepeatExplorer programından elde edilen CL67 tekrar dizilerinin aynı satelit tekrar elementi olup olmadığının karşılaştırılması.....	64
Şekil 4.20. TAREAN sonucunda elde edilen tekrar dizilerine özgü tasarlanan primerler ile birlikte tekrar dizilerin amplifikasyonu	64
Şekil 4.21. Pelemir (<i>C. syriaca</i>) kromozomlarının satelit tekrar bölgelerine göre hazırlanmış ideogramı. CL45 satelite tekrar bölgesi kırmızı ile CL34 ve CL42 tekrar bölgeleri yeşil ile gösterilmektedir	65
Şekil 4.22. Pelemir (<i>C. syriaca</i>) kromozomlarının floresan in situ hibridizasyon (FISH) kullanarak haritalanması. Metafaz kromozomları üzerinde CL34 (a1-c1), interfaz kromozomları üzerinde CL34 (a2-c2), metafaz kromozomları üzerinde CL42 (d1-f1), interfaz kromozomları üzerinde CL42 (d2-f2), metafaz kromozomları üzerinde CL45 (g1-i1), interfaz kromozomları üzerinde CL45 (g2-i2). Bar=10 µm	66
Şekil 4.23. CL34 ve CL42 (<i>Cs150</i>) tekrar dizilerinin dot plot desenleri. CL34 için 5, CL42 için 5 dizi parçası kullanılmıştır	67
Şekil 4.24. CL34 ve CL42 (<i>Cs150</i>) tekrar dizilerinin karşılaştırılması. CL34 için 5, CL42 için 5 dizi parçası kullanılmıştır	68

- Şekil 4.25. Pelemir (*C. syriaca*)'in CL45 ve 45S rDNA kromozomal lokalizasyonu. DAPI ile boyanmış metafaz kromozomu (a), 45S rDNA sinyallerinin yeşil ile kromozomlar üzerinde gösterimi (b), CL45 satelit tekrar elementlerine ait sinyallerinin kırmızı ile kromozomlar üzerinde gösterimi (c), CL45-45S rDNA elementlerinin aynı bölgede sinyaller verdiği birleştirilmiş resimde (merge) (d) gösterilmektedir. Bar=10 µm 69
- Şekil 4.26. Pelemir (*C. syriaca*)'in CL45 ve CL34 kromozomal lokalizasyonu. DAPI ile boyanmış metafaz kromozomu (a), CL34 tekrar elementinin sinyallerinin yeşil ile kromozomlar üzerinde gösterimi (b), CL45 satelit tekrar elementlerine ait sinyallerinin kırmızı ile kromozomlar üzerinde gösterimi (c), CL45-CL34 elementlerinin aynı bölgede sinyaller verdiği birleştirilmiş resimde (merge) (d) gösterilmektedir. Bar=10 µm 70
- Şekil 4.27. Pelemir (*C. syriaca*)'in CL45 ve CL42 kromozomal lokalizasyonu. DAPI ile boyanmış metafaz kromozomu (a), CL42 tekrar elementinin sinyallerinin yeşil ile kromozomlar üzerinde gösterimi (b), CL45 satelit tekrar elementlerine ait sinyallerinin kırmızı ile kromozomlar üzerinde gösterimi (c), CL45-CL42 elementlerinin aynı bölgede sinyaller verdiği birleştirilmiş resimde (merge) (d) gösterilmektedir. Bar=10 µm 70
- Şekil 4.28. Pelemir (*C. syriaca*) kromozomlarının CL45-45S rDNA elementlerinin FISH kullanılarak analizi sonucu oluşturulan ideogramı. CL45 satelite tekrar bölgesi kırmızı ile 45S rDNA tekrar bölgeleri yeşil ile gösterilmiştir. Overlap (üstüste gelmiş) bölgeler ise mor renk ile gösterilmektedir 70
- Şekil 4.29. Pelemir (*C. syriaca*) kromozomlarının CL45-45S rDNA elementlerinin FISH kullanılarak analizi sonucu oluşturulan ideogramı. CL45 satelite tekrar bölgesi kırmızı ile CL34/CL42 tekrar bölgeleri yeşil ile gösterilmiştir. Overlap (üstüste gelmiş) bölgeler ise mavi renk ile gösterilmektedir 70

SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
μ	Mikro
μg	Mikrogram
μm	Mikrometre
μl	Mikrolitre
bç	Baz çifti
dk	Dakika
gr	gram
kb	kilobaz
Mbp	Mega baz çifti
M	Molar
mM	Milimolar
mg	Miligram
ml	Mililitre
ng	nanogram
pg	pikogram
u	ünite
V	Voltaj
vol	volum (hacim)

Kısaltmalar	Açıklama
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
ETOH	Etanol
FISH	Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon
IGS	İntergenik Boşluk
ITR	İntersitial Telomerik tekrarlar
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

NCBI	National Center For Biotechnological Information
PI	Propidium İodide
rDNA	Ribozomal DNA
rRNA	Ribozomal RNA
RAPD	Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA
SSR	Basit Dizi Tekrarları
TAREAN	Tandem Repeat Analyzer
YND	Yeni Nesil Dizileme



BÖLÜM I

GİRİŞ

Her organizmanın genom yapısı kendine özgü ve değişmez olduğu için bir canlıyı tanımlayabilmede ve o canlının diğer türlerle ve hatta kendi türündeki diğer bireyleriyle ilişkisini ortaya çıkartabilmede en önemli etken organizmaların genom yapısı hakkında bilgi sahibi olmayı gerektirir. Bitkilerin de dahil olduğu ökaryot organizmaların genomu içinde bulunan DNA dizileri proteinleri kodlayan genlerden, düzenleyici genlerden ve ayrıca tekrarlayan DNA dizilerinden oluşmaktadır. Ancak tekrarlayan DNA dizileri genomun yaklaşık %90'lık bir kısmını oluştururken diğer işlevsel özelliklere sahip genler genomda çok küçük bir orana sahiptir (Charlesworth vd., 1994; Heslop-Harrison ve Schmidt, 2012; Hidalgo vd., 2017; Mehrotra ve Goyal, 2014).

Tekrarlayan DNA elementleri genellikle genom içerisinde heterokromatin olarak adlandırılan yoğun, koyu renkli boyanan kısımda yüzlerce hatta binlerce kez tekrarlanan diziler olup ökaryot organizmaların genomlarının büyük bir kısmını oluştururlar (Biscotti vd., 2015a; Iglesias ve Moazed, 2017; Schmidt ve Heslop-Harrison, 1998).

Çok sıklıkla tekrarlanan bu DNA motifleri kendi arasında temel olarak iki sınıfa ayrılabilir. Birincisi tandem, yani genom içerisinde ardışık olarak tekrar eden dizilerdir, ikincisi ise genom boyunca dağılmış olarak bulunan transpozon elementlerdir. Tekrar dizileri türe, cinse, genoma ve hatta kromozoma özgü bir yapıda olabilirler. Bu elementler bitki türlerinde taksonomik gruplar içerisinde genellikle korunmuş bir dizi bilgisine sahip olsalarda, geniş bir dağılım görüntüsü de sergileyebilmektedir (Heslop-Harrison ve Schmidt, 2012; Sharma ve Raina, 2005). Bu durum onların bazı durumlarda hızlı değişen yapılarından, bazen de evrimsel olarak korunmuş olmasından kaynaklıdır.

Genom organizasyonu ve düzenlenmesinde rolü olan tekrarlayan DNA dizileri bitki kromozomlarının yapısal bileşenleri olarak da önemli bir rol oynar ve southern analizi, floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) ve dizileme gibi moleküler, sitogenetik ve biyoinformatik çalışmalarla tespit edilebilen bu motifler bitki genomunu anlamada, evrimsel çalışmalarda, gen transferinde ve gen klonlamada kullanılabilir (Biscotti vd., 2015b; Heslop-Harrison ve Schmidt, 2012; Schmidt ve Heslop-Harrison, 1998).

Yüksek verimli yeni nesil dizileme tekniklerinin gelişmesiyle birlikte çok hızlı, yüksek derecede ve doğru bir şekilde çok sayıda tekrar dizisi ortaya çıkarılabilmekte ve bu elementlerin orijini, fonksiyonu ve dinamikleri hakkında daha fazla bilgiye sahip olunabilmektedir (Biscotti vd., 2015b; Mehrotra ve Goyal, 2014). Aynı zamanda floresan *in situ* hibridizasyonu sayesinde tekrarlayan DNA elementlerinin genom içerisinde buldukları fiziksel yerleri de tespit edilebilmektedir. Örneğin FISH tekniği kullanılarak retrotranspozonların kromozom üzerindeki yerleri belirlenip lokalizasyon farklılıkları ortaya çıkarılarak ardışık tekrarlardan farklı olduğu tespit edilmiştir (Schmidt ve Heslop-Harrison, 1998; Schmidt, 1999).

Genellikle buğday ekim alanlarında buğdayla birlikte yetişen Dipsacaceae familyasının bir üyesi olan pelemir (*Cephalaria syriaca* L.) tek yıllık yabani bir bitkidir. Türkçedeki yaygın adıyla pelemir olarak bilinen bu bitki genellikle Batı Asya ve Akdeniz bölgelerinde dağılım göstermektedir. Bunun dışında Türkiye’nde Güneydoğu Anadolu bölgesinde doğal yayılım gösteren bir bitkidir (Uslu, 2016; Yazıcıoğlu vd., 1978). Pelemir bitkisinin nispeten soğuğa ve kuraklığa dayanıklı olması, % 19.72-20.60 arasında yağ içeriğine sahip olması onu Türkiye’nin Doğu Anadolu ve Orta Anadolu bölgelerinde kolza, ayçiçeği, soya gibi yağ bitkilerine alternatif bir yağ bitkisi yapmaktadır (Arslan vd., 2014). Ayrıca tohumlarının buğdayın pişirme değerini arttırmada bayatlama önleyici etken olarak da kullanılabilmesi ülkemizde alternatif tohum ve yağ bitkisi olarak kültüre alınma çalışmalarını başlatmıştır (Arslan vd., 2014).

Bu çalışmada yeni kültüre alınan ve tescil çalışmasıyla çeşit tanımlaması yapılan bir kültür bitkisi olarak pelemir genomunu oluşturan ve genom içinde yaygın olarak bulunan tekrarlayan DNA elementlerinin keşfi hedeflenerek pelemir genomuna özgü veya diğer bitki genomlarına benzer DNA dizileriyle genomların yapısal karşılaştırılması amaçlanmıştır. *Cephalaria* türlerinin genom içeriğini belirlemek amacıyla yapılan moleküler klonlanma çalışmalarının sonuçlarından elde edilen verilere bağlı olarak bireylerin, populasyonların ve filogenetik taksonların arasındaki ilişkileri inceleme amacıyla ileride moleküler markörler oluşturulabilecektir. Bu markörler bu taksonomik gruptaki bitkilerde iklimsel adaptasyona katkıda bulunabileceği gibi tarımsal açıdan ümitvar hatların genetik özellikleri ortaya çıkarılabilecektir. Moleküler markörler kromozom üzerinde bulunan genlerin muhtemel konumunu etiketlemede kullanılabilmektedir (Singh vd., 2008). Ayrıca bu çalışma

mevcut türün genom yapısı hakkında literatürdeki ilk kapsamlı çalışmayı oluşturduğu için muhtemel genoma özgü DNA elementlerinden yola çıkılarak bitki genom dinamikleri biyoinformatik yöntemlerle keşfedilebilecektir.



BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

2.1 Genom Büyüklüğü ve Yapısı

Bitkiler dünya üzerindeki tüm organizmaların yaşamı için gereklidir. Bu nedenle temel organizma olarak adlandırılan bitkinin genomunun tanımlanması gerekmektedir. Bir canlının genomu ne kadar iyi anlaşılırsa o bitkinin işlevini çözmek de o kadar kolaylaşır.

Her organizmanın genom yapısı, büyüklüğü kendine özgüdür ve eşsiz yapıdadır. Hatta yakın akraba türlerde dahi kromozomların sayısı ve morfolojisi değişiklik gösterebilmektedir (Iwata vd., 2013). Aynı şekilde çiçekli bitkilerde de kromozom sayısı ve genom büyüklüğü farklılıklar göstermektedir (Soltis vd., 2003). Genom büyüklüğü düşük olan canlılar düşük oranda kodlayan ve düzenleyici gen dizilerini, yüksek oranda ribozomal DNA, sentromerik ve telomerik tekrarlayan DNA elementlerini ve transpozon elementleri içerirler. Diğer yandan yüksek genom kompozisyonuna sahip olan canlılar yaklaşık aynı miktarda gen sayısı içermesine rağmen bu canlıların genomlarının yarıdan fazla olan kısmını ardışık tekrarlar ve transpozon elementler meydana getirmektedir (Heslop-Harrison ve Schwarzacher, 2011).

Bitki çekirdek genomunda DNA içeriğinin bu denli farklılıklar göstermesinin temel nedeni ploidi seviyelerindeki farklılıklardan, tekrarlayan DNA dizilerinin farklı varyasyonlarda çoğalmasından ve birikiminden kaynaklanmaktadır (Bennetzen vd., 2005; Macas vd., 2007). Bir gametik çekirdek genomundaki tekrar edilmemiş DNA miktarı 1C değeri olarak ifade edilir (Soltis vd., 2003). Bitkilerin genom büyüklükleri çoğunlukla bitki DNA C değeri veritabanında (Plant DNA C-Values database) mevcuttur. Sırasıyla Çizelge 2.1. ile Çizelge 2.2.'de bazı farklı familyaların ve Dipsacaceae familyasına ait bazı türlerin 1C değerleri, kromozom sayıları ve ploidi seviyeleri belirtilmektedir. Çizelgelerin incelenmesinden ploidi seviyesi ve kromozom sayılarında görülen artışlar ile 1C değeri arasında doğrudan ilişki olmadığını ortaya çıkarmaktadır (Kew, 2018).

Çizelge 2.1. Bazı çiçekli bitki türleri arasında görülen genom büyüklüklerindeki farklılıklar

Familiya	Tür	Kromozom sayısı (2n) ve ploidi seviyesi (x)	1C değeri (Mbp)	Kaynak
Rosaceae	<i>Fragaria viridis</i>	2n=2x=14	98	Antonius ve Ahokas, 1996
Rosaceae	<i>Rubus simplex</i>	2n=2x=14	254	Meng ve Finn, 2002
Rosaceae	<i>Fragaria moschata</i>	2n=6x=42	342	Antonius ve Ahokas, 1996
Rosaceae	<i>Sorbus intermedia</i>	2n=4x=68	1359	Siljak-Yakovlev vd., 2010
Rosaceae	<i>Prunus webbii</i>	2n=2x=16	377	Baird vd., 1994
Rosaceae	<i>Prunus serotina</i>	2n=4x=16	489	Dickson vd., 1992
Brassicaceae	<i>Neslia paniculata</i>	2n=2x=14	196	Lysák vd., 2009
Brassicaceae	<i>Arabidopsis neglecta</i>	2n=2x=16	196	Lysák vd., 2009
Brassicaceae	<i>Cardamine yezoensis</i>	2n=12x=96	1208	Marhold vd., 2010
Liliaceae	<i>Tulipa bakeri</i>	2n=2x=24	26651	Antonius ve Ahokas, 1996
Liliaceae	<i>Tulipa turkestanica</i>	2n=4x=48	42543	Southern, 1967

Kaynak: Kew (2018)

Çizelge 2.2. Dipsacaceae familyasının genom büyüklüklerinde görülen farklılıklar

Tür adı	Kromozom sayısı (2n) ve ploidi seviyesi (x)	1C değeri (Mbp)	Kaynak
<i>Cephalaria flava</i>	2n=2x=18	4081	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Cephalaria alpina</i>	2n=2x=18	4237	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Cephalaria uralensis</i>	2n=2x=18	4361	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Cephalaria leucantha</i>	2n=2x=18	5244	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Cephalaria gigantea</i>	2n=4x=36	6712	Temsch ve Greilhuber, 2010

Kaynak: Kew (2018)

Çizelge 2.2 (Devam) Dipsacaceae familyasının genom büyüklüklerinde görülen farklılıklar

Tür adı	Kromozom sayısı (2n) ve ploidi seviyesi (x)	1C değeri (Mbp)	Kaynak
<i>Scabiosa trivera</i>	2n=2x=16	1086	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Scabiosa cinerea</i>	2n=2x=16	1063	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Scabiosa fumarioides</i>	2n=2x=16	1472	Siljak-Yakovlev vd., 2010
<i>Scabiosa delmaniana</i>	2n=2x=16	2049	Siljak-Yakovlev vd., 2010
<i>Scabiosa canescens</i>	2n=2x=16	2194	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Scabiosa leuchopylla</i>	2n=2x=16	944	Siljak-Yakovlev vd., 2010
<i>Scabiosa ochroleuca</i>	2n=2x=16	997	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Scabiosa lucida</i>	2n=2x=16	1039	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Scabiosa columbaria</i>	2n=2x=16	1048	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Pterocephalus lasiospermus</i>	2n=2x=18	1614	Suda vd., 2005
<i>Pterocephalus dumetorum</i>	2n=2x=18	1741	Suda vd., 2005
<i>Sixalix atropurpurea</i>	2n=2x=16	882	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Succisa pratensis</i>	2n=2x=20	2716	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Succisella petteri</i>	2n=2x=20	2560	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Dipsacus pilosus</i>	2n=2x=18	5174	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Knautia dinarica</i>	2n=2x=20	621	Siljak-Yakovlev vd., 2010
<i>Knautia integrifolia</i>	2n=2x=20	2115	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Knautia ambigua</i>	2n=2x=20	3522	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Knautia arvensis</i>	2n=2x=20	3608	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Knautia drymeia</i>	2n=2x=20	3646	Temsch ve Greilhuber, 2010

Kaynak: Kew (2018)

Çizelge 2.2. (Devam) Dipsacaceae familyasının genom büyüklüklerinde görülen farklılıklar

Tür adı	Kromozom sayısı (2n) ve ploidi seviyesi (x)	1C değeri (Mbp)	Kaynak
<i>Lomelosia crenata</i>	2n=2x=18	1014	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Lomelosia cretica</i>	2n=2x=18	1975	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Lomelosia caucasica</i>	2n=4x=36	4467	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Knautia norica</i>	2n=4x=40	6975	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Knautia maxima</i>	2n=6x=60	10216	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Dipsacus fullonum</i>	2n=2x=18	3210	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Dipsacus sativus</i>	2n=2x=18	3214	Temsch ve Greilhuber, 2010
<i>Dipsacus laciniatus</i>	2n=2x=18	3249	Temsch ve Greilhuber, 2010

Kaynak: Kew (2018)

Poliploidi seviyesinin genom büyüklüğüyle ilişkisinin araştırıldığı çalışmalarda Özkan vd. (2003), altı farklı poliploidi seviyesindeki yeni sentezlenmiş buğday allopoliploidileri ve bunların ebeveyn bitkilerinin C değerlerinin birbirleriyle olan ilişkisini araştırmışlardır. Çalışmada, sentetik allotetraploidler ve alloheksaploidlerin çekirdek genom büyüklüklerindedeki görülen azalmalarında hiçbir fark olmadığını ve 2C değerinde 2 pg olduğunu tespit etmişlerdir. Allopoliploidilerin genom büyüklüğünde yapmış olduğu artışın normalden daha az olduğunu belirten Özkan vd. (2003), elde edilen verilerin hızlı bir dizi eliminasyonunu gösterdiğini ifade etmişlerdir. Shaked vd. (2001), buğday grubundan (*Aegilops* ve *Triticum*) elde edilen diploid F1 türlerini ve bunlardan türemiş allotetraploidleri araştırmışlardır. Sonuç olarak dizi eliminasyonunun buğday genomunun allopoliploidilere en büyük ve hızlı tepkilerinden biri olduğunu ve ebeveynlerinin genomlarının eşit bir şekilde etkilenmediğini ve allopoliploidlerin dizi eliminasyonunun genomun büyük bir kısmında ve kodlanmayan dizilerde olduğunu ifade etmişlerdir. Çünkü *Ae. sharonensis* ve *Ae. umbellulate* melezlemesi sonucu oluşan F1 bitkilerinde *Ae. sharonensis*'den %14 loci elimine olurken, *Ae. longissima* ve *T. urartu* melezlemesinde oluşan bireylerde %0.5'lik bir dizi eliminasyonu görüldüğünü belirtmişlerdir. Bu durumun F1 hibridlerinde görülen en büyük değişikliği

oluşturduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca eliminasyon zamanının genomik kombinasyona bağlı olduğunu belirten Shaked vd. (2001), en fazla eliminasyonun *Ae. sharonensis* ve *Ae. umbelluata* F1 melezinde olduğunu *Ae. longissima* ve *T. urartu* F1 melezinde ise çoğu eliminasyonun kromozom iki katına çıktıktan sonra meydana geldiğini bildirmişlerdir.

2.2 Tekrarlayan DNA Elementleri

Genom içerisinde yüzlerce hatta binlerce kez tekrarlanma kabiliyetine sahip tekrarlayan DNA elementleri ökaryotik genomlarda proteinlere kodlanan DNA dizilerinden daha fazla miktarda bulunur. Bu elementler bazen genom boyunca dağılmış bir özellik gösterirken bazen de kromozom üzerinde belirli bir bölgeye lokalize olmuş olarak da bulunabilir (Adega vd., 2009; Schmidt ve Heslop-Harrison, 1998). Çizelge 2.3.'de tekrarlayan DNA dizilerinin genel sınıflandırması sunulmuştur

Çizelge 2.3. Tekrarlayan DNA elementlerinin genel sınıflandırması

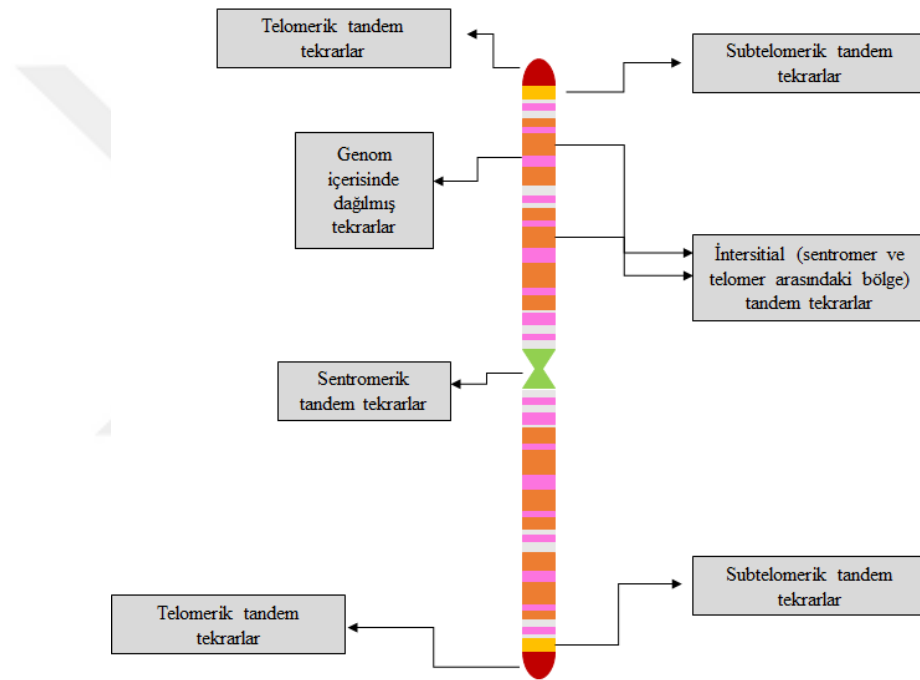
Tekrarlayan DNA Dizileri	
Ardışık Tekrarlar	Dağınık Tekrarlar
1. Satelit tekrarlar	DNA transpozonlar
2. Minisatellitler ve Mikrosatellitler	Retrotranspozonlar
3. Ribozomal DNA (rDNA)	

Sentromer, telomer, subtelomer ve interstitial (sentromer ve telomer arasındaki bölge) gibi kromozoma özgü bölgelerde bulunan tekrar dizilerine tandem yani ardışık tekrarlar adı verilirken genom boyunca hareket eden kromozom üzerinde dağılmış olarak bulunan elementlere ise transpozon adı verilmektedir (Iglesias ve Moazed, 2017; Şekil 2.1.).

Ardışık tekrarlar kendi içerisinde farklı sınıflara ayrılmaktadır. Bunların ilki satelit tekrarlardır ve genom içerisinde yüksek oranda art arda tekrarlanabilme özelliğine sahip dizilerdir. Bir diğer ardışık tekrar sınıfı ise minisatellitler ve mikrosatellitlerdir. Bu

tekrarlar satelitlere göre genomda daha az tekrarlanabilme özelliğine sahiptir. Sonuncu ardışık tekrar dizisi ise ökaryot canlıların genomlarındaki en büyük ardışık tekrar sınıfı olan ribozomal DNA (rDNA)'lardır (Charlesworth vd., 1994; Kobayashi, 2006; Sharma ve Raina, 2005).

Çizelge 2.3.'de gösterildiği gibi retrotranspozon ve DNA transpozon olarak iki kısma ayrılan transpozonlar genom içerisinde hareket ettikleri için “mobil elementler” olarak bilinirler ve bitki genomunun yaklaşık %50 ile 90'lık bir kısmını oluştururlar (Biscotti vd., 2015a; Charlesworth vd., 1994; Fu vd., 2016).



Şekil 2.1. Kromozom üzerinde tekrarlayan DNA elementlerinin dağılımının genel bir görüntüsü (Schmidt ve Heslop-Harrison, 1998 makalesinden uyarlanmıştır)

Bitki ve hayvan genomunun çok büyük bir bölümünü kapsayan tekrarlayan DNA elementleri hâlen çok sayıda organizma için en az karakterize edilmiş genomun meçhul bileşenleridirler (Novak vd., 2013). Ancak bu bileşenlerin fonksiyonu canlılar üzerinde tam olarak netlik kazanmadığından dolayı genom içinde hem fonksiyonel hem de yapısal bir role sahip olduğu belirtilmekte veya herhangi bir rolü bulunmadığı da savunulmaktadır (Biscotti vd., 2015b). Diğer taraftan bu elementlerin türden türe miktar, dizi ve dağılım modeli bakımından farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Schmidt

ve Heslop-Harrison, 1998). Bu nedenle tekrarlayan DNA dizilerinin genomdaki dağılımının bitki genomlarının organizasyonları ve evriminin anlaşılmasında gerekli olduğu belirtilmektedir (Harrison ve Heslop-Harrison, 1995).

Bu diziler yüksek bitki türlerinin genomunun en az %20'lik bir bölümünü oluştururken bazen de %90'dan fazla bir bölüme hâkim olabilmektedir (Harrison ve Heslop-Harrison, 1995). Örnek verilecek olursa insan genomunun %40'ını (Kobayashi, 2006), mısır genomunun %80'ini (Gebhardt vd., 2005), kamelya (*Camellia japonica*) genomunun %73'ünü (Heitkam vd. 2015), arpa (*Hordeum vulgare* L.) genomunun %80'ini (Karafiatova vd., 2013), *Vallisneria spinulosa*'nın %60'nı (Feng vd., 2017), kuzukulağı (*Rumex acetosa*) genomunun en az %49'unu (Steflova vd., 2013), bezelye genomunun %38 ile 48'lik bir parçasını (Macas vd., 2007), Fabaceae türlerin %55 ile 83'lük kısmını (Macas vd., 2015), zeytin (*Olea europea* L.) genomunun yaklaşık %70'ini (Barghini vd., 2014) *Luzula elegans* genomunun %61'ini (Heckmann vd., 2013) muz (*Musa acuminata*) genomunun ise %30'unu (Hribova vd., 2010) tekrarlayan DNA dizileri oluşturmaktadır. Bu durum sonuç olarak genom içerisinde tekrar elementlerinin protein kodlayan DNA elementlerinden daha büyük bir oranda olduğunu ifade etmektedir.

Bir çeşit markör görevi üstlenen tekrarlayan DNA dizileri, türler arasındaki ilişkinin anlaşılmasına da katkıda bulunur. Örneğin, tekrarlayan DNA elementleri eğer genomda korunmuş bir yapı sergilerlerse bir türün diğer akraba türlerinde de aynı dağılımı gösterebilmektedir. Ancak hızlı bir şekilde değişim gösterdiğinde bir türün çok yakın akraba türlerinde bile daha düşük ya da yüksek kopya sayısına sahip olmak yada o modelin diğer türlerde görülmemesi gibi değişiklikler oluşabilmektedir (Slamovits ve Rossi, 2002; Biscotti vd., 2015a). Yani, tekrar dizileri taksonomik aileler içerisinde veya cinsler arasında geniş dağılım gösterdikleri gibi türe, hatta kromozoma özgü bile olabilirler (Sharma ve Raina, 2005). Ortaya çıkan bu polimorfik özellik onların taksonomik ve filogenetik çalışmalarda kullanılmasını sağlar (Sharma ve Raina, 2005). *Solanum bulbocastanum*'un sentromer bölgesine özgü olarak bulunan pSbTC1 adındaki tandem tekrar dizisinin *Solanum* türlerinde yaygın olarak bulunduğu ifade edilmiştir (Tek ve Jiang, 2004). *Rhynchospora* türleri arası yapılan çalışmada daha önceden *Rhynchospora pubera* genomunda bulunan Tyba adındaki sentromerik satelit tekrar (Marques vd., 2015) *R. ciliata*, *R. globosa*, *R. tenuis*'de incelenmiş ve Tyba *R. ciliata*

ve *R. tenuis*'de bulunmasına rağmen *R. globosa*'da tespit edilememiştir. Tyba dizisinin her iki türde bulunuyor olması nedeniyle bu elementin türler arasında korunmuş olduğuna işaret olduğu belirtilmiş; ancak diğer yandan *R. cliata* ve *R. tenuis*'de Tyba elementinin kompozisyonu ve dağılımının türler arasında farklılıklar gösterdiği de belirtilmiştir (Ribeiro vd., 2016).

2.2.1 Ardışık tekrarlar

Çizelge 2.4.'de gösterildiği üzere ardışık tekrarlar, genellikle satelit tekrarlar, minisatelit ve mikrosatelit tekrarlar ve ribozomal DNA olmak üzere üç sınıfa ayrılır (Schmidt, 1999).

Çizelge 2.4. Ardışık tekrar sınıfları

Ardışık Tekrar Dizisi	Dizi Uzunluğu	Kaynak
Satelit Tekrarlar	~100-1000 bç	Slamovits ve Rossi, 2002
Minisatelit Tekrarlar	~10-60 bç	Ogunbayo, 2012
Mikrosatelit Tekrarlar	~2-8 bç	Ogunbayo, 2012
Ribozomal DNA (rDNA)	~ 10.000 bç (10 kbç)	Harrison-Heslop-Harrison, 1995

Ardışık tekrarlar üzerine yapılan çalışmalarda bu dizilerin genomun önemli bir kısmını kapsadığı tespit edilmiştir. Örneğin, *Arabidopsis thaliana* genomunda %17 (Gebhardt vd., 2005), kamelya (*Camellia japonica*)'nın genom kompozisyonunda %12,5 (Heitcam vd., 2015), zeytin (*Olea euroa* L.) genomunda yaklaşık olarak %31 oranında (Barghini vd., 2014) ardışık tekrar dizisi bulunmaktadır.

2.2.1.1 Satelit DNA

Satelit DNA dizileri ilk defa 1960'lı yıllarda yapılan araştırmalarda gradient yoğunluk santrifüjünde bir çeşit uydu bantları şeklinde ayrıldıklarından dolayı satelit DNA olarak adlandırılmışlardır (Yunis ve Yasmineh, 1971; Tek vd., 2005). Tandem yani ardışık

olarak tekrar eden bu diziler genomda 100 ile 1000 bç arasında değişen uzunluğa sahip olup yaklaşık 100 ile 1000 kez ardışık olarak tekrar edebilme kapasitesine sahiptirler (Slamovits ve Rossi, 2002; Vittorazzi vd., 2014).

Satelit tekrarlar yüksek ökaryotik genomların yoğun kısmı olan heterokomatin bölgesinin ana bileşenidir. Genellikle 160-180 baz çifti uzunluğundaki satelit DNA elementleri ökaryotik genomların önemli bir kısmını meydana getirir. Bu grup çoğunlukla kromozomun sentromer, perisentromer ve telomer bölgesinde lokalize olmuş şekilde karakteristik bir durum sergilemektedir (Biscotti vd., 2015a; Biscotti vd., 2015b; Sharma ve Raina, 2005; Tek vd., 2005; Yu vd., 2017). Bu tekrar elementlerinin kökeni bilinmemesine rağmen genişleyebilme ve daralabilme gibi hızlı bir gelişim sergileme yeteneklerine sahip oldukları bilinmektedir. Bu sebepten dolayı türler arasındaki genom büyüklüklerinde önemli farklar yarattığı ifade edilmektedir. Ancak buna rağmen bazen tüm taksonomi içerisinde aynı tekrar DNA dizisini muhafaza edebildikleri de belirtilmektedir (Ribeiro, 2016; Tek vd., 2005).

Neumann vd. (2001), *Pisum sativum* L. genomunu anlayabilmek ve tekrar dizilerinin belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada PisTR-A ve PisTR-B adında iki ardışık tekrar dizisi tespit etmişlerdir. Bunların sırasıyla 212 bç ve 50 bç uzunluğunda olduğunu ve PisTR-A tekrar dizisinin kromozom üzerinde dağılmış bir görüntü sergilerken, PisTR-B dizisinin kromozomun sentromer ve (sub)telomerik bölgesinde bulunduğunu ifade etmişlerdir. Yine aynı çalışmada iki tekrar dizisinin *P. sativum* dışında *Pisum elatius* türünde de bulunduğunu, bu yüzden *Pisum* türlerine özgünlüğünü, *Fabaceae* (baklagil) familyasına ait 19 tür ve *Arabidopsis thailana* türü ile karşılaştırılması sonucunda ise PisTR-A satelit tekrar dizisinin sadece *Pisum* türlerine özgü olduğunu, PisTR-B tekrar dizisinin ise birkaç *Vicia* türünde görülmesiyle *Pisum* türleri dışında *Vicia* türlerine de özgü olduğunu belirtmişlerdir.

Tek vd. (2005), yaptıkları çalışmada diploid patates türü olan *Solanum bulbocastanum*'da bulunan sobo adını verdikleri satelit tekrar dizisini tespit etmişlerdir. Sobo tekrar dizisi 7. kromozomun perisentromerik bölgesinde lokalize olmuş olup, bu dizinin monomer uzunluğunun yaklaşık olarak 360 kb ile 4.7 kb arasında olduğunu rapor etmişlerdir. *Solanum bulbocastanum* bitkisinde tespit edilen sobo tekrar dizisinin, *S. bulbocastanum*'a ait bazı üyelerde ve diğer *Solanum* türlerinde bulunmaması bu

tekrar elementinin türe özgü olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde Galasso vd. (1995), *Vigna unguiculata* (L.) üzerinde yaptıkları çalışmada pVuKB1 adında 448 bçlik sentromer bölgesine lokalize tekrar dizisini bulmuşlar ve bu diziyi *Vigna* türleri ve *Fabaceae* familyasının diğer türleri ile karşılaştırmışlar, ancak sadece *V. unguiculatada* bulunarak türe özgünlüğünü göstermişleridir.

Galasso vd. (2001), *Lens culinaris ssp. culinaris* genomunda pLc30 ve pLc7 adında 2 satelit tekrar dizisi karakterize ettiklerini rapor etmişlerdir. Ayrıca, Plc30 dizisinin 466 bç uzunluğunda 6. kromozom hariç tüm kromozomlar üzerinde sentromer, subtelomer ve interstitial (sentromer ve telomer arası bölge) bölgeleri gibi her biri farklı bölgelerde olduğunu tespit etmişlerdir. Plc30 tekrar dizisini başka *Lens* türünde görülmediği ifade edilen çalışmada Plc7 dizisinin 408 bç uzunluğunda sadece 1. kromozom üzerinde intersitial bölgesinde bulunduğunu, diğer *Fabaceae* türlerinde mevcut olduğunu belirterek bu durumu Plc7 tekrarının Plc30 tekrarından daha eski olabileceği şeklinde yorumlamışlardır.

Ökaryotik genomlarda gen ifadesini düzenlemekten kromozomal bütünlüğü korumaya kadar birçok fonksiyonla ilişkili olan heterokromatin bölgesi neredeyse tüm hücre döngüsü boyunca oldukça yoğun bir yapı sergilemektedir. Bu bölge tekrarlayan DNA dizilerini çok fazla miktarda barındırıyor olmasına rağmen az miktarda kodlayan DNA bölgesine sahiptir (Mehrotra ve Goyal, 2014; Ribeiro, 2016; Stupar vd., 2002).

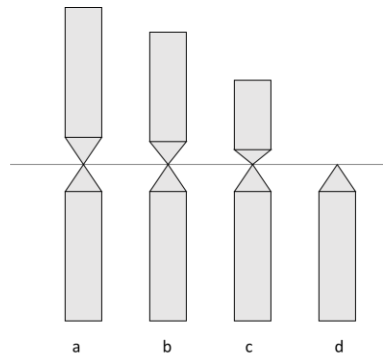
Çoğunlukla kromozomların heterokromatik bölgesine lokalize olan kodlanmayan tekrarlayan dizi bileşenleri satelit ve transpozon elementlerinden oluşmaktadır (Adega vd., 2009). Satelit tekrar dizileri hayvanlar gibi yüksek organizmalarda toplam genomun %30 ile 40'ı arasında bir oranı oluşturmaktadır (Yunis ve Yasmineh, 1971). Memelilerde heterokromatin bölgesinde bulunan tekrarlayan DNA dizileri (satelit DNA) sentromer bölgesinde bulunmaktadır (Iglesias ve Moazed, 2017).

Physalaemus cuvieri türünde tespit edilen PcP190 satelit DNA dizisi diğer *Physalaemus* türlerinde araştırılmıştır. Çoğunlukla bu tekrar dizisinin 190 bç uzunluğunda olduğu bildirilmiştir. Ancak, yalnızca *P. albonotatus* türünde PcP190 tekrarının uzunluğunun 7 bç eksik yani 183 bç olduğu belirtilmiştir. Yapılan FISH deneylerinden elde edilen sonuçlara göre ise PcP190 satelit DNA dizisinin incelenen türlerde sentromer ve

perisentromer bölgesine lokalize olduğu belirlenmiştir. Bu durum PcP190 tekrar dizisinin *Physalaemus* türleri için karakteristik olduğu yönünde ifade edilmiştir (Vittorazzi vd., 2014).

Kowar vd., (2016) şeker pancarı genomunda %30 oranında satelit DNA bulunduğunu belirterek, bunun %89'unun heterokromatik bölgenin intersitial kısmına yerleşmiş olan pEV adı verilen satelit tekrar dizisi olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca aynı türün perisentromerik ve sentromerik bölgesinde ise pBv adında başka bir satelit tekrar dizisinin yer aldığını vurgulamışlardır. *Vigna unguiculata* (L.) walp (börülce)'da 11 sentromer çiftinin yedisinde ise 455 bç'lik sentromer bölgesinde ardışık tekrar bulunmuştur (Iwata-Otsubo vd., 2016).

Sentromer tüm ökaryotik organizmalarda kromozomların mayoz ve mitoz bölünmesi sırasında düzgün bir şekilde ayrılmasını sağlayan, kinetokor aracılığıyla iğ ipliklerinin bağlandığı özelleşmiş bölge olarak tanımlanmaktadır (Adega vd., 2009; Iwata vd., 2013; Kobayashi, 2006; Neumann vd., 2015; Tek vd., 2015). Sentromerin bulunduğu konuma göre Şekil 2.2.'de gösterildiği gibi kromozomlar metasentrik, submetasentrik, akrosentrik ve telomerik olmak üzere dört farklı şekilde sınıflandırılmışlardır. Ayrıca bu bölge üzerinde genellikle tek bir satelit tekrar dizisi baskındır ve bu nedenle sentromerik satelit tekrarlar çoğunlukla homojendir (Gong vd., 2012). Diğer yandan Soya'nın sitogenetiğin yönelik yapılan bir araştırmada sentromer bölgesinde GmCent-1 ve GmCent-4 adında iki satelit tekrar dizisinin bulunmuş olması soyanın eskiden kalma bir allopoloid olduğunu düşündürmektedir (Tek vd., 2010).



Şekil 2.2. Sentromerin bulunduğu konuma göre kromozomların sınıflandırılması.
Metasentrik (a) Submetasentrik (b) Akrosentrik (c) Telosentrik (d)

Birçok bitki türünde sentromer bölgesine özgü tekrarlayan dizi elementleri tespit edilmiştir. Örneğin *Camellia japonica*'da CajaSat-1, CajaSat-2, CajaSat-3 ve CajaSat-4 adında dört adet perisentromerik bölgeden subtelomerik bölgeye kadar yerleşmiş durumda olan satelit tekrar dizisi (Heitcam vd., 2015); *Phaseolus vulgaris* L. (fasulye) genomunda ise sentromere özgü CentPV1 ve CentPV2 adında iki bağımsız satelit DNA dizisi belirlenmiştir (Iwata vd., 2013).

Brassica ailesine ait *B. campestris* ve *B. oleraceae* türlerinde sırasıyla pBoKB1 ve pBcKB4 adında iki adet sentromer bölgesine yakın satelit tekrar dizisi bulunmaktadır (Harrison ve Heslop-Harison, 1995). *Phodopus sungorus* üzerinde yapılan çalışmada PSUCentSat adında satelit tekrar dizisinin kromozomların (peri)sentromer bölgesinde ve Y kromozomu üzerinde bulunduğu saptanmıştır (Paço vd., 2014).

Mısır üzerinde yapılan çalışmada 10'uncu kromozom üzerindeki sentromer bölgesine özgü 156 bç'lik CentC adında satelit tekrar dizisi olduğu ifade edilmiştir (Birchler ve Han, 2009). İnsanda sentromer bölgesinde 170 bç uzunluğunda alphoid DNA elementi ardışık olarak tekrar etmektedir (Jabs ve Persica, 1987).

Yüksek ökaryot organizmaların sentromer bölgesinde megabaz büyüklüğünde satelit tekrar elementleri bulunur (Iwata vd., 2013). Bununla birlikte çoğu ökaryot genomunda telomer bölgesinin dışında da telomer benzeri diziler bulunmaktadır ve sentromerik bölgeler çoğunlukla intersitial telomerik tekrarları (intersitial telomeric repeats (ITR)) bulundurmaktadır (Tek ve Jiang, 2004).

Diploid bir patates türü olan *Solanum bulbocastanum* bitkisinde yapılan çalışmada pSbTC1 adı verilen 2.8 kb monomer uzunluğunda sentromer bölgesindeki ITR dizisinin tanımlandığı bildirilmektedir (Tek ve Jiang, 2004). Sentromer bölgesi dışında çok sayıda ökaryotik organizmaların kromozomlarında TG nükleotidleri bakımından zengin tekrar dizilerinin olduğu telomer bölgeleri bulunmaktadır (Tek ve Jiang, 2004).

Kromozomların dayanıklılığını koruyabilmesini sağlayan telomerler, ökaryotların genomlarında iyi korunmuş bölgelerden biridir (Rosato vd., 2018). Bitki ve hayvan kromozomlarının uç kısımlarında yer alan telomerik satelit tekrar dizileri kromozom uçlarının zarar görmesini engelleyerek yapılarının korunmasını sağlayan özelleşmiş

bölgelerdir (Schmidt ve Heslop-Harrison, 1998; Torres vd., 2011). Ökaryotik organizmalarda telomer bölgesine komşu olan subtelomerik bölgelerde ardışık olarak tekrarlanan uzun satelit diziler vardır. Bu diziler hızlı gelişen, dinamik bir yapı gösterir (Torres vd., 2011).

Torres vd. (2011), patatesten 182 bp uzunluğunda CL14 ve 339 bp uzunluğunda CL34 adında iki subtelomerik tekrar dizisi izole etmişlerdir. Bu tekrarlar bazı kromozomlarda direkt olarak telomerik bölgelerle ilişkili olduğu görülebiliyorken, aynı kromozom üzerinde iki tekrar dizisinin de bulunması durumunda CL34 dizisinin her zaman telomere daha yakın bir pozisyonda olduğu ifade edilmiştir. CL14 tekrar dizisi domates bitkisinin (*Solanum lycopersium*) aralarında bulunduğu *Solanum* türlerinde ve *Nicotina* türlerinde oldukça yaygın bir durumdur. Buna karşın CL34 tekrar dizisi ise sadece patatesten ve yakın akraba türlerinde bulunmaktadır. Bütün bunlara ek olarak CL34 tekrarı CL14' e göre daha fazla dizi varyasyonu göstermektedir. Bu durum CL34 tekrar ailesinin son zamanlarda oluşup hızlıca evrimleşme gösterdiği şeklinde açıklanmaktadır.

Satelit dizilerin retrotranspozonların amplifikasyonundan türediğine dair veyahut ribozomal DNA (rDNA)'dan meydana gelmiş olabileceğine dair görüşler mevcuttur. Örneğin, bir kurbağa türü olan *Physalaemus cuvieri*'de tespit edilen PcP190 satelit DNA dizisi bu ailenin birkaç türünde analiz edilmiş ve PcP190 tekrar elementinin atasal türlerinde 5S rDNA'dan türediğini tespit edilmiştir (Vittorazzi vd., 2014).

Solanum bulbocastanum'da bulunan sobo adındaki satelit tekrar elementinin retrotranspozonların bir üyesi olan LTR dizileri ile oldukça benzer bir yapıda olduğu ifade edilmektedir. Bu durum sobo tekrar elementinin LTR içeren genom bölgesinin ani bir şekilde gelişiminden dolayı ortaya çıktığını düşündüren ilk kanıt olmuştur (Tek vd., 2005).

2.2.1.2 Minisatellitler ve mikrosatellitler

Satelit tekrarlar dışında genomda bulunan mikrosatellitler 2-8 bp uzunluğuna sahipken, minisatellitlerde 10-60 bp uzunluğunda bulunmaktadır (Ogunbayo, 2012; Çizelge 2.4.). Bazı ökaryot canlılarda çok fazla miktarda ve değişken olarak bulunan dizilere mikrosatellitler veya diğer adıyla basit dizi tekrarları (SSR) adı verilmektedir (Yu,

2000). SSR markörleri kullanılarak yapılan çalışmalarda bitkilerin genetik yapıları anlaşılıp, genetik çeşitlilikleri belirlenebilmektedir. Ayrıca, bu markörler aracılığıyla bitkilerin evrimsel olarak gelişimlerinin incelenmesi de sağlanmaktadır. Bu markörler genetik haritalama yapmak için bir araç olarak kullanılabilirler (Kibar, 2012).

2.2.1.3 Ribozomal DNA

İntergenik boşluk (intergenic spacer, IGS) 18S, 5.8S ve 25S rRNA'ları (ribozomal RNA) kodlayan genler dağınık ve ardışık olarak düzenlenirler. Genomda çoklu kopya halinde bulunan ribozomal DNA dizilerinin uzunluğunun 10 kbç (10.000 bç) olduğu belirtilmiştir (Harrison ve Heslop-Harrison, 1995; Macas vd., 2003; Çizelge 2.4.).

Ribozomal DNA (rDNA) dizileri bireyler arasındaki filogenetik ilişkilerin araştırılmasına katkı sağlamaktadır (Hillis ve Dixon, 1991). Örneğin, *Heracleum* türleri arasında çok küçük morfolojik farklılıklar olduğundan dolayı bu türleri ayırt etmek amacıyla rDNA bölgeleri markör olarak kullanılmıştır. Ayrıca, *Heracleum* türlerini kapsayan Apioideae alt familyasına ait filogenetik ilişki ortaya çıkarılmıştır (Maras, 2008).

Vicia sativa genomunu karakterize etmek için yapılan bir çalışmada 25S-18S rDNA IGS bölgesi dizilenmiştir. S12 adında bir satelit tekrar tespit edilmiş ve sonuç olarak S12 ile bulunan rDNA gruplarından bazılarının dizi benzerliği olduğu açığa çıkmıştır. Bu olay iki hipoteze bağlanmıştır. Bunlardan ilki S12 tekrar dizisinin rDNA'dan oluşmuş olma ihtimali, ikincisi ise S12 tekrarının genomda dağılımından sonra S12'ye ait tekrarların evrimleşmiş olma ihtimalidir (Macas vd., 2003).

Stupar vd. (2002), *Solanum bulbocastanum*'da 2D8 adında 5,9 kb'lik uzunlukta ribozomal DNA (rDNA) olan tandem tekrarı kromozomun perisentromerik bölgesinde keşfetmişlerdir. 2D8 tekrar dizisinin rDNA'nın intergenic spacer (IGS) bölgesine homolog bir özellik gösterdiğini belirterek, bu durumu üç ihtimal nedenle ilişkilendirmişlerdir. Bunlardan birincisi ve en güçlü olasılık olanı, 2D8 dizisinin IGS tekrarlarından oluşmuş olma ihtimali, ikincisi IGS'nin 2D8 tekrarından oluşma olasılığı, üçüncü ve son ihtimal ise IGS ve 2D8 dizisinin ortak bir şekilde oluşmuş olma olasılığıdır.

2.2.2 Transpozon elementler

Genom üzerinde dağınık bir şekilde bulunan retroelementler veya retrotranspozonlar tekrarlayan DNA dizilerinin büyük bir kısmını oluşturur. Bu elementler Ty1-copia ve Ty3-gypsy elementlerinin içerisinde bulunduğu LTR (long terminal repeat) retrotranspozonlarını içerdiği gibi, LTR olmayan, LINE (long interspersed nuclear elements) ve SINE (short interspersed nuclear elements) retrotranspozonlarını da içerirler (Schmidt, 1999, Çizelge 2.5.). Neredeyse tüm bitki genomlarında bulunabilen transpozon elementler birçok bitki türünün detaylı araştırılmasını sağladığı gibi diğer türlerle karşılaştırılmasını da sağlayabilmektedir (Du vd., 2010). Örneğin Türkiye’de bulunan *Pisum sativum* gemplasmalarının genetik çeşitliliklerinin belirlenmesinde iPBS retrotranspozonları markör olarak kullanılmıştır (Baloch vd., 2015).

Çizelge 2.5. Retrotranspozonların genel sınıflandırması

Retrotranspozon	
LTR	Non-LTR
1. Ty3/gypsy	SINE
2. Ty1/copia	LINE

Mısır bitkisinde sentromere spesifik CRM adında retrotranspozon bulunduğu bildirilmiştir (Birchler ve Han., 2009) Ayrıca mısır genomunun sentromer bölgesine özgü CRM dizisinin dört alt soyu olan CRM1, CRM2, CRM3 ve CRM4 tekrar dizilerinin çeltik (*Oryza sativa*) genomunda bulunduğu bildirilmiştir (Sharma ve Presting, 2008). CRM1 tekrar dizisi *Orzya sativa*'nın yabani akrabalarında karşılaştırıldığı zaman *Orzya sativa ssp. indica* ve *Orzya officinalis* genomunda bulunurken, *Orzya sativa ssp. japonica* genomunda bulunmayışı durumun alt ailelerin diğer türlerde kaybı yönünde yorumlanmaktadır.

Kowar vd. (2016), şeker pancarı genomunda sentromerik ve perisentromerik bölgede Ty3/gypsy retotranspozon üyesi Beetle 7 ve sentromerik bölgede Beetle 4 tekrarları bulunduğunu tespit etmişlerdir. Jiang vd. (2003), Ty3/gypsy retrotranspozon ailesine ait sentromer bölgesine özgü retrotranspozon olan bir CR ailesini buğdaygil türlerinde

bulduklarını bildirmişlerdir. *Vigna unguiculata* (L.) walp (börülce)'da sentromerik ve perisentromerik bölgede 2 retrotranspozon keşfedilmiştir (Iwata-Otsubo vd., 2016). *Olea europea* L. genomunda %5 oranında DNA transpozon (Barghini vd., 2014), şeker pancarı genomunda ise %11 oranında DNA transpozon (Kowar vd., 2016) elementlerinin bulunduğu bildirilmektedir.

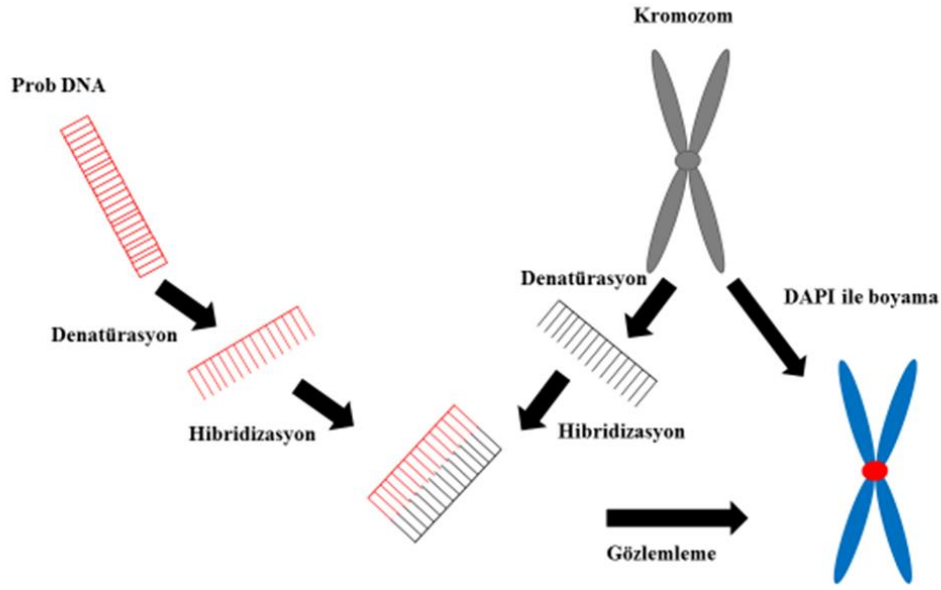
Sınıf I olarak adlandırılan retrotranspozonlar ilk önce hayvan ve maya genomlarında tespit edilmiş olup, ökaryotik genomların tamamında bulunan transpozon elementlerdir (Schmidt, 1999). Örneğin, *Olea europea* L. genomunun yaklaşık %21'i Gypsy, %18'i Copia elementidir (Barghini vd., 2014).

Luzula elegans genomunda kromozom boyunca dağılmış %33'lük parçasını Ty1/copia LTR retrotranspozonlarının bir üyesi olan ancera sınıfı oluştururken, %0.9'unu LTR Ty1/copia maximus sınıfı, %1.1'ini Ty3/gypsy oluşturmaktadır (Heckmann vd., 2013).

Şeker pancarı genomunda Ty1/copia %18'lik bir alandayken ve Ty3/gypsy %20'lik bölümü kapsamaktadır (Kowar vd., 2016). *Vallisneria spinulosa* genomunun yaklaşık %43'ü LTR retrotranspozondur (Feng vd., 2017). Baklagil bitkilerinde keşfedilen Ogre elementi LTR retrotranspozondur. Bu element bazı bitkilerde %40'a varan bir oranı kapsar (Macas ve Neumann., 2006). Bezelye genomunda LTR retrotranspozonlar baskındır. Yaklaşık olarak %25 oranında 4 varyantı bulunan Ty3/gypsy mevcutken, yaklaşık %5 oranında 8 varyanta sahip Ty1/copia bulunmaktadır. Ayrıca, ogre elementleri genomun %20'lik kısmını oluşturmaktadır (Macas vd., 2007).

2.3 Floresan *in situ* Hibridizasyon

Moleküler genetik araçların gelişmesiyle birlikte bitki genomlarının yapısı, evrimsel gelişimi ve fonksiyonu hakkında daha fazla bilgi edinilebilmektedir (Gebhardt vd., 2005). Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) tekniği, bir canlının genomunda bulunan tekrar dizilerinin ve tek kopya dizilerin kromozom üzerinde yerlerinin belirlenmesini sağlayarak organizmanın genom yapısının özelliklerinin anlaşılmasındaki katkısıyla moleküler sitogenetik yöntemlerin temelini oluşturan etkin ve kesin bir araçtır (Jong vd., 1999; Tek vd., 2013). FISH tekniğinin belirli aşamaları Şekil 2.3.'de gösterilmektedir.



Şekil 2.3. FISH tekniğinin genel aşamaları. Florokrom moleküllerinin bağlandığı prob DNA ve kromozomal DNA denatüre edildikten sonra ilgili kısımları hibridize olurlar. DAPI ile boyanan kromozom ve prob DNA'nın bağlandığı bölge floresan mikroskopu aracılığıyla gözlemlenir

FISH, satelit tekrarların, ribozomal DNA tekrarlarının ve transpozon elementlerin kromozom üzerinde yerlerini göstererek bir canlının genom yapısının haritalandırılmasına yardımcı olmaktadır. Bu teknik kromozomlar üzerindeki 10 kb'dan 100 kb uzunluğuna kadar değişen DNA dizilerinin lokalizasyonlarının belirlenebilmesinde kullanılmaktadır (Gebhardt vd., 2005; Karafiatova vd., 2013).

FISH tekniği sayesinde bitki genomlarında keşfedilen tekrar elementlerinin kromozom üzerindeki yerleri belirlenerek çok sayıda çalışmanın derinlik kazanması sağlanmaktadır Çizelge 2.5.'de bu konuya ilişkin örnekler verilmektedir. Fabaceae familyasının genomunda bulunan retrotranspozonları anlamak amaçlı yapılan çalışmada Ty1/copia elementleri genomun temel bileşeni olarak bulunmuş ve FISH sonucuna göre bu elementler kromozomda sentromer ve subtelomer bölgeleri dışında tüm kromozom üzerine dağılmış olarak keşfedilmiştir (Galasso vd., 1997).

Muz (*Musa acuminata*) üzerinde yapılan çalışmada telomer bölgesinde C133 adında yaklaşık 130 bç uzunluğunda, subtelomer bölgesinde C118 adında yaklaşık 2 kbç uzunluğunda satelit tekrar keşfedilmiş ve FISH kullanarak yerleri belirlenmiştir (Hribova vd., 2010).

Büyük genomlara sahip bitki türlerinin fiziksel haritasını geliştirmek amacıyla arpa (*Hordeum vulgare* L.) üzerinde yapılan çalışmada FISH tekniği kullanılmış ve bu tekniğin fiziksel haritalama elde etmek için faydasının olduğu doğrulanmıştır (Karafiatova vd., 2013).

Çizelge 2.6. Bazı bitki genomlarında görülen tekrar dizilerinin FISH analiz sonuçları

Tür adı	Bulunduğu bölge	Tekrar dizisinin adı	Tekrar dizisinin türü	Monomer uzunluğu	Kaynak
<i>Solanum bulbocastanum</i> (Patates)	Perisentromer	Sobo	Satelit	~360kb-4,7kb	Tek vd., 2005
<i>Solanum bulbocastanum</i> (Patates)	Sentromer	pSbTC1	ITR	2,8 kb	Tek ve Jiang, 2004
<i>Solanum bulbocastanum</i> (Patates)	Perisentromer	2D8	rDNA	5,9 kb	Stupar vd., 2002
<i>Solanum tuberosum</i> (Patates)	subtelomer	CL14	Satelit	182 bç	Torres vd., 2011
<i>Solanum tuberosum</i> (Patates)	subtelomer	CL34	Satelit	339bç	Torres vd., 2011
<i>Glycine max</i> (Soya)	Sentromer	GmCENT-1	Satelit	92 bç	Tek vd., 2010
<i>Glycine max</i> (Soya)	Sentromer	GmCENT-4	Satelit	411 bç	Tek vd., 2010
<i>Glycine max</i> (Soya)	Sentromer	GmCR	Retro-transpozon		Tek vd., 2010
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Fasulye)	Sentromer	CentPV1	Satelit	110 bç	Iwata vd., 2013
<i>Pisum sativum</i> (Bezelye)	Tüm kromozom üzerinde dağılmış durumda	PisTR-A	satelit	212 bç	Neumann vd., 2001
<i>Brassica campestris</i>	sentromer	pBoKB4	satelit	360 bç	Harrison ve Heslop-Harison, 1995
<i>Brassica oleraceae</i>	sentromer	pBcKB1	Ssatelit	360 bç	Harrison ve Heslop-Harison, 1995
<i>Vicia sativa</i> (Fiğ)	Kromozom üzerinde dağılmış durumda	VicTR-B	Satelit	38 bç	Macas vd., 2000

Çizelge 2.6. (Devam) Bazı bitki genomlarında görülen tekrar dizilerinin FISH analiz sonuçları

Tür adı	Bulunduğu bölge	Tekrar dizisinin adı	Tekrar dizisinin türü	Monomer uzunluğu	Kaynak
<i>Vicia pannonica</i> (Macar fiğ)	Telomer	VicTR-A	Satelit	69 bç	Macas vd., 2000
<i>Lens culinaris ssp. Culinaris</i> (Mercimek)	Sentromer, subtelomer, interstitial	pLc30	Satelit	466 bç	Galasso vd., 2001
<i>Lens culinaris ssp. Culinaris</i> (Mercimek)	intersial (sentromer ve telomer arası bölge)	pLc7	Satelit	408 bç	Galasso vd., 2001
<i>Pisum sativum</i> (Bezelye)	sentromer (sub)telomer	PisTR-B	Satelit	50 bç	Neumann vd., 2001
<i>Beta vulgaris</i> (Şeker pancarı)	Sentromer perisentromerik	Pbv	Satelit		Kowar vd., 2016
<i>Camellia japonica</i> (Kamelya)	Subtelomerik	CajaSat1	Satelit	43 bç	Heitcam vd., 2015
<i>Camellia japonica</i> (Kamelya)	Sentromer	CajaSat2	Satelit	321 bç	Heitcam vd., 2015
<i>Camellia japonica</i> (Kamelya)	IGS	Cajasat3	Satelit	139 bç	Heitcam vd., 2015
<i>Camellia japonica</i> (Kamelya)	Tüm kromozom üzerinde (Subtelomerik-perisentromerik)	Cajasat4	Satelit	178 bç	Heitcam vd., 2015
<i>Camellia japonica</i> (Kamelya)	5SrDNA kodlama bölgesi	Caja5S	rDNA	121 bç	Heitcam vd., 2015

2.4 Dizileme ve Biyoinformatik

Bir canlının genomunda bulunan nükleotidlerin dizilenmesine genom dizilenmesi adı verilmektedir. Klasik genom dizileme yönteminde ddNTP kullanarak zincir sonlandırma metodu ile DNA dizileri belirlenmeye çalışılır ve DNA dizilerinin görselleştirilmesi amacıyla jel elektroforezi kullanılır. Ancak, verimliliğin düşük olmasının yanı sıra hem maddi olarak pahalı olduğundan hem de dizilemenin yapılması büyük zaman aldığından dolayı bu yöntem sadece küçük genoma sahip olan ve tarımsal açıdan ekonomik önemi yüksek bitkilerin dizilenmesinde kullanılmıştır. Bu nedenle

canlılar üzerinde sitogenetik ve genomik çalışmaların artırılması amacıyla yeni nesil dizileme teknikleri ve biyoinformatik araçlara ihtiyaç duyulmuştur.

2000 yılından itibaren 100'den fazla bitki genomunun dizilendiği ifade edilirken, bitki genomlarının dizilenmesindeki artışın en önemli nedeni ise yeni nesil dizileme tekniklerinin (YND) ortaya çıkışına ve ucuz olmasına bağlanmıştır. Çünkü yeni nesil dizileme teknikleri düşük maliyetli, ancak yüksek verimliliğe sahip olduklarından dolayı genom büyüklüğü fazla olan veya ekonomik değeri düşük olan bitkilerin dizilenmesi sağlanabilmektedir (Michael ve Vanburen, 2015).

2.4.1 Yeni nesil dizileme teknikleri kullanılarak yapılan çalışmalar

Barghini vd. (2014), zeytin (*Olea euroa* L.) bitkisinin dizi analizi için Illumina ve 454 okumalarını, Heckmann vd. (2012), *Luzula elegans* genomunun dizilenmesi için Illumina dizileme tekniğini kullanmışlardır.

Ribeiro vd. (2016), Illumina dizileme tekniğini kullanarak *Rhynchospora ciliata*, *Rhynchospora tenuis* ve *Rhynchospora globosa* türleri dizilenmiş ve satelit tekrarları belirlemiştir. *R. ciliata* türünde Rcsat2 ve Rcsat20; *R. globosa* türünde Rgsat1, RgSat47, RgSat158, RgSat173; *R. tenuis* türünde RtSat239 adında satelit tekrar dizileri bulunmuştur.

Feng vd. (2017) tarafından, *Vallisneria spinulosa* üzerinde yaptıkları çalışmada, Illumina HiSeq 2500 tekniğini kullanılarak genom dizilemesi yapılmışlar ve elde edilen verilerin tüm genom dizilemesi bakımından yeterli olmadığını, ancak genom içerisinde bulunan tekrar elementleri hakkında bilgi verici olduğunu bildirmişlerdir.

454 dizileme tekniği ile *Rumex acetosa*'da bulunan tekrarlayan DNA dizilerini elde edip karakterize ettikleri çalışmada Copia ve Gypsy retrotranspozonlarının baskın olduğunu belirtirlerken DNA transpozon ve non-LTR retrotranspozonların bunları takip ettiğini ifade etmişler ve elde edilen Copia retrotranspozonlarına ait en fazla Maximus/Sirevirusess alt ailelerinin yoğun olduğu diğer yandan Gypsy retrotranspozonlarına ait CRM ve Tat/Ogre adında iki alt ailenin yüksek oranda bulunduğunu açıklamışlardır (Steflova vd., 2013).

2.4.2 Tekrar dizilerinin tespit edilmesine yönelik biyoinformatik çalışmalar

Bazı bitkilerin genom büyüklüğü tekrarlayan DNA dizilerinin fazla miktarda olması, yüksek derecede dizi benzerliklerine sahip olması ve genom üzerinde geniş bir şekilde yayılmış olmaları gibi etkenler nedeniyle bu elementler haritalamayı ve dizilemeyi etkilemektedir. Ayrıca dizilenen genomun analizini ve birleştirilmesini de zorlaştırmaktadır (Gebhardt vd., 2005). Bununla birlikte yeni nesil dizileme tekniklerinde görülen hatalı, daha kısa uzunluklu okumalardan kaynaklı olumsuzluklar genomun birleştirilip tüm bir genom dizisinin oluşmasını engellemiştir. Bu durum biyoinformatik yöntemlerin geliştirilmesi ile çözümlenmiştir (Gümüş, 2013).

Biyoinformatik, biyolojik çalışmalar yoluyla kazanılan verilerin bilgisayarlarla işlenebilir formata getirilerek analizini sağlar. Bu verilerin uygun formatta saklanabilmesinde gereken tüm yöntemleri içeren disiplinler arası bir çalışma alanı olup genom dizilenmesini, dizilenen genom verileri arasındaki ilişkilerin analizinde, proteinlerin sınıflandırılmasında ve organizmalar arasındaki çeşitliliklerin belirlenmesi gibi çalışmalarda kullanılmaktadır (Gümüş, 2013).

Yaşadığımız çevrede görülen en basit canlıdan en üst seviyedeki canlılara kadar olan çeşitliliğin anlaşılabilmesinde biyoinformatik araçlar kullanılabilir. Macas vd. (2007), 454 dizileme yöntemini kullanıp *Pisum sativum* genomunun dizilemesini yaparak varyasyonu fazla olan tekrar dizilerini belirlemişler ve daha sonra karşılaştırmalı genomik yaklaşımını kullanarak *M. trunculata*, *Pisum sativum* ve *Glycine max* arasındaki tekrar dizi benzerlikleri ve farklılıkları araştırarak genom analizini geniş ölçüde yapmışlar ve buna göre *Pisum sativum* ve *M. trunculata*'da benzer diziler *Glycine max* ve *Pisum sativum* genomunda da korunmuş bir kaç tekrar dizisi tespit etmişlerdir.

Illumuna dizilemesi ile Heitcam vd. (2015), *Camellia japonica* genomunun dizilenmesi sonucunda CajaSat-1, CajaSat-2, CajaSat-3 ve CajaSat-4 adında dört adet satelit tekrar dizisi ve 5S rDNA grafik tabanlı kümeleme (Graph-based read clustering) biyoinformatik programı kullanılarak sınıflandırılmış organizmanın genom yapısının anlaşılmasını sağlamışlardır. RepeatExploer programı yeni nesil dizileme sonucu elde edilen verileri kullanıp analiz edilmesini sağlayan, tekrarlayan DNA dizilerinin

saptanmasını, retroelementlerin filogenetik ilişkilerinin araştırılmasını ve birden fazla tür arasındaki tekrar kompozisyonun karşılaştırmalı analizini yapmak için ideal olarak kullanılabilir biyoinformatik bir araçtır (Novak vd., 2013).

Tekrarlayan DNA dizilerinin keşfi amacıyla son zamanlarda geliştirilen iki biyoinformatik program, RepeatExplorer ve TAREAN, YND verileri kullanarak bitki genomlarının ayrıntılı analizinin yapılmasında katkı sağlamaktadırlar. Örneğin, Macas vd. (2015), *Illumina* ile Fabaceae familyasına ait türlerin dizilemesini yaptığı çalışmada tekrar dizilerinin analizini RepeatExplorer programını kullanarak gerçekleştirmişlerdir.

Benzer şekilde Vu vd. (2015), *Illumina* HiSeq2000 ve *Illumina* Miseq ve Roche 454 kullanarak elde ettikleri *Carnivorous* türlerinin dizileme sonuçlarını RepeatExplorer programı aracılığıyla analiz ederek tekrar dizilerini belirlemişlerdir.

RepeatExplorer programı dışında Novak vd. (2017), satelit tekrarları doğrudan bir araya getirilmemiş kısa okumalardan algılayabilen TAREAN (Tandem repeat analyzer) adında yeni bir bilişimsel hattı meydana getirmişlerdir. TAREAN analizi birleştirilmemiş YND okumalarını girdi olarak kullanır ve yüksek miktarda bulunan satelit tekrar dizilerin özellikleri ile birlikte bir liste halinde sonuç olarak vermektedir. Bu programlar kullanılarak analiz edilen dizilerden elde edilen tekrar elementlerinin kromozomlar üzerindeki yerleri FISH gibi sitogenetik yöntemlerle belirlenebilmektedir.

2.5 *Cephalaria* Cinsinin Genel Özellikleri

Cephalaria taksonomik grubundaki bitki türleri geniş coğrafi dağılıma, yüksek adaptasyon özelliğine, doğadaki yaygınlığa, kültüre alınma potansiyeline ve zengin fitokimyasal bileşiklere sahiptirler. Bu nedenle, evrimsel biyoloji ve genetik de dahil olmak üzere çeşitli alanlarda çalışan bilim insanları için önemli bir bitki materyalidir.

2.5.1 *Cephalaria* Cinsinin taksonomik ve filogenetik özellikleri

Cephalaria cinsi, yaygın olarak Avrupa, Batı ve Orta Asya'da ve Kuzey ve Güney Afrika bölgelerinde dağılım gösteren Dipsacaceae familyasının bir üyesidir. Ülkemizde *Cephalaria* cinsi yakın zamanda morfolojik özelliklerine göre yeni bir taksonomik

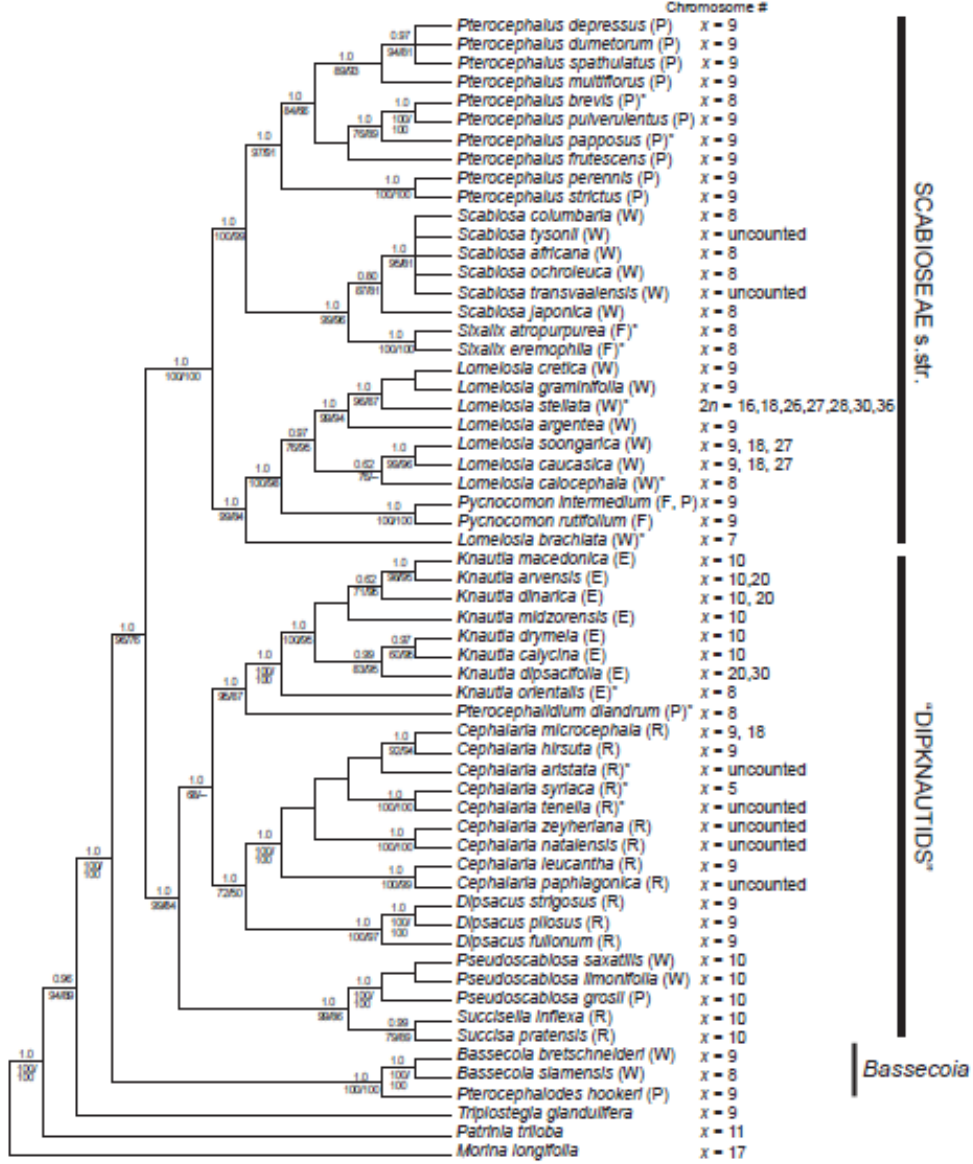
düzenlenmeye tabi tutulmuştur (Göktürk ve Sümbül, 2014). Bu konuyla ilgili yapılan çalışmada, 1994 ve 2010 yılları arasında Türkiye’den toplanan örnekler ve herbaryum numuneleri kullanılarak Türkiye florasında daha önce bilinmeyen *Cephalaria* türleri tespit edilip tanımlanmıştır. *Cephalaria* türlerinin toplam sayısı 1940 yılına kadar dünya çapında 65 iken, yapılan araştırmalar sonucunda *Cephalaria* cinsinin 94 adet tek yıllık veya çok yıllık otsu türü bulunduğu bildirilmiştir. Türkiye’de bulunan takson sayısının ise takriben 41 olduğu ve bunlardan yaklaşık 25’inin endemik olduğu belirtilmiştir (Göktürk ve Sümbül, 2014).

Dipsacaceae familyasında, *Cephalaria* türleri veya populasyonları arasındaki morfolojik ve moleküler filogenetik ilişkiyi tanımlamak için birçok çalışma yapılmıştır (Avino vd., 2009; Carlson vd., 2009; Carlson vd., 2011; Göktürk vd., 2012; Jakovljević vd., 2014; Rosselló vd., 2009).

Örneğin, Türkiye’den iki yeni *Cephalaria* türü olan *Cephalaria davisiana* ve *Cephalaria sümbüliana*’yı tanımlanıp bu türlerin morfolojik farklılıklarının akrabaları olan *Cephalaria speciosa* ve *Cephalaria elmaliensis* ile karşılaştırıldığı çalışmada; ağırlıklı olarak RAPD’e (Randomly Amplified Polymorphic DNA) dayanan moleküler markörler yardımıyla dört *Cephalaria* türü arasındaki genetik polimorfizm ortaya çıkarılmıştır (Göktürk vd., 2012). Bu çalışmadaki RAPD sonuçlarına göre *C. davisiana* ve *C. sümbüliana*’nın *C. speciosa* ve *C. elmaliensis*’e göre farklı olduğu belirlenmiştir (Göktürk vd., 2012).

Ayrıca, Dipsacaceae familyasının filogenetik çalışmalarında, çekirdek ve kloroplast DNA markörleri vasıtasıyla taksonomik gruplandırmalar yapılmış ve CYCLOIDEA benzeri genler kapitulum çiçek oluşumuyla ilişkilendirilmiştir (Carlson vd., 2009; Carlson vd., 2011). Yine bir başka çalışmada, çekirdek, ribozomal ve kloroplast DNA dizileri *C. squamiflora*’da taksonomik ve coğrafik sınırlarla ilgili moleküler farklılaşmanın modelleri belirlenmiştir (Rossello vd., 2009).

Carlson vd. (2009), Dipsacaceae türlerinin filogenetik ilişkilerinin belirlenmesine yönelik ITS ve kloroplast markörlerini kullanmışlardır. Bu çalışma sonucunda Dipsacaceae familyasının içerisinde pelemir (*C. syriaca*) türünün diğer türlerle ilişkisi filogenetik ağaçta gösterilmiştir (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Dipsacaceae familyasında filogenetik ilişkiler (Carlson vd., 2009)

2.5.2 *Cephalaria* türlerinin kullanım alanları

Birçok *Cephalaria* türü geleneksel olarak dünyanın çeşitli yerlerinde farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Bu durum, bazı *Cephalaria* taksonlarının ekonomik, çevresel ve ekolojik önemini arttırmaktadır. *Cephalaria* yabani bitkileri barındıran bir taksonomik grup olsa da, son zamanlarda bazı ülkelerde bazı öne çıkan türler için seleksiyon ve tarıma alma çalışmalarına devam edilmektedir (Benelli vd., 2014; Miron vd., 2012).

Yabani bir bitki olan *Cephalaria joppensis*, buğday yerine ruminantların beslenmesinde silaj olarak ve özellikle laktasyondaki süt ineklerinin rasyonunda besleyici değeri artırmada yem bitkisi olarak kullanılabilir (Miron vd., 2012).

Avrupa ve Akdeniz havzasındaki ülkelerde özellikle kuru yaz dönemlerinde ve erken sonbaharda oluşan besin yetersizliği nedeniyle *Cephalaria transsylvanica* bulunan çiçek bahçeleri arılar için potansiyel besin kaynağı olarak görülmektedir (Benelli vd., 2014).

Cephalaria cinsindeki türlerin birçok makromolekül bakımından kimyasal içerikleri ve bu içeriğin çeşitliliği son derece zengindir. Son zamanlarda yapılan fitokimyasal çalışmalar, *Cephalaria* cinsinin fenolik, flavonoid, iridoid ve triterpen tipi glikozitler ile biyolojik açıdan aktif yeni glikozitleri ve yağ asidi gibi son derece zengin kimyasal kaynakları içerdiğini göstermektedir (Kayce ve Kırmızıgül, 2010; Kırmızıgül vd., 2012; Sarıkahya vd., 2011; Sarıkahya ve Kırmızıgül, 2012; Sarıkahya vd., 2015).

Cephalaria türlerinde vanilolose ve picein adında iki glikozit ilk defa tespit edilmiş ve bunların gelecekte yapılacak çalışmalarda kemotaksonomik belirteçler olabileceği ifade edilmiştir (Kayce ve Kırmızıgül, 2010). Bunun dışında triterpenler, iridoidler ve flavonoidler Dipsacaceae familyasına karakterize olduğundan dolayı kemotaksonomik belirteçler olarak kullanılabilirler (Sarıkahya vd., 2011).

Yapay olarak sentezlenmiş pestisitlerin çevre ve sağlığa olan olumsuz etkisi nedeniyle bitkilerde doğal olarak bulunan etken moleküllerden elde edilen ürünler ümit verici olarak değerlendirilmektedir.

Akdeniz bölgesinde yapılan kişisel gözlemlere göre *Cephalaria balansae*'nin meyve başlığının epigastrik yanma tedavisinde kullanıldığı tespit edilmiştir (Göktürk ve Sümbül, 2014). Sahip oldukları bioaktif madde içerikleri sebebiyle antimikrobiyal olarak kullanılma potansiyeli mevcuttur (Kırmızıgül vd., 2012; Sarıkahya ve Kırmızıgül, 2012).

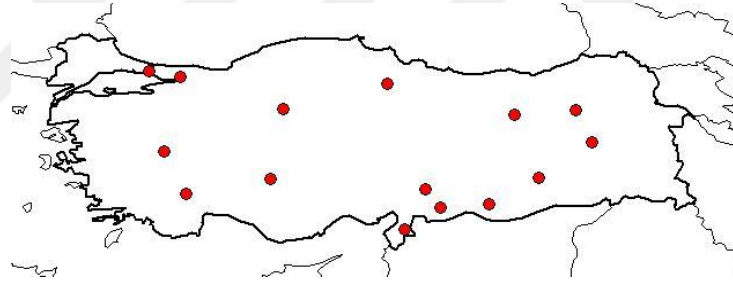
Yine benzer şekilde bazı *Cephalaria* türlerinden elde edilen ekstraksiyon bileşenlerinde antifungal, hipotermik, gevşetici, böcek öldürücü, herbisidal ve sitotoksik etkilerinden

dolayı tıbbi amaçlı bir katkı maddesi olarak kullanılma potansiyeli öngörülmüştür (Sarıkahya vd., 2015).

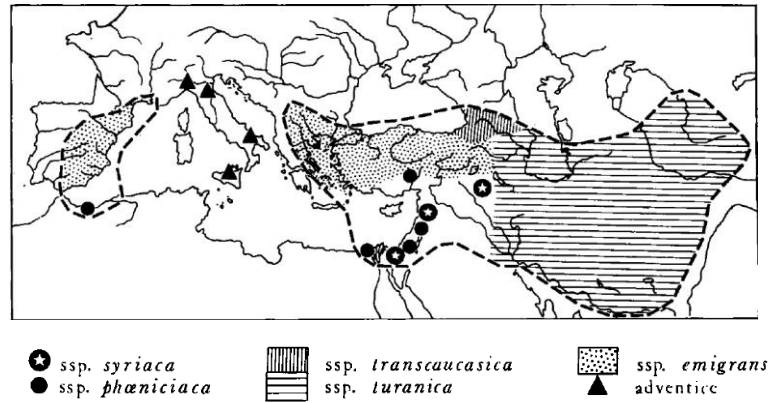
2.5.3 Pelemir (*Cephalaria syriaca* L.) türünün genel özellikleri

Bazı bölgelerde acımık adıyla anılmakta olan *Cephalaria syriaca* genellikle halk arasında pelemir olarak bilinmektedir. Şekil 2.5. ve Şekil 2.6.'de de gösterildiği gibi genellikle ülkemizin Orta ve Güneydoğu bölgesinde, dünyada ise en çok Akdeniz bölgesinde ve Batı Asya'da doğal olarak yetişmektedir (Altunbaş, 2015; Öğüt vd., 2014; Yazıcıoğlu vd., 1978).

Türkiye'deki coğrafi dağılımı Şekil 2.5'de gösterilen pelemir, Dipsacaceae familyasının bir üyesidir ve $2n=10$ kromozoma sahip dikotiledon, tek yıllık, otsu bir bitkidir (Çizelge 2.6).



Şekil 2.5. Pelemir türünün Türkiye'deki dağılımı. (Gaziantep, İstanbul, Amasya, Ankara, Burdur, Diyarbakır, Erzincan, Erzurum, Hatay, Kocaeli, Konya, Kahramanmaraş, Muş, Şanlıurfa, Uşak; TÜBİVES, 2018)



Şekil 2.6. Pelemir (*C. syriaca*) türünün Dünya üzerindeki dağılımı (Verlaque, 1980)

Çizelge 2.7. *Cephalaria syriaca* (pelemir) türünün taksonomik açıdan genel gösterimi

Kingdom (Alem)	<i>Plantae</i> (Bitkiler)
Subkingdom (Altalem)	Tracheobionta (Vascular Plants) (Damarlı Bitkiler)
Superdivision (Şube)	<i>Spermatophyta</i> (Seed plants) (Tohumlu Bitkiler)
Division (Altşube)	<i>Magnoliophyta</i> (Flowering Plants) (Çiçekli Bitkiler)
Class (Sınıf)	<i>Magnoliopsida – Dicotyledons</i> (Çift çenekli bitkiler)
Subclass (Altsınıf)	<i>Asteridae</i>
Order (Takım)	<i>Dipsacales</i>
Family (Aile)	<i>Dipsacaceae</i> (Teasel Family) (Tarakotugiller)
Genus (Cins)	<i>Cephalaria</i>
Species (Tür)	<i>Cephalaria syriaca</i> L.

Kaynak: USDA PLANTS (2018)

2.5.3.1. Pelemir (*Cephalaria syriaca* L.) türünün yabancı ot olarak varlığı

Buğday ekim alanlarında yabancı ot olarak bulunan pelemir bitkisi, tüylü ve pembe ya da mor çiçeğe sahip, yaklaşık olarak 100 cm'e kadar boylanabilmektedir (Göktürk ve Sümbül, 2014; Uslu, 2016).

Yabancı ot florasının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada *Cephalaria* cinsine ait *C. syriaca* ve *C. aristata* türlerinin Mardin'de ve Kahramanmaraş'da bulunan buğday tarlalarında bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Diyarbakır bağ üretim alanlarında görülen yabancı otlar arasında *C. syriaca* türünün, Erzurum ovasındaki buğday ve çavdar tarlalarında görülen yabancı otlar arasında *C. aristata* türünün yer aldığı gözlemlenmiştir. (Aksoy, 1973; Gökalp, 2015; Pekcan Kaçar, 2017; Tursun vd., 2006; Yıldırım ve Ekim, 2003).

Her ne kadar pelemirin bitki morfolojisi buğdaydan farklı olsa da, tohum büyüklüğü ve şekli benzerdir. Bu sebeple buğdayla birlikte nesilden nesile sürekliliğini

sağlayabilmektedir. Şekil 2.7.'de pelemir bitkisinin genel görünümü, çiçek rengi ve tohum şekli gösterilmektedir.



Şekil 2.7. Pelemir bitkisinin genel bitki morfolojisi (a), yaprak (b), çiçek (c) Çiçek tomucuğu (d), tohum ve kök ucu (e) görüntüsü

2.5.3.2 Pelemir (*Cephalaria syriaca* L.) türünün yeni bir kültür bitkisi olarak kullanımı

İnsan beslenmesinde diyet içerisindeki lif miktarı sağlık açısından önemlidir. Geleneksel olarak, pelemir tohumlarının karışık olduğubugdaydan elde edilen unun, ekmek yapımında kullanıldığı ve gecikmeli kuruma sağladığı bilinmektedir. Her ne kadar pratikte yapılan uygulamalar bulunsa da, bu karışımın etkisi hakkında sınırlı araştırma mevcuttur.

Son zamanlarda, buğday ununa % 0.25-2.25 oranında pelemir karıştırılmasının hamur kabarmasına etkisi araştırılmıştır (Karaoglu, 2012). Pelemir karıştırılmasının buğday ununun kabarma özelliklerini olumlu etkilediği ve karışım oranına bağlı olarak ekmeçlik kalitesini önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir (Karaoglu, 2012).

Özellikle ekmeçlik kalitesi düşük buğdaylardan elde edilen unlarda, pelemir bitkisinin hamur yapısını kuvvetlendirmek amacıyla kullanılabilceği belirtilirken, gluten içeriği az olan unlardan elde edilen hamurlara katıldığında ise hamurların viskoelastik özelliklerini de iyileştirilebileceği belirtilmektedir (Boz ve Karaoğlu, 2015). Ayrıca tohumları ekmeğin bayatlamasını önleyici olarak da kullanılabilir (Yazıcıoğlu vd., 1978).

İnsan beslenmesinde bitkisel yağlar önemli bir yer tutmaktadır. Bitkisel yağlar içerdikleri yağ asitlerinin kompozisyonuna göre farklı kalitelere ayrılır. Türkiye'nin yağ ihtiyacı düşünüldüğünde yeni alternatif kaynaklara ihtiyacımız olduğu görülmektedir (Arslan vd., 2014; Yazıcıoğlu vd., 1978). Bu yeni kaynakların yağ asitleri kompozisyonu yemelik veya sanayilik kullanımını belirler. *Cephalaria* taksonunun temel yağ asitleri nedeniyle insan beslenmesinde potansiyel katkı maddesi olduğu belirtilmektedir (Kırmızıgül vd., 2012). Pelemir bitkisinin yağ bitkisi olarak değerlendirilmesi ve bu amaçla yeni bir kültür bitkisi geliştirme çalışmaları da mevcuttur.

Diğer yaygın olarak tarımı yapılan yağ bitkilerine oranla, pelemir tohumları linoleik asit ve miristik asit içeriği yönünden daha yüksek içeriğe sahiptir (Baydar ve Turgut, 1999). Hatta yüksek miktarda miristik asit içerdiğinden dolayı yağ, sabun üretimi için çok uygun olduğu belirtilmektedir (Yazıcıoğlu vd., 1978). Bu sebeple yağ kalite ıslahı çalışmalarında değerlendirilebilir. Özellikle Türkiye ekolojik koşullarında tarıma alınması çalışmalarında marjinal alanlarda tohum ve yağ verimi açısından tavsiye edilmektedir (Katar vd., 2012).

Bunun dışında pelemir yağından elde edilen biyodizelin yakıt özelliklerinin standartlara uygun olduğu ifade edilmektedir (Öğüt vd., 2014). Ayrıca pelemir bitkisinin biyo-yakıt dönüşürölme olanaklarının araştırıldığı bir çalışmada ise elde edilen biyo-yakıtın

günümüzde kullanılan sıvı yakıtlara alternatif, yenilenebilir çevre dostu enerji kaynağı olabileceği belirtilmektedir (Altunbaş, 2015).

2.6 Tez Çalışmasının Amaç ve Hedefleri

Bu tez çalışmasında; pelemir bitkisinin genom yapısı ve kromozom morfolojisinin anlaşılması ve detaylı analizine yönelik klon temelli tekrar dizilerinin tanımlanması, ribozomal DNA'ların kromozom üzerindeki yerlerinin tespit edilmesi, yeni nesil dizileme sonucunda yapılan biyoinformatik analiz ile belirlenmesi ve satelit tekrarların FISH kullanılarak lokalizasyonu amaçlanmıştır.

Bu yöntemler ile pelemir genomunda bulunan tekrarlanan DNA elementlerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. DNA kütüphanesi temelli klonlama yöntemi ile restriksiyon kesim enzimlerinden yararlanılmıştır. Ligasyon ve transformasyon sonucunda oluşan rekombinant DNA klonları dot blot tekniği ile görüntülenerek klon seçimi yapılmıştır. Dizi analizi yapıldıktan sonra biyoinformatik yöntemler ile pelemir genomunda bulunan tekrar elementleri tanımlanmıştır.

Ayrıca pelemir genom yapısının tanımlanmasında daha kapsayıcı bir yöntem olarak tekrar dizilerinin karakterize edilmesinde kullanılan yeni nesil dizileme tekniklerinden faydalanılmıştır. Bu yöntem ile pelemir genomunda bulunan tekrar dizileri RepeatExplorer ve TAREAN programı aracılığıyla tespit edilebilmiştir. Elde edilen tekrar elementlerinin, ribozomal genlerin ve telomerik tekrarların kromozomlar üzerindeki yerleri FISH tekniği kullanılarak tanımlanıp karyotip haritası oluşturulabilmiştir.

Bu tanımlamalar, *Cephalaria* genomik yapısını oluşturan DNA elementlerinin içeriğine ve dinamiklerine ışık tutacaktır. Böylece *Cephalaria syriaca* (pelemir) genomuna özgü veya diğer bitki genomlarına benzer DNA dizileriyle genomların yapısal karşılaştırılması yapılabilecektir.

BÖLÜM III

MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Bitki materyali

Çalışmada bitki materyali olarak ülkemizde *Cephalaria syriaca* (pelemir) türüne ait ilk tescilli çeşit olan Karahan ($2n=10$) çeşidi genomik DNA izolasyonu, yeni nesil dizileme, floresan *in situ* hibridizasyon ve sitolojik araştırmalar için kullanılmıştır. Bu çeşit Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, Yağlı Tohumlu Bitkiler birimi tarafından tescil edilmiştir.

Araştırmada kullanılan pelemir bitkileri; hem iklim odasında ve hem de tarla koşullarında yetiştirilmiştir. İklim odasında yetiştirilecek bitkileri oluşturacak tohumlar petri kutusunda nemli filtre kağıdı üzerinde 23°C'lik sıcaklıkta %60 rutubet ortamında çimlendirilmiştir. Çimlenme süresi yaklaşık olarak 4 gün sürmüştür. Çimlenen tohumlardan elde edilen fideler saksılara aktarılarak iklim odasında 23°C'lik sıcaklıkta %60 nem koşullarında yetiştirilmiştir.

3.1.2 Kimyasal malzemeler

Araştırmada kullanılan kimyasal malzemeler Ek A'da verilmiştir.

3.2 Metod

3.2.1 Genom büyüklüğünün ölçülmesi

Pelemir genom büyüklüğünün ölçümünde arpa bitkisi (*Hordeum vulgare*) genomu (10.36 pg/2C) referans olarak kullanılmıştır. Ölçümler Sysmex/Partec CyFlow Space flow cytometer aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Bunun için, pelemir bitkisinin ve arpanın taze genç yaprakları petri kutusunda keskin uçlu jilet kullanılarak içerisinde

propidium iodide (PI; 50µg/ml) ve RNase (50µg/ml) olan 1000 µl izolasyon tampon solüsyonu (45 mM MgCl₂, 20 mM MOPS, 30 mM sodium citrate, %0.1 (vol/vol) Triton X-100, 1 M NaOH. pH 7.0) içerisinde parçalanmıştır (Galbraith vd., 1983). Hazırlanan örnek 30 µm delik çaplı filtreden süzülerek tüpe aktarılmıştır ve buz üzerinde 5 dk bekletilmiştir. Ölçümler iki farklı günde toplamda altı tekrar olarak aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir. Çekirdek DNA içeriği örnek ile standardın G1 piklerinden elde edilen değerlere göre aşağıdaki formül ile Excel dosyası üzerinde pg ve Mbp değerleri hazırlanmıştır. Öncelikle pikogram cinsinden belirlenen bu değerler daha sonra 1C değeri olan Mbp değerine dönüştürülmüştür.

$$\begin{aligned} \text{Çekirdek DNA içeriği (pg): } & \frac{\text{Örneğin florasan yoğunluğu (G1 pikinin değeri)}}{\text{Standardın florasan yoğunluğu (G1 pikinin değeri)}} \times \text{standardın pikogram olarak bilinen DNA içeriği} \\ \text{Çekirdek DNA içeriği (Mbp): } & \frac{\text{Elde edilen pg değeri} \times 978}{2} \end{aligned}$$

3.2.2 Genomik DNA izolasyonu

Toplam genomik DNA, bitkinin hızlı gelişen genç yapraklarından standart CTAB metodu kullanılarak aşağıda anlatılan protokole göre izole edilmiştir (Xin ve Chen, 2006).

İzole edilen genomik DNA'ların spektrofotometre ve standart agaroz jel elektroforez testleriyle saflık ve miktar tayini yapılmış ve genomik DNA konsantrasyonu µg/µl olarak tespit edilmiştir.

Genomik DNA izolasyonu için dondurulmuş 1 gr'lık yaprak dokusu sıvı azot kullanılarak parçalandıktan sonra elde edilen yaprak örnekleri CTAB ayrıştırma tampon solüsyonunda (%2 CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, % 2 β-merkaptolanol) 60°C'de 30 dk 165 rpm'de su banyosunda bekletilmiştir. 30 dakikanın sonunda tüp içerisine Kloroform-izoamilalkol (24:1) eklenmiş ve solüsyon 10 dk

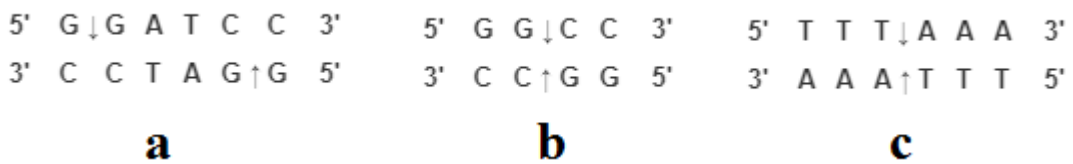
boyunca iyice karıştırılmıştır. 5 dk santrifüje tabii tutulmuştur ve sıvı faz yeni bir tüpe transfer edilmiştir.

Sıvı faz üzerine CTAB çöktürme tampon solüsyonu (%1 CTAB, 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA) eklendikten sonra tekrar 5 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra, tüpün üst kısmında kalan supernatant uzaklaştırılmıştır. Pelet %70 etanol ile yıkanmıştır. Pelet yüksek tuz oranına sahip TE içerisinde (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1M NaCl) çözülmüştür. 10 µl RNase A (10 mg/ml) 37°C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Oda sıcaklığında 5 dk etanol (2.5 Vol) eklenerek inkübasyon sağlanmıştır. Santrifüj kullanılarak çöktürülen DNA 2 defa %70 etanol ile yıkanmıştır. Alkolü uzaklaştırılan kuruyan pellet 500 µl destile su ile çözülmüştür.

3.2.3 Restriksiyon enzimleriyle kesme

Yüksek moleküler ağırlıktaki genomik DNA solüsyonu 4-6 bazlık sık kesen *Bam*HI, *Bsu*RI (*Hae*III) ve *Dra*I restriksiyon kesim enzimleri kullanılarak parçalara ayrılıp test edilmiştir (Şekil 3.1). *Bam*HI yapışkan uçlu altı bazlık bir enzim iken, *Bsu*RI (*Hae*III) ve *Dra*I ise sırasıyla 4 ve 6 bazlık sık kesen kör uçlu restriksiyon enzimleridirler. 17 µl (20 µg) genomik DNA, 5 µl restriksiyon enzimine özgü tampon solüsyonu, 4 µl (6u) *Bam*HI restriksiyon enzimi, ve 24 µl destile su kullanılarak toplamda 50 µl restriksiyon enzim reaksiyon çözeltisi oluşturulmuştur. Bu reaksiyon çözeltisi su banyosunda 37°C'de bir gece bekletilmiştir.

Restriksiyon enzimleri ile kesilen genomik DNA %0.8'lik agaroz jel üzerinde 40 dk 120 V'da yürütülerek görüntülenmiştir. Daha sonra 0.3 M sodyum asetat pH= 6 ve saf etanol ile çöktürüldükten sonra 10 dk yüksek hızda santrifüj yapılmıştır. Pelet %70'lik etanol ile yıkanıp kurutulup destile su kullanarak çözülmüştür.



Şekil 3.1. *Bam*HI, *Bsu*RI, *Dra*I restriksiyon enziminin kesim dizisi (a) *Bam*HI, (b) *Bsu*RI, (c) *Dra*I

3.2.4 DNA parçalarının agaroz jel elektroforezinde ayrıştırılması ve saflaştırılması

Restriksiyon enzimleriyle kesilen DNA parçaları 1x TAE tampon solusyonunda (40 mM Tris base, 20 mM glasiyel asetik asit, 1 mM EDTA) %0.8'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuşlardır. Böylece klonlanabilir büyüklükteki DNA parçaları standart 1 kb'lik markör DNA ile birlikte ayrıştırılabilmişlerdir.

Uygun büyüklükteki DNA, agaroz jel'den kesilmiş ve Li vd. (2010), tarafından açıklanan slika matriks protokolüne göre 100 mg jel parçası için 300 µl sodyum iyodür (6M NaI) kullanılmış ve jel 70°C'de 3 dk içerisinde eritilmiştir. Eriyen jelin içerisine 10 µl slika matriks eklenerek iyice karıştırılmış ve 5 dk oda sıcaklığında bırakılmıştır. Bu şekilde DNA'nın matrikse bağlanması sağlanmıştır. 16 saniye 12000 rpm'de santrifüj yapıldıktan sonra tüpün üst kısmında bulunan supernatant peletten uzaklaştırılmıştır.

Pelet üzerine 500 µl yıkama solüsyonu eklenmiştir (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA ve %50 ETOH). Böylece pelet agaroz parçalarından temizlenmiştir. Tekrar 16 saniyede hızlı bir santrifüj yapılarak peletten supernatantın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkama solüsyonu kullanılarak yapılan bu işlem iki defa gerçekleştirilmiştir. Daha sonra tüp içerisine 20 µl distile su eklenmiş ve 70°C'de 2 dk boyunca bekletilmiştir. Böylece matriks ve DNA kompleksinin ayrıştırılması sağlanmıştır. 2 dk boyunca santrifüj yapıldıktan sonra tüpten sıvı kısım içerisinde bulunan DNA alınarak yeni tüpe aktarılmıştır.

3.2.5 PCR

PCR kullanılarak agaroz jel'den elde edilen saflaştırılmış DNA'nın 3' ucuna restriksiyon enzimleriyle kesilen genomik DNA parçaları ile vektörün ligasyon sonucunda rekombinant DNA oluşturabilmesi amacıyla dATP (deoksi adenin trifosfat) eklenmiştir. Bunun için hazırlanan PCR reaksiyonunda 5 µl (50 ng/µl) DNA, 0.5 µl (2u/µl) Taq DNA polimeraz, 2 µl (5x) PCR buffer, 1 µl (50x) dNTP kullanılmıştır. Reaksiyonun toplam miktarı 10 µl olacak şekilde 2.5 µl ddH₂O (çift destile su) eklenmiştir. Reaksiyon 68°C'de 10 dkda 1 döngü olacak şekilde dATP uçlarının eklenmesi amacıyla PCR'a tabi tutulmuştur.

PCR ürünleri yukarıda anlatılan slika matriks protokolü kullanılarak saflaştırılmıştır (Li, vd., 2010). Ancak bu metod uygulanırken jel purifikasyonundan farklı olarak 50 µl PCR örneğine 150 µl 6M NaI eklenerek gerçekleştirilmiştir. Bunun dışında jel pürifikasyonu için kullanılan prosedür izlenmiştir.

3.2.6 Ligasyon ve bakteriyel transformasyon

Ligasyon için pGEM-T Easy vektörü (Promega) kullanılmıştır ve ligasyon reaksiyonu toplamda 2.5 µl olacak şekilde 1.25 µl (2x) rapid ligation buffer, 0.25 µl (50 ng/µl) pGEMT easy vektör, 0.75 µl (4 ng/µl) PCR ürünü restriksiyon enzimi ile kesilmiş DNA parçası, 0.25 µl T4 ligaz enzimi kullanılarak hazırlanmıştır. Reaksiyon çözeltisi oda sıcaklığında 4 saat boyunca bırakılmıştır.

Transformasyon elektroporasyon yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Daha yüksek transformasyon oranlarına ulaşmayı sağlayan XLN blue bakteri ırkları ile hazırlanmış elektrokompotent hücreler elektroporasyon yöntemi için kullanılmıştır. Tryptone, Yeast extract, NaCl ve agardan hazırlanan ampisilinli (1000 µg/ml) LB (1 litre için 10 g Tryptone, 5 g Yeast ekstrakt, 10 g NaCl, 15 g Agar) tabaklarına rekombinant plazmidler aktarılmıştır alkolle steril yapılmış plastik bir dağıtıcı yardımıyla LB tabağına dağıtılmıştır.

3.2.7 Klon seçimi ve dot blot

LB tabağında bir gece 37°C bekletildikten sonra rekombinant DNA elde edilmediğinin tespit edilmesi amacıyla agaroz jel elektroforezinde test etmek üzere steril kürdan yardımıyla büyüyen koloniler seçilmiştir ve standart plazmid izolasyonu protokolü kullanılarak izolasyon yapılmıştır. İzolasyondan sonra elde edilen DNA %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve inset DNA'lar seçilmiştir. Plazmid izolasyonu için bakteri 37°C'de 2 ml'lik LB ortamı içerisinde antibiyotik (ampisilin) ile birlikte bir gece boyunca büyütülmüştür. Büyüyen hücrelerin çöktürülmesi 2 dk boyunca santrifüj kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pelet 200 µl resuspension solüsyonu (1 M Tris-HCl, pH 8, 0.5 M Na₂EDTA, %20 glikoz, 10mg/µl RNase A, ddH₂O) içerisinde askıya alınmıştır ve oda sıcaklığında 5 dk boyunca bekletilmiştir. Daha sonra aynı tüpün içerisine 400 µl SDS/NaOH eklenmiş ve birkaç defa nazikçe

karıştırılmıştır. Solüsyon buzda 5 dk bekletilmiş ve 300 µl 7.5 M amonyum asetat eklenmiştir. Solüsyon birkaç saniye nazıkçe karıştırılıp 10 dk buzda bekletilmiştir. 3 dk boyunca 10.000 rpm'de yapılan santrifüjde solüsyon çöktürülmüştür. Pelet atılmış ve süpernatant kısmı yeni tüpe aktarılmıştır. Süpernatantın üzerine 0.6 vol hacminde izopropanol eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dk boyunca bekletilmişve DNA'nın çöktürülmesi sağlanmıştır. 10 dk boyunca yüksek hızda santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve pelet %70 etanol ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından etanol uzaklaştırılmış ve pelet kurumaya bırakılmıştır. Son olarak 50 µl dH₂O içerisinde pelet çözülmüştür (Maloy, 1990). Plazmid izolasyonundan sonra klonlar jel elektroforezinde yürütülmüşlerdir. İnsört DNA'lar jel elektroforezi sayesinde tespit edildikten sonra bunların yüksek kopya tekrar dizisi taşıyıp taşımadıklarını tespit etmek amacıyla dizi analizine gönderilmeden önce dot blot uygulamasına tabii tutulmuşlardır. İnsört DNA'lar agaroz jel elektroforezinde kullanılan 1 kb'lik markör aracılığıyla saptanmıştır. Elde edilen pozitif klonlar %20'lik gliserol içeren saklama tüplerine aktarılıp, stok hücreler -80°C'de depolanmıştır.

Dot blot yöntemi için pelemir genomik DNA'sı Biotin DecaLabel DNA labeling kiti kullanılarak Biotin-11-dUTP ile prob olarak hazırlanmıştır (Thermo Scientific). Kitin sağladığı prosedüre göre Biotin-11-dUTP ile prob DNA'nın hazırlanması için 10 µl (25 ng/1µg) DNA, 10 µl (5x) reaksiyon buffer içinde decanucleotide, 24 µl distile su kullanılarak toplamda 44 µl olacak şekilde reaksiyon oluşturulmuştur. Tüp hızlı bir şekilde santrifüj yapılmıştır. 5-10 dk 100 °C suyun içerisinde tüp inkübe edilmiştir ve buz üzerinde soğutulmuştur. Tekrar hızlı bir şekilde santrifüj yapılmıştır. Daha sonra 5 µl Biotin Labeling mix, 1 µl (5u) Klenow fragment, exo eklenmiştir. Tüp karıştırıldıktan sonra hızlıca santrifüj edilmiştir. En az 1 saat olacak şekilde 37°C'de reaksiyonun inkübasyonu sağlanmıştır. Reaksiyonun durdurulması için 1 µl (0.5 M) EDTA, pH 8.0 eklenmiştir. Hazırlanan etiketli DNA -20°C'de kullanılana kadar saklanmıştır.

Dot blot uygulamasına başlamadan önce membran hazırlanmıştır. İlk olarak membran üzerine saçılan klonlar damlatılmıştır. Hazırlanan membrane trans uv'de 5 dk tutulmuştur böylece klonlar denatüre edilerek sabitlenmiştir. Denatüre olan membran önce 2x SSC ile 5 dk boyunca yıkanmıştır. Daha sonra da hibridizasyon solüsyonu (5x SSC, %0.02 SDS, %1 Blocking reagent, %0.1 N-Lauroylsarcosine) ile 1 saat boyunca

65°C’de inkübe edilmiştir. Pelemer genomik DNA’sından hazırlanan prob 100°C’de denatüre edilmiştir. Hibridizasyon solüsyonu döküldükten sonra tekrar yeni hibridizasyon solüsyonu eklenmiştir.

Denatüre edilmiş 35 µl prob DNA eklenmiştir. Bu şekilde gece boyu 65°C’de hibridizasyon gerçekleşmiştir 1 gece sonrasında membran önce 2x SSC ve %0.1 SDS ile birlikte oda sıcaklığında her biri 10 dk iki defa yıkanmıştır. Daha sonra 0.1x SSC ve %0.1 SDS ile birlikte 15 dk boyunca oda sıcaklığında çalkalanarak yıkanmıştır. Yıkama işlemlerinden sonra 5 dk boyunca membran 30 ml blocking/washing solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında çalkalayıcıda bırakılmıştır. 30 ml blocking solüsyonunda 30 dk boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda bırakılmıştır. Membran 20 ml Streptavidin-AP içerisinde 30 dk oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.

Çalkalayıcı üzerinde membran oda sıcaklığında 60 ml blocking/washing solüsyonunda 15 dk iki defa yıkanmıştır ve 20 ml detection solüsyonu içerisinde 10 dk inkübe edilmiştir. 10 ml substrate solüsyonunda oda sıcaklığında karanlık alanda inkübe edilmiş olan membran üzerinde mavi-mor renkler görüldükten sonra substrat solüsyonu dökülmüş ve membran distile su ile durulanmıştır.

3.2.8 Dizi sonuçlarının biyoinformatik analizi

Bu aşama da, dot blot sonucu yüksek kopya tekrar dizisinin olduğu düşünülen koyu renkli 11 klonun nükleotit dizisinin tespit edilmesi için DNA dizi analizi yapılmıştır. Bu işlem, Türkiye’de dizi analizi yapan Sentegen, Ankara, isimli firmaya örneklerimizi ve standart M13 ileri (forward) primerlerimizi göndererek sağlanmıştır. Ayrıca aynı klonların dizilemesinin yapılması amacıyla M13 geri (reverse) primerleri kullanılarak IPK (Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research)’de (Gatersleben, Almanya) dizileme yapılmıştır.

Dizileme sonuçları elimize ulaştıktan sonra klonlara ait DNA dizileri biyoinformatik analizlere tabi tutulmuştur. Bu amaçla ileri (forward) ve geri (reverse) yönünde elde edilen dizilerin contig oluşturulması ve pGEM-T easy vektör dizisinin uzaklaştırılması için GeneStudio programı kullanılmıştır. Vektör dizisi uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen diziler BLAST programı aracılığıyla NCBI gen bankasında taranmıştır.

3.2.9 Yeni nesil dizileme ve biyoinformatik analizi

Pelemir genom dizisi yeni nesil dizileme teknikleri kullanılarak (YND) analiz edilmiştir. Illumina PE150 sistemi Novogene (Hong Kong, China) şirketinde dizileme için kullanılmıştır. Illumina dizilemesinde her bir okuma 150 bp olacak şekilde toplamda yaklaşık 1GB dizi bilgisi elde edilmiştir.

Pelemir genomunda bulunan tekrarlayan DNA elementlerinin oranı RepeatExplorer programı kullanılarak ve pelemir genomundaki *in silico* analizi, yüksek kopya tekrarların belirlenmesi amacıyla RepeatExplorer programının TAREAN aracı kullanılmıştır (Novak vd., 2017). TAREAN programında elde edilen satelit tekrarların birbirlerine benzer olup olmadıkları GeneWarrior ve EMBOSS explorer programları kullanılarak karşılaştırılmıştır.

3.2.10 TAREAN programı sonuçlarına göre primer tasarımı ve PCR

Primerler TAREAN programından elde edilen satelit tekrar elementlerinin dizi bilgisine göre dizayn edilmiştir. Çalışmada kullanılan primerlerin listesi Çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Satelit tekrarların amplifikasyonu için kullanılan primerlerin listesi

Primer Adı	Primer Dizisi
Cl34 İleri	5' TTTGAACCCAAAACCTAAAACA3' (22 bp)
Cl34 Geri	5' ACGTCCAATTTGGGTGACT 3' (19 bp)
Cl36 İleri	5' ATCCTAACAAATGTTCGCT 3' (19 bp)
Cl36 Geri	5' GCACAATCTCGTAATATTGA 3' (20 bp)
Cl42 İleri	5' GCACGAATTCAAAAAAGTCAC 3' (21 bp)
Cl42 Geri	5' CATGTGTTGGAGACGAC 3' (17 bp)
Cl45 İleri	5' GACACATAAAAATGGGGTCT 3' (20 bp)
Cl42 Geri	5' AGACTTAGCCGTTCCATGTC3' (20 bp)

Primerler için gerçekleştirilen PCR programı reaksiyon içeriğinde 2 µl (25 ng/µl) DNA, 5 µl (5x) PCR Buffer, 1 µl (2.5 mM) dNTP, 1'er µl ileri ve geri primerleri, 0.5 µl Taq DNA polimeraz enzimi (Qiagen) ve 14.5 µl ddH₂O eklenerek toplamda 25 µl olacak şekilde bir reaksiyon hazırlanmıştır. Bu reaksiyon için 6 basamaklı bir PCR programı hazırlanmıştır. İlk denatürasyon basamağı 95 °C'de 5 dk boyunca gerçekleştirilmiştir. Denatürasyon basamağı 95°C'de 30 saniye, bağlanma basamağında her bir primer için 55°C'de 1 dk olacak şekilde düzenlenmiştir. Uzama basamağı 72°C'de 1 dk olarak ayarlanmıştır toplam döngü sayısını 35 olarak programlanmıştır. Daha sonra 70°C'de 5 dklık bir süre içerisinde son uzama gerçekleştirilmiştir ve PCR programı 4°C'de tamamlanmıştır.

3.2.11 Kromozomların hazırlanması

Pelemir tohumları, nemli filtre kağıt üzerinde petri kutusunda oda sıcaklığında çimlendirilmiştir. Çimlenen tohumlardan kromozom hazırlanması için kök uçları toplanmıştır. Kök uçları toplandıktan sonra 2 mM 8-hydroxyguanine kullanılarak 4 saatliğine oda sıcaklığı koşullarında ön muameleye tabi tutulmuştur. 4 saat sonrasında yıkanan kök uçları etanol: glacial asetik asit (3:1) solüsyonunda gece boyunca 4°C'de fikse edilmiştir. Daha sonra -20°C'de muhafaza edilmiştir. Kromozomlar için slaytlar hazırlanırken aşağıda belirtilen damlatma metodu kullanılmıştır.

Kromozomlarının hazırlanmasında fikse edilen kökler buz üzerinde önce iki defa destile su ile daha sonra bir defa 1x CB (0,01 M citrate buffer) ile 3'er dk boyunca yıkanmıştır. Yıkanan kök uçları köklerden kesilip eppendorf tüpüne aktarılmıştır. Kök uçları enzim karışımı (0.01 M citrate buffer (CB) içinde 0.7% cellulase R10, %0.7 cellulase, %1.0 pectolyase, %1.0 cytohellicase) içinde 37°C'de 1,5 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kök uçları önce iki defa 500 µl destile su içerisinde daha sonra 500 µl 1X CB içerisinde 2 dk boyunca 7000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Böylece enzimin kök uçlarından uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, tüp içerisinde kök uçları etanol: glacial asetik asit solüsyonu (3:1) içerisinde parçalanmıştır. Tüpe 500 µl etanol: glacial asetik asit solüsyonu (3:1) eklenerek 3 dk boyunca 7000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Bu işlem üç defa tekrar edilmiştir.

Bir kök ucu için 30 µl olacak şekilde tüpe etanol: glacial asetik asit (3:1) solüsyonu eklenmiştir. 8 µl hücre süspansiyonundan alınarak ıslak slaytların üzerine damlatılmıştır. Bu işlem 50°C'ye ayarlanmış hot plate üzerinde gerçekleştirilmiştir. FISH yapılmadan önce ışık mikroskobu ile üzerinde kromozom tespit edilen slaytlar etanol: glacial asetik asit solüsyonu (3:1) içerisinde ve %96 etanol içerisinde 3'er dk bırakılmıştır. Kurutulan slaytlar 4°C'de kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

3.2.12 Floresan *in situ* hibridizasyon

Bu çalışmada ribozomal DNA, satelit tekrarlar ve telomerik tekrarlar pelemir (*C. syriaca*) genomunun haritalanması için kullanılmışlardır. Satelit tekrar dizileri TAREAN programı sonucunda elde edilmiştir. Buğdaydan (*Triticum aestivum*) elde edilen pTa71 plazmidi (Gerlach ve Bedbrook, 1979) 45S rDNA spesifik probu olarak kullanılmıştır. Bunun dışında, 5S rDNA spesifik probu PCR kullanılarak elde edilmiştir. 5S rDNA elde etmek amacıyla yapılan PCR reaksiyon içeriğinin hazırlanmasında 2 µl 25 ng/µl DNA, 5 µl 10X PCR Buffer, 4 µl 0.5 mM dNTP mix (0.5 mM dATP, 0.5mM dCTP, 0.5 mM dGTP, 0.25 mM dTTP), 1 µl 1.0 mM dUTP (ATTO 488-dUTP), 1 µl Up46.1 primer (5' GTG CGA TCA TAC CAG CRK TAA TGC ACC GG 3'), 1 µl Up47.1 primer (5' GAG GTG CAA CAC GAG GAC TTC CCA GGA GG 3'), 0.5 µl Taq DNA polymerase ve 35.5 µl ddH₂O kullanılarak 50 µl olacak şekilde reaksiyon hazırlanmıştır. 5S rDNA'nın amplifikasyonu için kullanılan PCR programında ilk denatürasyon 95°C'de 5 dk boyunca gerçekleştirilmiştir. Denatürasyon basamağı 95°C'de 30 saniye boyunca gerçekleştirilirken bağlanma basamağı 55°C'de 30 saniye içerisinde gerçekleştirilmiştir. Uzama basamağı ise 72°C'de 1 dk sürmüştür. Denatürasyon, bağlanma ve uzama basamakları için 35 döngü programlanmıştır. 72°C'de 5 dk son uzama yapılmış ve PCR basamağı 4°C'de durdurulmuştur.

FISH problemleri, ATTO-488-dUTP ve ATTO-550-dUTP kullanılarak Nick Translation kiti (Jena Bioscience) kullanılarak etiketlenmiştir. Kromozomlar 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ile boyanmışlardır. Problemlerin hazırlanması kit içerisinde belirtilen protokole göre gerçekleştirilmiştir. Protokole göre toplamda 25 µl olacak şekilde hazırlanan reaksiyona 2 µl (10x) NT etiketleme tampon solüsyonu, 2 µl Atto-488 veya Atto-550 NT etiketleme karışımı, 1.5 µg olacak şekilde ayarlanmış DNA, 2 µl (10X) enzim karışımı ve toplamda 20 µl olacak şekilde kit tarafından sağlanan su eklenmiştir.

Hazırlanan tüp vorteks yapıldıktan sonra 15°C'de 90 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra reaksiyon 5 µl reaksiyonu durdurucu solüsyon eklenmiştir.

FISH tekniği için kromozom slaytlarının hazırlanmasında slaytlar 2x SSC içerisinde iki defa 5'er dk olmak üzere yıkanmıştır. Daha sonra, RNase (Her bir slayt için 95 2x SSC 5 µl RNase) ile 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edilmiş ve 3 defa 2x SSC içerisinde 5'er dk olmak üzere yıkanmışlardır. Yıkama işleminden sonra slaytlar %45 asetik asit içerisinde oda sıcaklığında 10 dk boyunca muamele edilmiş ve 2 defa 2x SSC içerisinde 5'er dk boyunca yıkanmışlardır. %4 formaldehide içerisinde oda sıcaklığında 10 dk boyunca inkübe edilmiş olan slaytlar 3 defa 2x SSC içerisinde 5'er dk boyunca yıkanmışlardır. Daha sonra bir etanol serisi içerisinde (%70, %90, %96) sırasıyla 3'er dk bekletilmiş olan slaytların 10 dk boyunca kurumaları beklenilmiştir.

Hibridizasyon karışımı ve proplar 95°C'de 10 dk boyunca denature edilmişlerdir. Denatüre olan proplar ve hibridizasyon karışımı kuruyan slaytların üzerine uygulanmıştır. Bu işlem hot plate üzerinde 80°C'de 2 dk boyunca gerçekleşmiştir. Slaytlar 37°C'de bir gece boyunca inkübe edilmişlerdir. Diğer gün slaytlar 2x SSC içerisinde 55-60°C'de 20 dk boyunca yıkanmıştır. Bir etanol serisi içerisinde (%70, %90, %96) sırasıyla 3'er dk bekletilen slaytların daha sonra kurumaları için beklenilmiştir. Kuruyan slaytlar üzerine DAPI uygulanmıştır.

Resimler Hamamatsu Orca-Er CCD kamera ve Olympus Bx61 flaresan mikroskopi kullanılarak slaytlar üzerinde tespit edilen kromozomların görüntüleri alınmıştır. Resimler Analyses ^ D Orca-ER programı aracılığıyla kaydedilmişlerdir. Elde edilen siyah beyaz resimler Adobe Photoshop programı ile (Adobe Systems) renklendirilerek birleştirilmişlerdir.

BÖLÜM IV

BULGULAR

Bu çalışmada pelemir (*C. syriaca*) türünün genomunu karakterize etmek için ilk olarak flow sitometri aracılığıyla genom büyüklüğü belirlenmiştir. Pelemir bitkisinin genomik yüksek kopya fraksiyonuna dayalı olarak yüksek kopya tekrar dizilerinden markörler oluşturulmuştur. Bu amaçla biyoinformatik yollarla elde edilen satelit tekrar dizileri için primerler tasarlanmıştır.

PCR aracılığıyla çoğaltılan dizilerin kromozomlar üzerindeki yerleri saptanmıştır. FISH aracılığıyla ideogramını belirlemek için yüksek kopya tekrarları olan satelit tekrarlar, 45S ve 5S rDNA ve telomerik tekrar kullanılmıştır.

4.1 Pelemir (*C. syriaca*)'nın Genom Büyüklüğünün Ölçülmesi

Pelemir bitkisinin genom büyüklüğü flow sitometrik analizler ile belirlenmiştir. Çizelge 4.1.'de pelemir bitkisinin genom büyüklüğünün ölçülmesi amacıyla pg değeri bilinen arpa (*Hordeum vulgare*) bitkisinin referans olarak kullanıldığı flow sitometrik analizde elde edilen ölçüm sonuçları gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçların histogramında da görüldüğü gibi pelemir ve arpa bitkisinin G1 tepe noktalarının yansıttığı floresan yoğunluğundan elde edilen değerler kullanılarak pelemir bitkisinin genom büyüklüğü hesaplanmıştır (Şekil 4.1.).

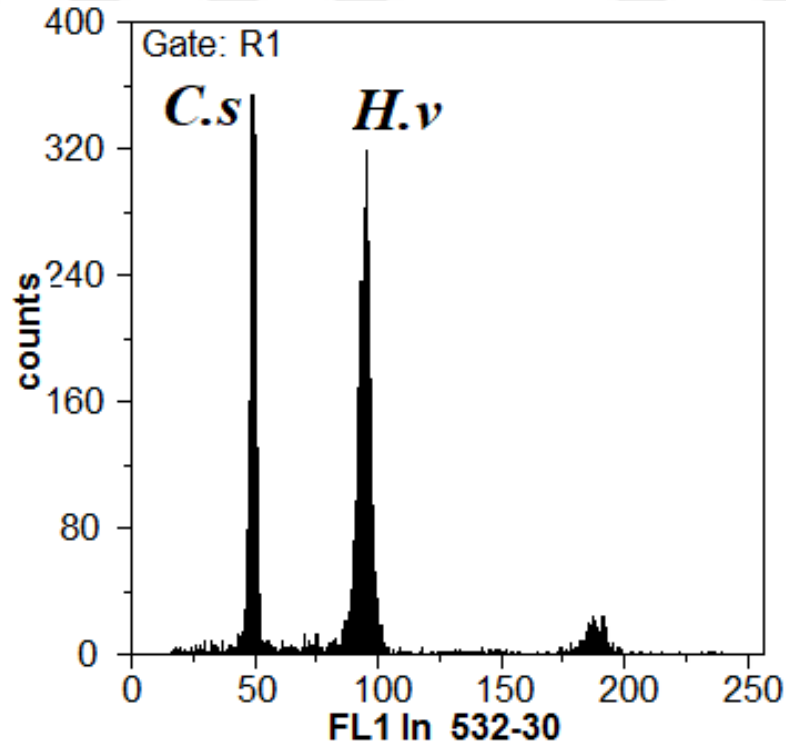
İlk gün 3 tekrar, ikinci gün 3 tekrar olmak üzere toplamda 6 tekrar yapılmıştır. Alınan tekrarların sonuçları daha önce materyal ve metod kısmında verilen formülde yerlerine konularak 2C ve 1C değerlerine göre genom büyüklüğü hesaplanmıştır.

Daha sonra 6 tekrarın 2C ve 1C değerlerinin ortalaması alınarak pelemir bitkisinin 2C değeri 5,46 pg ve 1C değeri ise 2668 Mbp olarak bulunmuştur.

Bulunan C değerlerine göre, bu türün daha önceki yıllarda genom büyüklüğü saptanan *Cephalaria* türlerinden daha küçük genom büyüklüğüne sahip olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. Pelemir bitkisinin flow sitometrik analizi sonucunda elde edilen 1C ve 2C değerleri

Analiz Tarihi	Tekrar	<i>Cephalaria syriaca</i> G1 değeri	<i>Hordeum vulgare</i> G1 değeri	pg/2C	Mbp/1C
26. 02. 2018	1	52.34	98.99	5.48	2679
	2	53.07	100.45	5.47	2677
	3	55.02	103.5	5.51	2693
02. 03. 2018	4	49.23	98.89	5.43	2656
	5	48.91	93.13	5.44	2661
	6	49.31	94.44	5.41	2645
Ortalama				5.46	2668



Şekil 4.1. *C. syriaca* (pelemir, *C. s*) türünün genç yapraklarında çekirdek DNA içeriğinin flow sitometrik analizi

4.2 Pelemir (*C. syriaca*) Kromozomlarında Ribozomal Genlerin (45S ve 5S) ve Telomerik DNA Dizilerinin FISH ile Haritalanması

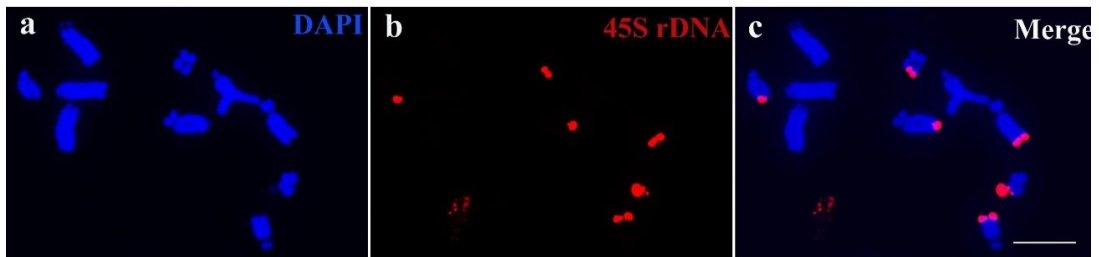
4.2.1 5S ve 45S ribozomal genlerin haritalanması

45S ve 5S rDNA elementlerinin ve *Arabidopsis* tipi telomer tekrarlarının lokalizasyonu FISH aracılığıyla belirlenmiştir. Bu amaçla, 45S rDNA spesifik probu olarak buğdaydan (*Triticum aestivum*) elde edilen plasmid pTa71 kullanılmıştır (Gerlach ve Bedbrook., 1979).

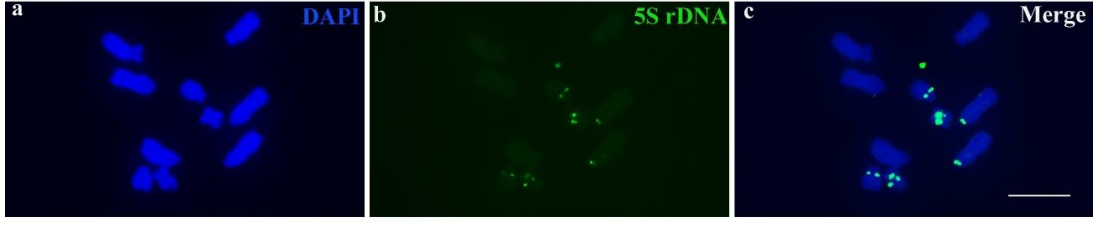
DAPI ile boyanan pelemir (*C. syriaca*) kromozomlarında bulunan 45S rDNA bölgeleri Şekil 4.2.'de gösterildiği gibi 3., 4. ve 5. kromozomların uzun kolunun sonunda tespit edilmiştir.

5S rDNA ise PCR kullanılarak genomik DNA'dan amplifiye edilmiş ve etiketlemeden sonra FISH probu olarak kullanılmıştır. DAPI ile boyanan pelemir (*C. syriaca*) kromozomları üzerinde 5S rDNA sinyalleri Şekil 4.3.'de gösterildiği gibi 1., 4. ve 5. kromozomların persentromerik bölgelerinde bulunmuştur.

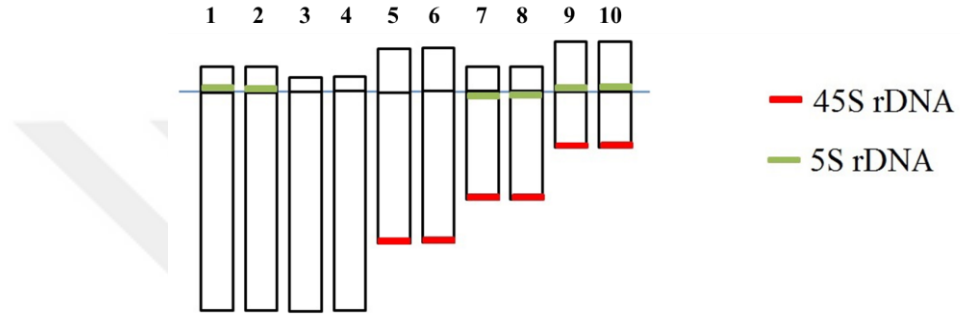
45S ve 5S rDNA sinyalleri FISH kullanılarak elde edildikten sonra kromozomlar üzerinde ideogramı oluşturulmuştur (Şekil 4.4.)



Şekil.4.2. 45S rDNA'nın *C.syriaca* kromozomları üzerinde lokalizasyonu (2n=10). DAPI ile boyanmış metafaz kromozomları (a), 45S rDNA sinyalleri kırmızı ile gösterilmektedir (b), kromozom üzerinde 45S rDNA sinyalleri birleştirilmiş (merge) resminde (c) gösterilmektedir. Bar=10µm



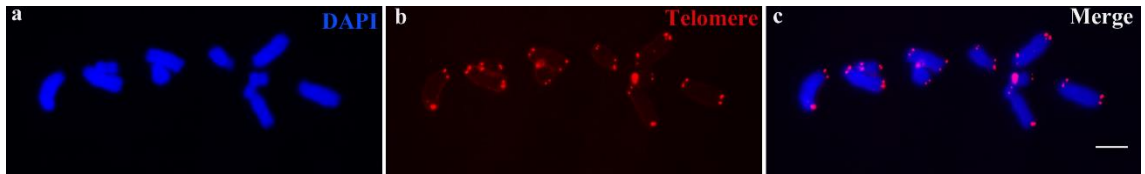
Şekil.4.3. 5S rDNA'nın *C.syriaca* kromozomları üzerinde lokalizasyonu ($2n=10$). DAPI ile boyanmış metafaz kromozomları (a) 5S rDNA sinyalleri yeşil ile gösterilmektedir (b), kromozom üzerinde 5S rDNA birleştirilmiş (merge) resminde (c) gösterilmektedir. Bar= $10\mu\text{m}$



Şekil 4.4. *C.syriaca* kromozomlarının 45S rDNA ve 5S rDNA sinyallerine göre ideogramı. 45S rDNA bölgesi kırmızı ile 5S rDNA bölgeleri yeşil ile gösterilmiştir

4.2.2 Telomerik DNA dizilerinin haritalanması

Arabidopsis tipi telomerik sinyaller kullanılarak pelemin kromozomlarının telomer bölgelerindeki satelit tekrarlar tespit edilmiştir. Telomerik satelit tekrar dizileri beklenildiği gibi tüm kromozomlarının uç bölgelerinde gözlemlenmiştir (Şekil 4.5.). Telomerik tekrar dizilerinin kromozomların sonlarında bulunarak onların zarar görmesini engellemektedir (Torres vd., 2011).

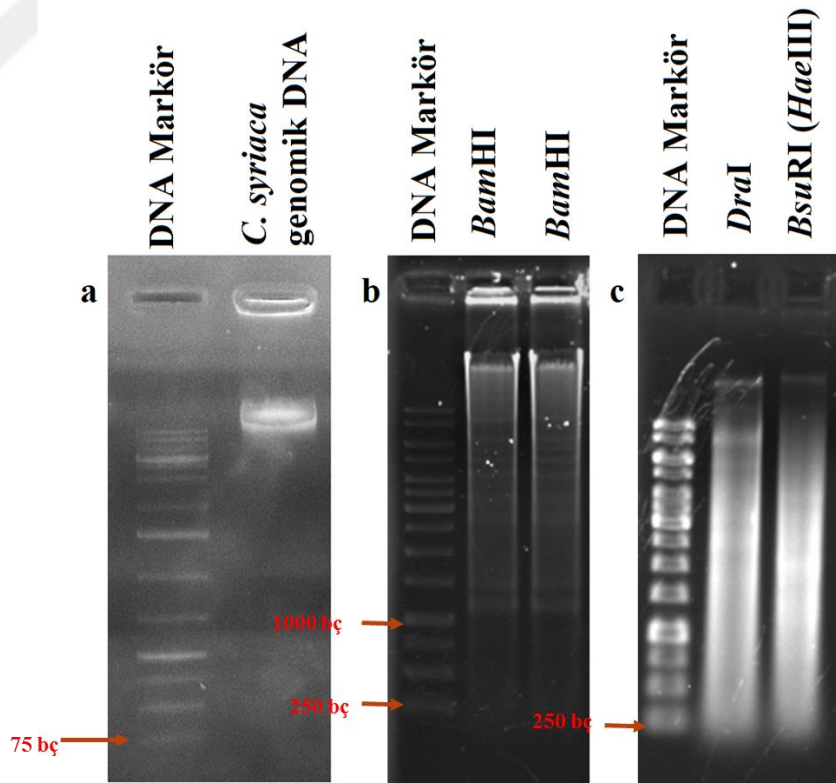


Şekil.4.5. Telomerik tekrarın *C.syriaca* kromozomları üzerinde lokalizasyonu ($2n=10$). DAPI ile boyanmış kromozomlar (a), telomer sinyalleri (b), kromozomlar ve telomer sinyallerinin birleştirilmiş (merge) görseli (c). Bar= $10\mu\text{m}$

4.3. Pelemir (*C. syriaca*)'in *Bam*HI Restriksiyon Enzimiyle Düşük Çözünürlüklü Genom DNA Kütüphanesinin Kurulması

4.3.1 *Bam*HI restriksiyon enzimiyle pelemir (*C. syriaca*) genomik DNA'sının kesilmesi

İzolasyon sonucu elde edilen genomik DNA *Bam*HI, *Bsu*RI ve *Dra*I restriksiyon enzimleriyle kesilmiştir. %0.8'lik agaroz jel üzerinde yürütülmüştür (Şekil 4.6.). Yürütme işlemi 40 dk boyunca 120 V'da gerçekleşmiştir. Jel görüntüsünde *Bam*HI ile kesilen genomik DNA'nın daha net fragmentler göstermesinden dolayı ve bu enzimin yapışkan uca sahip olmasından dolayı agaroz jelden *Bam*HI ile kesilen genomik DNA fragmentleri izole edilmiştir. İzole edilen DNA fragmentine saflaştırma işlemi yapıldıktan sonra pGEM-T easy vektörü kullanılmadan önce PCR aracılığıyla dATP ucu eklenmiştir.



Şekil 4.6. Pelemir (*C. syriaca*) genomik DNA (a), *Bam*HI restriksiyon enzimi kullanılarak genomik DNA'nın kesilmesi (b), *Dra*I ve *Bsu*RI restriksiyon enzimi kullanılarak genomik DNA'nın kesilmesi (c). Markör=1 kb

4.3.2 Restriksiyon fragmentlerinin klonlanması

*Bam*HI kullanılarak elde edilen genomik DNA parçasına PCR ile dATP ucu eklendikten sonra, pGEM-T easy vektörü kullanılarak oluşturulan rekombinant DNA moleküllerinin elektroporasyon yöntemi ile transformasyonu yapılmıştır. Transformasyondan sonra hücreler ampisilinli agar plağına yayılmıştır ve tek koloniler büyüdüktan sonra plazmit izolasyonu için seçilmiştir. Kolonilerin pozitif olup olmadığını anlamak için plazmid izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen izolasyon ürünlerine T adı verilmiştir. İzolasyon sonuçları agaroz jelde görüntülenmiştir. Şekil 4.7. ve Şekil 4.8. rekombinant DNA'ların analizi için yapılan jel elektroforezi sonuçlarını göstermektedir.

4.3.3 Klonlanan fragmentlerin dot blot yöntemiyle taranması

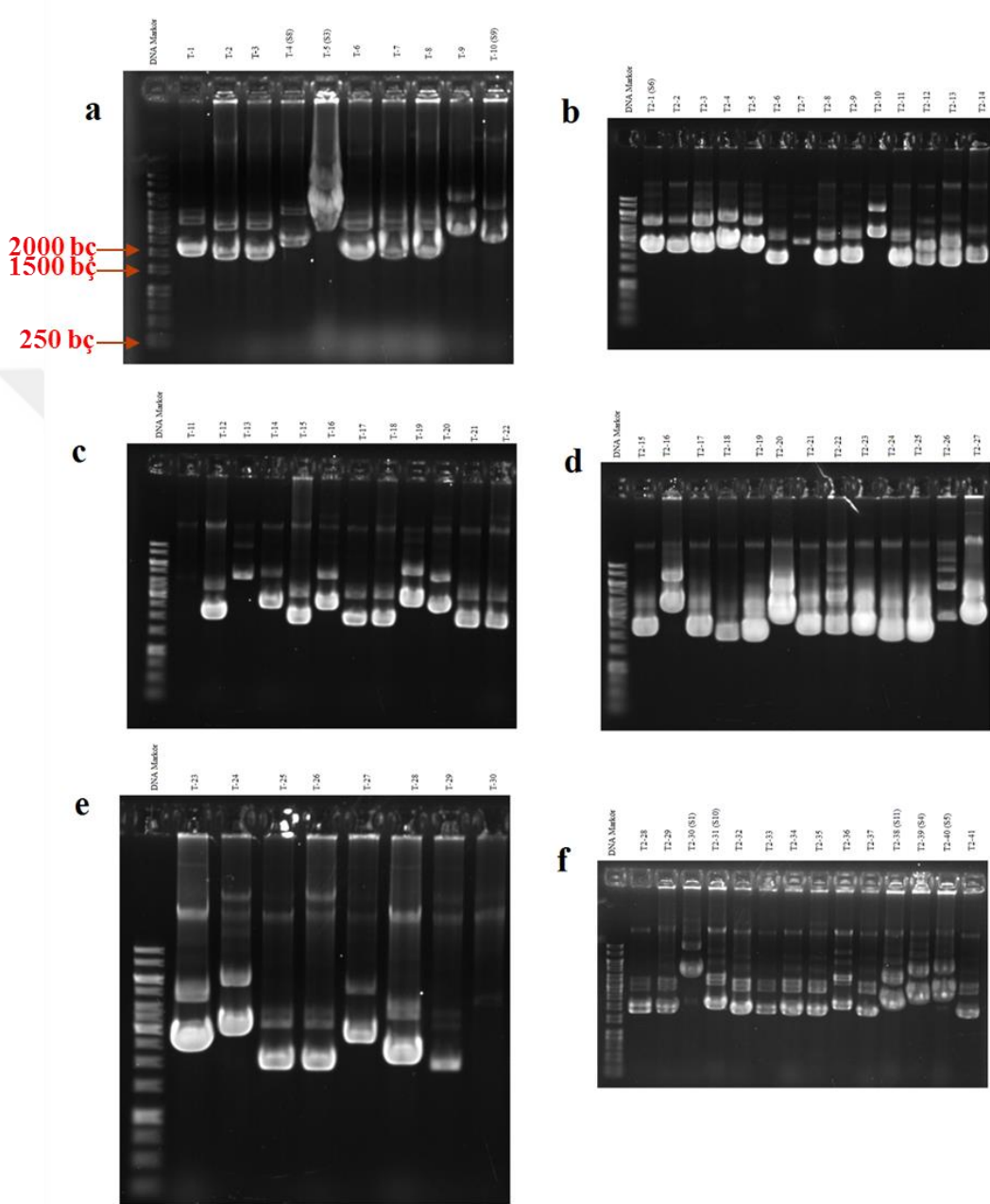
Plazmid DNA izolasyonu yapılan klonlar agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra jel üzerinde iki farklı fragment görülmüştür. Bunlardan bir tanesi ligasyon ürünü olan daha ağır yapıdaki insört DNA (süpersarmal), diğeri ise içerisinde pelemir genomik DNA'sının bulunmadığı vektörü (plazmid) gösteren fragmenttir.

Jel görüntüsünde markörden faydalanılarak rekombinant DNA'lar tespit edilmiştir. İnsört olmayan plazmid DNA'lar 1500 bp büyüklüğünde iken insört DNA'lar 1500 bp'nin üzerinde büyüklüğe sahiptirler. Dot blot yapmak amacıyla 90 adet süpersarmal yapıdaki insört DNA örnekleri seçilmiştir. Seçilen klonların tekrar elementi olup olmadığı taranmıştır. Tarama sonucunda 11 adet insert DNA'nın dizilenmesi yaptırılmıştır.

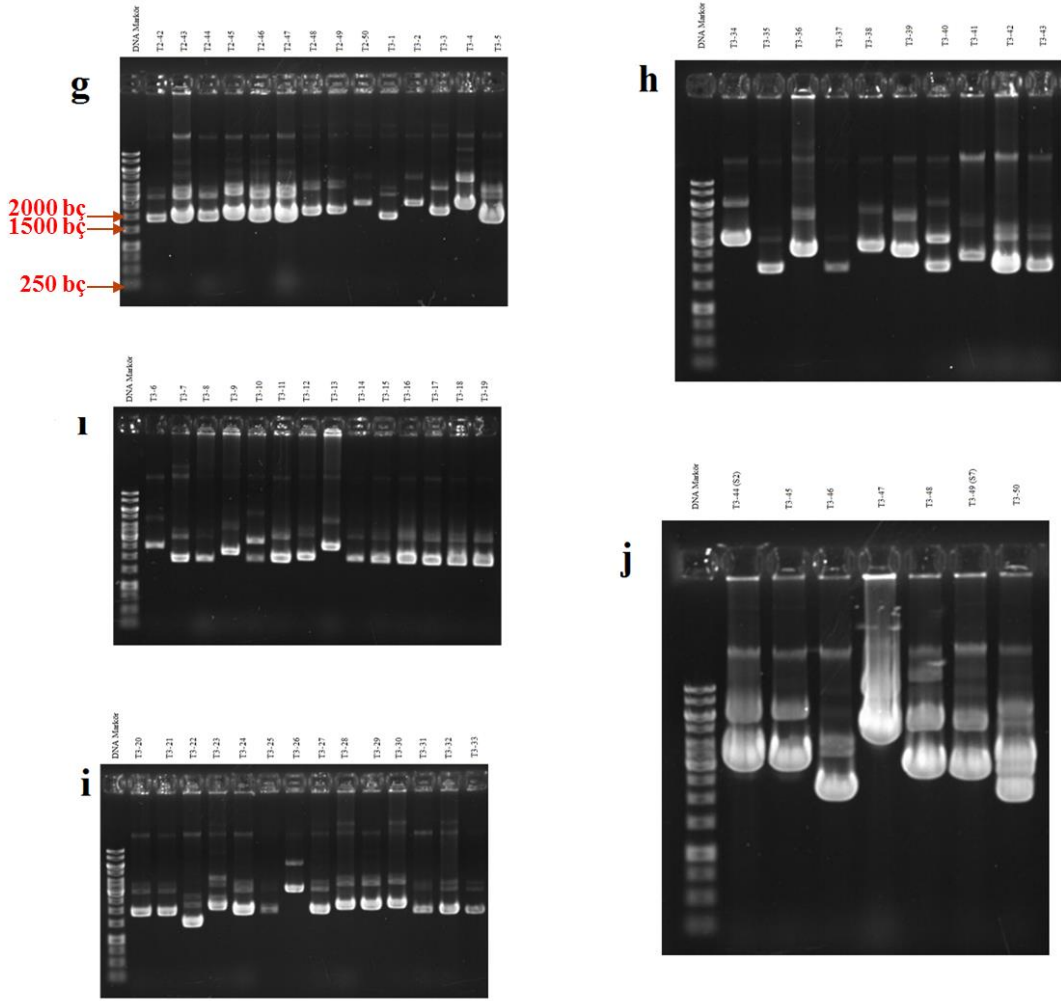
4.3.4 Yüksek kopya içerikli klonların seçimi

İnsert DNA'ların içerisinde yüksek kopya tekrarları taşıyıp taşımadıklarını belirlemek amacıyla yapılan dot blot taramasının sonuçları Şekil 4.9.'de gösterilmiştir. Genomun %70'inden fazlasını tekrarlanan DNA elementleri oluşturduğundan dolayı Dot blot membranı üzerinde pelemir (*C. syriaca*) genomik DNA'sının prob olarak kullanılmasıyla içerisinde tekrarlayan DNA dizilerini taşıyan insert DNA'lar daha koyu bir renk ile kendini göstermiştir. Boyama sonucunda görülen daha koyu renkli yapıların tekrar elementi olma ihtimalinin yüksek olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle Dot blot

sonucu dizilemeye göndermek amacıyla membrane üzerinde hibridizasyonun en yüksek olduğu 11 adet koyu renkte görülen klonlar (S1-S11) seçilmiştir. Seçilen klonların dizi analizi sırasında karışmasını önlemek amaçlı bu klonlara S adı verilmiştir.



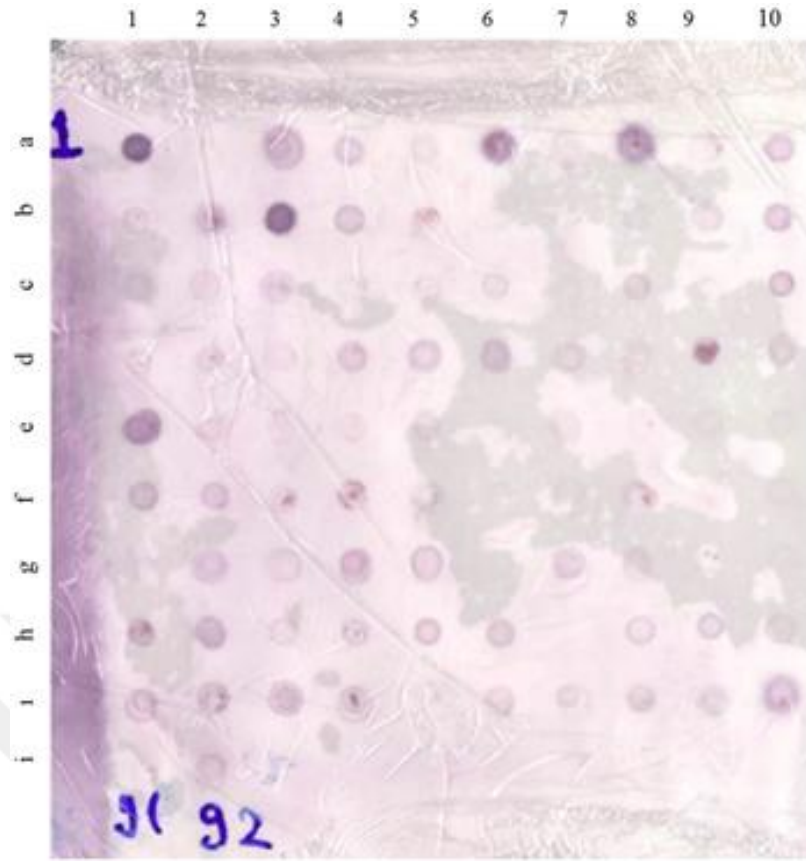
Şekil 4.7. Agaroz jel elektroforezi kullanılarak süpersarmal plazmitlerin analizi. T1-T10 (a), T2-1-T2-14 (b), T11-T22 (c), T2-15-T2-27 (d), T23- T30 (e), T2-28-T2-41 (f) arasını göstermektedir (T4, T5, T10, T2-1, T2-30, T2-31, T2-38, T2-39, T2-40 dizileme için gönderilmiştir). Markör= 1 kb



Şekil 4.8. Agaroz jel elektroforezi kullanılarak süpersarmal plazmitlerin analizi. T2-42-T3-5 (g), T3-34-T3-43 (h), T3-6-T3-19 (i), T3-20- T3-33 (i) T3-44-T3-50 (j) arasını göstermektedir (T3-44, T3-49 dizileme için gönderilmiştir). Markör= 1 kb

4.3.5 Aday klonların dizilenmesi ve dizi analizi

Dizi analizi sonucunda elde edilen diziler GeneStudio programı kullanılarak ileri ve geri uçları birleştirilmiş ve pGEM-T easy vektör dizileri uzaklaştırılmıştır. Contig oluşturulan diziler Blast programı kullanılarak analiz edilmiştir (Çizelge 4.2.). Yapılan biyoinformatik analiz sonucunda S1, S2, S5, S8, S9, S11 klonlarının NCBI gen bankasında benzer dizilerine rastlanmamıştır. S7 klonunun tanımlanamayan dizilere benzer oldukları varsayılmıştır. S3, S4, S6 ve S10 klonlarının NCBI gen bankasındaki pelemin bitkisinin de içinde bulunduğu Dipsacales takımındaki *Kolkwitzia amabilis* türü ile %85-%99 oranında benzer kloroplast dizilerine sahip olduğu tespit edilmiştir.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
a	T2-30 (S1)	T13	T3-47	T2-10	T2-16	T3-44 (S2)	T3-45	T5 (S3)	T9	T24
b	T2-20	T2-39 (S4)	T2-40 (S5)	T3-26	T3-34	T16	T19	T20	T23	T27
c	T2-1 (S6)	T2-2	T2-3	T2-5	T2-7	T2-50	T3-2	T3-4	T3-6	T3-36
d	T3-38	T3-39	T3-48	T3-49 (S7)	T4 (S8)	T10 (S9)	T28	T2-4	T2-31 (S10)	T2-36
e	T2-38 (S11)	T2-41	T1	T12	T15	T17	T18	T21	T22	T25
f	T26	T29	T2-6	T2-8	T2-11	T2-12	T2-13	T2-14	T2-15	T2-17
g	T2-21	T2-22	T2-23	T2-26	T2-27	T2-28	T2-29	T2-32	T2-33	T2-34
h	T2-35	T2-37	T2-41	T2-48	T2-49	T3-3	T3-5	T3-9	T3-13	T3-23
i	T3-28	T3-29	T3-30	T3-35	T3-37	T3-40	T3-42	T3-43	T3-46	T3-50
	5S2	puc18								

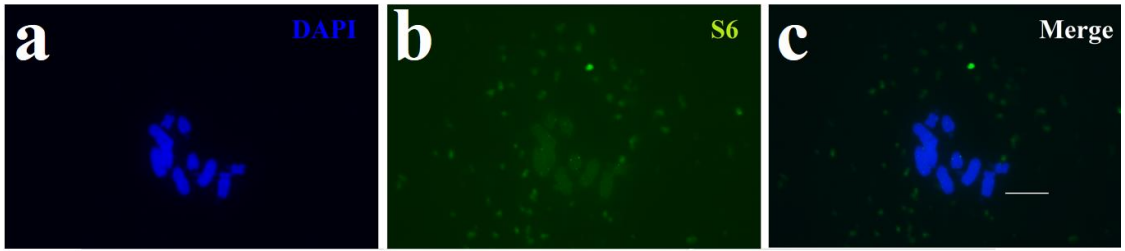
Şekil 4.9. Dot blot kullanılarak yüksek kopya içeriklerin belirlenmesi S1-S11 arası klonlar dizilemeye gönderilmiştir. 1a: S1, 6a: S2, 8a: S3, 2b: S4, 3b: S5, 1c: S6, 4d: S7, 5d: S8, 6d: S9, 9d: S10, 1e: S11

Çizelge 4.2. Aday klonların blast programı kullanılarak analizi

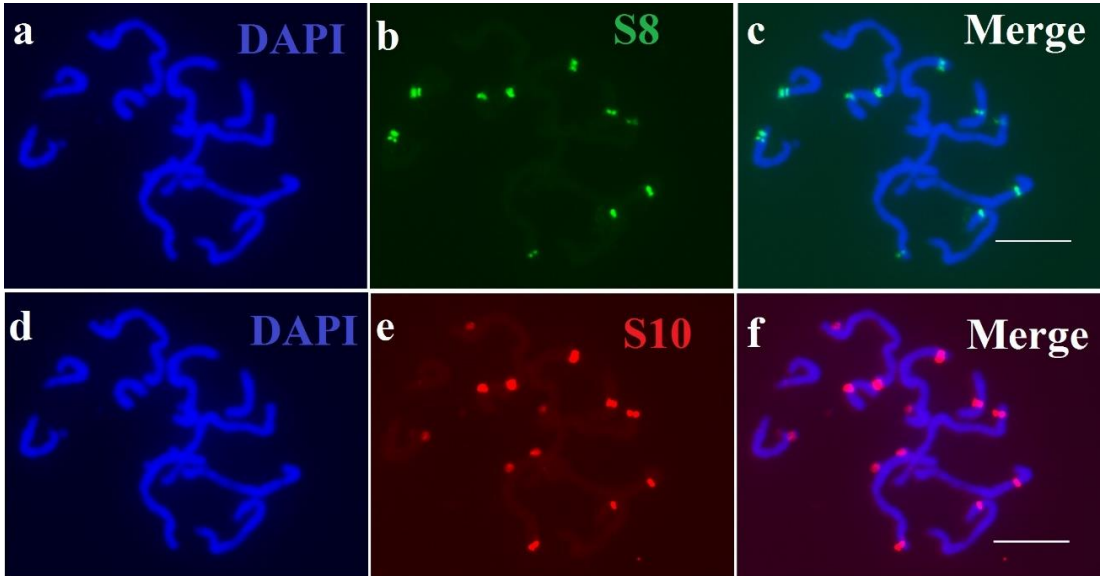
Klon ismi	Baz çifti	%AT	NCBI sonucu ve Açıklama	E Değeri	FISH
S1	630	~53	Benzerlik bulunamadı		
S2	888	~59	Benzerlik bulunamadı		
S3	870	~64	<i>Kolkwitzia amabilis</i> türünün kloroplast genomuna %87 benzerdir.	0.0	
S4	872	~61	<i>Kolkwitzia amabilis</i> türünün kloroplast genomuna %95 benzerdir	0.0	
S5	866	~58	Benzerlik bulunamadı		
S6	878	~68	<i>Kolkwitzia amabilis</i> türünün kloroplast genomuna %85 benzerdir.	4e-173	Spesifik sinyal tespit edilemedi
S7	914	~56	Tanımlanamayan başka dizilere benzer oldukları tahmini olarak belirtilmiştir	8e-62 1e-52	
S8	793	~67	Benzerlik bulunamadı		Sentromer
S9	949	~80	Benzerlik bulunamadı		
S10	380	~44	<i>Kolkwitzia amabilis</i> türünün kloroplast genomuna %99 benzerdir	0.0	Sentromer ve subtelomer
S11	837	~55	Benzerlik bulunamadı		Dağınık transpozon element

Dot blot sonucuna göre seçilen klonlardan S6, S8, S10 ve S11 olmak üzere 4 tanesi FISH kullanılarak kromozomlar üzerindeki lokalizasyonu analiz edilmiştir. S6 klonu kromozomlar üzerinde herhangi bir spesifik sinyal vermemiştir (Şekil 4.10.).

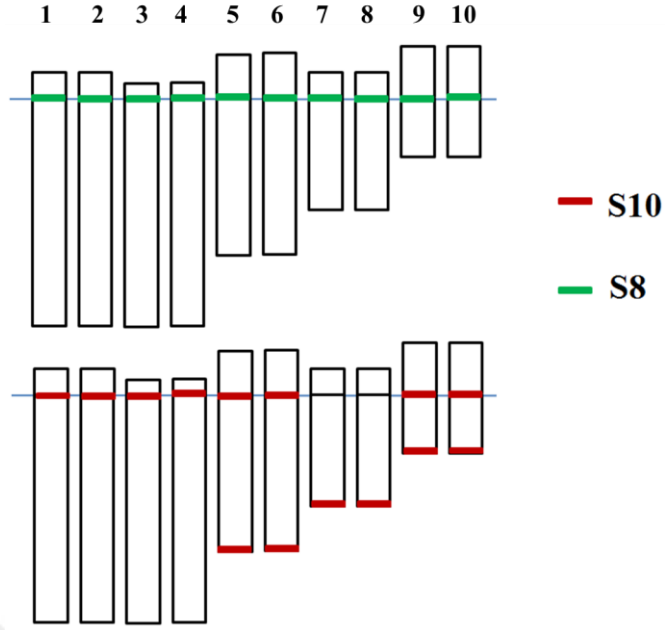
S8 klonu ise pelemir bitkisinin 5 kromozom çifti üzerinde sentromer bölgesine özgü sinyaller vermiştir (Şekil 4.11.). Bunun dışında S10 klonu 4 kromozom çiftinin (1., 2., 3., 5.) sentromer bölgesinde sinyaller gösterirken 3 kromozom çiftinin subtelomer bölgesinde sinyaller vermiştir (Şekil 4.11.). Ancak, S10 için elde edilen FISH şeklinde 6 subtelomerik sinyalin hangi kromozom üzerinde olduğu her ne kadar Şekil 4.11.'de belirli olmasada S8 ve S10 sinyallerinin hangi kromozom çiftleri üzerinde görüldüğünün anlaşılabilmesi amacıyla ideogram hazırlanmıştır (Şekil 4.12.). S11 klonunun ise kromozomlar üzerinde transpozon tipi dağınık sinyaller verdiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.13.).



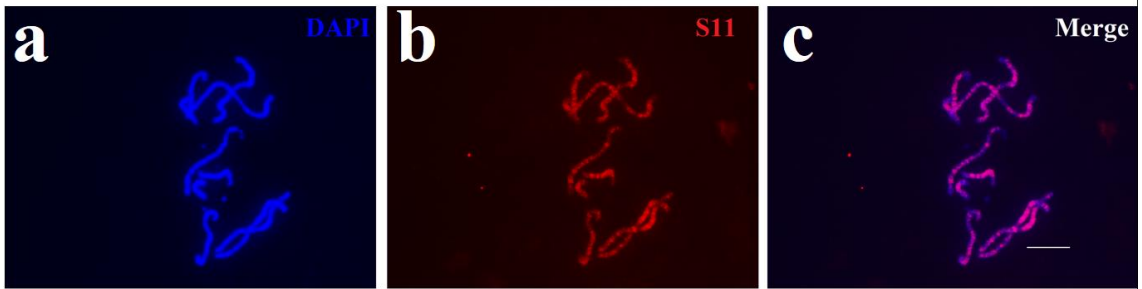
Şekil 4.10. S6 klonunun pelemir (*C. syriaca*) kromozomları üzerinde dağılımı. DAPI ile boyanmış pelemir (*C. syriaca*) kromozomu (a), yeşil renkte gösterilmiş S6 klonunun sinyalleri (b), S6 klonu sinyalleri ve kromozomların birleştirilmiş (merge) görseli (c).
Bar=10 μ m



Şekil 4.11. S8 ve S10 klonlarının pelemir (*C. syriaca*) kromozomları üzerinde dağılımı. Yeşil renk ile gösterilen S8 klonu (a-c), kırmızı renk ile gösterilen S10 klonu. (d-e), S8 ve S10 klonlarının lokalizasyonu birleştirilmiş (merge) resimde (c,f) gösterilmektedir.
Bar=10 μ m



Şekil 4.12. Pelemyr (*C. syriaca*) kromozomlarının satelit tekrar bölgelerine göre hazırlanmış ideogramı. CL45 satelite tekrar bölgesi kırmızı ile CL34 ve CL42 tekrar bölgeleri yeşil ile gösterilmektedir



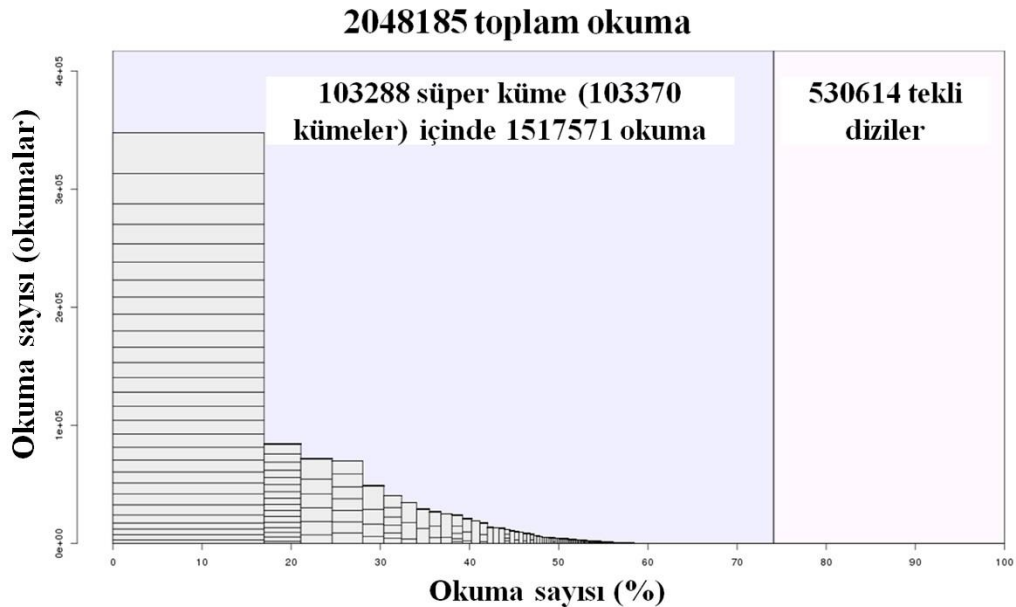
Şekil 4.13. S11 klonunun pelemyr (*C. syriaca*) kromozomları üzerinde dağılımı. DAPI ile boyanmış pelemyr (*C. syriaca*) kromozomu (a), kırmızı renkte gösterilmiş S11 klonunun sinyalleri (b), S11 klonu sinyalleri ve kromozomların birleştirilmiş (merge) görseli (c). Bar=10 μ m

4.4 Pelemyr (*C. syriaca*) Genomunun Yeni Nesil Dizilemesi (YND)

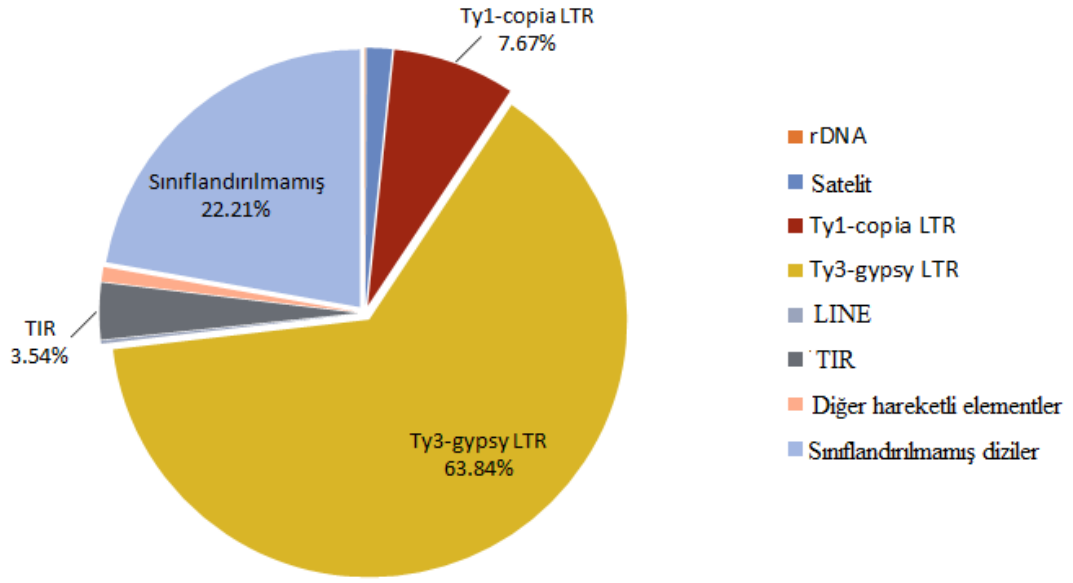
4.4.1 Yeni nesil dizileme sonuçlarının biyoinformatik analizi

Illumuna okumaları ilk önce RepeatExplorer programı kullanılarak analiz edilmiştir. Bu program sayesinde pelemyr genomunda yaygın olarak bulunan tekrarlayan DNA dizilerinin kapsamlı bir şekilde tanımlanması sağlanmıştır. Bu çalışma kapsamında

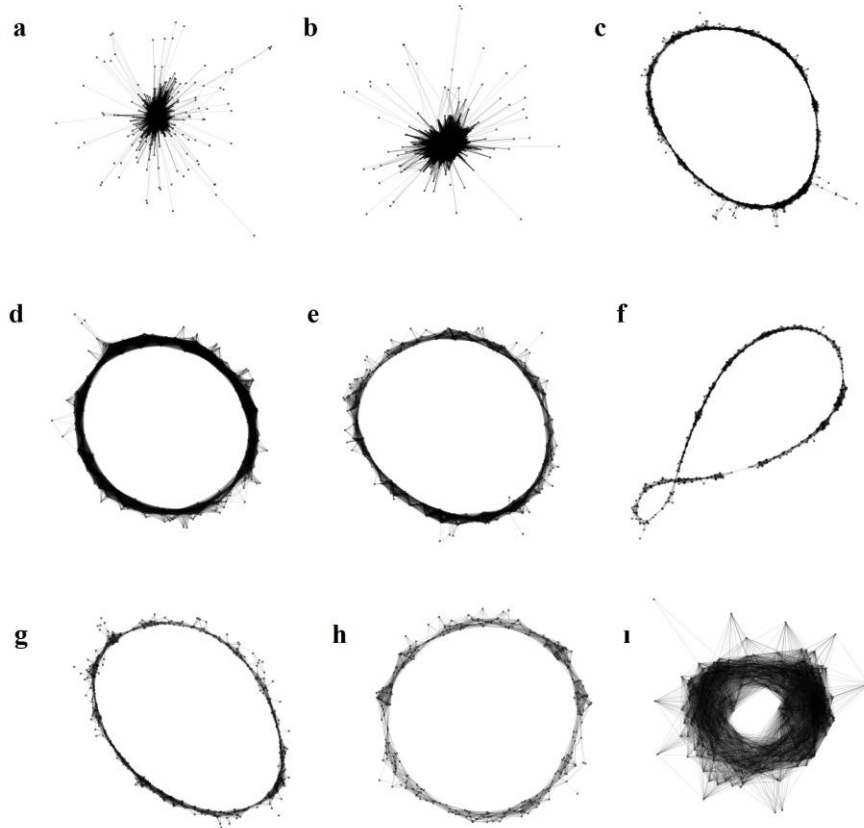
Illumuna dizilemesi yapılan pelemin genomunun dizi sonuçları RepeatExplorer programında girdi olarak kullanılmıştır. Programda pelemin genomuna ait 2048185 dizi okuması yapılmıştır (Şekil 4.14.). Okuma sonucunda diziler, tekrarlayan elementler ve teklı diziler olarak iki gruba ayrıldıkları gibi, tekrarlayan DNA dizileri kümeler halinde de sınıflandırılmıştır. Bu okumanın sonucunda pelemin bitkisinin genomunda %0.04 oranında rDNA'ların, %0.89 oranında satelit tekrarların bulunduğu tespit edilirken, sınıf I hareketli elementlerin genomun %40,57'lik bir oranını kapsadığı ve bunun içerisinde en fazla orana LTR-Ty3 gypsy elementlerinin hakim olduğu saptanmıştır. Son olarak genomun %2'lik bir kısmını sınıf II hareketli elementlerinin oluşturduğu tanımlanmıştır (Çizelge 4.3., Şekil 4.15.). Bu sonuçlardan hareketle pelemin genomunun %45'e yakın kısmının transpozon elementlerden oluştuğu belirlenmiştir. Transpozon elementler içerisinde en büyük oranı Ty3 gypsy retrotranspozon tekrar elementi kapsamaktadır. Ayrıca bu program aracılığıyla pelemin genomu içerisinde 15 satelit tekrar dizisi, 6 LTR elementinin ve 1 rDNA dizisinin bulunduğu saptanmıştır (Çizelge 4.4.). Programdan elde edilen rapora göre satelit olma kapasitesi yüksek tekrar dizilerinin görselleri Şekil 4.16.'de sunulmuştur. Şekilde yıldızvari ya da yuvarlak olarak tespit edilen diziler ardışık olarak tekrar eden elementleri temsil ederken, noktalar YND okumalarını köprüler ise iki tekrar dizisi arasındaki benzerlikleri ifade etmektedir (Şekil 4.16.).



Şekil 4.14. Yeni Nesil Dizileme sonucu elde edilen dizilerin RepeatExplorer programı tarafından pelemin (*C. syriaca*) genomun kümelerinin analiz sonucu. X eksenii kümelerin kapsadığı genom yüzdesini, Y eksenii her kümedeki yeni nesil dizileme okumalarının sayısını göstermektedir



Şekil 4.15. RepeatExplorer programına göre pelemir (*C. syriaca*) genomunda bulunan tekrar elementlerinin yüzdeleri

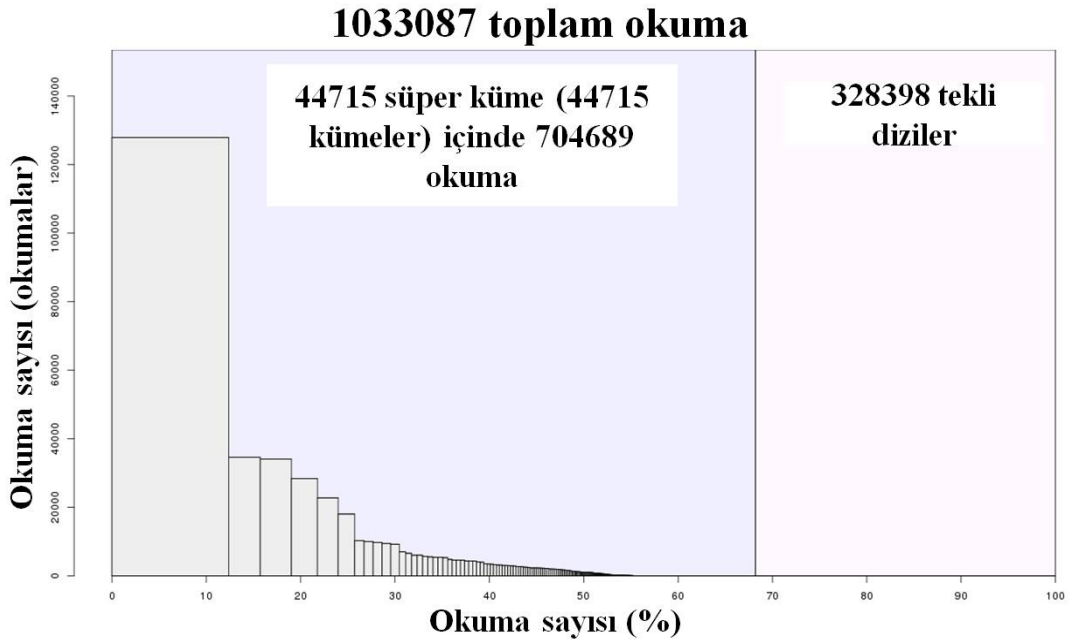


Şekil 4.16. RepeatExplorer programına göre genom içerisinde satelit olma olasılığı yüksek tekrar elementleri kümesinin gösterimi. CL67 (a), CL81 (b), CL184 (c), CL187 (d), CL200 (e), CL203 (f), CL205 (g), CL241 (h), CL256 (i)

Çizelge 4.3. Pelemir (*C. syriaca*) genomunda bulunan tekrar elementlerinin RepeatExplorer programı aracılığıyla analiz edilmesi

Yeni nesil dizileme verilerinin girdi sayısı	6,603,850	
Analiz edilen dizilerin sayısı	2,048,185	
Kümede okumaların sayısı	1,517,571	
Küme sayısı	103,370	
Süper küme sayısı	103,288	
Tekli dizilerin sayısı	530,614	
Tekrarlayan DNA elementlerinin sınıfları	Aile	Genomdaki oranı (%)
rDNA		0.04
Satellite		0.89
Sınıf I hareketli elementler		40.57
LTR-Ty1 copia		4.33
	<i>Ale</i>	0.15
	<i>Angela</i>	0.32
	<i>Bianca</i>	0.18
	<i>Ikeros</i>	0.09
	<i>Ivana</i>	1.07
	<i>SIRE</i>	0.88
	<i>TAR</i>	0.44
	<i>Tork</i>	1.17
	<i>Others</i>	0.03
LTR-Ty3 gypsy		36.05
	<i>Athila</i>	10.60
	<i>CRM</i>	0.15
	<i>Galadriel</i>	0.29
	<i>Tekay</i>	25.01
LINE		0.11
Others		0.08
Sınıf II hareketli elementler		2.00
TIR		2.00
	<i>EnSpm</i>	0.74
	<i>CACTA</i>	
	<i>Hat</i>	0.32
	<i>MuDR</i>	0.88
	<i>Mutator</i>	
	<i>PIF</i>	0.07
	<i>Harbinger</i>	
Diğer hareketli elementler		0.43
Sınıflandırılmamış diziler		12.54

genomuna ait TAREAN ve RepeatExplorer programlarının sonuçları karşılaştırılmıştır ve iki programda da ortak tekrar dizilerinin bulunup bulunmadığı test edilmiştir. Sonuç olarak, TAREAN programından elde edilen dizi uzunluğu 147 bç olan CL34 ile RepeatExplorer programından elde edilen dizi uzunluğu 147 bç olan CL67 dizilerinin bire bir aynı olduğu dizi benzerlikleri karşılaştırılarak saptanmıştır (Şekil 4.19.). Bu tez çalışması içerisinde TAREAN programından elde edilen 4 satelit tekrar dizisi satelit olma olasılıkları daha yüksek olduğu için FISH çalışmalarında kullanılmıştır. Kullanılan satelit tekrar dizilerini özellikleri Çizelge 4.6.'da ve resimleri Şekil 4.18'da verilmiştir. Şekil 4.18.'de gösterildiği gibi satelit tekrarlar yuvarlak ya da yıldızvari bir görsel oluşturmuşlardır. Bunun nedeni satelit tekrar dizilerin birbirlerine olan benzerliklerinin yüksek olması ve ardışık olarak tekrar etmeleridir. Şekilde nokta ile YND okumaları gösterilirken, dizilerin birbirlerine olan benzerlikleri köprülerle gösterilmiştir (Şekil 4.18.). Daha önce bitki türleri üzerinde yapılan çalışmalarda satelit tekrarların dizi uzunluğunun yaklaşık 100 ile 1000 bç arasında değiştiği ifade edilmiştir. Pelemir genomunun TAREAN programı kullanılarak yapılan biyoinformatik analizinde 4 satelit tekrar dizisinin bu aralık içerisinde bulunduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.17. Yeni Nesil Dizileme sonucu elde edilen dizilerin TAREAN programında *in silico* analizinin gösterimi. X eksenini kümelerin kapsadığı genom yüzdesini, Y eksenini her kümedeki yeni nesil dizileme okumalarının sayısını gösterir

Çizelge 4.5. TAREAN programından alınan raporda pelemir (*C. syriaca*) genomunda bulunan tekrar elementlerinin kümelendirilmesi ve bunların satelit tekrar dizisi olma olasılıkları

Yüksek ihtimal ile olası satelit kümeleri

Küme adı	Genom içerisindeki oranı (%)	Gerçek boyutu	Satelit olma olasılığı	Dizi uzunluğu
34	0.31	3164	0.905	147
42	0.26	2690	0.926	150

Düşük ihtimal ile olası satelit kümeleri

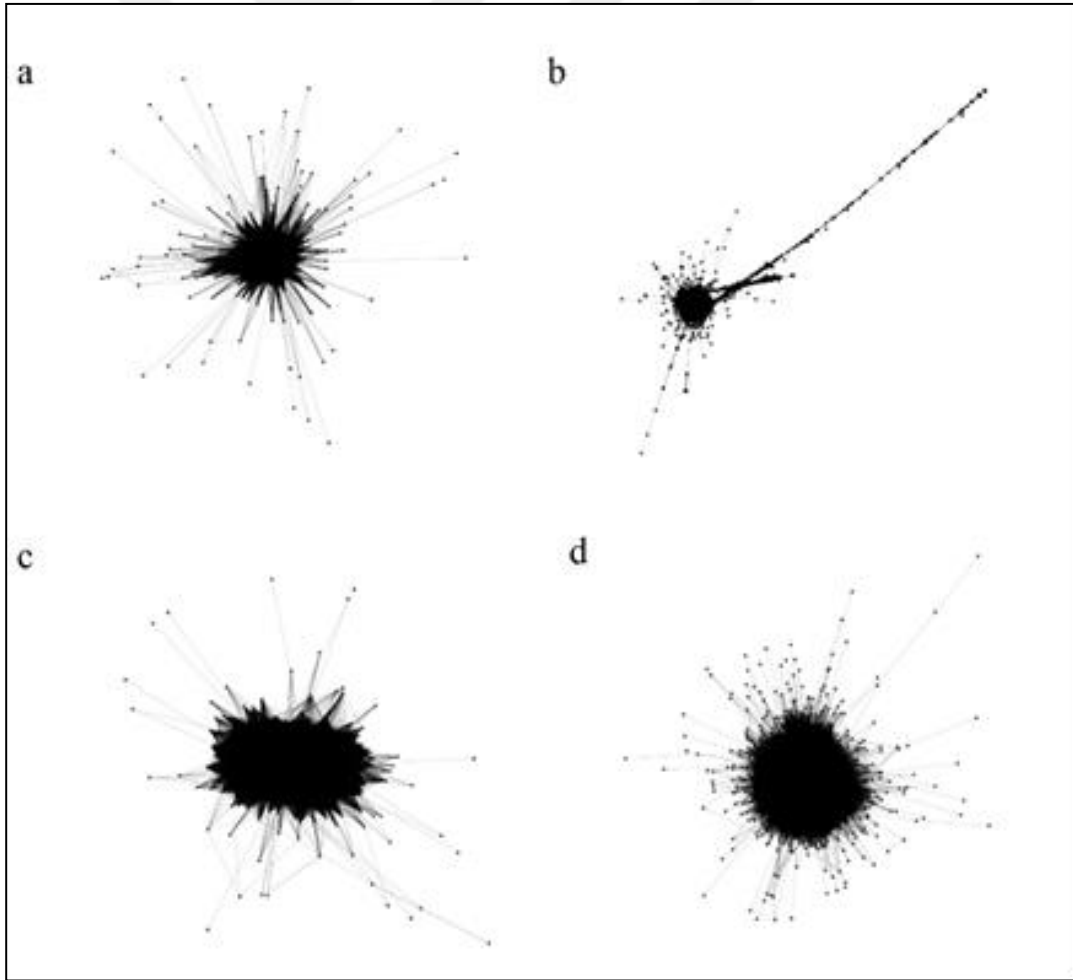
Küme adı	Genom içerisindeki oranı (%)	Gerçek boyutu	Satelit olma olasılığı	Dizi uzunluğu
36	0.300	3069	0.0564	305
45	0.240	2529	0.1370	215
67	0.160	1612	0.0737	4390
100	0.071	731	0.0626	2340

Olası LTR kümeleri

Küme adı	Genom içerisindeki oranı (%)	Gerçek boyutu	Satelit olma olasılığı	Dizi uzunluğu
1	12.000	127889	0.0600	7190
2	3.400	34631	0.5120	11700
11	0.900	9269	0.0393	5020
31	0.340	3462	0.0522	3990
43	0.260	2648	0.0548	5360
47	0.220	2321	0.8470	6520
59	0.190	1978	0.0381	5670
87	0.097	1002	0.0952	4480
99	0.073	750	0.2850	5330

rDNA

Küme adı	Genom içerisindeki oranı (%)	Gerçek boyutu	Satelit olma olasılığı	Dizi uzunluğu
6	1.7	18039	0.974	8070



Şekil. 4.18. TAREAN programı sonucu elde edilen 4 satelit tekrar kümesinin gösterimi. CL34 (a), CL36 (b), CL42 (c), CL45 (d)

Çizelge 4.6. TAREAN programı sonucunda elde edilen satelit tekrar dizileri

Yüksek ihtimal ile olası satelit kümeler

Küme adı	Genom içerisindeki oranı (%)	Gerçek boyutu	Satelit olma olasılığı	Dizi uzunluğu	Dizi
34	0.31	3164	0.905	147	CGATGACAATTTAAAGGTC ATATTTTACTATTACTAGTT CATGTTTTAGGTTTTGGGTT CAAAACATCATATTTTGCG CCAAACGTCCAATTTGGGT GACTTTTTGGAAGTCGTGC AATTTCTCAAAAATCCATGT GGTGGAGACGAC
42	0.26	2690	0.926	150	TAGTTCAGGTTTTAGGTTC AAAACATCCTATTTTGCGC AAAAGGTATATTTGGGTG ACTTTTTGAATTCGTGCA ATTTCTCAAAAATCCATGTG TTGGAGACGACGGATGACG ATTTGAAAATCGAATTTA TTAGAAATAAGTTGTTC

Düşük ihtimal ile olası satelit kümeler

Küme adı	Genom içerisindeki oranı (%)	Gerçek boyutu	Satelit olma olasılığı	Dizi uzunluğu	Dizi
36	0.300	3069	0.0564	305	AATTATTATGTAAATAGA TTAGCGAACATTTGTTAG GATTTACGCACGCACAAT CTCGTAATATTGAAAACA TATGGAAAACAAAAGCGT GAATAGAGTAACTGGTAA TCTCGTATGTCTTATAACC GAGAGGTCACCTGGATCGA ATCTCGTTACTTATTAAT TAAGTAATTTTTTTGATAA TCATACTTAA TGTTGGTTC AATTGGACAATGAATTGT AACATTACGAAAATGCC CTAATCGGAATTTCTTTA ACGATAATCGAGGGTATA ATTGAAAACATTGACAA AAAAGTAGCAGA
45	0.240	2529	0.1370	215	CAGACCCCATTTTTATGTG TCAAGCTCATGTCAGACT TAGCCGTTCCATGTCACA ACCGAGAAATGGATGTCA GAACCTAGAAAATCAAGC CACGACATGACAACAACC GAGGAAGGCATGTCAATGA CATAATGCGACCTAGAA AATCAGATCGCGGTGCGC CGCGGCGTGTCTGAACCT GGTTTTCTCATGTCAGAA CCCAACAAAACCATGT

DNA dizilerinin sıralanması

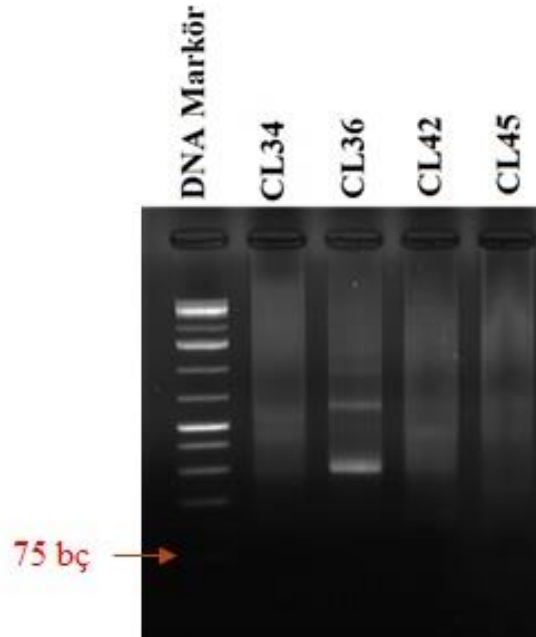
1. sıra: CL34
2. sıra: CL67

```
CGATGACAAT TTAAGGTCA TATTTTACTA TTAGTAGTTC ATGTTTATAG TTTTGGGTTT AAAACATCAT ATTTTGCGCC AAACGTCCAA TTTGGGTGAC TTTTGGGAAAG
CGATGACAAT TTAAGGTCA TATTTTACTA TTAGTAGTTC ATGTTTATAG TTTTGGGTTT AAAACATCAT ATTTTGCGCC AAACGTCCAA TTTGGGTGAC TTTTGGGAAAG
TCGTGCAATT TCTCAAAATC CATGTGGTGG AGACGAC
TCGTGCAATT TCTCAAAATC CATGTGGTGG AGACGAC
```

Şekil 4.19. TAREAN programından elde edilen CL34 ve RepeatExplorer programından elde edilen CL67 tekrar dizilerinin aynı satelit tekrar elementi olup olmadığının karşılaştırılması

4.4.2 Yaygın DNA elementlerinin klonlanması

Bu tez çalışması içerisinde FISH tekniğinde prob olarak kullanılması amacıyla TAREAN programı sonucunda elde edilen 4 satelit tekrara özgü primerler tasarlanıp 55°C’de PCR kullanılarak bu dizilerin amplifiye edilmesi sağlanmıştır. PCR ürünleri %0.2’lik agaroz jelde 30 dk 60 V’da yürütülmüştür (Şekil 4.20.). Agaroz jel elektroforezi sonrası alınan görüntüde primerlerin genomik DNA üzerinde merdivenvari bir desen oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu desen, TAREAN programının çıktısı olarak verdiği satelitlerin gerçekten de pelemir genomunda ardışık tekrar özelliği gösterdiğini kanıtlamıştır.

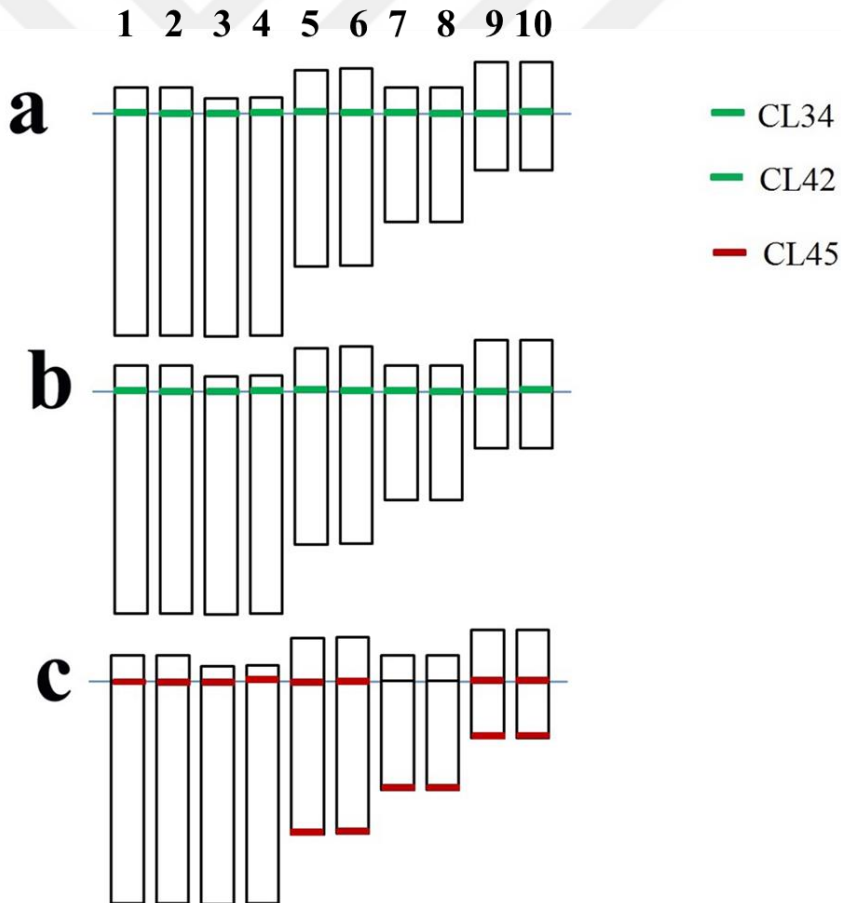


Şekil 4.20. TAREAN sonucunda elde edilen tekrar dizilerine özgü tasarlanan primerler ile birlikte tekrar dizilerin amplifikasyonu

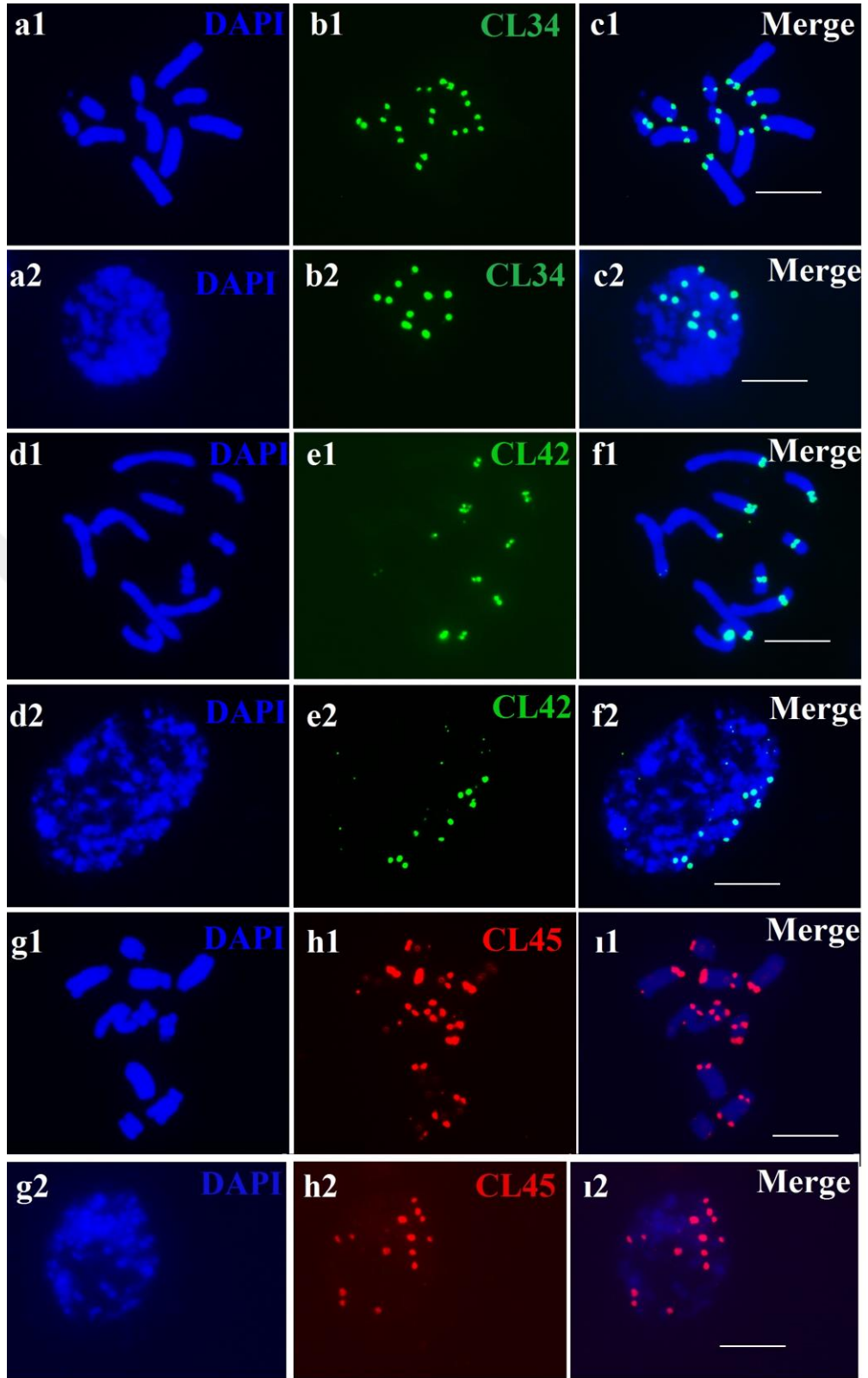
4.4.3 FISH yöntemi ile yaygın DNA elementlerinin haritalanması

Pelemir bitkisinde CL34, CL36, CL42 ve CL45 satelit tekrarlarının kromozomal pozisyonları FISH kullanarak tespit edilmiştir. PCR yoluyla çoğaltılan bu dizilerden FISH uygulamaları için proplar hazırlanıp satelit tekrarların kromozomlar üzerinde haritalanması sağlanmıştır.

CL34 ve CL42 hibridizasyon bölgelerinin tüm kromozomların sentromerik bölgelerinde bulunduğu tespit edilirken, CL45 sinyallerinin 1., 2., 3. ve 5. kromozomların sentromer bölgelerinde, 3., 4. ve 5. kromozomların ise uzun kollarının sonunda subtelomerik bölgede olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.21., Şekil 4.22.). Ancak CL36 sinyalleri kromozomlar üzerinde zayıf bir dağılım göstermiştir (Şekil verilmemiştir).



Şekil 4.21. Pelemir (*C. syriaca*) kromozomlarının satelit tekrar bölgelerine göre hazırlanmış ideogramı. CL45 satelite tekrar bölgesi kırmızı ile CL34 ve CL42 tekrar bölgeleri yeşil ile gösterilmektedir

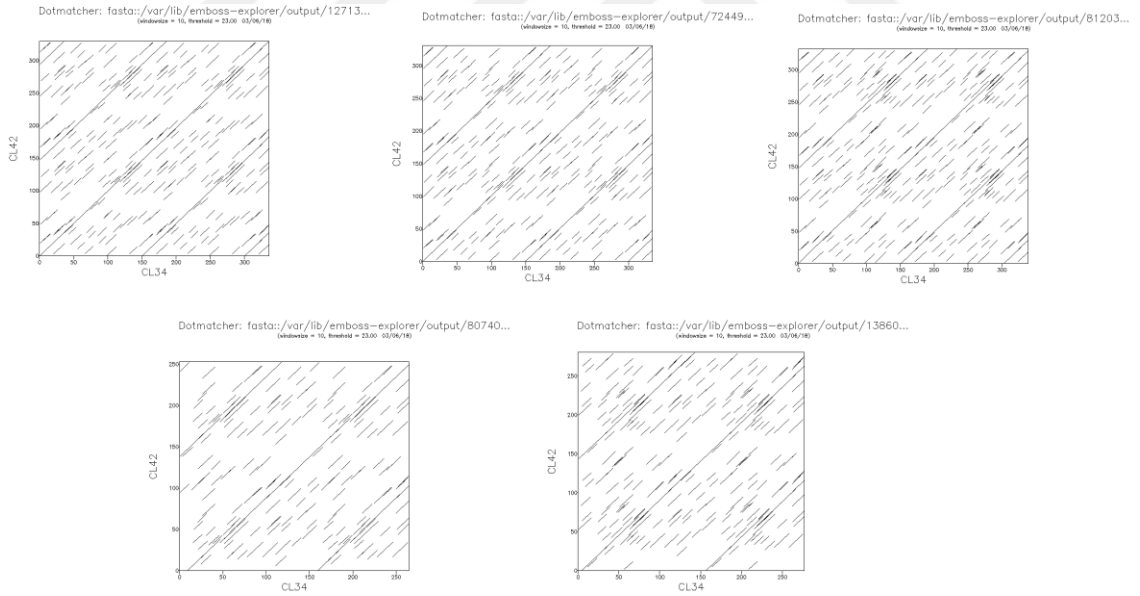


Şekil 4.22. Pelemyr (*C. syriaca*) kromozomlarının floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) kullanarak haritalanması. Metafaz kromozomları üzerinde CL34 (a1-c1), interfaz kromozomları üzerinde CL34 (a2-c2), metafaz kromozomları üzerinde CL42 (d1-f1), interfaz kromozomları üzerinde CL42 (d2-f2), metafaz kromozomları üzerinde CL45 (g1-i1) interfaz kromozomları üzerinde CL45 (g2-i2). Bar=10 µm

FISH sonucunda CL34 ve CL42 satelit tekrarlarının aynı kromozomal bölgede saptanması sonucu iki dizi bilgisi karşılaştırılmıştır. Bunun için TAREAN programından elde edilen CL34 satelit elementini oluşturan 5 dizi parçası ve CL42 satelit elementini oluşturan 5 dizi parçası GeneWarrior programı kullanılarak analiz edilmiştir.

Daha sonra, EMBOSS explorer programı kullanılarak iki tekrar dizisinin dot plot figürleri oluşturulmuştur. GeneWarrior programında karşılaştırılan diziler, TAREAN programının satelit tekrar dizilerini tespit etmek amacıyla gruplandığı kümelerden ham dizi olarak rastgele seçilmiştir. Ayrıca yine aynı diziler EMBOSS explorer programı ile karşılaştırılmıştır.

Dot plot görselinde her 150 bç'de aynı modelin ortaya çıktığı görüntülenmiştir. Bütün bu karşılaştırmalı analizler sonucunda iki tekrar dizisinin aynı aileden olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, CL34 ve CL42 satelit tekrarlarının isimleri Cs150 olarak adlandırılmıştır (Şekil 4.23., Şekil 4.24.).



Şekil 4.23. CL34 ve CL42 (Cs150) tekrar dizilerinin dot plot desenleri. CL34 için 5, CL42 için 5 dizi parçası kullanılmıştır

DNA dizilerinin sıralanması

1. sıra: Cl34
2. sıra: Cl34
3. sıra: Cl34
4. sıra: CL34
5. sıra: Cl42
6. sıra: Cl42
7. sıra: Cl42
8. sıra: Cl42
9. sıra: CL42
10. sıra: Cl42

1	AAATC	CATAT	TTTGC	GCCAA	ACGTCC	AATT	TGGGT	GACTT	TTTGA	AAGTC	GTTCA	ATTTT	TCAAA	ATCCA	TGTGT	TGGAG
2	AAATC	CATAT	TTTGC	GCCAA	ACGTCC	AATT	TGGGT	GACTT	TTTGA	AAGTC	GTGCA	ATTTT	TCAAA	ATCCA	TGTGT	TGGAG
3	AAATC	CATAT	TTTGC	GCCAA	ACGTCC	AATT	TGGGT	GACTT	TTTGA	AAGTC	GTGCA	ATTTT	TCAAA	ATCCA	TGTGT	TGGAG
4	AAATC	CATAT	TTTGC	GCCAA	ACGTCC	AATT	TGGGT	GACTT	TTTGA	AAGTC	GTGCA	ATTTT	TCAAA	ATCCA	TGTGT	TGGAG
5	AAATC	CATAT	TTTGC	GCCAA	ACGTCC	AATT	TGGGT	GACTT	TTTGA	AAGTC	GTGCA	ATTTT	TCAAA	ATCCA	TGTGT	TGGAG
6	AAATC	CCTAT	TTTGC	GCCAA	AGGTAT	ATTTT	TGGGT	GACTT	TTTGA	AATTC	GTGCA	ATTTT	TCAAA	ATCCA	TGTGT	TGGAG
7	AAATC	CCTAT	TTTGC	GCCAA	AGGTAT	ATTTT	TGGGT	GACTT	TTTGA	AATTC	GTGCA	ATTTT	TCAAA	ATCCA	TGTGT	TGGAG
8	AAATC	CCTAT	TTTGC	GCCAA	AGGTAT	ATTTT	TGGGT	GACTT	TTTGA	AATTC	GTGCA	ATTTT	TCAAA	ATCCA	TGTGT	TGGAG
9	AAATC	CCTAT	TTTGC	GCCAA	AGGTAT	ATTTT	TGGGT	GACTT	TTTGA	AATTC	GTGCA	ATTTT	TCAAA	ATCCA	TGTGT	TGGAG
10	AAATC	CCTAT	TTTGC	GCCAA	AGGTAT	ATTTT	TGGGT	GACTT	TTTGA	AATTC	GTGCA	ATTTT	TCAAA	ATCCA	TGTGT	TGGAG

1	ACGAC	CCGATG	ACAAT	TTTAAA	GGTCAT	ATTTT	TACTAT	TACT	A---	GTTCA	TGTTT	TAGGT	TTTGG	TGTTCA	AAACAT	CATA
2	ACGAC	CCGATG	ACAAT	TTTAAA	GGTCAT	ATTTT	TACTAT	TACT	A---	GTTCA	TGTTT	TAGGT	TTTGG	TGTTCA	AAACAT	CATA
3	ACGAC	CCGATG	ACAAT	TTTAAA	GGTCAT	ATTTT	TACTAT	TACT	A---	GTTCA	TGTTT	TAGGT	TTTGG	TGTTCA	AAACAT	CATA
4	ACGAC	CCGATG	ACAAT	TTTAAA	GGTCAT	ATTTT	TACTAT	TACT	A---	GTTCA	TGTTT	TAGGT	TTTGG	TGTTCA	AAACAT	CATA
5	ACGAC	CCGATG	ACAAT	TTTAAA	GGTCAT	ATTTT	TACTAT	TACT	A---	GTTCA	TGTTT	TAGGT	TTTGG	TGTTCA	AAACAT	CATA
6	ACGAC	CGGATG	ACGAT	TTTAAA	AATCGA	ATTTT	TATTAGA	AAT	AAGTT	GTTT	-	TAGTT	CAGGT	TTT	AGGTT	CA
7	ACGAC	CGGATG	ACGAT	TTTAAA	AATCGA	ATTTT	TATTAGA	AAT	AAGTT	GTTT	-	TAGTT	CAGGT	TTT	AGGTT	CA
8	ACGAC	CGGATG	ACGAT	TTTAAA	AATCGA	ATTTT	TATTAGA	AAT	AAGTT	GTTT	-	TAGTT	CAGGT	TTT	AGGTT	CA
9	ACGAC	CGGATG	ACGAT	TTTAAA	AATCGA	ATTTT	TATTAGA	AAT	AAGTT	GTTT	-	TAGTT	CAGGT	TTT	AGGTT	CA
10	ACGAC	CGGATG	ACGAT	TTTAAA	AATCGA	ATTTT	TATTAGA	AAT	AAGTT	GTTT	-	TAGTT	CAGGT	TTT	AGGTT	CA

1	TTTTG	CGCCA	AACGT	CCTAAT	TTGGGT	GACTT	TTTTG	GGAAGT	CGTTC	CAATTT	CTCAA	AAATCC	ATGTT	GTTGGA	GACGAC	CCGAT
2	TTTTG	CGCCA	AACGT	CCTAAT	TTGGGT	GACTT	TTTTG	GGAAGT	CGTTC	CAATTT	CTCAA	AAATCC	ATGTT	GTTGGA	GACGAC	CCGAT
3	TTTTG	CGCCA	AACGT	CCTAAT	TTGGGT	GACTT	TTTTG	GGAAGT	CGTTC	CAATTT	CTCAA	AAATCC	ATGTT	GTTGGA	GACGAC	CCGAT
4	TTTTG	CGCCA	AACGT	CCTAAT	TTGGGT	GACTT	TTTTG	GGAAGT	CGTTC	CAATTT	CTCAA	AAATCC	ATGTT	GTTGGA	GACGAC	CCGAT
5	TTTTG	CGCCA	AACGT	CCTAAT	TTGGGT	GACTT	TTTTG	GGAAGT	CGTTC	CAATTT	CTCAA	AAATCC	ATGTT	GTTGGA	GACGAC	CCGAT
6	TTTTG	CGCAA	AAAGT	ATATTT	TTGGGT	GACTT	TTTTT	GGAATT	CGTTC	CAATTT	CTCAA	AAATCC	ATGTT	GTTGGA	GACGAC	GGAT
7	TTTTG	CGCAA	AAAGT	ATATTT	TTGGGT	GACTT	TTTTT	GGAATT	CGTTC	CAATTT	CTCAA	AAATCC	ATGTT	GTTGGA	GACGAC	GGAT
8	TTTTG	CGCAA	AAAGT	ATATTT	TTGGGT	GACTT	TTTTT	GGAATT	CGTTC	CAATTT	CTCAA	AAATCC	ATGTT	GTTGGA	GACGAC	GGAT
9	TTTTG	CGCAA	AAAGT	ATATTT	TTGGGT	GACTT	TTTTT	GGAATT	CGTTC	CAATTT	CTCAA	AAATCC	ATGTT	GTTGGA	GACGAC	GGAT
10	TTTTG	CGCAA	AAAGT	ATATTT	TTGGGT	GACTT	TTTTT	GGAATT	CGTTC	CAATTT	CTCAA	AAATCC	ATGTT	GTTGGA	GACGAC	GGAT

1	GACA	ATTTAA	AGGTC	ATATT	TTACT	ATTAC	TA---	GTTT	ATGTT	TAGG	TTTTG	GGTTC	AAAA	CATCAT	ATTTT	GCGCC	
2	GACA	ATTTAA	AGGTC	ATATT	TTACT	ATTAC	TA---	GTTT	ATGTT	TAGG	TTTTG	GGTTC	AAAA	CATCAT	ATTTT	GCGCC	
3	GACA	ATTTAA	AGGTC	ATATT	TTACT	ATTAC	TA---	GTTT	ATGTT	TAGG	TTTTG	GGTTC	AAAA	CATCAT	ATTTT	GCGCC	
4	GACA	ATTTAA	AGGTC	ATATT	TTACT	ATTAC	TA---	GTTT	ATGTT	TAGG	TTTTG	GGTTC	AAAA	CATCAT	ATTTT	GCGCC	
5	GACA	ATTTAA	AGGTC	ATATT	TTACT	ATTAC	TA---	GTTT	ATGTT	TAGG	TTTTG	GGTTC	AAAA	CATCAT	ATTTT	GCGCC	
6	GACG	ATTTGA	AAATCG	AATT	TTATT	AGAAA	TAAGT	TGTTT	-	TAGTT	CAGG	TTTT	AGGTT	AAAA	CATCCT	ATTTT	GCGCA
7	GACG	ATTTGA	AAATCG	AATT	TTATT	AGAAA	TAAGT	TGTTT	-	TAGTT	CAGG	TTTT	AGGTT	AAAA	CATCCT	ATTTT	GCGCA
8	GACG	ATTTAA	AAATCG	AATT	TTATT	AGAAA	TAAGT	TGTTT	-	TAGTT	CAGG	TTTT	AGGTT	AAAA	CATCCT	ATTTT	GCGCA
9	GACG	ATTTAA	AAATCG	AATT	TTATT	AGAAA	TAAGT	TGTTT	-	TAGTT	CAGG	TTTT	AGGTT	AAAA	CATCCT	ATTTT	GCGCA
10	GACG	ATTTAA	AAATCG	AATT	TTATT	AGAAA	TAAGT	TGTTT	-	TAGTT	CAGG	TTTT	AGGTT	AAAA	CATCCT	ATTTT	GCGCA

1	AAAC	GTCCAA	TTTGG	TGAC	T
2	AAAC	GTCCAA	TTTGG	TG--	--
3	AAAC	GTCCAA	TTTGG	TG--	--
4	AAAC	GTCCAA	TTTGG	TGAC	T
5	AAAC	GTCCAA	TTTGG	TG--	--
6	AAAG	GATAT	TTTGG	TG--	--
7	AAAG	GATAT	TTTGG	TG--	--
8	AAAG	GATAT	TTTGG	TG--	--
9	AAAG	GATAT	TTTGG	TG--	--
10	AAAG	GATAT	TTTGG	TG--	--

Şekil 4.24. CL34 ve CL42 (Cs150) tekrar dizilerinin karşılaştırılması. CL34 için 5, CL42 için 5 dizi parçası kullanılmıştır

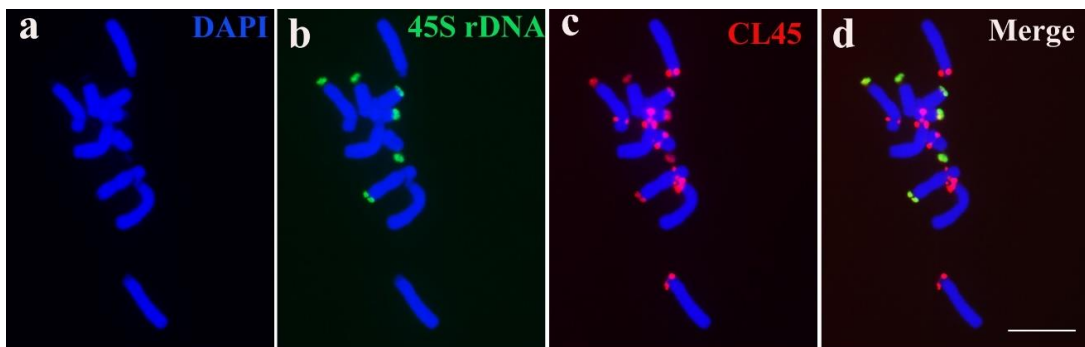
Satelit tekrarların FISH tekniği kullanılarak kromozomlar üzerinde haritalanmasının ardından, CL45 satelit tekrar elementinin 45S rDNA elementiyle aynı bölgede olup olmadığını saptayabilmek amacıyla iki elementten oluşturulan kombinasyonlar kromozomlar üzerinde gözlemlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre CL45 ve 45S rDNA 3., 4. ve 5. kromozomların subtelomerik bölgesinde örtüşmektedir (Şekil 4.25.).

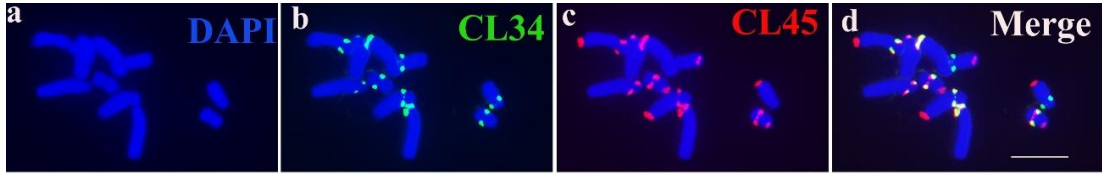
Benzer şekilde CL45-CL34 satelit tekrarlarının kromozomlar üzerinde aynı bölgede bulunduğunu tespit etmek amacıyla kombinasyonları hazırlanmıştır. FISH sonuçları CL45-CL34 tekrar elementlerinin 1., 2., 3. ve 5. kromozomlarının sentromerik bölgesinde kolokalizasyonu göstermektedir (Şekil 4.26.).

Benzer şekilde CL45-CL42 tekrar elementlerinin kromozomlar üzerinde örtüşüp örtüşmediğini gözlemlenmek için bu iki satelit kombinasyonundan oluşan FISH çalışması yapılmıştır.

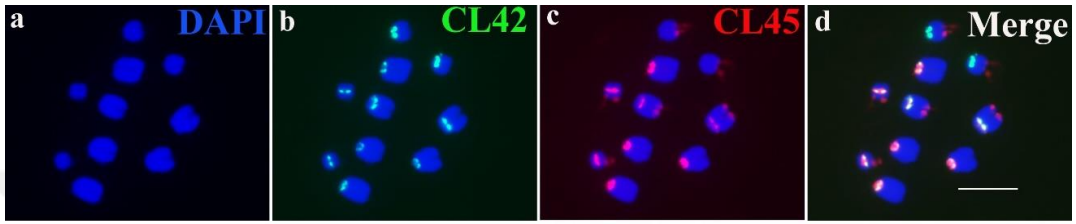
Sonuç olarak hem CL42'nin hem de CL45'in 1., 2., 3. ve 5. kromozomlarının sentromer bölgesinde overlap olduğu saptanmıştır. (Şekil 4.27.). Pelemir (*C. syriaca*) kromozomlarının üzerinde satelit tekrarların örtüşüp örtüşmediği anlaşıldıktan sonra FISH yönteminden elde edilen resimlerle ideogramı hazırlanmıştır (Şekil 4.28., Şekil 4.29.).



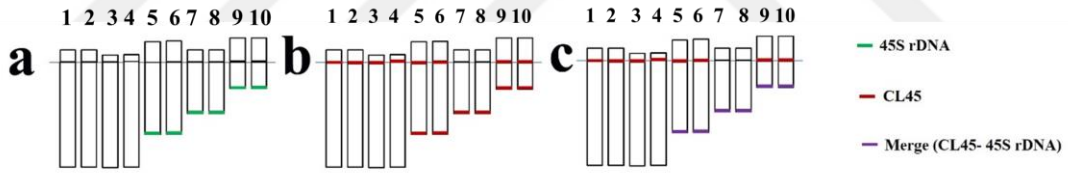
Şekil 4.25. Pelemir (*C. syriaca*)'in CL45 ve 45S rDNA kromozomal lokalizasyonu. DAPI ile boyanmış metafaz kromozomu (a), 45S rDNA sinyallerinin yeşil ile kromozomlar üzerinde gösterimi (b), CL45 satelit tekrar elementlerine ait sinyallerinin kırmızı ile kromozomlar üzerinde gösterimi (c), CL45-45S rDNA elementlerinin aynı bölgede sinyaller verdiği birleştirilmiş resimde (merge) (d) gösterilmektedir. Bar=10 µm



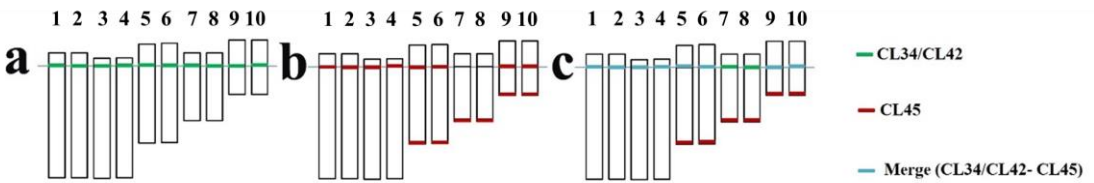
Şekil 4.26. Pelemir (*C. syriaca*)'in CL45 ve CL34 kromozomal lokalizasyonu. DAPI ile boyanmış metafaz kromozomu (a), CL34 tekrar elementinin sinyallerinin yeşil ile kromozomlar üzerinde gösterimi (b), CL45 satelit tekrar elementlerine ait sinyallerinin kırmızı ile kromozomlar üzerinde gösterimi (c), CL45-CL34 elementlerinin aynı bölgede sinyaller verdiği birleştirilmiş resimde (merge) (d) gösterilmektedir. Bar=10 μm



Şekil 4.27. Pelemir (*C. syriaca*)'in CL45 ve CL42 kromozomal lokalizasyonu. DAPI ile boyanmış metafaz kromozomu (a), CL42 tekrar elementinin sinyallerinin yeşil ile kromozomlar üzerinde gösterimi (b), CL45 satelit tekrar elementlerine ait sinyallerinin kırmızı ile kromozomlar üzerinde gösterimi (c), CL45-CL42 elementlerinin aynı bölgede sinyaller verdiği birleştirilmiş resimde (merge) (d) gösterilmektedir. Bar=10 μm



Şekil 4.28. Pelemir (*C. syriaca*) kromozomlarının CL45-45S rDNA elementlerinin FISH kullanılarak analizi sonucu oluşturulan ideogramı. CL45 satelite tekrar bölgesi kırmızı ile 45S rDNA tekrar bölgeleri yeşil ile gösterilmiştir. Overlap (üstüste gelmiş) bölgeler ise mor renk ile gösterilmektedir



Şekil 4.29. Pelemir (*C. syriaca*) kromozomlarının CL45-45S rDNA elementlerinin FISH kullanılarak analizi sonucu oluşturulan ideogramı. CL45 satelite tekrar bölgesi kırmızı ile CL34/CL42 tekrar bölgeleri yeşil ile gösterilmiştir. Overlap (üstüste gelmiş) bölgeler ise mavi renk ile gösterilmektedir

BÖLÜM V

TARTIŞMA VE SONUÇ

Her türün kendine özgün kromozom sayısı, kromozom morfolojisi, genom büyüklüğü ve ploidi seviyesi bulunmaktadır. Ancak bugüne kadar süregelen çalışmalarda pelemir (*C. syriaca*) bitkisinin genom yapısı hakkında kromozom sayısı dışında herhangi bir kayıt bulunamamıştır. Verlaque (1980), Pelemir (*C. syriaca*)’de kromozom sayısının saptanmasına yönelik yaptığı çalışmada kromozom sayısını $2n=10$ olarak bulduğunu ifade etmiştir. Bu tez çalışmasında Pelemir (*C. syriaca*)’in genom büyüklüğü flow sitometri kullanılarak araştırılmış ve 1C değeri 2668 Mbp olarak bulunmuştur. Kromozom morfolojisinin anlaşılması ve detaylı analizi için klon temelli tekrar dizilerinin tanımlanması, ribozomal DNA’ların kromozom üzerindeki yerlerinin tespit edilmesi ve yeni nesil dizileme sonucunda yapılan biyoinformatik analiz ile belirlenen satelit tekrarların FISH kullanılarak tespit edilmesi şeklinde üç yöntem kullanılmıştır.

Tekrarlayan DNA elementleri genomda ardışık olarak ya da genom boyunca geniş ölçüde dağılmış hâlde bulunabilmektedir (Schmidt ve Heslop-Harrison, 1998; Biscotti vd., 2015a). Dağınık DNA dizileri, özellikle transpozon elementler (DNA transpozon ve retrotranspozon), tüm genom boyunca geniş ölçüde dağılmış mobil (hareketli) DNA dizileridir (Schmidt ve Heslop-Harrison, 1998; Heslop-Harrison ve Schmidt, 2012). Tandem (ardışık) tekrarlar ise bir veya birkaç tanımlanmış kromozomal bölgede tekdüze bir şekilde birbirine bitişik olarak sıralanmış kodlanmayan DNA dizileri içeren birimlerdir (Heslop-Harrison ve Schmidt, 2012). Tandem tekrarlar, satelit tekrarları, minisatelit ve mikrosatelitler ve ribozomal DNA (rDNA) elementlerini içermektedirler. Tekrarlayan DNA dizileri türlerin birbirinden ayırt edilmesini sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Bu elementlerin dizi veya kopya numaralarında görülen farklılıklar nedeniyle genom çeşitliliği, genomlar arası uzaklaşma ve bunun sonucu olarak türleşme meydana gelebilmektedir (Karafiátová, 2014). Asma (*Vitis*) genomunun tanımlanması üzerine yapılan çalışmada uygun RFLP markörlerini belirlemek amacıyla tekrarlayan DNA dizilerinin farklı sınıflarının kullanıldığı, sonuç olarak tür içi ve türlerarası DNA polimorfizmi görüldüğü belirtilmiştir (Thomas vd., 1993).

Tekrarlayan DNA dizilerinin bir sınıfı olan mikrosatelitler aynı zamanda önemli bir moleküler markör grubunu oluşturur. Moleküler markörler polimorfik bölgelerin tanımlanmasını sağlar. Böylece bireyler arası seleksiyona katkı sağladığından dolayı bitki ıslahında önemli yer tutmaktadırlar (Yorgancılar vd., 2015). Mikrosatelitler yüksek derecede polimorfizm gösterdiği için arpa (Ramsay vd., 2000), buğday (Song vd., 2005), fasulye (Yu vd., 2000), ayçiçeği (Tang vd., 2002), gibi bitki genomlarında genetik haritalamalarda yaygın olarak kullanılmıştır.

Moleküler klonlama, *in situ* hibridizasyon, DNA dizileme gibi moleküler teknikler bitkiler arasında görülen kromozom yapı farklılıklarının anlaşılmasını ve türleriçi ve arası çeşitliliğin belirlenmesinde önemli bir göreve sahiptir (Galasso vd., 1995). Bu çalışmada Peleminir (*C. syriaca*) genomunda bulunan tekrar dizilerinin belirlenmesi amacıyla iki farklı strateji kullanılmıştır. Bunlardan ilki tekrar dizilerinin klon temelli izolasyondur. Bu amaçla, *Bam*HI restriksiyon enziminden yararlanılmıştır. Dot blot kullanılarak seçilen yüksek kopya dizisine sahip olduğu düşünülen insert DNA'lar içerisinde S8, S10 ve S11 isimli üç pozitif klonunun. floresan *in situ* hibridizasyon kullanılarak kromozom üzerinde yerleri tespit edilmiştir. S8 klonuna ait sinyaller 5 kromozom çiftinin sentromerik bölgesinde spesifik sinyaller vermiştir. S10 klonunun sinyalleri 1., 2., 3. ve 5. kromozom çiftlerinin sentromer bölgesinde, 3., 4. ve 5. kromozom çiftlerinin subtelomer bölgelerinde gözlemlenmiştir. S11 klonunun sinyallerinin ise kromozom üzerine dağılmış transpozon tekrar dizisi özelliğinde olduğu tespit edilmiştir. Restriksiyon enzimi kullanılarak tekrar dizilerinin belirlenmesine yönelik literatürde benzer çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, tütün (*Nicotina tabacum*) çekirdek DNA'sında bulunan tekrar dizilerinin belirlenmesi için *Bam*HI restriksiyon enzimi kullanılarak HRS60 adında tekrar DNA ailesi tespit edildiği ifade edilmiştir (Koukalova vd., 1989). Kavun (*Cucumis melo*)'da bulunan satelit tekrarın belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada *Hind*III restriksiyon enzimi kullanıldığı belirtilmiştir (Hemblen vd., 1982). Bakla (*Vicia faba*)'da *Fok*I enzimi kullanılarak tekrar dizisi tespit edilmektedir (Kato vd., 1984). *Vicia unguiculata* bitkisinde bulunan tekrarlayan DNA elementinin (pVuKB1) *Dra*I kullanılarak klonlanıp karakterize edildiği ve kromozomların sentromer bölgesinde bulunduğu belirtilmektedir (Galasso vd., 1995). Tahıllar üzerinde yapılan çalışmada sorgumun sentromer bölgesinde pSauA9 adında tekrar dizisinin FISH kullanılarak tespit edildiği bildirilmiş ve bu tekrar dizisinin çeltik gibi diğer tahıl türlerinde de tespit edildiği ifade edilmiştir. Bu durumda elde edilen

tekrar dizisinin korunmuş olduğu ve sentromerin fonksiyonunda önemli role sahip olduğu ifade edilmektedir. (Jiang vd., 1996). Bu tez çalışmasında elde edilen S8 ve S10 klonu ileride yapılacak *Cephalaria* cinsindeki diğer türlerin moleküler çalışmalarında temel bir referans olacaktır.

Büyük ökaryotik genomlarda büyük oranda kodlanmayan DNA bölgeleri bulunduğu için genomik DNA'nın restriksiyon enzimleriyle kesilmesiyle elde edilen klonlardan oluşturulan genomik DNA kütüphaneleri bir bitkinin genom yapısının anlaşılmasında sınırlı kalmaktadır (Turner vd., 2000). Ancak, tüm genomun dizilenmesi sonucu elde edilen veriler üzerine yapılan çalışmalar genom yapısı hakkında daha ayrıntılı bilgiler sunabilmektedir. Bu amaçla, Pelemir (*C. syriaca*) genomunda bulunan tekrar dizilerinin karakterize edilmesinde kullanılan ikinci strateji ise yeni nesil dizileme kullanılarak tüm genomun dizilenmesinden sonra biyoinformatik analiz yapılarak satelit tekrarların tespit edilmesi ve elde edilen tekrarlar için uygun primerler tasarlanıp FISH'de görüntülenmesinin sağlanmasıdır. Çalışmanın sonucunda elde edilen Cs150 satelit tekrar dizisi Pelemir (*C. syriaca*) kromozomlarının sentromer bölgesinde tespit edilirken, diğer satelit tekrar CL45 sentromer ve subtelomer bölgesinde tespit edilmiştir. DNA dizileri sentromer fonksiyonu için önemli bir rol oynamaktadır (Jiang vd., 1996).

Sentromer bölgesi mitoz ve mayoz bölünmede anafaz sırasında kardeş kromatidlerin birbirinden ayrılmasını sağlayan iğ ipliklerinin bağlanma yeri olarak tanımlanabilmektedir (Turner vd., 2000). Bu bölge mitoz ve mayoz sırasında kromozomların doğru ayrılmasında önemli bir rol oynar, böylece genetik bilginin bir sonraki nesle eşit dağılımı sağlanır (Jiang vd., 1996). Bu nedenle; sentromer bölgesi kromozomların ayırt edilip sınıflandırılmasında karyotip analizlerin yapılmasında önemli bir yere sahiptir. Sentromerik tekrarların tespit edilmesine yönelik bir çok çalışma literatürde mevcuttur. Örneğin, önemli bir şeker bitkisi olan şeker kamışında (*Saccharum spp. hybrids*) Ss1 tekrar elementi bulunmuş, ancak bu dizi yabancı türlerde (*S. spontaneum* and *S. robustum*) tespit edilmiş olup, kültüre alınmış türde (*S. officinarum*) saptanmadığı belirtilmiştir. Bu sonuç *S. spontaneum* türünün autopoliploid olması ile açıklanmıştır (Zhang., 2017). Bunun dışında yonca (*Medicago sp.*) cinsi ve üç uzak akrabasında sentromer bölgesinde MtR3 adında satelit tekrar dizisi tespit edildiği belirtilmiş ve bu durum MtR3 dizisinin korunmuş bir yapıda olduğu şeklinde açıklanmaktadır (Yu vd., 2017). Pelemir (*C. syriaca*) kromozomları üzerinde tespit

edilen satelit tekrar dizileri Pelemir (*C. syriaca*) genom kompozisyonunun anlaşılmasına katkı sağlayacağı gibi *Cephalaria* türlerinde yapılacak çalışmalara da elde edilen tekrar elementlerinin sentromer bölgesinin fonksiyonları üzerine etkisi tartışılabilecektir.

Bir türün genom yapısının ve evrimsel gelişimin anlaşılması için öncelikle kromozom yapısının belirlenmesi gerekmektedir (Cuadrado vd., 2013). Kromozom yapılarının anlaşılmasında sitogenetik bir belirteç görevi üstlenen ribozomal DNA (rDNA)'lar türlerin birbirleriyle olan ilişkilerinin aydınlatılmasını sağlar ve onlar arasında karşılaştırmalı karyotip analizin yapılmasına imkan verir. Solanaceae familyasına ait *Cestrum* türlerinin kromozomlarının haritalanmasında (Fregonezi vd., 2006), *Hordeum murinum* alttürlerinin birbirleriyle olan ilişkilerinin saptanmasında (Cuadrado vd., 2013), Asteraceae familyasına ait *Artemisia* cinsi türlerinin fiziksel haritalanmasında (Hoshi vd., 2006) FISH kullanılarak elde edilen 45S ve 5S rDNA sinyallerinden yararlanıldığı belirtilmiştir. Bu çalışma içerisinde Pelemir (*C. syriaca*) bitkisinin homolog kromozom çiftlerinin doğru bir şekilde tespit edilmesini sağlamak amacıyla 45S rDNA ve 5S rDNA bölgeleri FISH aracılığıyla kromozomlar üzerinde saptanmıştır. 45S rDNA 3., 4. ve 5. kromozom çiftlerinin uzun kollarının uç kısımlarında olmak üzere toplamda altı sinyal tespit edilirken, 5S rDNA ise 1., 4. ve 5. kromozom çiftlerinin kısa kollarının sentromere yakın olan bölgelerinde altı sinyal gözlemlenmiştir. Pelemir (*C. syriaca*) kromozomları üzerinde yerleri ve sinyal sayıları tespit edilen rDNA'lar daha sonra çalışılabilecek *Cephalaria* cinsine ait türlerin filogenetik ilişkilerinin belirlenmesini sağlayabileceği gibi *Cephalaria* türlerinin ribozomal DNA bölgesinin evriminin anlaşılabilmesinde katkıda bulunabilecektir.

5.1 Sonuç

Pelemir (*C. syriaca*) genomunda bulunan tekrarlayan DNA elementlerinin tespitine yönelik yapılan bu çalışma içerisinde hem klasik dizileme metodu hem de yeni nesil dizileme teknikleri kullanılmış ve genomun ayrıntılı bir şekilde incelenmesi sağlanmıştır. İlk olarak DNA kütüphanesi klonlama yöntemi ile S8, S10 ve S11 isimli üç klon tespit edilmiştir. FISH tekniği kullanılarak bu klonların kromozom üzerindeki yerleri saptanmıştır. İkinci bir yöntem olarak yeni nesil dizileme sonucu elde edilen genom dizisi RepeatExplorer ve TAREAN biyoinformatik programları ile işlenmiştir.

Genomda bulunan satelit tekrar dizileri ve diğer tekrar sınıfları belirlenmiştir. Biyoinformatik programlardan elde edilen sonuçlara göre pelemir genomunun önemli bir kısmına LTR retroelementlerinin içinde bulunduğu retrotranspozonlar hakimdir. TAREAN programı kullanılarak tespit edilen satelit tekrarların kromozom üzerindeki yerleri FISH kullanılarak karakterize edilmiştir. *Cs150* adındaki satelit tekrar dizisinin kromozomların sentromer bölgesinde olduğu tespit edilirken, CL45 satelit tekrar elementinin ise 4 kromozom çiftinin sentromer bölgesinde ve 3 kromozom çiftinin subteler bölgesinde olduğu saptanmıştır. Son olarak Pelemir (*C. syriaca*) üzerinde rDNA'ların lokalizasyonları belirlenmiştir. 45S rDNA sinyalleri 3., 4. ve 5. kromozom çiftlerinin uç kısımlarında gözlemlenmiştir ve 5S rDNA sinyalleri 1., 4. ve 5. kromozom çiftlerinin perisentromerik bölgesinde tespit edilmiştir. Gözlemlenen rDNA sinyalleri pelemir kromozomlarının karyotip haritasının çıkarılmasına fayda sağlayacağı gibi *Cephalaria* cinsi ve Dipsacaceae familyasına ait türlerin genom yapılarının anlaşılmasında filogenetik ilişkinin oluşturulmasında katkı sağlayabilecektir.

Pelemir (*C. syriaca*) türü üzerine bugüne kadar yapılan sitogenetik çalışmaların sınırlı olması bu çalışmanın özgün değerini yansıtmaktadır. Bu çalışma sonucunda bu familya ile ilgili sentromerik tekrarlar ilk defa tespit edildi. Ayrıca rDNA ve satelit tekrarlar kullanılarak ilk defa bu tür üzerinde genom dinamiğine ışık tutacak bir şekilde haritalama yapıldı. Bunun dışında Dipsacaceae familyasındaki türler arasında ilk defa sentromer bölgesi tespit edilen tür olmuştur. Bu nedenle elde edilen veriler bu takson ile tüm genom özellikleri bakımından ilk bilgiyi oluşturmaktadır. Böylece ileri dönemde yapılacak çalışmalarda yol gösterici bir sığfata sahip olabileceğinden dolayı türün taksonomik bilgisinin araştırılmasında yararlı olabilecektir. ITS ve kloroplast markörlerini kullanarak Dipsacaceae türlerinin filogenetik ilişkisinin tanımlanmasına yönelik araştırmalar (Carlson vd., 2009) yapıldığı gibi Dipsacaceae and Morinaceae familyasının birbirlerine yakın akraba aileler olup oladığını anlamak ve iki familyanın Caprifoliaceae familyasının içerisinde yer alıp almadığını belirleme yönünde araştırmalar yapılarak filogenetik ve taksonomik ilişkileri belirlenmeye çalışılmıştır (Temsch ve Greilhuber, 2010). Bu tez çalışmasından elde edilen tekrarlayan DNA elementleri *C. syriaca* genomunun anlaşılmasında katkı sağladığı gibi bu elementlerin markör olarak kullanılması sonucunda filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde referans olabilecektir.

KAYNAKLAR

Adega, F., Guedes-Pinto, H. and Chaves, R., “Satellite DNA in the karyotype evolution of domestic animals- clinical considerations”, *Cytogenetic and Genome Research* 126, 12–20, 2009.

Aksoy, A., Erzurum ovasındaki buğday ve çavdar Tarlalarında bulunan yabancı otlar üzerinde fitososyolojik bir araştırma, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, s. 25, 1973.

Altunbaş, O., Pelemir bitkisinin pirolizi, Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya, s. 107, 2015.

Arslan, Y., Subaşı, I., Kodaş, R. ve Katar, D., “Farklı azot ve fosfor dozlarının kuru şartlarda yetiştirilen pelemir (*Cephalaria syriaca* L.) bitkisinin verim ve verim özellikleri üzerine etkisi”, *SDU Ziraat Fakültesi Dergisi* 9 (2), 33-41, 2014.

Avino, M., Tortoriello, G. and Caputo, P., “A phylogenetic analysis of Dipsacaceae based on four DNA regions”, *Plant Systematics and Evolution* 279, 69-86, 2009.

Baloch, F.S., Alsaleh, A., Saenz de Miera, L.E., Hatipoğlu, R., Çiftçi, V., Karaköy, T., Yıldız, M. and Özkan, H., “DNA based iPBS-retrotransposon markers for investigating the population structure of pea (*Pisum sativum*) germplasm from Turkey”, *Biochemical Systematics and Ecology* 61, 244-252, 2015.

Barghini, E., Natali, L., Cossu, R.M, Giordani, T., Pindo, M., Cattonaro, F., Scalabrin, S., Velasco, R., Morgante, M. and Cavallini, A., “The peculiar landscape of repetitive sequences in the olive (*Olea europaea* L.) genome”, *Genome Biology and Evolution* 6(4), 776–791, 2014.

Baydar, H. ve Turgut, I., “Yağlı tohumlu bitkilerde yağ asitleri kompozisyonunun bazı morfolojik ve fizyolojik özelliklere ve ekolojik bölgelere göre değişimi”, *Turkish*

Journal of Agriculture and Forestry 23,81-86, 1999.

Benelli, G., Benvenuti, S., Desneux, N. and Canale, A., “Cephalaria transsylvanica-based flower strips as potential food source for bees during dry periods in European Mediterranean basin countries”, *PLoS One* 9 (3), e93153, 2014.

Bennetzen, J.L., Ma, J. and Devos, K.M., “Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants”, *Annals of Botany* 95, 127–132, 2005.

Birchler, J.A. and Han, F., “Maize centromeres: structure, function, epigenetics”, *Annual Review of Genetics*, 43, 287–303, 2009.

Biscotti, M.A., Olmo, E. and Heslop-Harrison J.S. “Repetitive DNA in eukaryotic genomes”, *Chromosome Research* 23, 415–420, 2015a.

Biscotti, M.A., Canapa, A., Forconi, M., Olmo E. and Barucca, M., “Transcription of tandemly repetitive DNA: functional roles” *Chromosome Research* 23, 463-477, 2015b.

Boz, H. ve Karaoğlu, M.M. “Fırın ürünleri için doğal katkı maddeleri”, *Gıda Mühendisliği Dergisi* 35, 57-64, 2015.

Carlson, S.E., Mayer, V. and Donoghue, M.J., “Phylogenetic relationships, taxonomy, and morphological evolution in Dipsacaceae (Dipsacales) inferred by DNA sequence data”, *Taxon* 58(4), 1075-1091, 2009.

Carlson, S.E., Howarth, D.G. and Donoghue, M.J., “Diversification of CYCLOIDEA-like genes in Dipsacaceae (Dipsacales): Implications for the evolution of capitulum inflorescences”, *BMC Evolutionary Biology* 11, 325, 2011.

Charlesworth, B., Sniegowski, P. and Stephan, W., “The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes”, *Nature* 371, 215-220, 1994.

Cuadrado, A., Carmona, A. and Jouve, N., “Chromosomal characterization of the three

subgenomes in the polyploids of *Hordeum murinum* L.: New insight into the evolution of this complex”, *Plos One* 8(12), 2013.

Du, J. Tian, Z., Hans, C.S., Laten, H.M., Cannon, S.B., Jackson, S.A., Shoemaker, R.C. and Ma, J., “Evolutionary conservation, diversity and specificity of LTR-retrotransposons in flowering plants: insights from genome-wide analysis and multi-specific comparison”, *The Plant Journal* 63, 584–598, 2010.

Feng, R.J., Wang, X., Tao, M., Du, G. and Wang, Q., “Genome size and identification of abundant repetitive sequences in *Vallisneria spinulosa*”, *PeerJ* 5, e3982, 2017.

Fregonezi, J.N., Fernandes, T., Torezan, J.M.D., Vieira, A.O.S. and Vanzela, A.L.L., “Karyotype differentiation of four *Cestrum* species (*Solanaceae*) based on the physical mapping of repetitive DNA”, *Genetics and Molecular Biology* 29(1), 97-104, 2006.

Fu, D., Mason, A.S., Xiao, M. and Yan, H., “Effects of genome structure variation, homeologous genes and repetitive DNA on polyploid crop research in the age of genomics”, *Plant Science* 242, 37–46, 2016.

Galasso I., Schmidt, T., Pignone, D. and Heslop-Harrison, J.S., “The molecular cytogenetics of *Vigna unguiculata* (L.) Walp: the physical organization and characterization of 18s.5.8s-25s rRNA genes, 5S rRNA genes, telomere-like sequences, and a family of centromeric repetitive DNA sequences”, *Theoretical and Applied Genetics* 91, 928-935, 1995.

Galasso, I., Harrison, G.E., Pignone, D., Brandes, A. and Heslop-Harrison, J.S., “The distribution and organization of Ty1-*copia*-like retrotransposable elements in the genome of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (Cowpea) and its relatives”, *Annals of Botany* 80, 327-333, 1997.

Galasso, I., Schmidt, T. and Pignone, D., “Identification of *Lens culinaris* ssp. *culinaris* chromosomes by physical mapping of repetitive DNA sequences”, *Chromosome Research* 9, 199-209, 2001.

Galbraith, D.W., Harkins, K.R., Maddox, J.M., Ayres, N.M., Sharma, D.P. and Firoozabady, E., “Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues”, *Science* 220 (4601), 1049–1051, 1983.

Gebhardt, C., Schmidt, R., Schneider, K., “Plant genome analysis: The state of the art”, *International Review of Cytology* 247, 223-284, 2005.

Gerlach, W.L. and Bedbrook, J.R., “Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley”, *Nucleic Acids Research* 7(7), 1869-1885, 1979.

Gong, Z., Wu, Y., Koblízková, A., Torres, G.A., Wang, K., Iovene, M., Neumann, P., Zhang, W., Novák, P., Buell, C.R., Macas, J. and Jiang, J., “Repeatless and repeat-based centromeres in potato: Implications for centromere evolution”, *The Plant Cell*, 24, 3559–3574, 2012.

Gökalp, Ö., Mardin’de buğday ekim alanlarında sorun olan yabancı otlar ve buğday ürününe karışan yabancı ot tohumlarının belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, **Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Hatay, s. 26-58, 2015.

Göktürk, R.S., Sümbül, H., Celebi, A. and Açık, L., “Two new species of *Cephalaria* (Caprifoliaceae) from Turkey”, *Turkish Journal of Botany* 36, 311-321, 2012.

Göktürk, R.S. and Sümbül, H., “A taxonomic revision of the genus *Cephalaria* (Caprifoliaceae) in Turkey”, *Turkish Journal of Botany* 38, 927-968, 2014.

Gümüş, E., Makina öğrenme yöntemleriyle genom dizilim verilerinin analizi, Doktora Tezi, **İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, İstanbul, s. 107, 2013.

Harrison, G.E. and Heslop-Harrison, J.S., “Centromeric repetitive DNA sequences in the genus *Brassica*”, *Theoretical and Applied Genetics* 90, 157-165, 1995.

Heckmann, S., Macas, J., Kumke, K., Fuchs, J., Schubert, V., Ma, L., Novak, P., Neumann, P., Taudien, S., Platzer, M. and Houben, A., “The holocentric species *Luzula elegans* shows interplay between centromere and large-scale genome organization”, *The*

Plant Journal 73, 555–565, 2013.

Heitkam, T., Petrasch, S., Zakrzewski, F., Kögler, A., Wenke, T., Wanke, S., Schmidt, T., “Next-generation sequencing reveals differentially amplified tandem repeats as a major genome component of Northern Europe’s oldest *Camellia japonica*”, *Chromosome Research* 23, 791–806, 2015.

Hemleben, V., Lewekel, B., Roth, A. and Stadler, J., “Organization of highly repetitive satellite DNA of two Cucurbitaceae species (*Cucumis melo* and *Cucumis sativus*)”, *Nucleic Acids Research* 10(2), 631-644, 1982.

Heslop-Harrison, J.S. and Schmidt, T., “Plant nuclear genome composition”, *eLS*, 1-9, 2012.

Heslop-Harrison, J.S. and Schwarzacher, T., “Organisation of the plant genome in chromosomes”, *The Plant Journal* 66, 18–33, 2011.

Hidalgo, O., Pellicer, J., Christenhusz, M., Schneider, H., Leitch, A.R. and Leitch, I.J., “Is there an upper limit to genome size?”, *Trends in Plant Science* 22(7), 567-573 , 2017.

Hillis, D.M., and Dixon, M.T., “Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference”, *The Quarterly Review of Biology* 66 (4), 411-453 1991.

Hřibová, E., Neumann, P., Matsumoto, T., Roux, N., Macas, J. and Doležel, J., “Repetitive part of the banana (*Musa acuminata*) genome investigated by low-depth 454 sequencing”, *BMC Plant Biology* 204, 1-10, 2010.

Hoshi, Y., Matoba, H. and Kondo, K., “Physical mapping of ribosomal RNA genes in the genus *Artemisia* L. (Asteraceae)”, *Caryologia* 59, 312-318, 2006,

Iglesias, N. and Moazed, D., “Heterochromatin silencing repetitive DNA”, *eLIFE* 6, 1-4, 2017.

Iwata, A., Tek, A.L., Richard, M.M., Abernathy, B., Fonseca, A., Schmutz, J., Chen, N.W., Thareau, V., Magdelenat, G., Li, Y., Murata, M., Pedrosa-Harand, A., Geffroy, V., Nagaki, K. and Jackson, S.A., “Identification and characterization of functional centromeres of the common bean”, *Plant Journal* 76,47-60, 2013.

Iwata-Otsubo, I., Lin, J.Y., Gill, N. and Jackson, S.A., “Highly distinct chromosomal structures in cowpea (*Vigna unguiculata*), as revealed by molecular cytogenetic analysis”, *Chromosome Research* 24, 197–216, 2016.

Jabs, E.W. and Persicot, M.G., “Characterization of human centromeric regions of specific chromosomes by means of alphoid DNA sequences”, *The American Journal of Human Genetics* 41, 374-390, 1987.

Jakovljevic, K., Kuzmanovic, N., Vukojicic, S. and Lakusic, D., “Leaf anatomical variation in *Cephalaria laevigata* (DIPSACACEAE) under different ecological conditions”, *Archives of Biological Sciences* 66(1), 161-171. 2014.

Jiang, J., Nasuda, S., Dong, F., Scherrer, C.W., Woo, S.S., Wingi, R.A, Gill, B.S. and Ward, D.C., “A conserved repetitive DNA element located in the centromeres of cereal chromosomes”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 14210-14213, 1996.

Jiang, J., Birchler, J.A., Parrott, A.W. and Dawe, R.K., “A molecular view of plant centromeres”, *Trends in Plant Science* 8(12), 570-575, 2003.

Jong, J.J., Fransz, P. And Zabel, P., “High resolution FISH in plants – techniques and applications”, *Trends in Plant Science* 4(7), 258-263, 1999.

Karafiátová, M., Bartoš, J., Kopecký, D., Ma, L., Sato, K., Houben, A., Stein, N. and Doležel, J., “Mapping nonrecombining regions in barley using multicolor FISH”, *Chromosome Research* 21, 739–751, 2013.

Karaoğlu, M.M., “Effect of *Cephalaria syriaca* addition on rheological properties of composite flour”, *International Agrophysics* 26,387-393,2012.

Katar, D., Arslan, Y., Subaşı, I. and Kodaş, R., “The effect of different sowing dates on yield and yield components of *Cephalaria* (*Cephalaria syriaca*) under Ankara/Turkey ecological condition”, *Biological Diversity and Conservation* 5(3), 48-53, 2012.

Kato, A., Yakural, K. and Tanifuji, S., “Sequence analysis of Viciafaba repeated DNA, the FokI repeat element”, *Nucleic Acids Research* 12(16), 6415-6426, 1984.

Kayce, P. and Kırmızıgül, S., “Chemical constituents of two endemic *Cephalaria* species” *Records of Natural Products* 4(3), 141-148, 2010.

Kew Royal Botanic Gardens., “Plant DNA C-values Database”, <http://data.kew.org/cvalues/>, 10 ocak 2018.

Kew Royal Botanic Gardens., “Plant DNA C-values Database”, <http://data.kew.org/cvalues/CvalServlet?querytype=2>, 10 ocak 2018.

Kew Royal Botanic Gardens., “Plant DNA C-values Database”, <http://data.kew.org/cvalues/CvalServlet?querytype=2>, 10 ocak 2018.

Kırmızıgül, S., Sarıkahya, N.B., Sümbül, H., Göktürk, R.S., Yavaşoğlu, N.Ü.K., Pekmez, M. and Arda, N., “Fatty acid profile and biological data of four endemic *Cephalaria* species grown in Turkey”, *Records of Natural Products* 6(2), 151-155, 2012.

Kibar, U., Ankara üniversitesi biyoteknoloji enstitüsü EST (expressed sequence tag) koleksiyonlarından üzüm mikrosatellit lokuslarının tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, **Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü**, Ankara, s. 3-46, 2012.

Kobayashi, T., “Genome instability of repetitive sequence: Lesson from the ribosomal RNA gene repeat”, *DNA Replication, Recombination, and Repair* 10, 235-247, 2006.

Koukalowi, B., Reich, J., Matyasek, R., Kuhrovh, V. and Bezdek, M., “A *Bam*HI family of highly repeated dna sequences of *Nicotiana tabacum*”, *Theoretical and Applied Genetics* 78:77-80, 1989.

Kowar, T., Zakrzewski, F., Macas, J., Koblížková, A., Viehovec, P., Weisshaar, B. and Schmidt, T., “Repeat composition of CenH3-chromatin and H3K9me2-marked heterochromatin in Sugar Beet (*Beta vulgaris*)”, ***BMC Plant Biology*** 16, 1-16, 2016.

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.

Macas, J., Pozarkova, D., Navratilova, A., Nouzova, M. and Neumann, P., “Two new families of tandem repeats isolated from genus *Vicia* using genomic self-priming PCR”, ***Molecular and General Genetics MGG*** 263(5), 741-741, 2000.

Macas, J., Navratilova, A. and Meszaros, T., “Sequence subfamilies of satellite repeats related to rDNA intergenic spacer are differentially amplified on *Vicia sativa* chromosomes”, ***Chromosoma*** 112, 152–158, 2003.

Macas, J. and Neumann, P., “Ogre elements — A distinct group of plant Ty3/gypsy-like retrotransposons”, ***Gene*** 390, 108–116, 2006.

Macas, J., Neumann, P. and Navrátilová, A., “Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) genome: Comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Medicago truncatula*”, ***BMC Genomics*** 427 (8), 1-16, 2007.

Macas, J., Novák, P., Pellicer, J., Čížková, J., Koblížková, A., Neumann, P., Fuková, I., Doležel, J., Kelly, L.J. and Leitch, I.J., “In depth characterization of repetitive dna in 23 plant genomes reveals sources of genome size variation in the legume tribe Fabeae”, ***PLoS ONE*** 10(11), e0143424, 2015.

Maras, M., “An *ITS* DNA sequence-based phylogenic study of some *Heracleum* L (Umbelliferae) species from Turkey’s partial flora”, ***Türk Biyokimya Dergisi (Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem)*** 33(4), 163-168, 2008.

Maloy, S., Experimental techniques in bacterial genetics, ***Jones & Bartlett Learning***, ABD, 1990.

Marques, A., Ribeiro, T., Neumann, P., Macas, J., Novák, P., Schubert, V., Pellino, M., Fuchs, J., Ma, W., Kuhlmann, M., Brandt, R., Vanzela, A.L.L., Beseda, T., Simková, H., Pedrosa-Harand, A. and Houben, A., “Holocentromeres in Rhynchospora are associated with genome-wide centromere-specific repeat arrays interspersed among euchromatin”, *PNAS* 112(44), 13633-13638, 2015.

Mehrotra, S. and Goyal, V., “Repetitive sequences in plant nuclear DNA: Types, distribution, evolution and function”, *Genomics Proteomics Bioinformatics* 12, 164–171, 2014.

Michael, T.P. and Vanburen, R., “Progress, challenges and the future of crop genomes”, *Current Opinion in Plant Biology* 24:71–81, 2015.

Miron, J., Weinberg, Z.G., Chen, Y., Miron, D., Raviv, Y., Bloch, A., Yosef, E., Nikbahat, M., Zenou, A. and Daklo, M., “Novel use of the wild species *Cephalaria joppensis* for silage preparation and its nutritive value for feeding lactating dairy cows” *Journal of dairy science* 95, 4501-4509, 2012.

Neumann, P., Nouzová, M. and Macas, J., “Molecular and cytogenetic analysis of repetitive DNA in pea (*Pisum sativum* L.)”, *Genome* 44 716–728, 2001.

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.

Novak, P., Neumann, P., Pech, J., Steinhaisl, J. and Macas, J., “RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads”, *Bioinformatics* 29 (6), 792-793, 2013.

Novak, P., Robledillo, L.A., Koblizkova, A., Vrbova, I., Neumann, P. and Macas, J., “TAREAN: a computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads”, *Nucleic Acids Research*, 45(12), e111, 2017.

Ogunbayo, A.F., Analysis of nucleotide repeats at variation sites, Master Thesis, **Bioinformatics Institute of Biomedical Technology (IBT)**, University of Tampere, Finland, s. 8, 2012.

Ozkan, H., Tuna, M. and Arumuganathan, K., “Nonadditive changes in genome size during allopolyploidization in the wheat (*Aegilops-Triticum*) group”, **Journal of Heredity** 94(3), 260–264, 2003.

Öğüt, H., Oğuz, H., Bacak, S., Aydın, F., Uygun, S., Arslan, Y. ve Subaşı, İ., “Pelemir biyodizelinin teknik özelliklerinin incelenmesi”, **Enerji Tarımı ve Biyoyakıtlar 4. Ulusal Çalıştayı**, Samsun, 45-49, 2014.

Paço, A., Adegas, F., Mestrovic, N., Plohl, M. and Chaves, R., “Evolutionary Story of a Satellite DNA from *Phodopus sungorus* (Rodentia, Cricetidae)”, **Genome Biol. Evol.** 6(10), 2944–2955, 2014.

Pekcan Kaçar, E., Diyarbakır ili bağ üretim alanlarında sorun olan yabancı ot türlerinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, **Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Diyarbakır, s. 21-56, 2017.

Ramsay, L., Macaulay, M., Ivanissevich, S., MacLean, K., Cardle, L., Fuller, J., Edwards, K.J., Tuveesson, S., Morgante, M., Massari, A., Maestri, E., Marmiroli, N., Sjakste, T., Ganai, M., Powell, W. and Waugh, R., “A simple sequence repeat-based linkage map of barley”, **Genetics** 156, 1997–2005, 2000.

Ribeiro, T., Marques, A., Novák, P., Schubert V., Vanzela, A.L.L., Macas, J., Houben, A. and Pedrosa-Harand, A., “Centromeric and non-centromeric satellite DNA organisation differs in holocentric *Rhynchospora* species”, **Chromosoma** 126(2), 325-335, 2016.

Rosato, M., Álvarez, I., Feliner, G.N. and Rosselló, J.A., “Inter- and intraspecific hypervariability in interstitial telomeric-like repeats (TTTAGGG)_n in *Anacyclus* (Asteraceae)”, **Annals of Botany** 121 (6), 1163-1172, 2018.

Rossello, J.A., Cosín, R., Bacchetta, G., Brullo, S. and Mayol, M., “Nuclear and chloroplast DNA variation in *Cephalaria squamiflora* (Dipsacaceae), a disjunct Mediterranean species”, *Taxon* 58,1242-1253, 2009.

Sarıkahya, N.B., Pekmez, M., Arda, N., Kayce, P., Yavaşoglu N.Ü.K. and Kırmızıgül, S., “Isolation and characterization of biologically active glycosides from endemic *Cephalaria* species in Anatolia”, *Phytochemistry Letters* 4, 415-420, 2011.

Sarıkahya, N.B. and Kırmızıgül, S., “Novel biologically active glycosides from the aerial parts of *Cephalaria gazipashensis*”, *Turkish Journal of Chemistry* 36, 323-334, 2012.

Sarıkahya, N.B., Kayce, P., Tabanca, N., Estep, A.S., Becnel, J.J., Khan, I.A. and Kırmızıgül, S., “Toxicity of *Cephalaria* Species and their Individual Constituents against *Aedes aegypti*”, *Natural Product Communications* 10(7), 1195-1198, 2015.

Schmidt, T. ve Heslop-Harrison, J.S., “Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes”, *Trends In Plant Science* 3 (5), 195-199, 1998.

Schmidt, T., “LINEs, SINEs and repetitive DNA: non-LTR retrotransposons in plant genomes”, *Plant Molecular Biology* 40, 903–910, 1999.

Sharma, A. and Presting, G.G., “Centromeric retrotransposon lineages predate the maize/rice divergence and in abundance and activity”, *Molecular Genetics and Genomics* 279, 133–147, 2008.

Sharma, S. and Raina, S.N., “Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes”, *Cytogenetic and Genome Research* 109, 15–26, 2005.

Shaked, H., Kashkush, K., Ozkan, H., Feldman, M. and Levy, A.A., “Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible Responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat”, *The Plant Cell* 13, 1749–1759, 2001.

Singh, R.K., Mishra, G.K., Thakur, A.K. and Singh, S.B., “Molecular markers in plants”, **Molecular Plant Breeding: Principle, Method and Application** 2, 1-77, 2008.

Slamovits, C.H. and Rossi, M.S., “Satellite DNA: Agent of chromosomal evolution in mammals”, *Mastozoología Neotropical / J. Neotrop. Mammal* 9 (2), 297-308, 2002.

Soltis, D.E., Soltis, P.S., Bennett, M.D. and Leitch, I.J., “Evolution of genome size in the angiosperms”, *American Journal of Botany* 90(11), 1596–1603, 2003.

Song, Q.J., Shi, J.R., Singh, S., Fickus, E.W., Costa, J.M., Lewis, J., Gill, B.S., Ward, R. And Cregan, P.B., “Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat”, *Theoretical and Applied Genetics* 110, 550–560, 2005.

Steflova, P., Tokan, V., Vogel, I., Lexa, M., Macas, J., Novak, P., Hobza, R., Vyskot, B. and Kejnovsky, E., “Contrasting patterns of transposable element and satellite distribution on sex chromosomes (xy1y2) in the dioecious plant *Rumex acetosa*”, *Genome Biology and Evolution*. 5(4), 769–782, 2013.

Stupar, M.R., Song, J., Tek, A.L., Cheng, Z., Dong, F. and Jiang, J., “Highly condensed potato pericentromeric heterochromatin contains rDNA-related tandem repeats”, *Genetics* 162, 1435–1444, 2002.

Tang, S., Yu, J.K, Slabaugh, M.B., Shintani, D.K. and Knapp, S.J., “Simple sequence repeat map of the sunflower genome”, *Theoretical and Applied Genetics* 105, 1124–1136, 2002.

Temsch, E.M. and Greilhuber, J., “Genome size in Dipsacaceae and *Morina longifolia*(Morinaceae)”, *Plant Systematics and Evolution* 289, 45-56, 2010.

Tek, A.L. and Jiang, J., “The centromeric regions of potato chromosomes contain megabase-sized tandem arrays of telomere-similar sequence”, *Chromosoma*. 113, 77-83, 2004.

Tek, A.L., Song, J., Macas, J. and Jiang, J., “Sobo, a recently amplified satellite repeat of potato, and its implications for the origin of tandemly repeated sequences”, *Genetics* 170(3), 1231-1238, 2005.

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), 2010.

Tek, A.L., Kashihara, K., Murata, M. and Nagaki, K., “Identification of the centromere-specific histone H3 variant in *Lotus japonicus*”, *Gene* 538: 8-11, 2013.

Thomas, M.R., Matsumoto, S., Cain, P. and Scott, N.S., “Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification”, 86, 173-180, 1993.

Torres, G.A., Gong, Z., Iovene, M., Hirsch, C.D., Buell, C.R., Bryan, G.J., Novák, P., Macas, J. and Jiang, J., “Organization and evolution of subtelomeric satellite repeats in the potato genome”, *G3: Genes, Genomes, Genetics* 1, 85-92, 2011.

Turner, P.C., McLennan, A.G., Bates, A.D. and White, M.R.H., *Molecular Biology*, 2nd ed, Konuk, M., *BIOS*, New York 2000.

Tursun, N., Kantarcı, Z. ve Seyithanoğlu, M., “Kahramanmaraş'ta buğday ürününe karışan yabancı ot tohumlarının belirlenmesi”, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 9(2), 110-115, 2006.

TÜBİVES., “Türkiye Bitkiler Veri Servisi”, <http://www.tubives.com/index.php>, 18 Mart 2018.

USDA PLANTS Database., “United States Department of Agriculture Natural Resources Conservation Service”, <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=CESY>, 18 Mart 2018.

Uslu, E.Ş., Zayıf unların ekmeçlik kalitelerinin pelemir (*Cephalaria syriaca*) ekstraktı ilavesiyle geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, **Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, İstanbul, s. 85, 2016.

Verlaque, R., “Cytotaxonomical Studies in Some Iranian Dipsacaceae”, **Plant systematics and Evolution** 134, 33-52, 1980.

Vittorazzi, S.E., Lourenço, L.B. and Recco-Pimentel, S.M., “Long-time evolution and highly dynamic satellite DNA in leptodactylid and hylodid frogs”, **BMC Genetics** 15(111), 1-11, 2014.

Vu, G.T.H., Schmutzer, T., Bull, F., Cao, H.X., Fuchs, J., Tran, T.D., Jovtchev, G., Klaus, P., Stein, N., Pecinka, A., Neumann, P., Novak, P., Macas, J., Dear, P.H., Blattner, F.R., Scholz, U. and Schubert, I., “Comparative genome analysis reveals divergent genome size evolution in a *Carnivorous* plant genus”, **The Plant Genome** 8(3), 1-14, 2015.

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

Yazıcıoğlu, T., Karaalı, A. and Gökçen, J., “Cephalaria syriaca seed oil”, **Journal of the American Oil Chemists' Society** 55, 412-415, 1978.

Yıldırım, A. ve Ekim, T., “Orta anadolu bölgesi yabancı ot florası”, **Bitki Koruma Bülteni** 43 (1-4), 1-98, 2003.

Yorgancılar, M., Yakışır, E. Ve Tanur Erkoyuncu, M., “Moleküler Markörlerin Bitki Islahında Kullanımı”, **Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi Journal of Bahri Dagdas Crop Research** 4 (2), 1-12, 2015.

Yu, K., Park, S.J., Poysa, V. and Gepts, P., “Integration of simple sequence repeat (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)”, **The American Genetic Association** 91(6), 429-434, 2000.

Yu, F., Dou, Q., Liu, R. and Wang, H., “A conserved repetitive DNA element located in the centromeres of chromosomes in *Medicago* genus”, *Genes Genom* 39, 903-911, 2017.

Yunis, J.J. and Yasmineh, W.G., “Heterochromatin, satellite DNA, and cell function”, *Science* 174(4015), 1200-1209, 1971.

Zhang, W., Zuo, S., Li, Z., Meng, Z., Han, J., Song, J., Pan, Y.B. and Wang, K., “Isolation and characterization of centromeric repetitive DNA sequences in *Saccharum spontaneum*”, *Scientific Reports* 7, 1-12, 2017.



EK-A**Kimyasallar Listesi**

Kloroform	Sigma
İzoamilalkol	Merck
Etanol	Isolab
Taq DNA Polimeraz	Qiagen
Pgem-T Easy	Promega
Agaroz	AppliChem
İzoproponol	Merck
Glasial Asetik Asit	Tekkim
Gene Ruler	Thermo Fisher Scientific
Ampicillin sodium salt	Applichem
RNase A	Applichem
Blocking reagent	Roche
Tris, Trizma® base	Sigma
Yeast Extract granulated	Merck

ÖZ GEÇMİŞ

Sevim Döndü KARA 10.11.1994 tarihinde Adana'nın Seyhan ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Adana'da tamamladı. 2012 yılında kazandığı Çukurova Üniversitesi Tarla Bitkilerini Bölümü'nden Haziran 2016'da mezun oldu. Aynı yılın Eylül ayında Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknoloji Fakültesi Tarımsal Genetik Mühendisliği bölümünde yüksek lisans öğrenimine başladı. Yüksek lisans öğrenimi sırasında Almanya'da bulunan IPK Enstitüsünde 3 ay alanı ile ilgili eğitim aldı.



