



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

YABANI SOYA TÜRLERİNDE CenH3 GENİNİN cDNA MOLEKÜLER  
KLONLANMASI

HÜMEYRA YILDIZ

Haziran 2019



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

YABANI SOYA TÜRLERİNDE CenH3 GENİNİN cDNA MOLEKÜLER  
KLONLANMASI

HÜMEYRA YILDIZ

Yüksek Lisans Tezi

Danışman  
Doç. Dr. Ahmet Latif TEK

Haziran 2019

**Hümeyra YILDIZ** tarafından **Doç. Dr. Ahmet Latif TEK** danışmanlığında hazırlanan “**Yabani Soya Türlerinde CenH3 Geninin cDNA 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 : Prof. Dr. Mehmet Emin ÇALIŞKAN  
Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Tarımsal Genetik Mühendisliği

  
İmza

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

  
İmza

**ONAY:**

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

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

**Doç. Dr. Murat BARUT**  
**MÜDÜR**

## TEZ BİLDİRİMİ

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



İmza  
Hümevra YILDIZ

## ÖZET

### YABANI SOYA TÜRLERİNDE CenH3 GENİNİN cDNA MOLEKÜLER KLONLANMASI

YILDIZ, Hümevra

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Genetik Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Ahmet Latif TEK

Haziran 2019, 88 sayfa

Tüm ökaryotlarda yapısal ve işlevsel olarak korunmuş bulunan sentromer, kromozomların doğru bir şekilde dağılımından sorumludur. Ökaryot sentromerlerinde sentromerik histon H3 (CENH3) proteini işlevsel özelliği sağlamada yapısal bir işaret olarak kabul edilmektedir. CENH3 proteininin sentromerler üzerindeki önemi düşünüldüğünde, farklı soya türlerinde CenH3 geninin homologlarının moleküler yapısının kapsamlı olarak incelenmesine ihtiyaç vardır. Bu çalışmada soya ve yabancı soya türlerinde total RNA izolasyonu, ters transkriptaz yardımıyla cDNA sentezi, gene özel primerlerle genin çoğaltılması, DNA fragmentlerinin klonlanması ve dizilemesi yapılmıştır. CENH3 protein dizi bilgisinin biyoinformatik yöntemlerle karşılaştırmalı analizi yapılarak türlerarası aminiasit benzerlik ve farklılıkları tespit edilmiştir. Analiz sonucu CENH3a ve CENH3b olarak adlandırılan 2 farklı form tespit edilmiştir. İki formun çoklu nükleotid ve protein hizalaması sonucu benzerlik oranı %95-%92.7 olarak tespit edilmiştir. Biyoinformatik analizler sonucunda CENH3a formu CENH3b formuna kıyasla daha fazla pozitif seleksiyon göstermiştir. Çalışmamız yabancı soya türlerinde CenH3 geninin tespit edilmesine yönelik yapılan ilk kapsamlı çalışma olması nedeniyle diğer ökaryotik türlerdeki sentromer çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

*Anahtar Sözcükler:* Glycine, sentromerik histon H3 (CenH3), Histon H3, Sentromer, cDNA

## SUMMARY

cDNA MOLECULAR CLONNING OF CenH3 GENE IN WILD SOYBEAN SPECIES

YILDIZ, Hümeyra

Niğde Ömer Halisdemir University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Agricultural Genetic Engineering

Supervisor: Associate Prof. Dr. Ahmet Latif TEK

June 2019, 88 pages

The centromere is structurally and functionally conserved in all eukaryotes. It is responsible for the correct distribution of chromosomes. In eukaryotic centromere, centromeric histone H3 (CENH3) protein is considered a structural marker in providing functional property. Given the importance of CENH3 protein on centromeres, a detailed analysis of the molecular structure of the homologues of the CenH3 gene in different soybean species is needed. In this study, total RNA isolation, cDNA synthesis by reverse transcriptase, PCR amplification of gene with specific primers, cloning and sequencing of DNA fragments were performed in soybean and wild soybean species. The comparative analysis of CENH3 protein sequence information by bioinformatics methods revealed similarities and differences between the species. Two different forms named CENH3a and CENH3b were determined. As a result of multiple nucleotide and protein alignment of the two forms, the similarity rate was found to be 95-92%. As a result of bioinformatic analysis, CENH3a form showed more positive selection than CENH3b form. Since our study is the first comprehensive study to detect CenH3 gene in wild soybean species, it is thought to contribute to centromere studies in other eukaryotic species.

*Keywords:* *Glycine*, centromere spesific histone H3 (CenH3), Histone H3, centromere, cDNA

## ÖN SÖZ

Yükseköğrenimim sırasında ve bu tezin konusunun belirlenmesinde, laboratuvar çalışmalarımın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ahmet Latif TEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman benim yanımda olan maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen ve bugüne gelmemde de büyük payları olan, yaptığım her şeyin arkasında olan ve bana inanan babam Yücel YILDIZ'a ve annem Dönüş YILDIZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim sırasında vermiş oldukları öğrenim bursu için Ayhan Şahenk Vakfına, Ayhan Şahenk Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi ve emeği geçen herkese teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu 1180670 kodlu 1002 Hızlı Destek Projesi ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı TÜBİTAK kurumuna teşekkür ederim.

Öncelikle zorlu ve uzun bir tecrübe olan bitki yetiştirme aşamasında ve daha sonra laboratuvar çalışmalarım süresince gerek uygulamalarda gerekse psikolojik destekte bulunan saygıdeğer arkadaşım Bilge Şevval YILDIRIM'a teşekkürlerimi borç bilirim. Yine laboratuvar çalışmalarımında desteğini esirgemeyen Sevim Döndü KARA, Ainura ADYLBEK KYZY, Ainiwaer ZİNAİTİGULİ ve Gizem SUNKAR'a sonsuz teşekkür ederim.



## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
SUMMARY .....	v
ÖN SÖZ .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
SİMGE VE KISALTMALAR .....	xii
BÖLÜM I GİRİŞ .....	1
BÖLÜM II GENEL BİLGİLER .....	3
2.1 Dünyada ve Türkiye’de Soya Tarımı .....	3
2.2 Soya ve Yabani Türlerinin Taksonomisi ve Coğrafi Dağılımı .....	4
2.3 Soya ve Yabanilerinin Genom Dinamikleri .....	7
2.4 Kromatin ve Nükleozom Yapısı .....	10
2.5 Sentromer, Önemi ve Yapısal Özellikleri .....	13
2.6 Sentromerik Histon H3 (CenH3) Geni .....	13
2.6.1 CENH3 proteinin yapısal özellikleri .....	15
2.6.2 CenH3 geninin farklı organizmalarda isimlendirilmesi .....	15
2.6.3 CenH3 geninin varyantları ve kopya sayıları .....	17
2.6.4. Diploid ve allopoliploidlerde CENH3 proteininin pozitif seleksiyonu .....	18
2.7 Bitki Islahında CenH3 Geninin Yeri ve Önemi .....	20
2.8 Tez Çalışmasının Amacı ve Hedefleri .....	21
BÖLÜM III MATERYAL VE METOT .....	23
3.1 Materyal .....	23
3.1.1 Bitki materyali .....	23
3.2 Metod .....	24
3.2.1 RNA izolasyonu .....	24
3.2.2 Veritabanı taraması ve primer tasarımı .....	24
3.2.3 Tek iplik cDNA sentezi ve 5'-RACE PCR .....	25
3.2.4 cDNA ürünü PCR optimizasyonu .....	26
3.2.5 Agaroz jelden PCR ürününün saflaştırılması .....	26

3.2.6 Elektrokompotent hücre hazırlama .....	27
3.2.7 Ligasyon .....	27
3.2.8 Bakteriyel transformasyon .....	28
3.2.9 Klon seçimi ve koloni PCR .....	29
3.2.10 Dizi sonuçlarının biyoinformatik analizi .....	30
<b>BÖLÜM IV BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>32</b>
4.1 Soya ve Yabani Türlerinde CenH3 Geni cDNA Moleküler Klonlamasının İş Akışı	32
4.2 Soya ve Yabanilerinin Çimlendirilmesi ve Optimum Şartların Tespiti.....	33
4.3 RNA İzolasyonu .....	34
4.4 RNA Ürünlerinin Konsantrasyon Tayini .....	36
4.5 Soya ve Yabani Türlerinde CenH3 cDNA Sentezinin PCR Optimizasyonu.....	36
4.6 Bakteriyel Transformasyon.....	39
4.7 CenH3 cDNA Fragmentlerini İçeren Plazmitlerin Seçimi .....	39
4.8 Koloni PCR İle Pozitif CenH3 Kolonilerinin Seçimi .....	40
4.9 Pozitif Klonların Biyoinformatik Analizi .....	45
<b>BÖLÜM V SONUÇ.....</b>	<b>62</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>65</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>75</b>
<b>ÖZ GEÇMİŞ .....</b>	<b>87</b>
<b>TEZ ÇALIŞMASINDAN ÜRETİLEN ESERLER .....</b>	<b>88</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>Glycine max</i> türünün taksonomik açıdan genel gösterimi.....	5
Çizelge 2.2. Farklı organizmalarda CENH3 protein isimleri ve protein uzunlukları.....	16
Çizelge 3.1. <i>Glycine</i> ve yabancı Soja türlerinin genom sembolü, kromozom sayısı ve menşei dağılımı .....	23
Çizelge 3.2. cDNA ürününün çoğaltılması için tasarlanan primer setleri .....	26
Çizelge 3.3. M13 primer seti dizi bilgisi .....	30
Çizelge 4.1. Toplam RNA ürünlerinin konsantrasyonu .....	36
Çizelge 4.2. Dizilemeye gönderilen pozitif kolonilerinin adlandırılması.....	41
Çizelge 4.3. Soya ve yabancı türlerinde CENH3 formlarının isimlendirilmesi .....	46
Çizelge 4.4. Soya ve yabancı türlerinde tüm gen uzunluğu, N terminal ve HFD bölgesi için yapılan nükleotid hizasına göre benzerlik oranları.....	55
Çizelge 4.5. Soya ve yabancı türlerinde tüm gen uzunluğu, N terminal ve HFD bölgesi için yapılan protein hizasına göre benzerlik oranları .....	55
Çizelge 4.6. Soya ve yabancı türlerinde CENH3b protein formlarının Ka/Ks(w) oranı ..	55
Çizelge 4.7. Soya ve yabancı türlerinde CENH3a protein formlarının Ka/Ks(w) oranı ..	55

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Soya ve yabani türlerinin soy dağılımı .....	5
Şekil 2.2. <i>Glycine</i> ve <i>Soja</i> türlerinin dünya üzerindeki dağılımı .....	6
Şekil 2.3. Soyanın Türkiye üzerindeki dağılımı .....	7
Şekil 2.4. Yabani soya türlerinin kloroplast DNA'sına dayalı filogenetik analizi.....	9
Şekil 2.5. Nüklear rDNA ITS dizi hizalamalarına göre çok yıllık <i>Glycine</i> türleri arasındaki filogenetik ilişki .....	9
Şekil 2.6. Histon H3-D dizi hizalamalarına göre diploid çok yıllık <i>Glycine</i> türleri arasındaki filogenetik ilişki .....	10
Şekil 2.7. Üç boyutlu nükleozom yapısı .....	11
Şekil 2.8. Kromatin paketlenmesi.....	12
Şekil 2.9. Farklı organizmalarda histon H3 ve CENH3 proteininin sistematik hizalaması.....	14
Şekil 2.10. Sentromerik histon H3 (CENH3) proteinin yapısal özellikleri. ( $\alpha$ : alfa helix, L:ilmek (loop), CATD: CENP-A hedeflenmiş bölge, C: karboksi terminal ve N: amino terminal.....	15
Şekil 3.1. cDNA ürününün çoğaltılmasında kullanılan primer setinin CENH3 protein dizisi üzerinde gösterimi .....	25
Şekil 3.2. pGEM-T Easy vektör sistemi .....	28
Şekil 4.1. Soya ve yabani türlerinde CenH3 geni cDNA moleküler klonlanmasının iş akışı .....	32
Şekil 4.2. Yabani soya türlerinin yetiştirilme aşamaları. MS besiyerinde çimlendirme (a), filtre kağıdında çimlendirme (b, c), pamukta çimlendirme (d), toprakta yetiştirip fide haline getirme (e, f, g, h), çiçeklenme dönemi (i, j), olgunlaşma ve tohum eldesi.....	34
Şekil 4.3. Soya ve yabani türlerinde RNA izolasyonu agaroz jel görüntüsü.....	35
Şekil 4.4. <i>Glycine max</i> cDNA ürününün PCR optimizasyon jel görüntüsü. G. max cDNA ürünü 55 °C, 57 °C, 60 °C, 63 °C ve 65 °C sıcaklıklarında gradient PCR yapılmıştır .....	37

Şekil 4.5. Yabani soya türlerinde farklı sıcaklıklarda PCR optimizasyonu sonucu agaroz jel görüntüsü. a) <i>G. argyrea</i> , <i>G. clandestina</i> ve <i>G. latrobeana</i> PCR optimizasyonu. b) <i>G. soja</i> , <i>G. falcata</i> , <i>G. canencens</i> ve <i>G. latifolia</i> PCR optimizasyonu. c) <i>G. crytolaba</i> , <i>G. curvata</i> , <i>G. peratosa</i> , <i>G. pescadrensis</i> , <i>G. dolichocarpa</i> ve <i>G. tomentella</i> PCR optimizasyonu .....	38
Şekil 4.7. Agaroz jel elektroforezi kullanılarak cDNA içeren süpersarmal plazmitlerin görüntülenmesi. Dizilemeye gönderilecek plazmit DNA örnekleri yıldız ile işaretlenmiştir .....	40
Şekil 4.8. Yabani soya türlerinde pozitif klon seçimi. Gm2-Gm3-Gm4-Gm5-Gm7-Ltr1-Ltr3- Ltr6- Ltr8-Clan2- Clan3- Clan6- Clan7-Arg2- Arg7- Arg9- Arg10 dizileme için gönderilmiştir .....	42
Şekil 4.9. Yabani soya türlerinde pozitif klon seçimi. Pes1-Pes9-Pes10-Pes11-Can3-Can5-Can11-Can12-Fal3-Fal8-Fal3-1-Fal5-Cur1-Cur5-Cur8-Cur10 dizileme için gönderilmiştir .....	43
Şekil 4.10. Yabani soya türlerinde pozitif klon seçimi. Cry5-Cry6-Cry12-Cry12-1-Lati2-Lati4-Lati8-Lati9-Doli8-Doli9-Doli10-Doli12 dizileme için gönderilmiştir .....	44
Şekil 4.11. Yabani soya türlerinde pozitif klon seçimi. Tom4-Tom7-Tom9-Tom10-Per1-Per4-Per8-Per9-Soja3-1-Soja3-2-Soja3-3-Soja7 dizileme için gönderilmiştir .....	45
Şekil 4.12. Soya ve yabani türlerinde CenH3 çoklu nükleotid dizi kıyaslaması .....	48
Şekil 4.13. Soya ve yabani türlerinde CenH3b çoklu nükleotid dizi kıyaslaması .....	49
Şekil 4.14. Soya ve yabani türlerinde CenH3a formu çoklu nükleotid dizi kıyaslaması .....	50
Şekil 4.15. <i>Glycine max</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> CenH3 ve kanonikal histon H3 nükleotid kıyaslaması .....	51
Şekil 4.16. <i>Glycine max</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> CENH3 ve kanonikal histon H3 protein kıyaslaması .....	51
Şekil 4.17. Soya ve yabani türlerinde CENH3 toplu protein kıyaslaması .....	52
Şekil 4.18. Yabani soya türlerinde CENH3a formu çoklu protein kıyaslaması .....	53
Şekil 4.19. Yabani soya türlerinde CENH3b formu çoklu protein kıyaslaması .....	51
Şekil 4.20. Soya ve yabani türlerinde toplu CENH3a, CENH3b formu filogenetik analizi .....	56
Şekil 4.21. Soya ve yabani türlerinde CENH3a formlarının filogenetik analizi .....	57
Şekil 4.22. Soya ve yabani türlerinde CENH3a formlarının filogenetik analizi .....	58

## SİMGE VE KISALTMALAR

### Simgeler

%

°C

μ

μg

μm

μl

bç

dk

gr

kb

Mbp

M

mM

mg

ml

ng

pg

u

V

### Açıklamalar

Yüzde

Santigrat derece

Mikro

Mikrogram

Mikrometre

Mikrolitre

Baz çifti

Dakika

gram

kilobaz

Mega baz çifti

Molar

Milimolar

Miligram

Mililitre

nanogram

pikogram

ünite

Voltaj

### Kısaltmalar

CATD

cDNA

CENH3

DNA

ETOH

### Açıklamalar

CENP-A Hedflenmiş Bölge

Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit

Sentromerik Histon H3

Deoksiribo Nükleik Asit

Etanol

FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
HFD	Histon Katlı Bölge
H3	Histon3
ITS	İnternal Ara Bölgeler
NCBI	National Center For Biotechnological Information
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rDNA	Ribozomal Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	Ribo Nükleik Asit
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
USDA	Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu

# BÖLÜM I

## GİRİŞ

Hücre çekirdeğindeki haploid kromozom setini oluşturan DNA miktarının tamamına genom adı verilir ve her canlı türünde kendine özgüdür. Bu özgünlük sayesinde tür içinde ve türler arasındaki genetik ilişki tespit edilebilmektedir. Nesilden nesile genetik bilginin aktarılabilmesi için hücrenin kontrollü olarak bölünmesi ve genetik materyalin doğru olarak kopyalanması gerekmektedir. Yapısal ve işlevsel olarak özelleşmiş olan sentromer, bütün ökaryotlarda korunmuş olarak bulunan bölgedir. Ökaryotlardaki korunmuşluğun anahtar simgesi olan sentromerik histon H3 (CENH3) proteini, kromozom ayrışması ve kromatinin doğru bir şekilde biçimlendirilmesinden sorumlu sentromerin temel bir bileşenidir. Kromozom üzerinde iğ ipçiklerini ve kardeş kromatitleri bir arada tutarak hücre bölünmesinde kontrolü sağlamaktadır. Sentromer, korunmuş fonksiyonuna rağmen yapı, boyut ve kromozomdaki pozisyonu bakımından, türlere göre farklılık göstermektedir (Talbert vd., 2004; Tek vd., 2011). Bu sentromerik farklılıkların ve bunlarla ilişkili proteinlerin tanımlanması ve karakterize edilmesi, gen regülasyonunun mekanizmalarını anlamak için ilk adımdır ve gelecekte de ıslah programları için hedef olarak değerlendirilmektedir (Moraes vd., 2015).

Gen düzenlenmesi, belirli amino asitlerde meydana gelen ve kromatin düzenleyici enzimler tarafından eklenebilen veya çıkarılabilen kovalent modifikasyonlar ile gerçekleştirilmektedir. CENH3 proteini her ne kadar fonksiyonel olarak korunmuş olsada bazı yapısal farklılıklar ile ökaryotik organizmalarda ayırt edilebilmektedir. CENH3 proteini N terminal kuyruk bölgesi ve histon katlı bölgesi (HFD) veya C terminal çekirdeği olarak iki bölgeye ayrılmaktadır. N terminal bölgesi  $\alpha$ N sarmal yapısına sahiptir ve türden türe uzunluğu değişiklik göstermektedir. Bu yapısal farklılıklar tercihen N-terminal kuyruk bölgesinde meydana gelmektedir. Bu nedenle organizmalar arasında CenH3 geni uzunluğu değişiklik göstermektedir. C terminal bölgesi içerdiği HFD bölgesinden dolayı daha az değişkendir ve türlerde daha fazla korunmuştur.

*Leguminosae* ailesinin bir üyesi olan soya (*Glycine max*), besin içeriği, atmosferik azotu tutması ve farklı birçok alanda hammadde olarak kullanılabilir olması açısından dünya



üzerinde çok önemli bir kültür bitkisi. Soya tam genom dizisi bilinen ilk baklagil türü olmuştur (Schmutz vd., 2010). Progenitör *Glycine soja*, kültür formu *Glycine max*'a en yakın yabani tür olmakla birlikte, ilk genom dizisi bilinen yabani soya türüdür (Kim vd, 2010). Poliploidlerin araştırılması da dahil olmak üzere filogenetik ve genetik çeşitlilik çalışmalarında çeşitli *Glycine* türlerinden elde edilen farklı genomik bölgelere göre filogenetik analizler yapılmıştır. Bu tez çalışmasında ise farklı soya türlerinde sentromerik histon H3 protein dizisi esas alınarak filogenetik analizler yapılmıştır ve daha önce yapılan çalışmalar ile karşılaştırılmıştır.

Tek vd. (2010), kültüre alınmış soyada CenH3 geninin cDNA klonlayarak dizi ve protein analizi yapmıştır. Ayrıca sitogenetik çalışmalar ile sentromerde iki farklı tekrar dizisi ve bir retrotranspozon tespit etmiştir. Tespit edilen gen GmCenH3 olarak adlandırılmıştır. Bu yapılan çalışmanın devamı niteliğinde olarak, yabani soya türlerinde sentromer yapısı hakkında sınırlı bilgi bulunmasından dolayı CenH3 geni moleküler yapısının incelenmeye ihtiyacı vardır. Bu hedefe ulaşmak amacıyla bu tez çalışmasında farklı yabani soya türlerinde moleküler yöntemler kullanarak cDNA dizi bilgisi tespit edilerek CenH3 dizi bilgileri ile türler arasındaki filogenetik ilişkisi ve seleksiyon baskısı keşfedilecektir. *Secale*, *Triticum*, *Hordeum* gibi poliploid olan türlerde tespit edilen CENH3 formlarının yine poliploid yabani *Glycine* türlerinde tespit edilmesi olasıdır. Formlar arasındaki evrimsel anlamda korunmuşluk ve benzerliği çeşitli biyoinformatik analizlerle test edilebilecektir.

## BÖLÜM II

### GENEL BİLGİLER

#### 2.1 Dünyada ve Türkiye’de Soya Tarımı

Leguminosae ailesinin bir üyesi olan soya (*Glycine max*), besin içeriği, atmosferik azotu tutması ve farklı birçok alanda hammadde olarak kullanılabilir olması açısından dünya üzerinde çok önemli bir kültür bitkisidir. Soya; içerdiği değerli besin maddeleri nedeniyle “sarı altın” veya “ asrın harika bitkisi ” olarak bilinmektedir. Çok fazla yabani türe sahip olması nedeniyle geniş bir coğrafik dağılım göstermektedir.

Yağ, protein, karbonhidrat, vitaminler ve mineraller bakımından zengin bir içeriğe sahip olan soya tohumları, insan ve hayvan beslenmesinde önemli bir yere sahiptir (Wolf, 1970). Ayrıca baklagil bitkisi olması nedeniyle de toprağı azotça zenginleştirmekte ve toprağın verimliliğini uzun süre devam ettirebilmektedir. Köklerinde yaşayan *Rhizobium japonicum* bakterisi sayesinde havanın serbest azotunu toprağına bağlamaktadır. Bu sayede hem kendisinden sonra ekilecek bitkiye azotça zengin bir toprak bırakmakta, hem de kendi ihtiyacı olan azotu karşılamaktadır. Saplarının kolay parçalanabilirliği sayesinde, toprağın organik madde oranını arttırmaktadır. Soyanın ekim nöbetine dahil edilmesiyle, toprağın verimliliği uzun süre eksilmeden devam ettirilebilmektedir (Thomas ve Sprent, 1984; Hymowitz vd., 1972; Arıoğlu, 1983). Dünyadaki yağlı tohum üretimin yarısından fazlası, besin ve hayvan yemi proteinlerinin dörtte biri soyadan sağlanmaktadır (Wilson vd., 2008). Türkiye’de son yıllarda gıda sektöründe de tüketimi yaygınlaşmaya başlayan soya, ağırlıklı olarak yem sektöründe kullanılmaktadır (Arıoğlu, 2007). Soyanın çok geniş kullanım alanları bulunmaktadır. Bunlardan bazıları; soya unu, hamur işleri, soya ezmesi, hayvan yemi, özel diyet ürünleri, yeşil sebze ve kuru baklagil olarak sıralanabilir. Soya endüstriyel ürünlerin yapımında kullanılması bakımından endüstri bitkisi olma özelliği taşımaktadır. Soya, uluslararası ticaret pazarlarında pamuk, yerfıstığı, ayçiçeği, kolza, keten, susam, aspir gibi önemli yağ bitkileri arasında birinci sıradır. Soya tohumlarının içerdiği yağ (%18-22), doymamış yağ asidi (%85) oranı nedeniyle dünyadaki yağlı tohum üretimin yarısından fazlasını karşılamaktadır (Wilson, 2008; Anonim, 2017). Soya tohumu yağının %57’si ABD tarafından üretilmektedir. Son zamanlarda, soya gıdaları ve biyoaktif bileşikleri,

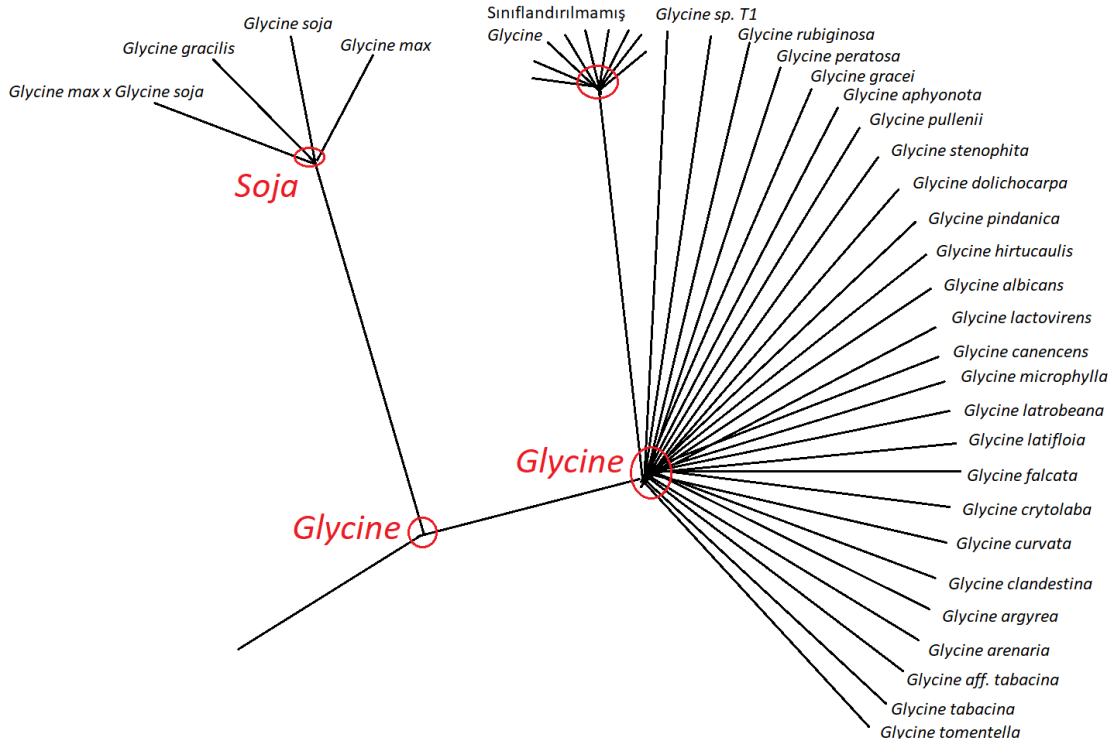
endometriyal, meme, prostat, kolon, akciğer ve mesane kanserleri de dahil olmak üzere birçok kanser ve kalp hastalığı riskini azaltarak insan sağlığı yararları nedeniyle dünya genelinde önemli ilgi görmektedir (Zhu vd., 2015). Soya proteini, çok değerli amino asitler içerdiğinden beslenme değeri oldukça yüksek olup, hayvansal proteinlere çok yakındır. Ayrıca %35-45 oranında protein içeren soya, bitkisel yağı tohumlarından ayrıldığında ekstraksiyonlardan kalan tohumlar kümes hayvanları ve süt hayvanları için küspe/yem olarak kullanılmaktadır (Yılmaz ve Efe, 1998).

## 2.2 Soya ve Yabani Türlerinin Taksonomisi ve Coğrafi Dağılımı

Leguminosae (Çizelge 2.1.) ailesinden olan soya (*Glycine*) cinsi, *Glycine* ve *Soja* altsınıflarına ayrılmaktadır. *Soja* altsinifında tek yıllık *Glycine max* ve yabani *Glycine soja* yer almaktadır. (Lackey, 1977). *Glycine soja*, soya ıslah programları için değerli bir genetik kaynağı temsil eden kültür formu *Glycine max*'ın progenitor yabani atası olarak kabul edilmektedir (Fukuda, 1933; Carter vd., 2004). Kültürü yapılan soya (*Glycine max*) tek yıllık otsu bir bitkidir. Bununla birlikte, yabani ve kültüre alınmış soya, çeşitli bitki morfolojik özelliklerine göre farklılık göstermektedir. Yabani soya, birçok yan dal ile salkım şeklinde büyürken, soyadaki fazla çiçek ve büyük sarı tohumlar yerine daha az çiçek ve daha küçük siyah tohumlar üretmektedir (Liu vd., 2007). Çiçekli bitkilerin ortak atası, şu anda varolan soyları üretebilmek için çeşitlendirilmeden önce tüm genom duplikasyonuna maruz kalmıştır (Jiao vd., 2011). Bu duplikasyonlar sonucu allopoliploid ve otopoliploid yabani soya türleri ortaya çıkmıştır. Poliploid *Glycine* türleri "tomentella kompleksi", "tabacina kompleksi" ve *G. hirticaulis* kompleksi olmak üzere üç ana gruptan oluşmaktadır. *Glycine* altsinifında çok yıllık olarak yaşayan 33 farklı yabani soya türü bulunmaktadır (Şekil 2.1) (USDA, 2010).

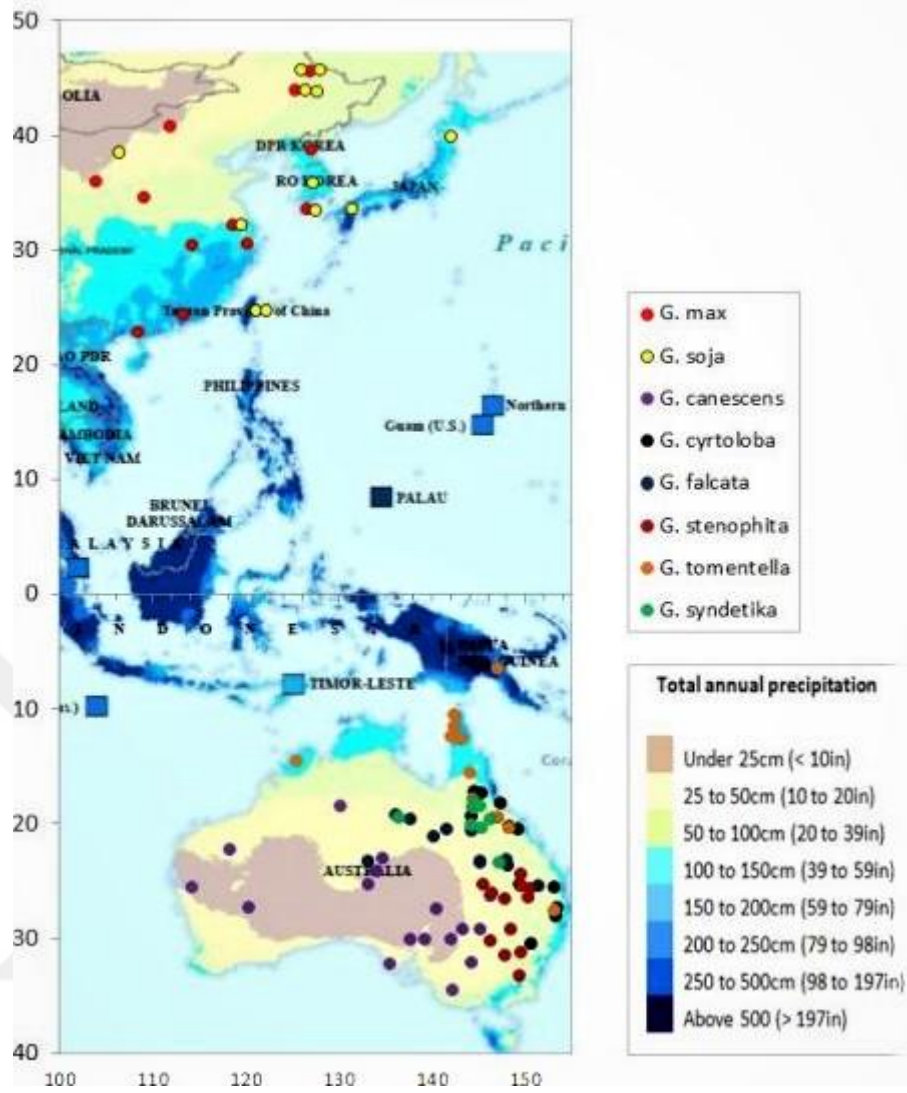
**Çizelge 2.1.** *Glycine max* türünün taksonomik açıdan genel gösterimi (USDA PLANTS Database, 2010)

Sınıf	Bilimsel adı
Kingdom (Alem)	<i>Plantae</i> (Bitkiler)
Subkingdom (Altalem)	<i>Tracheobionta</i> (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</i> – Dicotyledons (Çift çenekli bitkiler)
Subclass (Altsınıf)	<i>Rosidae</i>
Order (Takım)	<i>Fabales</i>
Family (Aile)	<i>Fabaceae/Leguminosae</i>
Genus (Cins)	<i>Glycine</i> Willd.
Species (Tür)	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.



**Şekil 2.1.** Soya ve yabancı türlerinin soy dağılımı (Anonim,2019b)

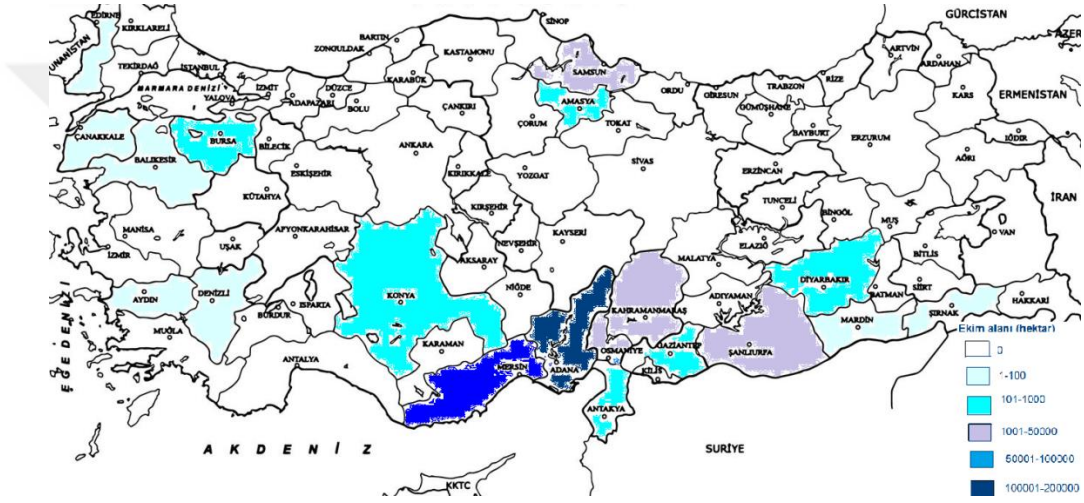
*Soja* altsınıfının temel iki türü olan *Glycine max* ve *Glycine soja*, Doğu Asya, Çin, Japonya, Kore, Hindistan ve Rusya'nın bir kısmında çokça üretimi yapılmaktadır (Şekil 2.2.). *Glycine* altsınıfına ait olan çok yıllık yabancı türleri genellikle Avustralya'nın farklı bölgelerinde doğal dağılım göstermektedir (Wilson, 2008; Badole vd., 2014)



Şekil 2.2. *Glycine* ve *Soja* türlerinin dünya üzerindeki dağılımı (Hwang vd., 2019)

Ülkemiz, soyanın yetişmesi için uygun ekolojiye sahip olmakla birlikte ilk yetiştiriciliğine 1940 yılının sonlarında Karadeniz Bölgesi'nde başlamıştır. Ardından Ege, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerimizde yetiştirme çalışmaları başlamıştır. Bu bölgelerde ikinci ürün olarak yetiştirilme şansına sahiptir. Soya tarımının 1980 yılında başlatılan ikinci ürün soya tarımını geliştirme projesi ile, özellikle Çukurova bölgesinde üretimi artmıştır. Ancak, 1987 yılında yıllık 250 bin ton soya üretimine ulaşılan ülkemizde, soya tarımı hızla gerilemeye başlamış ve 1994 yılında büyük tonaj kayıpları gerçekleşmiştir. Bu durum ihtiyacın çok gerisinde kalmaya neden olmuştur. Ülkemizi gerek soya yağı gerekse hayvan kütlesi ihtiyacı bakımından ithalata bağlı hale getirmiştir Bu nedenle soya üretimini arttırmak için teşvik çalışmaları yapılmıştır (Arioğlu, 2007).

Ülkemizde kültürü yapılan soya türünün ekolojiye uygun farklı çeşitleri geliştirilmiştir. Üretimi yapılan soya çeşitlerine örnek olarak Nova, Arısoy, Atakişi, Blaze, Bravo, Nazlıcan, Adasoy, Traksoy, Erensoy, Türksoy ve Sa.88 gibi çeşitler sayılabilmektedir (Anonim, 2019a). Ülkemizdeki iklim ve yetiştirme koşullarına göre farklı çeşitlerin yetiştirilmesi tercih edilebilmektedir. Ülkemizdeki soya üretiminin yaklaşık olarak %80'i Akdeniz bölgesinde Adana, Mersin, Osmaniye ve civarından sağlanmaktadır. Üretimde son verilere göre 177.830 dekar alan ile Adana birinci sıradadır (Şekil 2.3) (Anonim, 2018). TÜİK sonuçlarına göre 2004'ten bu yana artış gösteren soya ekim alanı ve üretiminde 2016'den itibaren bir düşüş gözlenmiştir (Anonim, 2018).



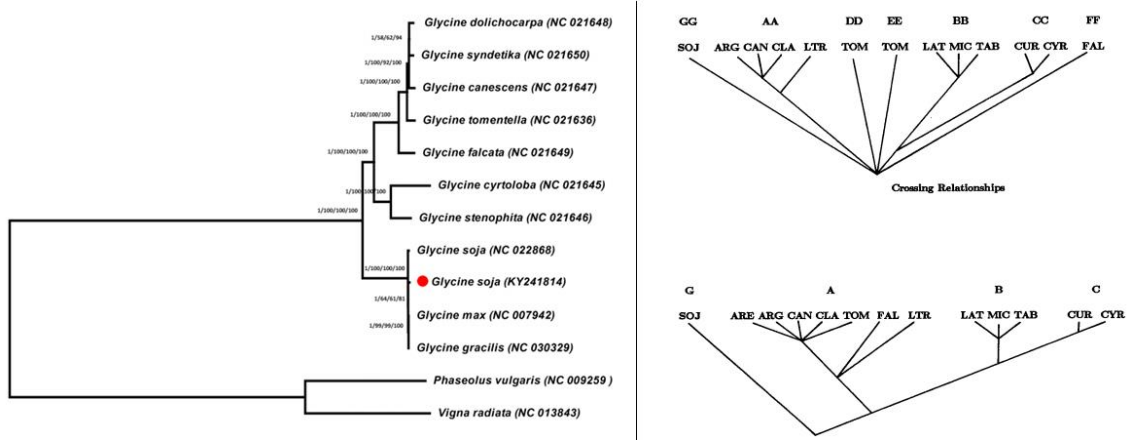
Şekil 2.3. Soyanın Türkiye üzerindeki dağılımı (Anonim, 2018)

### 2.3 Soya ve Yabanilerinin Genom Dinamikleri

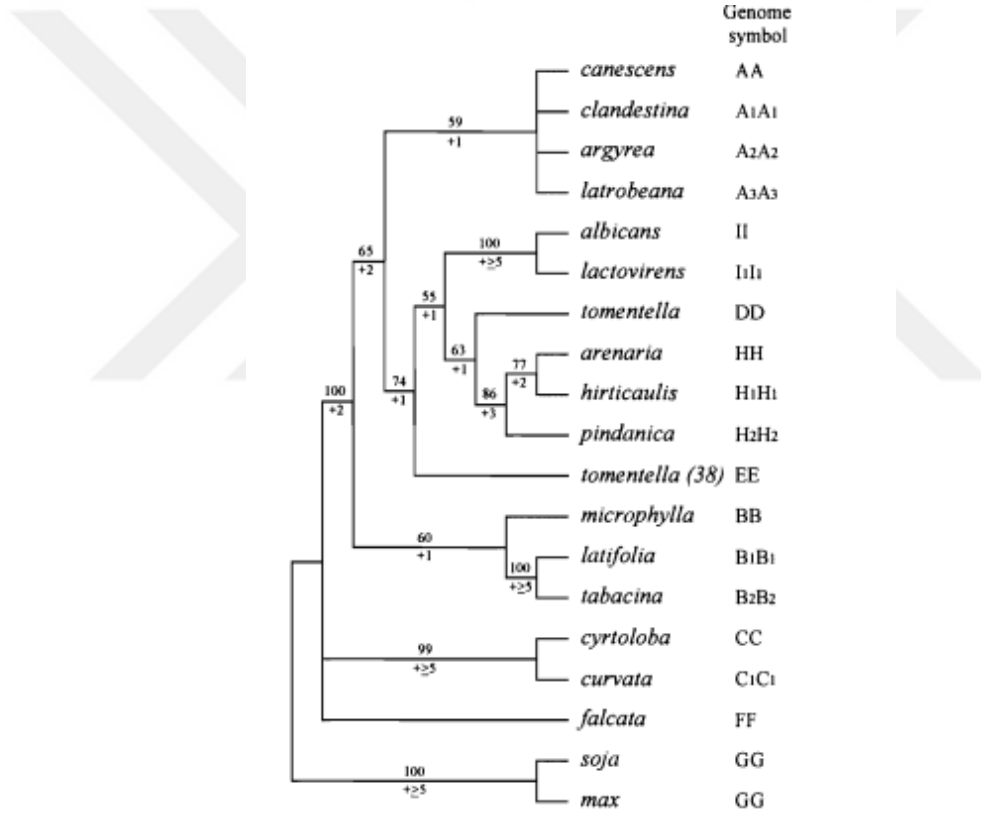
Soya ilk tam genom dizisi tespit edilen baklagil türü olması nedeniyle 20.000'den fazla baklagil türü için yapılacak olan genetik ve ıslah çalışmalarında önemli bir referanstır (Schmutz vd., 2010). Soya bitkisi diploid olup büyük ve karmaşık bir genoma (1,115 Mbp) sahiptir (Arumuganathan ve Earle, 1991). Soya genom dizilemesinin tamamlanması üzerine yabancı soya türlerinde de daha kapsamlı yeni çalışmalara başlanılmıştır. Kim ve ekibi tarafından 2010 yılında *Glycine soja*'nın genom dizilemesi yapılmıştır. Kültüre alınmış form olan soya ile *G. soja* arasında ITS (internal ara bölgeler) ve rDNA bölgelerine göre yaklaşık olarak %0.31 oranında farklılık olduğu rapor edilmiştir. (Kim vd., 2010).

Progenitör *Glycine soja*, kültüre alınmış *Glycine max*'ın en yakın akrabası olan yabancı türdür (Carter vd., 2004). *Glycine soja* ve *Glycine max*'ın her ikisi de ( $2n=2x=40$ ) kromozoma sahiptir ve kolayca melezlenebilmektedir.

Poliploidinin araştırılması da dahil olmak üzere filogenetik ve genetik çeşitlilik çalışmalarında çeşitli *Glycine* türlerinden elde edilen farklı genomik bölgelere göre filogenetik analizler yapılmıştır (Ratnaparkhe vd., 2011). Kollipara vd. (1997), tarafından izozim tekniği kullanılarak *Glycine* ve 16 farklı yabancı türü arasındaki filogenetik ilişkileri, ribozomal DNA'nın ITS bölgesindeki nükleotit dizi varyasyonundan saptanmıştır (Şekil 2.5.). Sonuç olarak bu türlerde bulunan yedi genom grubu belirlenmiş ve bunlar A'dan G'ye kadar harflerle gösterilmiştir (Hymowitz ve Singh, 1985; Hymowitz vd., 1998). İzozimler ve H3-D filogenetik analizleri, türlerin sınıflandırılmış genom gruplarına ek olarak H ve I genom gruplarının tasarlanmasında öncü olmuştur (Şekil 2.6.) (Hymowitz vd., 1998; Doyle vd., 1999). Doyle vd. (1990), çok yıllık *Glycine* türleri içerisinde DNA-kloroplast arasındaki varyasyonları belirleyerek filogenetik olarak farklı derecelerde akrabalık ilişkisi gösteren üç ana dal tanımlamıştır (Şekil 2.4.). Elde edilen filogenetik ile genomlar arasında gruplaşma olduğu belirlenmiştir fakat tam olarak anlamlandırılmamıştır (Doyle vd., 1990). Günümüzde *Glycine* türleri için kloroplast DNA esas alınarak yapılmış filogenetik ağaçlarda genom gruplandırılması tam olarak belirlenmiştir (Asaf vd., 2017). Bununla birlikte günümüzde yapılan araştırmalara göre, çeşitli genom gruplarının kloroplast DNA ve filogenileri arasındaki uyumsuzluğu ortaya konulmuştur. H3D genine dayalı filogeniye göre en belirgin uyumsuzluk F-genom grubundaki tek tür olan *G. falcata*'dadır (González-Orozco vd., 2012). *G. falcata* diğer tüm çok yıllık türlerden ayrı bir dal oluşturmuştur. Asaf vd. (2017)'nin yaptığı çalışmaya göre kloroplast DNA bazlı filogenetik ağaçta, *G. falcata*'nın A-genom grubuna ait türler ile aynı dala yerleştiği tespit edilmiştir (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Yabani soya türlerinin kloroplast DNA'sına dayalı filogenetik analizi (Asaf vd., 2017, Doyle vd., 1990).

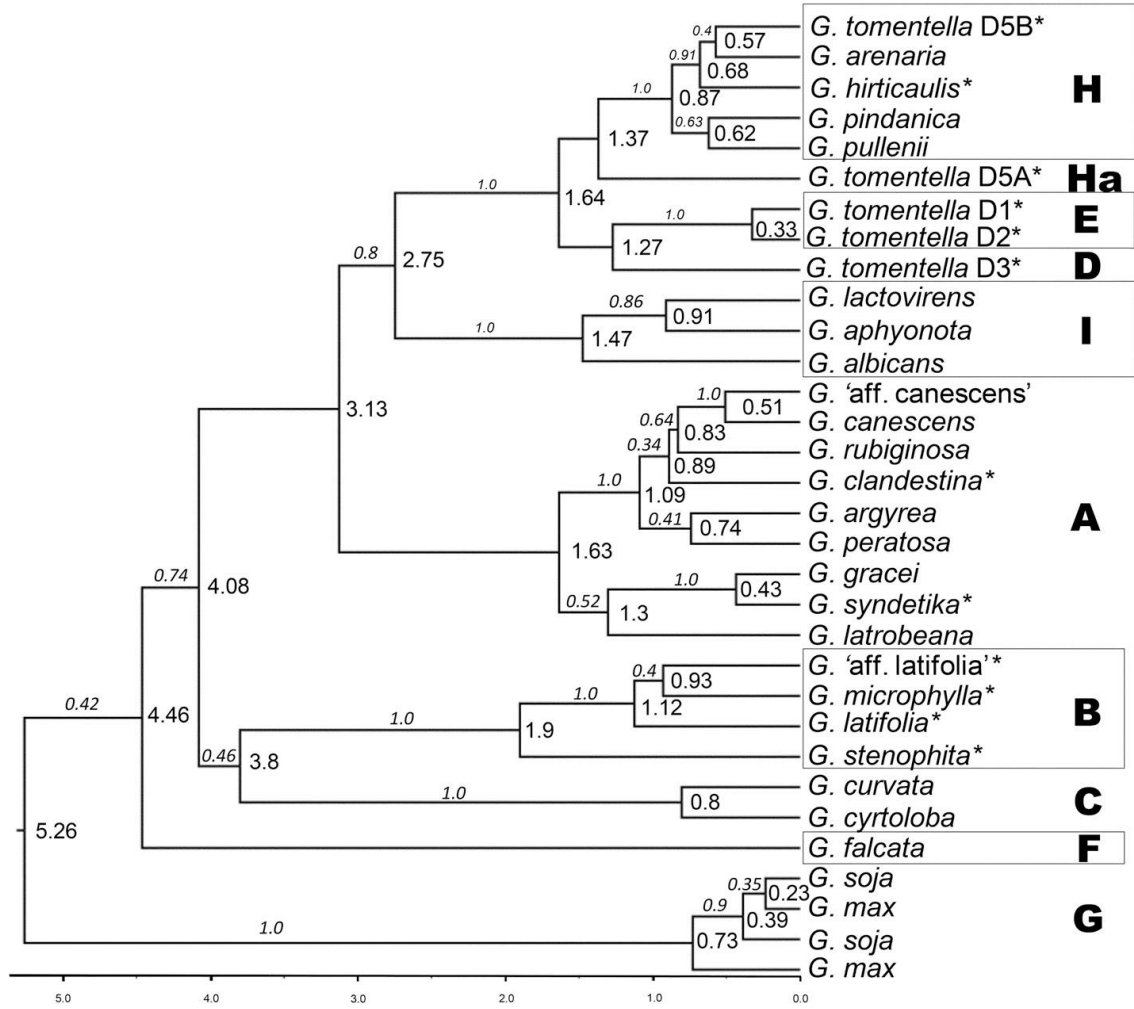


Şekil 2.5. Nükleer rDNA ITS dizi hizalamalarına göre çok yıllık Glycine türleri arasındaki filogenetik ilişki (Kollipara vd., 1997).

Avustralya'daki *Glycine* çeşitliliğinin analizi ve evrimsel olarak genomdaki sapmaları tespit edebilmek amacıyla histon H3D dizilerinin filogenetik analizi yapılmıştır (González-Orozco vd., 2012). Sonuç olarak *Glycine* türlerinde 10 farklı harf ile genom grup farklılıkları ortaya koyulmuştur.



Hwang vd. (2019) tarafından, 76 ortolog gen setine dayanan 8 farklı çok yıllık *Glycine* türünün ortalama genetik çeşitliliği ve filogenetik analizi yapılarak türler arasındaki akrabalık ilişkisi ortaya koyulmuştur. Sonuçlara göre, *G. canescens* en yüksek nükleotid çeşitliliği göstermiştir. *Glycine* türlerinin filogenetik analizi sonucu, *G. cyrtoloba* ve *G. stenophita* dışında diğer türler daha önceki literatürde belirlenen genom grupları ile benzer dağılım göstermiştir. Bunu takiben, *G. falcata*, *G. max*'tan en uzak olan tür olarak belirlenmiştir, ardından *G. cyrtoloba*, *G. syndetika*, *G. tomentella* D3, *G. stenophita* ve *G. canescens* takip etmiştir.

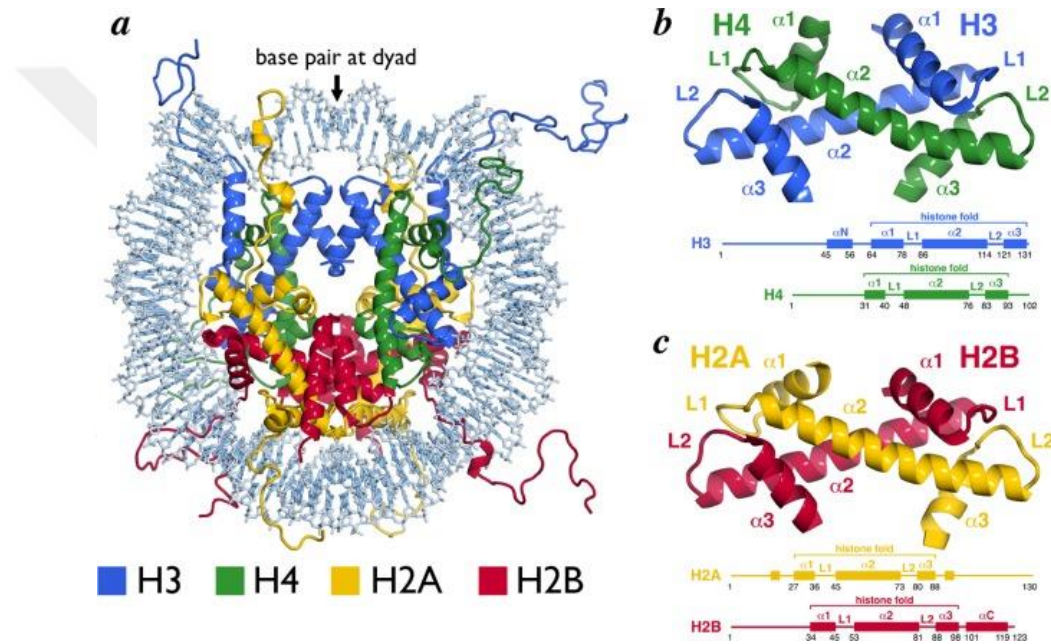


Şekil 2.6. Histon H3-D dizi hizalamalarına göre diploid çok yıllık *Glycine* türleri arasındaki filogenetik ilişki (González-Orozco vd., 2012)

## 2.4 Kromatin ve Nükleozom Yapısı

Ökaryotların DNA'sı ile histon ve histon olmayan proteinlerin bir araya gelmesiyle kromatin adı verilen oldukça dinamik bir kompleks oluşmaktadır (Şekil 2.8.). Kromatin,

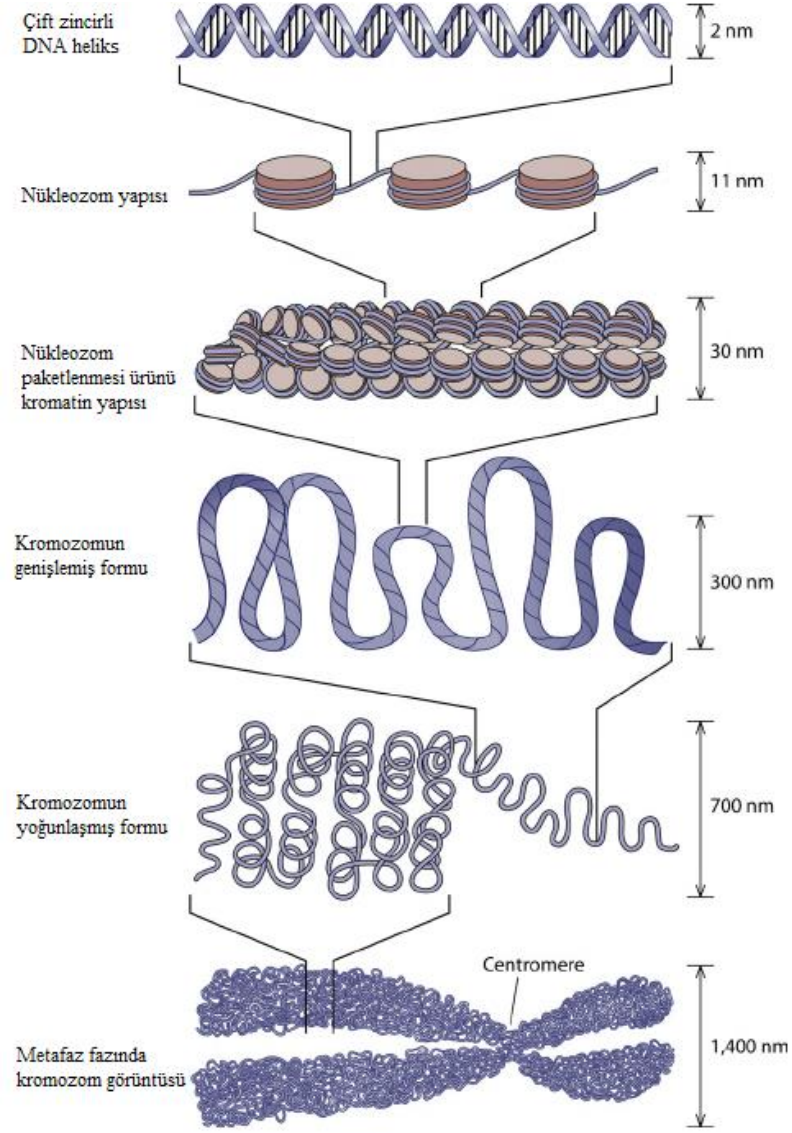
histon proteinlerinin oluşturduğu oktomerik nükleozomlardan meydana gelmektedir. Nükleozomda ikişer adet bulunan oktomer yapıdaki H2A, H2B, H3 ve H4 histon proteinleri etrafına DNA çift ipliğinin sarılmasıyla oluşan yaklaşık 11 nm çapa sahip bir protein kompleksidir (Şekil 2.7.). Nükleozomlar, en düşük seviyedeki yoğunlaşmış kromatin yapısını oluşturmak üzere bağlayıcı histon H1 proteini ile birbirine bağlanmaktadır. Kromatinin yüksek derecede yoğunlaşmış olduğu koyu renkli inaktif bölgeler heterokromatin olarak adlandırılmaktadır. Buna karşılık kromatin iplikçiklerin daha dağınık olduğu ve gen anlatımının aktif olduğu bölgeye ise ökromatin adı verilmektedir (Maeshima vd., 2014; Moraes vd., 2015; Luger ve Richmond, 1998).



Şekil 2.7. Üç boyutlu nükleozom yapısı (McGinty ve Tan, 2014)

Histon proteinleri, kromozomun en temel düzeydeki yapısal düzenlenmesinden sorumlu yüksek oranda korunmuş ökaryotik proteinlerdir. Bazı yapıya sahip proteinler olduğu için asidik özellikteki DNA molekülüne sıkı şekilde bağlanır. Histon H3, asetillenme, metillenme, fosforillenme gibi değişken modifikasyonlara uğramaktadır. Bu modifikasyonların ve bunlarla ilişkili proteinlerin tanımlanması ve karakterize edilmesi, gen regülasyonunun mekanizmalarını anlamak için ilk adımdır ve ıslah programları için hedef olarak değerlendirilmektedir (Moraes vd., 2015). Gen düzenlenmesi, seçici amino asitlerde meydana gelen ve kromatin düzenleyici enzimler tarafından eklenebilen veya çıkarılabilen kovalent modifikasyonlar ile gerçekleştirilir. Histonların bu translasyon sonrası modifikasyonları tercihen N-terminal kuyruklarında meydana gelir. Bunlar

çoğunlukla lizin ve arjininin metilasyonunu; lizinin asetilasyonu; ve serin, treonin ve tirozin fosforilasyonu şeklinde gerçekleşmektedir. Bu modifikasyonlar histon kodu olarak tanımlanmaktadır (Jenuwein ve Allis, 2001).



**Şekil 2.8.** Kromatin paketlenmesi (Jansen ve Verstrepen, 2011)

Kanonikal histon formlarının yerini alan çeşitli histon varyantları tespit edilmiştir. Örneğin, sentromerik histon H3 (CENH3), sentromerik kromatindeki histon H3 proteininin yerini alır. Diğer H3 varyantları H3.1, H3.2, H3.3'tür. Bu histon varyantları dizi olarak korunmuştur ancak yüksek benzerlik oranına rağmen farklı fonksiyonlarda rol oynamaktadırlar. Örneğin, CENH3'ün fosforilasyonu, kinetokor bağlanmasında ve kontrollü kromozom ayırımında önemli rol oynamaktadır (Ahmad ve Henikoff, 2000).

## 2.5 Sentromer, Önemi ve Yapısal Özellikleri

Sentromer, bütün ökaryotlarda korunmuş olarak varolan yapısal ve işlevsel olarak özelleşmiş bölgedir. Kromozom üzerinde iğ ipçiklerini ve kardeş kromatitleri bir arada tutarak hücre bölünmesinde kontrolü sağlamaktadır. Sentromerlerin yapısı, boyutu ve dağılımı, korunmuş fonksiyonuna rağmen türlere göre farklılık göstermektedir (Talbert vd., 2004; Tek vd., 2011). En basit sentromerler, tomurcuklanan mayalarda bulunan ve tek bir nükleozom içinde bulunan ve yaklaşık 125 bç DNA parçasından oluşan “nokta” sentromerlerdir (Meluh vd., 1998). Tüm çok hücreli türler de dahil olmak üzere çoğu ökaryotik organizmalar birkaç 100 kb’a kadar değişen uzunluklarda, “bölgesel” sentromerler olarak adlandırılan çok daha uzun DNA parçalarından oluşan sentromerleri içerir. Sitolojik olarak, sentromerler somatik metafaz kromozomları üzerindeki birincil boğumlar olarak görülmektedir. Moleküler olarak sentromerler, kanonikal histon H3’ün sentromerik histon H3 varyantı ile değiştirildiği kromozomal alan olarak tanımlanabilir (Henikoff vd., 2001; Hirsh ve Jiang, 2012).

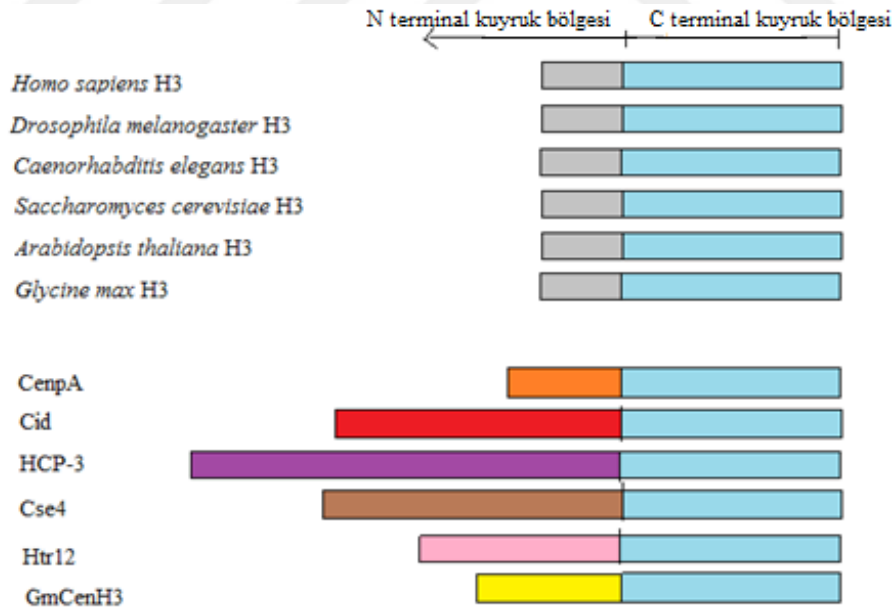
Sentromer, genom projelerinde sıklıkla tanımlanamayan bir kromozomal lokustur. Ökaryotik canlılarda sentromerler, geniş aralıklı satellit DNA ve retrotranspozonların art arda tekrarlanan dizilerini içerir (Gent vd., 2011; Verdaasdonk ve Bloom, 2011). Tekrar DNA elementlerinin en önemli görevi, sentromerlerle ilişkili büyük heterokromatik alanları muhafaza etmektir (Malik ve Henikoff, 2009; Black ve Cleveland, 2011). Yüksek oranda homojenize tekrarlayan DNA dizilerinden oluşan bu uzun dizi bölgeleri mevcut klonlama ve dizileme teknolojileri kullanılarak kolayca klonlanamaz, dizilenemez ve birleştirilemez (Hirsh ve Jiang, 2012).

## 2.6 Sentromerik Histon H3 (CenH3) Geni

Sentromerik histon H3 (CENH3) proteini, bütün ökaryotlarda kromozom ayrışması ve kromatinin doğru bir şekilde biçimlendirilmesinden sorumlu sentromerin temel bir bileşenidir. CENH3 proteininin kromozom üzerinde bulunduğu nokta, aktif sentromerlerin kinetokor kompleksi için bağlanma bölgesidir. Mantar, bitki ve hayvanlarda sentromerleri karakterize etmek için sentromerik histon H3 (CENH3) proteininin varlığından yararlanır. Histon geninin transkripsiyonunda, translasyonunda ve modifikasyonunda meydana gelen herhangi bir hata CenH3 kromatininin oluşmasını

etkileyebilir ve dolayısıyla sentromer kimliğinin değişmesine veya yok olmasına neden olabilmektedir. Kanonikal histonların aksine, CenH3 geni hızla evrimleşmekte ve bazı türlerde adaptif evrimin izlerini göstermektedir (Henikoff vd., 2001).

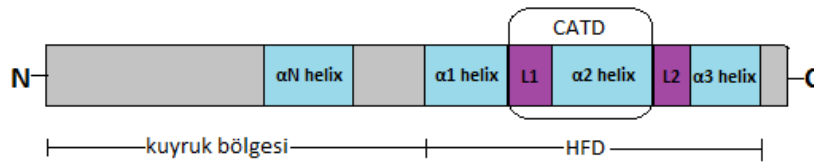
Tek vd. (2010), yaptıkları bir çalışmada kanonikal histon H3 ve CENH3 proteinlerini karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak *Arabidopsis thaliana* H3 (AtH3)-136 aminoasit, *Glycine max* CENH3 (GmCENH3)-158 aminoaside sahiptir (N terminal uç daha farklı ve uzundur). Histon katlı bölge (HFD)'de loop1 bölgesi CENH3 proteininde (8 aminoasit) H3 proteinine (7 aminoasit) kıyasla 1 amino asit daha uzundur. AtH3'de korunmuş glutamin GmCENH3'de izolosin ile yer değiştirmektedir. CENH3 proteini, standart olmayan bir NH2-terminal kuyruğu, daha farklı bir çekirdek histon katlaması ve biraz daha uzun bir loop1 bölgesi içermesi bakımından kanonikal histon H3 proteininden ayrılmaktadır (Şekil 2.9.). Kanonikal histon H3 proteini evrimsel olarak benzer ve korunmuş olmasına rağmen, sentromerik histonlar birbirinden farklıdır. Bu farklılığın temel sebebi ökaryotik genomların en hızlı gelişen bileşenleri olan satelit tekrarlarından oluşuyor olmasıdır (Henikoff vd., 2001).



**Şekil 2.9.** Farklı organizmalarda histon H3 ve CENH3 proteininin sistematik hizalaması (Henikoff vd., 2001 makalesinden uyarlanmıştır.)

### 2.6.1 CENH3 proteinin yapısal özellikleri

Bazı organizmalarda CENH3 protein dizilerinin karşılaştırılması bazı yapısal özellikleri ortaya koymuştur. CENH3 proteini N terminal kuyruk bölgesi ve histon katlı bölge (HFD) veya C terminal çekirdeği olarak iki ayrı bölgeye ayrılmaktadır (Şekil 2.10.). N terminal bölgesi  $\alpha$ N sarmal yapısına sahiptir ve türden türe uzunluğu değişiklik göstermektedir. Bu nedenle organizmalar arasında CenH3 geni büyüklüğü değişmektedir. C terminal bölgesi içerdiği HFD bölgesinden dolayı daha az değişkendir. HFD yapısı türler arasında korunmuş bir yapı olup 3 adet  $\alpha$  sarmal ve 2 loop bölge içermektedir. Loop1 ve  $\alpha$ 2 sarmal bölgesi HFD' nin sentromere hedeflenmesinden sorumludur. Bu nedenle bu bölge CATD (CENP-A hedeflenmiş bölge) olarak adlandırılmaktadır. Bu bölge, nükleozom oluşumundan önce ve sonra moleküler tanıma olaylarına aracılık eder. Bu sebeple CENH3 proteininin sentromerik DNA'ya, CENH3'e özgü şaperonlara ve CENH3-stabilize edici faktörlere bağlanması için önemlidir (Black vd., 2004).



**Şekil 2.10.** Sentromerik histon H3 (CENH3) proteinin yapısal özellikleri. ( $\alpha$ : alfa helix, L:ilmek (loop), CATD: CENP-A hedeflenmiş bölge, C: karboksil terminal ve N: amino terminal (Watts vd., 2016 makalesinden uyarlanmıştır).)

### 2.6.2 CenH3 geninin farklı organizmalarda isimlendirilmesi

Sentromerik proteinlerin ilk seti otoimmün hasta insandan elde edilen serumda tanımlanan CENP-A (sentromerik protein A), CENP-B ve CENP-C olarak adlandırılan türlerden CENP-A proteini olarak saflaştırılmıştır ve akabinde sentromerik histon proteini olduğu keşfedilmiştir (Palmer vd., 1987, 1991). Farklı organizmalarda CENH3'nin ortologları farklı isimlerle bilinmektedir (Çizelge 2.2.). *Saccharomyces cerevisiae*'de Cse4 (Meluh vd., 1998), *Caenorhabditis elegans*'da HCP-3 proteinleri (Buchwitz vd., 1999), *Arabidopsis thaliana*'da HTR12 (Talbert vd., 2002) ve *Drosophila melanogaster*'da bulunan Cid genleri (Henikoff vd., 2000) CenH3 geninin farklı organizmalardaki homologlarına örnektir.

Model bir baklagil türü olan *Lotus japonicus*' da sentromer yapısı hakkında sınırlı bilgi olması sebebiyle incelenme gereği duyulmuştur. Sentromerik histon H3 geni karakterize edilmiştir ve LjCenH3 (159 aa) olarak isimlendirilmiştir. İmmünofloresans yöntemi kullanılarak *Lotus japonicus*' daki LjCenH3 proteinlerinin sentromerik pozisyonu ortaya koyulmuştur (Tek vd., 2014).

Sentromerler, içerdiği satellit tekrarları nedeniyle takson içindeki türler arasında önemli ölçüde değişkenlik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda *Triticum urartu*'da H $\alpha$ CENH3, *Hordeum vulgare*'de H $\nu$  $\beta$ CENH3, *Secale cereale*'de  $\alpha$ CENH3 ve  $\beta$ CENH3 olarak adlandırılan iki farklı protein formu tespit edilmiştir (Evtushenko vd., 2017). Bu formlar CENH3'ün uzunluk ve amin oasit dizisi bakımından farklılık gösteren N terminal ve genellikle korunmuş bir histon katlanma bölgelerinde (HFD: histon fold domain) bulunur. HFD sentromer özgünlüğünü sağlar ve bu özgünlük türlere göre değişmektedir (Morey vd., 2004).

**Çizelge 2.2.** Farklı organizmalarda CENH3 protein isimleri ve protein uzunlukları

	Organizma adı	CENH3 adı	Toplam büyüklük	Kuyruk bölgesi	HFD	Referanslar
M O D E L  O R G	<i>Homo sapiens</i>	CENP-A	140	47	93	Palmer vd., 1987
	<i>Drosophila melanogaster</i>	CID	225	133	92	Henikoff vd., 2000
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	HTR12	176	82	94	Talbert vd., 2002
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CSE4	229	133	96	Meluh vd., 1998
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Cnp1	120	23	97	Takahashi vd., 2000
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	HCP-3	288	192	96	Buchwitz vd., 1999
	<i>Luzula Nivea</i>	LnCENH3	177	86	91	Nagaki vd., 2005
M O N O K O T	<i>Oryza sativa</i>	OsCENH3	164	69	95	Nagaki vd., 2004
	<i>Zea mays</i>	ZmCENH3	157	61	96	Zhong vd., 2002
	<i>Sorghum bicolor</i>	-	154	58	96	
	<i>Hordeum vulgare</i>	H $\nu$ $\alpha$ CENH3- H $\nu$ $\beta$ CENH3	139 158	37 72	102 86	Sanei vd., 2011
	<i>Brachypodium distachyon</i>	-	162	67	95	

D İ K O T	<i>Solanum tuberosum</i>	StCENH3	147	51	96	Gong vd., 2012
	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	144	48	96	
	<i>Cucumis sativus</i>	-	154	58	96	
B A K L A G İ L L E R	<i>Pisum sativum</i>	PsCENH3	119	23	96	Neumann vd., 2015
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	PVCENH3	163	67	96	Iwata vd., 2013
	<i>Glycine max</i>	GmCENH3	158			Tek vd., 2010
	<i>Astragalus cicer</i>	AsCENH3	122			Tek vd., 2011
	<i>Lotus japonicus</i>	LjCENH3	159			Tek vd., 2014

### 2.6.3 CenH3 geninin varyantları ve kopya sayıları

Poliploid türlerde, tek kopya CenH3 geni içeren genomların veya çoklu CENH3 protein anlatımı yapan yapısal genlerin bir araya gelmesiyle çoklu CENH3 kopyaları oluşmaktadır. Soyada 7. kromozom üzerinde bulunan CenH3 geni tek kopya olup, ürünü olan CENH3 proteini genom üzerindeki tüm kromozomların sentromer yapısında işlev görmektedir.

Evtushenko vd. (2017), *Secale cereale* ve alt sınıflarında CenH3 genini karakterize etmişlerdir. *Hordeum*, *Triticum* gibi yakından ilişkili türler ile filogenetik ilişkisine bakarak gen üzerindeki evrimsel korunmuşluğunu ortaya koymuşlardır. Sonuç olarak *Secale cereale* genomunda CenH3 geninin 2 farklı formunun bulunduğunu rapor etmişlerdir. Nükleotid benzerliği %81-83 oranında bulunan  $\alpha$ CENH3 ve  $\beta$ CENH3 formlarının intron ve ekzon yapısında farklılıklar vardır. Bu farklılık özellikle N terminal ucunda meydana gelen delesyon ve insersiyondan kaynaklanmaktadır. *Secale* türleri ve alttürleri arasında  $\alpha$ CENH3 ve  $\beta$ CENH3 dizilerinin %98-100 oranında özdeş olduğu belirlenmiştir.

*Leguminosae* (baklagil) türlerinde CenH3 geni dizisinin ortak atanın duplikasyonundan kaynaklı CenH3-1 ve CenH3-2 olmak üzere iki paralog kopyası ortaya çıkartılmıştır. *Pisum* ve *Lathyrus*'da her iki paralogta korunurken, CenH3-1 geni sonradan *Vicia* ve *Lens* alt sınıflarında kaybolmuştur ya da susturulmuştur. Her ne kadar kaybolma da



gerçekleşse fonksiyonel CENH3 proteini üretilmeye devam etmiştir ve aktif sentromer yapısının korunduğu belirlenmiştir (Neumann vd., 2015).

CenH3 geni mısır, *Drosophila*, insan, çeltik, *Arabidopsis* gibi çoğu diploid organizmada tek kopyaya sahiptir. Bazı diploidlerde çoklu CENH3 kopyaları mevcuttur. Örneğin diploid canlı olan *Caenorhabditis elegans*, HCP-3 ve CPAR-1 isimli iki kopyaya sahipken *Caenorhabditis briggsae* sadece tek kopyaya sahiptir (Monen vd., 2005). *Arabidopsis lyrata* ve *Arabidopsis halleri* iki kopyaya sahipken *Arabidopsis thaliana* tek kopyaya sahiptir. Bu türler arasındaki bu farklılığın nedeni sentromerde bulunan üç farklı tekrarlı dizisinin (pAa, pAge1 and pAge2) bulunmasıdır (Kawabe vd., 2006).

Birden fazla CENH3 transkripti içeren diploid ebeveynlerin çaprazlanması kararlı ve kararlı olmayan melezlerle sonuçlanmıştır. Sanei vd. (2011), farklı kromozomlarda  $\alpha$ CENH3 ve  $\beta$ CENH3 varyantlarının her ikisini de içeren diploid arpa türleri *Hordeum vulgare* ve *Hordeum bulbosum* arasında çaprazlama çalışmaları yapmıştır. Bu çalışma sonucunda kararsız tür kombinasyonlarında bulunan birden fazla CENH3 varyantlarının her zaman sentromerde bulunamayabileceği gösterilmiştir.

#### **2.6.4. Diploid ve allopoliploidlerde CENH3 proteininin pozitif seleksiyonu**

İki veya daha fazla farklı genomun aynı genetik ortama gelmesiyle allopoliploid türler meydana gelirken, tür içerisinde genom katlanması sonucu otoploid türler meydana gelmektedir. Bu nedenden dolayı diploid, allopoliploid ve otoploidi bitki türlerinde genellikle farklı CENH3 formlarının bir araya gelmesi beklenmektedir. Bu poliploid formlar sayesinde canlı türlerinde evrimsel farklılıklar ve benzerlikler ortaya çıkmaktadır. CENH3 dizi farklılıkları en fazla N-terminal bölgede meydana gelmektedir (Malik vd., 2002; Maheshwari vd., 2015) (Çizelge 2.2.). Henikoff (2000), CENH3 proteinindeki dizi farklılıklarının pozitif evrime dayandığını gösteren ilk çalışmayı *Drosophila melanogaster*'de tanımlamıştır.

Proteinler üzerinde etkili olan pozitif seçimler, yakından ilişkili türlerde kodlanan diziler arasındaki sinonim olmayan ( $K_a$ ) ve sinonim ( $K_s$ ) oranları karşılaştırılarak ölçülebilmektedir. Bu oranlar sonucu elde edilen,  $K_a/K_s=1$  nötr seçilimi,  $K_a/K_s<1$  negatif seçilimi ve son olarak  $K_a/K_s>1$  oranı ise pozitif seçilimi (adaptif evrim) ifade

etmektedir. Pozitif seçim, sinonim olmayan değişimlerin hücre içindeki sinonim değişimlere uyum sağlaması sonucu ortaya çıkmaktadır. CENH3 evrimsel olarak adaptif bir gen olsa bile fonksiyon olarak korunmuş bir gen dir (Talbert vd., 2004).

Yapılan bir çalışmada, CENH3 genleri iki allopoliploid *Oryza* türü ve üç temsili diploid progenitor türden klonlanmıştır. Diploid *Oryza* türleriyle ilişkili pozitif seleksiyon, poliploid *Oryza* türlerinde korunmuştur. Ayrıca DDEE genomunda CENH3'ün evrimsel özellikleri, CCDD genomunda da muhafaza edilmiştir. Böylece, bazı spesifik hatlarda CENH3 ile ilişkili evrimsel korunmuşluğun genetik faktörler tarafından kontrol edildiği ve bir allopoliploid içinde birleşen genomun getirdiği sayısız değişiklik boyunca devam edebildiği görülmüştür (Hirsch vd., 2009).

*Arabidopsis* ve *Oryza*' da bulunan CenH3 geninin moleküler klonlaması yapılarak türler arasında bu genin hangi oranda evrimleştiği tespit edilmiştir (Talbert vd., 2002; Hirsch vd., 2009). *Triticum*'da CenH3 geni karakterizasyonu yapılmıştır ve bitki gelişimindeki rolü incelenmiştir (Yuan vd., 2015). *Hordeum* türleri arasında yapılan çaprazlama sonucu sentromerde bulunan CenH3 geninin adaptif evrimi incelenmiştir (Sanei vd., 2011). *Leguminosae* türlerinde yapılan bir çalışmada CenH3 geninin duplikasyonu ve sentromerde oluşturduğu değişim saptanmıştır (Neumann vd., 2015). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise, diploid ve triploid muz (*Musa spp.*) türlerinde CenH3 geninin anlatım seviyeleri araştırılmıştır (Muiruri vd., 2017). Yine diploid ve poliploid türleri olan pamukta (*Gossypium*) CenH3 geninin evrimsel değişimi üzerine araştırma yapılmıştır (Masonbrink vd., 2014). Evtushenko vd. (2017), 11 farklı çavdar türü üzerinde CenH3 geninin moleküler klonlanması yapılarak *Aegilops*, *Triticum*, *Oryza* gibi yakın akraba türler arasındaki CENH3 dizi benzerliklerine göre filogenetik ilişkileri ortaya konulmuştur. Filogenetik analiz sonucuna göre CenH3 geninin hızla değiştirdiği ve fonksiyonunun evrimsel olarak korunduğu kanısına varılmıştır.

Kültüre alınmış triploid ve yabancı diploid muzların CENH3 transkriptlerinin karakterize edilmesi sonucunda MusaCENH-1A, MusaCENH-1B VE MusaCENH-2 transkriptleri benzerliklerine göre gruplandırılmıştır. CENH3 dizileri SNP'lerin yanı sıra eklenen veya kaybedilen ekzon/intron yapısı bakımından farklılık göstermiştir. Farklı muz genotiplerindeki CENH3 transkriptleri 7/6, 5/4, 6/5 (ekzon/intron) olarak belirlenmiştir. 7/6, 5/4 transkriptleri hem diploid hemde triploidlerde bulunmuştur ancak 7/6 en baskın

olan transkripttir. 6/5 yapısı, 7/6'nın doğru bir şekilde birleşmemesinin bir sonucudur. Elde edilen çeşitli transkriptlerin, oldukça değişken N kuyruk bölgesini ve nispeten korunmuş bir C kuyruk bölgesi histon katlama alanını (HFD) kodladığı tahmin edilmiştir. SNP'lerin bazı durumlarda, etkilenen alanları uzatarak veya kısaltarak proteinin ikincil yapısını etkilediği düşünülmüştür. Muz CENH3 transkriptlerinin dizilenmesi aminoasit dizilerini ve alternatif olarak eklenmiş transkriptleri etkileyen SNP varyasyonlarını ortaya koymaktadır. Bu değişikliklerin çoğu, CENH3'ün N kuyruk bölgesini etkiler (Muiruri vd., 2017).

## 2.7 Bitki Islahında CenH3 Geninin Yeri ve Önemi

Kültür bitkilerinde yeni çeşitlerin geliştirilmesi ve saf hatlar elde etmek için ıslah yapmak gerekmektedir. Klasik bir ıslah programında bu saf hatlar melezlemeler sonucu elde edilebilmektedir. Bu yüzden saf hatlar üretebilmek için yeni teknikler geliştirilmektedir. Bu zahmetli ve uzun süreci azaltabilmek için haploid ıslah teknikleri geliştirilmiştir (Forster vd., 2007, Dunwell, 2010). Normal süreçte haploidlerin kendiliğinden ortaya çıktıkları, incelenmiş birkaç türde bildirilmiştir. Sitolojik kanıt elde edilen ilk haploid angiosperm 1921'de *Datura stramonium* bitkisinde bulunmuştur (Blakeslee vd., 1922). Bazı türlerde ise haploidler, tür içi ve türler arası melezleme yoluyla üretilirken, bazı bitki türlerinde anter kültüründen üretilebildiği gösterilmiştir (Guha ve Maheshwari, 1964, Wędzony vd., 2009). Ancak haploid indüksiyon yöntemlerinin hiçbiri, tüm büyük tarımsal ürünlere evrensel olarak uygulanabilir değildir. Bu nedenle, kolay ve etkili bir haploid ıslah yöntemi geliştirme ihtiyacı mevcuttur. Bu ihtiyacı kapatmak amacıyla sentromer aracılığıyla genom eliminasyonu, haploid bitki hatları üretiminde yeni bir yöntem olarak geliştirilmiştir. *Arabidopsis thaliana* bitkisinde, modifiye edilmiş CENH3 proteinlerini içeren mutant ile yabani tip mezlelendiğinde, mutanttan kromozomların elimine edilerek haploid bitkilerin üretildiği keşfedilmiştir. Bu mekanizmada doğal bir tetraploid *Arabidopsis*'i bir diploide dönüştürmek için sentromer aracılı genom eliminasyonundan yararlanılmıştır (Ravi ve Chan, 2010). Bu çalışma sayesinde, sentromerler ve CenH3 geni artık sadece temel öneme sahip epigenetik bir işaret değil, aynı zamanda önemli tarımsal uygulamalar için potansiyel bir alan olarak da görülmektedir (Tek vd., 2015).

Son zamanlarda Kelliher vd (2016), mısırdaki CENH3 kaynaklı haploid ıslah hatlarını rapor etmişlerdir. Bu çalışmada, CenH3 geni RNAi teknolojisi ve transpozon yerleştirilmesi ile susturulmuştur. Elde edilen mutant CENH3, bu tür mısır hatlarını üretebilmek için in vivo haploid indüksiyonunda kullanılmıştır. Haploidizasyon çalışmaları sonucu CENH3:RNAi hatlarının diğer hatlara kıyasla daha az haploid ürün verdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak kısa sürede verimli ve homozigot haploid hatlar üretebilmek için sentromer modifikasyonuna dayalı teknolojiler dikkat çekmeye başlamıştır. Tüm canlılar için kalıtımın önemli parçası olan sentromer haploidi ve ıslah çalışmalarında önemli bir yere sahiptir. Bitkilerde CENH3 proteini ile yapılan temel çalışmalar sayesinde gelecekte yeni haploid ıslah hatları geliştirme potansiyeli vardır.

## 2.8 Tez Çalışmasının Amacı ve Hedefleri

Yaklaşık 33 farklı türe sahip olan *Glycine* cinsi içerisinde sadece *G. max* kültür formunu oluşturmaktadır. Kültür formu kültürel ve tarımsal açıdan önemliyen yabancılarının doğrudan tarımsal bir önemi bulunmamaktadır. Yabani türlerde bulunan ploidi ve kromozom farklılıklarından dolayı genetik çalışmaları da sıklıkla değerlendirilmektedir. Tek vd. (2010), soyada CenH3 geninin cDNA klonlamasını yaparak sentromerik dizi ve genom analizi yapılmıştır. Tespit edilen gen GmCENH3 olarak adlandırılmıştır. Bütün bu yapılan çalışmalara göre CenH3'nin sentromer üzerindeki önemi düşünüldüğünde, kültüre alınmış ve yabani *Glycine* türlerinin CenH3 geninin moleküler yapısının incelenmeye ihtiyacı vardır. Bu hedefe ulaşmak amacıyla farklı yabani soya türlerinde CenH3 geni moleküler klonlanması yapılacaktır. Çalışmada 13 farklı yabani soya türünde CenH3 geninin varlığı tespit edilecektir ve tanımlanacaktır. Farklı biyoinformatik analiz yöntemleri kullanılarak soya türlerinde CENH3 protein dizilerinin çoklu hizalaması yapılarak benzerlik oranları tespit edilecektir. Türler arasında filogenetik analiz yapılarak akrabalık ilişkileri belirlenecektir ve CENH3 formlarında evrimsel olarak seleksiyon baskısı tespit edilecektir.

Kültüre alınmış soyada bulunan melezleme noktasındaki genetik darboğazı genişletecek yakın akraba tür zenginliği bulunmamaktadır. Bu açığı kapatmak amacıyla yabancı türlerde bulunan faydalı genler kültür formuna gelecekte aktarılabilmesi olasıdır. CenH3 gibi yapısal bir genin tespit edilmesi yapılabilecek bunun gibi genetik çalışmaların temelini oluşturacaktır. Bu tez çalışması baklagillerde ve diğer bitkilerde gelecekte yapılabilecek

sentromer çalışmalarına ışık niteliğindedir. Genom eliminasyonu ile haploidi çalışmalarında ıslahı bir adım öne taşıyacaktır. Ayrıca gelecekte keşfedilecek yeni ıslah tekniklerine öncü niteliğindedir.



## BÖLÜM III

### MATERYAL VE METOT

#### 3.1 Materyal

##### 3.1.1 Bitki materyali

Bu çalışmada kullanılan Adasoy soya çeşidi Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden sağlanmıştır. Yabani soya türleri U.S. National Plant Germplasm System, USDA-Agricultural Research Service gen bankası kaynaklarından sağlanmıştır.

Adasoy soya çeşidi ve yabani soya türlerinin çimlenme sorunundan dolayı MS besi ortamında, filtre kağıdında ve pamukta çimlendirme çalışmaları yapılmıştır. Soya ve yabani tohumları (Çizelge 3.1.) 25 °C, %60 nisbi nem oranında çimlendirilmiştir. Çimlenmeden sonra elde edilen fideler 1:2 oranında perlit-toprak bulunan saksılara aktarılarak serada (25 °C:18 °C, gün:gece 16 saatlik gün boyu) yetiştirilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Glycine ve yabani Soja türlerinin genom sembolü, kromozom sayısı ve menşei dağılımı (ABD: Amerika Birleşik Devletleri, Avus.: Avustralya)

	Altsınıf	PI Numarası	Türler	Kromozom numarası	Genom sembolü	Menşei
1.			<i>Glycine max</i>	40	G	
2.	<i>Glycine</i>	100060	<i>Glycine soja</i>	40	G	Avus.
3.		PI 583946	<i>Glycine canescens</i>	40	A	ABD
4.		PI 378870	<i>Glycine clandestina</i>	40	A1	ABD
5.		PI 505166	<i>Glycine curvata</i>	40	C1	ABD
6.		PI 440962	<i>Glycine dolichocarpa</i>	80	AD3	ABD
7.		PI 612234	<i>Glycine falcate</i>	40	F	Avus., ABD
8.	<i>Soja</i>	PI 378709	<i>Glycine latifolia</i>	40	B1	Avus., ABD
9.		PI 505184	<i>Glycine latrobeana</i>	40	A3	ABD
10.		PI 583966	<i>Glycine peratosa</i>	40	A5	ABD
11.		PI 505195	<i>Glycine pescadrensis</i>	80	AB1	ABD
12.		PI 373988	<i>Glycine tomentella</i>	78	D3E	Avus., ABD
13.		PI 505151	<i>Glycine argyrea</i>	40	A2	Avus.
14.		PI 440962	<i>Glycine crytolaba</i>	40	C	Avus.

## 3.2 Metod

### 3.2.1 RNA izolasyonu

Toplam RNA, bitkinin hızlı gelişen genç yapraklarından RNeasy Plant Mini Kiti protokolüne uygun olarak izole edilmiştir (Qiagen, Valencia, CA, USA). RNA izolasyonu için -80 °C'de muhafaza edilmiş veya taze 100 mg yaprak örneği sıvı azot kullanılarak parçalandıktan sonra elde edilen yaprak örnekleri 450 µl RLT tamponu ve 4.5 µl %2'lik β- merkuptoethanol bulunan karışım üzerine renk değişimi olmadan hızlı bir şekilde 2 ml'lik tüpe aktarılmıştır. Doku solüsyon içerisinde saf bir görüntü oluşturana kadar vorteks yardımıyla çözdürülmüştür. Solüsyon hızlı bir şekilde kit dahilinde bulunan 2 ml'lik membran içeren mor koleksiyon tüpüne aktararak 2 dk 13.500 rpm hızında santrifüj yapılmıştır. Membran sisteminin altına geçen sıvı kısım yeni bir 1.5'lik tüpe aktarılmıştır. Solüsyon üzerine (0.5 vol) %100 etanol eklenerek hafifçe karıştırılmıştır. Karışım 2 ml'lik membran içeren pembe koleksiyon tüpüne aktararak 15 sn 10.000 rpm'de santrifüj yapılmıştır ve membran altında kalan sıvı kısım atılmıştır. Membranı yıkama işlemi için sırasıyla 700 µl RW1 tamponu eklenerek 15 sn 10.000 rpm'de, 500 µl RPE tamponu eklenerek 15 sn 10.000 rpm'de, 500 µl RPE tamponu eklenerek 2 dk 10.000 rpm hızında santrifüj yapılmıştır. Membranda bulunan fazla alkolün uzaklaştırılması için yaklaşık 1 dk kurutma işlemi yapılmıştır. Membran içerisinde bulunan RNA'yı elde etmek için yeni bir koleksiyon tüpüne aktarılan membran sistemi 50 µl RNase içermeyen su eklenerek 1 dk 10.000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. RNA içeren tüp hızlı bir şekilde buza aktararak muhafaza edilmiştir.

### 3.2.2 Veritabanı taraması ve primer tasarımı

*Glycine max* cDNA ürünü olan GmCENH3 proteini (FK014964) referans alınarak 5' ve 3' uç bölgelerinden ileri (F) ve geri (R) primerler tasarlanmıştır (Şekil 3.1)(Çizelge 3.2.). Tasarlanan primerler Sentebiolab firması tarafından hizmet alımı olarak temin edilmiştir.





### 3.2.4 cDNA ürünü PCR optimizasyonu

cDNA ürününün çoğaltılması için farklı enzimler ile farklı bağlanma sıcaklıklarında optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Öncelikle düşük etkinlikli standart DNA Taq polimeraz kullanılmıştır. Ardından SeqAmp (638504, Takara), PrimeStar HS (R040A, Takara) ve Ex Taq™ (RR001A, Takara) gibi etkinliği yüksek DNA polimerazlar ile PCR çalışmaları yapılmıştır.

On üç yabancı soya türünde cDNA ürününün çoğaltılması için TaKaRa Ex Taq™ DNA polimeraz) (RR001A, Takara, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) kullanılarak PCR optimizasyonu yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak öncelikle *Glycine max* PCR yapılmıştır. PCR reaksiyonunda kullanılan primer seti GmCENH3 proteinine (FK014964) uygun olarak tasarlanmıştır (Çizelge 3.2.).

Her bir reaksiyon için 5 µl Premix Ex Taq™ DNA polimeraz (5 units/µl ), 0.25 µl 20 mM ileri primer, 0.25 µl 20 mM geri primer, 200 ng 0.5 µl cDNA ve 4 µl distile H<sub>2</sub>O toplam hacim 10 µl olacak şekilde bir araya getirilmiştir. Reaksiyon denatürasyon için 94 °C'de 2 dk, toplam 30 döngü olmak üzere 94 °C'de 30 sn, primerin bağlanması için 60 °C'de 30sn, uzama için 69 °C'de 1 dk, son uzama için 69 °C'de 7 dk sıcaklığa tabi tutulmuştur. Primerin farklı bağlanma sıcaklıklarını tespit edebilmek için 55 °C, 57 °C, 60 °C, 63 °C, 65 °C sıcaklıklarda gradient PCR yapılmıştır.

**Çizelge 3.2.** cDNA ürününün çoğaltılması için tasarlanan primer setleri

Primer Adı	Konum	Primer Dizisi (5'-3')	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	PCR Ürününün boyutu (nt)
9H3f	5'	5'-ATGGCGAGAGTGAAGCAC-3'	54-56	18
10H3r	3'	5'-TCACCAAGGCCTTCCTATTCTCG-3'	61-67	24

### 3.2.5 Agaroz jelden PCR ürününün saflaştırılması

Uygun büyüklükteki PCR ürünü (cDNA), agaroz jelden kesilmiş ve Li vd. (2010), tarafından açıklanan silika matriks protokolü takip edilmiştir. Yaklaşık 100 mg jel

parçası için 300 µl sodyum iyodür (6M NaI) kullanılmış. Jel 70 °C'de 3 dk içerisinde eritilmiştir. Eriyen jelin içerisine 10 µl silika matriks eklenerek iyice karıştırılmış ve 5 dk oda sıcaklığında bırakılmıştır. Bu şekilde cDNA'nın matrikse bağlanması sağlanmıştır. 16 sn 12.000 rpm hızında santrifüj yapıldıktan sonra tüpün üst kısmında bulunan süpernatant pelletten uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 500 µl yıkama solüsyonu eklenmiştir (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA ve %50 ETOH). Böylece pellet agaroz parçalarından temizlenmiştir. Tekrar 16 sn hızlı bir santrifüj yapılarak pelletten süpernatantın 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 cDNA kompleksinin ayrıştırılması sağlanmıştır. 2 dk boyunca santrifüj yapıldıktan sonra tüpten sıvı kısım içerisinde bulunan cDNA alınarak yeni tüpe aktarılmıştır.

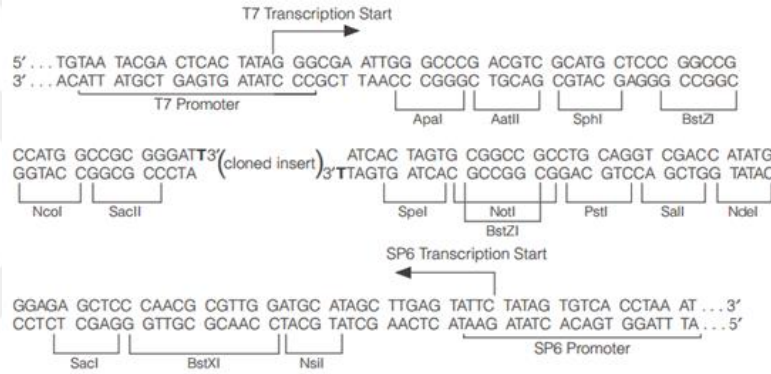
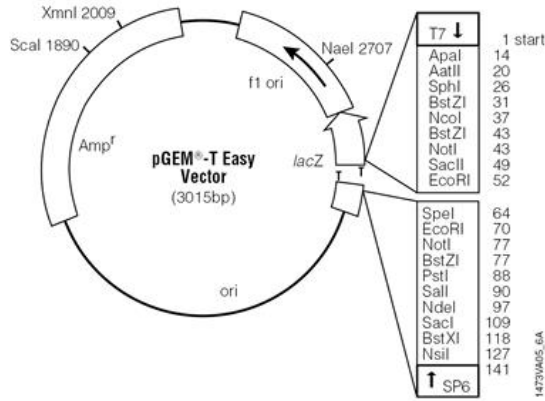
### **3.2.6 Elektrokompotent hücre hazırlama**

Elektrokompotent hücre, Dower vd. (1988), optimize ettiği protokole uygun olarak hazırlanmıştır. 2 ml'lik mini kültürü hazırlanan XL1-blue bakteri suşu bir gece 37 °C 165 rpm'de inoküle edilmiştir. Hazırlanan bu mini kültürlerden 1 ml alınarak 4 farklı 100 ml'lik LB besiortamlarına yarım saat arayla ekim yapılmıştır ve 37 °C 165 rpm'de üremeye bırakılmıştır. Her yarım saatte bir ilk üremeye bırakılan 100 ml'lik kültürün OD<sub>600</sub> nm'deki spektrofotometrik sonucu ölçülmüştür. Sonuç 0.5-0.7 nm olduğu zaman üremeye son verilmiştir. 4 farklı 100 ml'lik kültür 20 dk buzda bekletilmiştir. Bekleyen kültürler 50 ml'lik falkon tüplere aktarılarak 15 dk 4 °C 4000 xg'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atılmıştır ve pellet üzerine 25 ml soğuk distile su eklenerek çözdürülmüştür. Bu yıkama işleme 4 defa tekrarlanarak toplam pellet bir falkon tüpte biriktirilmiştir. Pellete 1 ml %10'luk gliserol eklenerek çözdürülmüştür ve 100 µl alınarak ependorf tüplere aktarılmıştır. -80 °C'de kullanılabilecek kadar muhafaza edilmiştir.

### **3.2.7 Ligasyon**

Ligasyon pGEM-T Easy vektörü (A1360, Promega, Madison, WI, USA) kullanılarak yapılmıştır (Şekil 3.2.). Ligasyon ürünü toplamda 5 µl olacak şekilde 0.5 µl distile su, 2.5 µl (2×) Rapid ligasyon tamponu, 0.5 µl (50 ng/µl) pGEM-T vektörü, 1µl (4 ng/µl)

saflaştırılmış PCR ürünü, 0.5 µl T4 ligaz enzimi kullanılarak hazırlanmıştır. Reaksiyon çözeltisi 4 °C’de bir gece boyunca bırakılmıştır.



Şekil 3.2. pGEM-T Easy vektör sistemi (A1360, Promega, Madison, WI, USA)

### 3.2.8 Bakteriye transformasyon

*E. coli* bakteriye transformasyon Biorad Gene Pulser Xcell™ elektroporasyon cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Dower vd, 1988). Daha yüksek transformasyon oranlarına ulaşmayı sağlayan XL1-blue bakteri ırkları ile hazırlanmış elektrokompotent hücreler elektroporasyon yöntemi için kullanılmıştır. 2.5 µl ligasyon ürünü ve 100 µl elektrokompotent hücre buzda bir araya getirilerek hafifçe pipetaj yapılmıştır. Yaklaşık 1 dk beklemeden sonra kesik pipet ucu ile 0.1 cm elektrot boşluklu (kahverengi kapak) Gene Pulser®/MicroPulser™ transformasyon küvetine aktararak transformasyon gerçekleştirilmiştir. Transformant hızlı bir şekilde SOC besiyerine (100 ml SOB besiyeri, (10 g tripton, 2.5 g maya özütü, 0.25 g NaCl, 5 ml 1 M MgSO<sub>4</sub>, 2 ml %20 glukoz, gerisi ddH<sub>2</sub>O ile 500 ml'e tamamlanmıştır.) aktarılmıştır. 225 rpm'de 45 dk inkübe edilmiştir. Tryptone, Yeast extract, NaCl ve agardan hazırlanan ampisilinli

(1000 µg/ml) LBA (1 litre için 10 g Tryptone, 5 g Yeast ekstrakt, 10 g NaCl, 15 g Agar) tabaklarına rekombinant plazmitlerden 50 µl aktarılmıştır. Alkolle steril edilmiş cam bir öze yardımıyla LB tabağına dağıtılmıştır. Ekim yapılan tabaklar 37 °C inkübatörde 1 gün boyunca çoğalmasa beklenip +4 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

### 3.2.9 Klon seçimi ve koloni PCR

LB tabağında bir gece 37 °C bekletildikten sonra rekombinant cDNA elde edilip edilmediğinin tespit edilmesi amacıyla agaroz jel elektroforezinde test etmek üzere steril kürdan yardımıyla büyüyen koloniler seçilmiştir (Woodman, 2008). Standart plazmit izolasyonu protokolü kullanılarak izolasyon yapılmıştır. İzolasyondan sonra elde edilen DNA %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve insert cDNA'lar seçilmiştir. Plazmit izolasyonu için bakteri 37 °C'de 2 ml'lik LB ortamı içerisinde µl/ml oranında ampisilin ile birlikte bir gece boyunca büyütülmüştür. Büyüyen hücrelerin çöktürülmesi 2 dk boyunca 13.000 rpm'de santrifüj yapılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pellet 100 µl resuspension solüsyonu (1 M Tris-HCl, pH 8, 0.5 M Na<sub>2</sub>EDTA, %20 glikoz, 10 mg/µl RNase A, ddH<sub>2</sub>O) içerisinde askıya alınmıştır. Daha sonra aynı tüpün içerisine 100 µl SDS/NaOH eklenmiş ve birkaç defa nazikçe karıştırılmıştır. Solüsyon 2 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve 100 µl 1.32 M KOAc eklenmiştir. Solüsyon birkaç saniye nazikçe karıştırılıp 3 dk boyunca 13.000 rpm'de yapılan santrifüjde solüsyon çöktürülmüştür. Pellet atılmış ve süpernatant kısmı yeni tüpe aktarılmıştır. Süpernatantın üzerine 500 µl NaI eklenerek hafifçe karıştırılmıştır. Vorteks ile çözdürülen silika matrixden 20 µl eklenerek karıştırılmıştır ve oda sıcaklığında 10 dk boyunca bekletilmiştir. DNA'nın çöktürülmesi sağlandıktan sonra 10 dk boyunca yüksek hızda santrifüj yapılarak süpernatant uzaklaştırılmış ve silika solüsyon E (%100 EtOH, 5 mM EDTA, 1.4 Mm NaCl, Tris HCl) ile iki defa yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından etanol uzaklaştırılmış ve silika kurumaya bırakılmıştır. Son olarak 40 µl dH<sub>2</sub>O içerisinde silika çözülmüştür. 2 dk boyunca 70 °C'de bekletilerek silikaya tutunan DNA'nın serbest kalması sağlanmıştır. 3 dk yüksek hızda santrifüj yapılarak süpernatant temiz tüpe aktarılmıştır. Plazmit izolasyonundan sonra klonlar jel elektroforezinde yürütülmüşlerdir. İnsert DNA'lar jel elektroforezi sayesinde tespit edildikten sonra bunların transforme edilmiş CenH3 dizisini taşıyıp taşımadıklarını kontrol amacıyla dizi analizine gönderilmeden önce koloni PCR yapılmıştır. İnsert DNA'lar agaroz jel elektroforezinde kullanılan 1 kb'lik marker

aracılığıyla saptanmıştır. Elde edilen pozitif klonlar (100 µl) %20'lik gliserol (100 µl) içeren saklama tüplerine aktarılıp, stok hücreler -80 °C'de depolanmıştır.

Seçilen klonlardan elde edilen plazmit DNA'ları kullanılarak koloni PCR yapılmıştır. PCR reaksiyonunda 0.25 µl (50 ng/µl) DNA, 0.5 µl (2u/µl) Taq DNA polimeraz, 2.5 µl (10×) PCR buffer, 0.5 µl (50×) dNTP ve, 0.5 µl (20 Mm) M13F/M13R primerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.3). Reaksiyonun toplam miktarı 25 µl olacak şekilde 20 µl ddH<sub>2</sub>O (çift distile su) eklenmiştir. Reaksiyon denatürasyon için 94 °C'de 2 dk, toplam 30 döngü olmak üzere 94 °C'de 15 sn, primerin bağlanması için 55 °C'de 30 sn, uzama için 72 °C'de 5 dk, son uzama için 72 °C'de 10 dk sıcaklığa tabi tutulmuştur.

**Çizelge 3.3.** M13 primer seti dizi bilgisi

Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')
M13 R	5'-GCGGATAACAATTTTCACACAGG-3'
M13 F	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

PCR ürünlerinden 10 µl yüklenerek %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Agaroz jel sonucu Bio-Rad UV Transilluminatör cihazı ile görüntülenmiştir. Sonuca göre pozitif koloniler teyit edilmiştir.

### 3.2.10 Dizi sonuçlarının biyoinformatik analizi

Bu aşamada, soya ve yabancı çeşitlerinde bulunan CENH3 cDNA dizisinin tespit edilmesi için 55 pozitif klonun dizi analizi yapılmıştır. Plazmit DNA örnekleri Ankara BMLabosis firması aracılığıyla Macrogen tarafından DNA dizilemesi işlemi hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir.

Dizileme sonuçları elde edildikten 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 Geneious Pro v. 4 2019.1.1 sürümü (Biomatters, Auckland, New Zealand) ve UGENE biyoinformatik analiz programları kullanılmıştır. Vektör dizisi uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen diziler BLAST ve Phytozome v12.1 programı

aracılığıyla NCBI gen bankasında taranmıştır. Geneious Pro v. 4 ClustalW biyoinformatik yazılımı (Biomatters, Auckland, New Zealand) çoklu hizalama programı ile her bir soya çeşidi kendi içerisinde ve birbirleri ile protein ve nükleotid hizalaması yapılmıştır. MEGA7 yazılımı kullanılarak tüm türlerin filogenetik ağacı çıkartılmıştır. DnaSP (Rozas ve Librado, 2010) yazılımında, McDonald-Kreitman (McDonald ve Kreitman, 1991) testi kullanılarak CENH3a ve CENH3b proteinlerinin evrimsel analizi tespit edilmiştir. HFD, N terminal bölge ve tüm gen uzunluğu esas alınarak analiz edilmiştir.

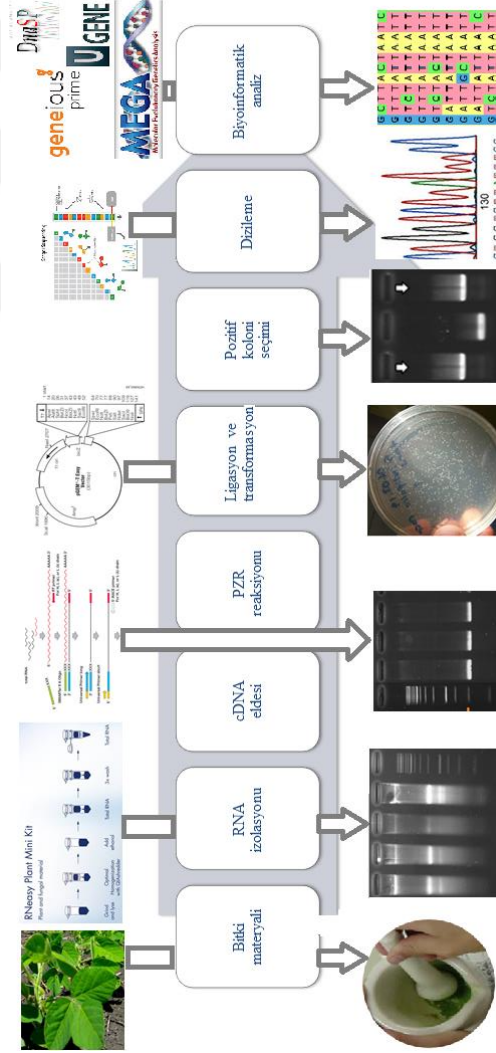


## BÖLÜM IV

### BULGULAR VE TARTIŞMA

#### 4.1 Soya ve Yabani Türlerinde CenH3 Geni cDNA Moleküler Klonlamasının İş Akışı

Soya ve yabancı türlerinden cDNA klonlaması yapabilmek için total RNA izolasyonu, ters transkriptaz yardımıyla cDNA sentezi, CenH3 genine özel primerlerle PCR çoğaltılması, fragmentlerin klonlanması ve dizilemesi yapılmıştır. Elde edilen CENH3 proteininin biyoinformatik analizi yapılmıştır.



Şekil 4.1. Soya ve yabancı türlerinde CenH3 geni cDNA moleküler klonlanmasının iş akışı

Soya ve yabancı türlerinde CenH3 geninin cDNA moleküler klonlaması sonucu Şekil 4.1. de görülen iş akışı ortaya çıkmıştır.

#### **4.2 Soya ve Yabancilerinin Çimlendirilmesi ve Optimum Şartların Tespiti**

Adasoy soya çeşidi petri kutusunda filtre kağıdında ve pamukta çimlendirilmiştir. Ne var ki, yabancı soya tohumlarını çimlendirmede güçlük yaşandığı için farklı ortamlarda denemeler yapılmıştır (Şekil 4.2.). MS besi ortamında iklim odasında (25 °C, %60 nisbi nem oranı) çimlendirilme yapılmıştır. Çimlendirme işleminden %50 oranında başarı edilirken bazı tohumlarda kontaminasyon görülmüştür. Tohumlar, iklim odasında (25 °C, %60 nisbi nem oranı) petride nemli filtre kağıdında çimlendirilmiştir ve %75 oranında başarı elde edilmiştir. Başarı oranını artırmak amacıyla tohumlara, stereo mikroskop altında jilet ile embriyodan uzak bir noktada yaralama yapılmıştır. Buradaki amaç tohumun su almasını hızlandırarak kısa sürede çimlenmeyi sağlamaktır. Bu muamele sonucunda %100 başarı elde edilmiştir. Ortalama olarak 5 günde çimlenme görülmüştür. Çimlenmeden sonra elde edilen fideler 1:2 oranında perlit-toprak bulunan saksılara aktarılarak serada (25 °C:18 °C, gün:gece 16 saatlik gün boyu) yetiştirilmiştir. Yaklaşık üç ayın sonunda bitkilerden tohum elde edilmiştir.

RNA izolasyonu için yapraklar taze olarak toplanarak alüminyum folyo ile paketlenerek etiketleme işleme yapılmıştır. Taze bitki yapraklarında DNA ve RNA yıkımı başlamadan doğrudan buzda muhafaza edilmiştir. Her bir tür için yaklaşık 1 gr yaprak örneği alınmıştır. Taze yapraklar -80 °C'de kullanım süresine kadar muhafaza edilmiştir.



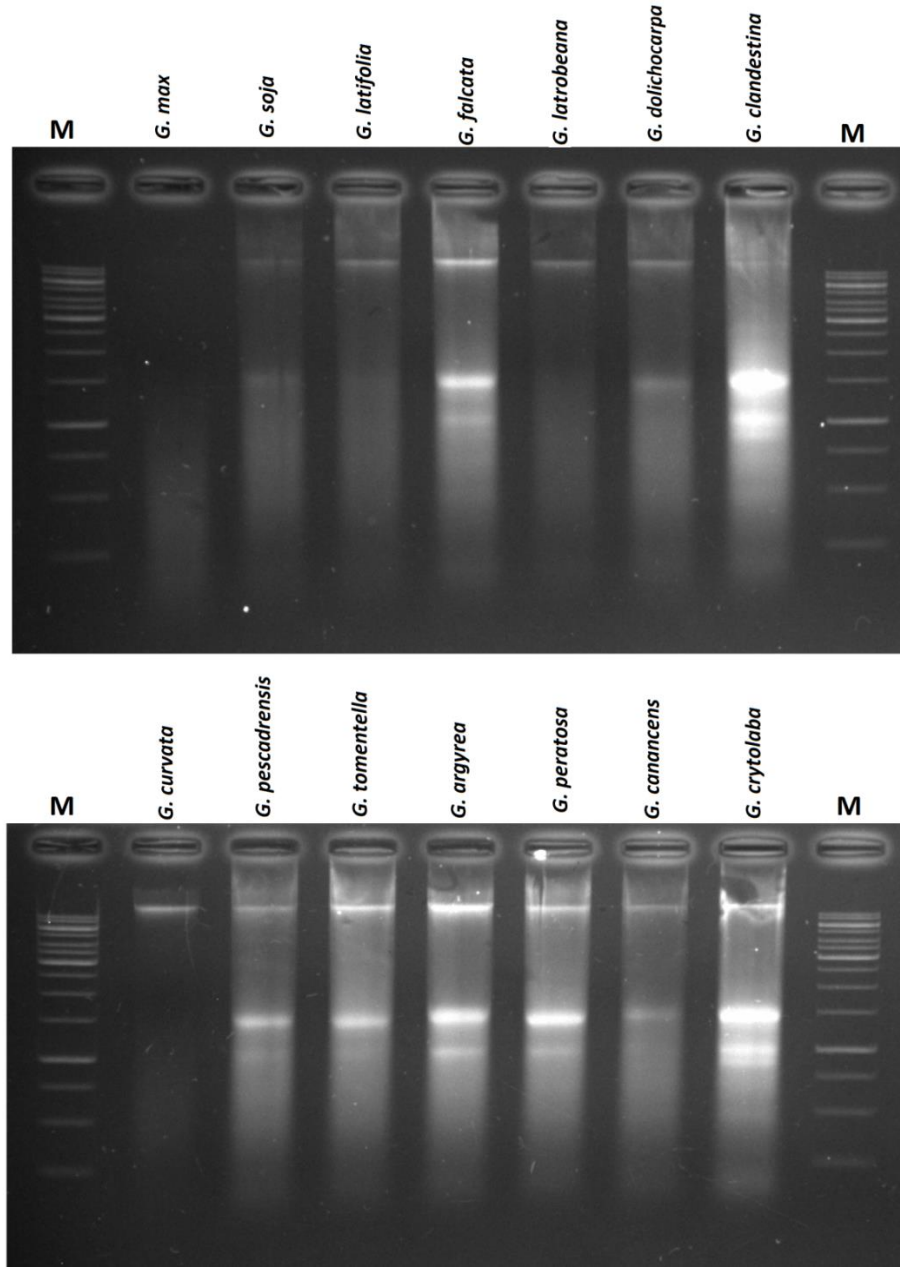


**Şekil 4.2.** Yabani soya türlerinin yetiştirilme aşamaları. MS besiyerinde çimlendirme (a), filtre kağıdında çimlendirme (b, c), pamukta çimlendirme (d), toprakta yetiştirip fide haline getirme (e, f, g, h), çiçeklenme dönemi (i, j), olgunlaşma ve tohum eldesi (k)

### 4.3 RNA İzolasyonu

Toplam RNA, bitkinin hızlı gelişen genç yapraklarından RNeasy Plant Mini Kiti protokolüne uygun olarak izole edilmiştir.

Şekil 4.3’de gösterildiği üzere soya ve 13 yabani türünden izole edilen toplam RNA’nın varlığının ve yoğunluğunun tayini amacıyla %2 agaroz kullanılarak 70 V’da 47 dk yürütülmüştür. Agaroz jel sonucu Bio-Rad UV Transilluminatör cihazı ile görüntülenmiştir.



**Şekil 4.3.** Soya ve yabani türlerinde RNA izolasyonu agaroz jel görüntüsü

Agaroz jel resimlerine göre elde edilen total RNA'yı oluşturan 28S, 18S, 5S rRNA, mRNA ve tRNA nedeniyle farklı boyutlarda bant şeklinde görünmektedir. Bazı türlerde yukarıdaki ana bantlar yerine daha düşük moleküler ağırlıklı yayılmış görümlü RNA ürünleri elde edilmiştir. Sadece 10 farklı türde bantlar şeklinde RNA görülmüştür. Dağınık şekilde elde edilmiş ürünün işlevsel olup olmadığı tek iplikli cDNA formuna dönüştürülerek tespit edilmiştir. Bu görüntünün jelden kaynaklı bir sorundan dolayı elde edildiği düşünülmektedir. Sonuç olarak 14 türde RNA izolasyonu başarıyla tamamlanmıştır (Şekil 4.3.).

#### 4.4 RNA Ürünlerinin Konsantrasyon Tayini

Quawell Q5000 (V6.08) nanadrop cihazı ile toplam RNA ürünlerinin saflık ve konsantrasyon tayini yapılmıştır (Çizelge 4.1.).

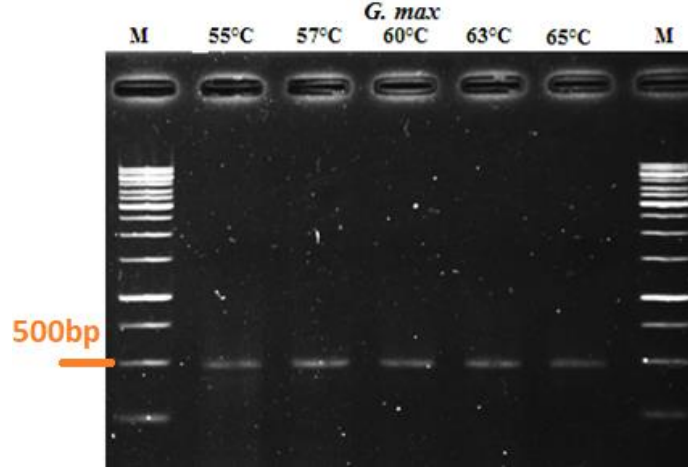
**Çizelge 4.1.** Toplam RNA ürünlerinin konsantrasyonu

	<b>Türler</b>	<b>RNA konsantrasyonu (ng/ µl)</b>
<b>1</b>	<i>Glycine max</i>	109.200
<b>2</b>	<i>Glycine soja</i>	131.120
<b>3</b>	<i>Glycine canescens</i>	216.280
<b>4</b>	<i>Glycine clandestine</i>	561
<b>5</b>	<i>Glycine curvata</i>	49.80
<b>6</b>	<i>Glycine dolichocarpa</i>	191.440
<b>7</b>	<i>Glycine falcate</i>	365.200
<b>8</b>	<i>Glycine latifolia</i>	111.480
<b>9</b>	<i>Glycine latrobeana</i>	89.080
<b>10</b>	<i>Glycine peratosa</i>	361.560
<b>11</b>	<i>Glycine pescadrensis</i>	344.240
<b>12</b>	<i>Glycine tomentella</i>	338.080
<b>13</b>	<i>Glycine crytolaba</i>	434.560
<b>14</b>	<i>Glycine argyrea</i>	335.880

RNA ürünlerinin konsantrasyon ölçümü sonucu elde edilen değerler jelde çıkan parlaklıklar ile orantılı çıkmıştır. Elde edilen sonuçların cDNA sentezi için yeterli konsantrasyonda olduğu tespit edilmiştir.

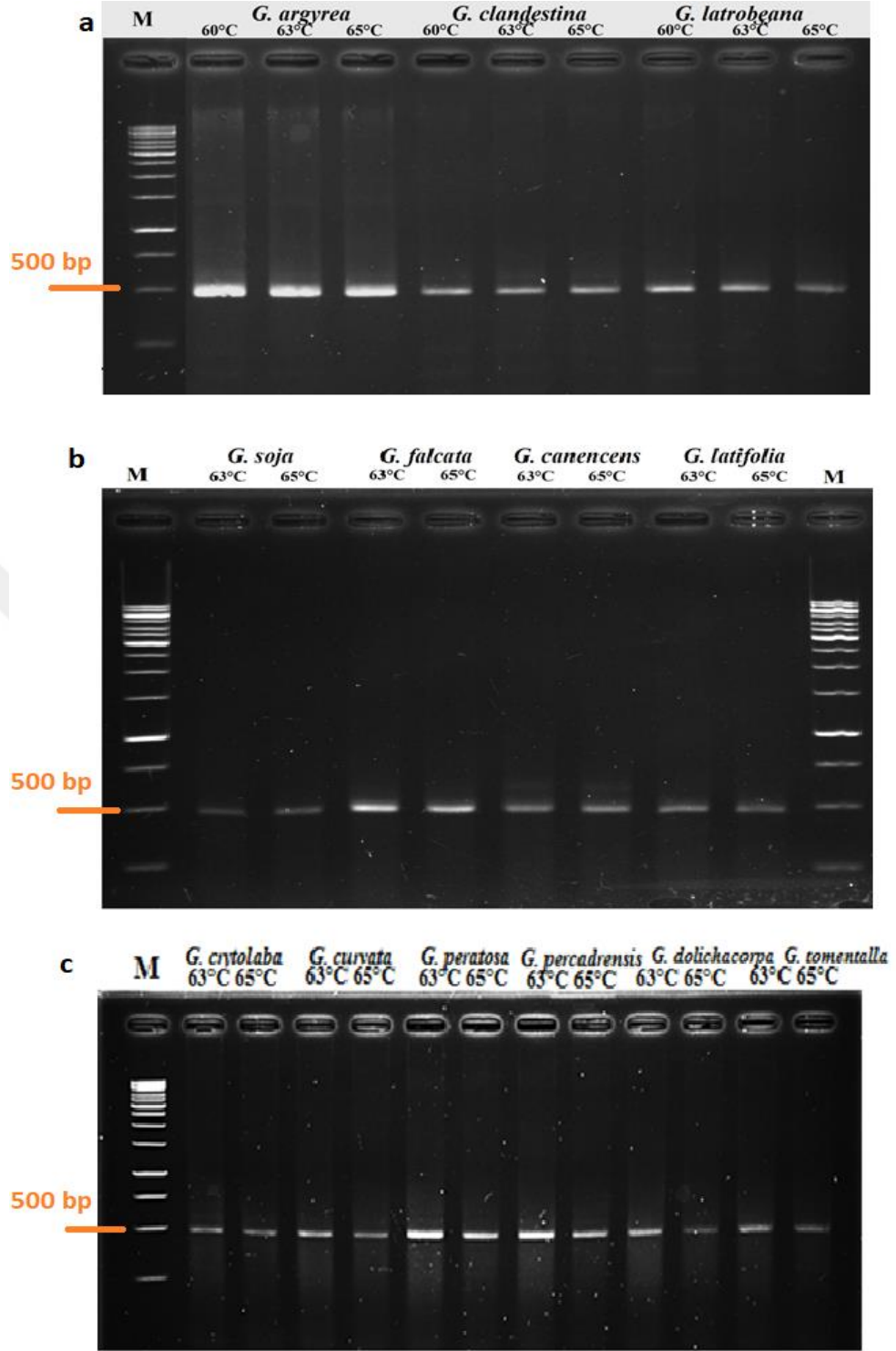
#### 4.5 Soya ve Yabani Türlerinde CenH3 cDNA Sentezinin PCR Optimizasyonu

Standart DNA Taq polimeraz, SeqAmp (Takara) ve PrimeStar HS (Takara) ile yapılan PCR optimizasyonları sonucu yalnızca SeqAmp ve Ex Taq™ DNA polimeraz enzimleri ile yapılan optimizasyonlar başarılı olmuştur. Fakat SeqAmp enzimi ile elde edilen cDNA ürününün vektöre aktarımı başarısız olmuştur. Kontrol amaçlı öncelikle *G. max* türünde Ex Taq™ PCR ürünü ile PGEM-T Easy vektörünün transformasyonu yapılmıştır. Akabinde transformasyon işlemi başarılı olmuştur. Diğer yabani türlerde Ex Taq™ DNA polimeraz ile muamele edilerek tüm türlerde PCR optimizasyonu başarıyla sağlanmıştır (Şekil 4.4.).



**Şekil 4.4.** *Glycine max* cDNA ürününün PCR optimizasyon jel görüntüsü. *G. max* cDNA ürünü 55 °C, 57 °C, 60 °C, 63 °C ve 65 °C sıcaklıklarında gradient PCR yapılmıştır. (M:Markör=1kb)

Elde edilen PCR ürünleri 70V'da 47 dk %1.6'lık agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuşlardır. Agaroz jel sonucu Bio-Rad UV Transilluminatör cihazı ile görüntülenmiştir.

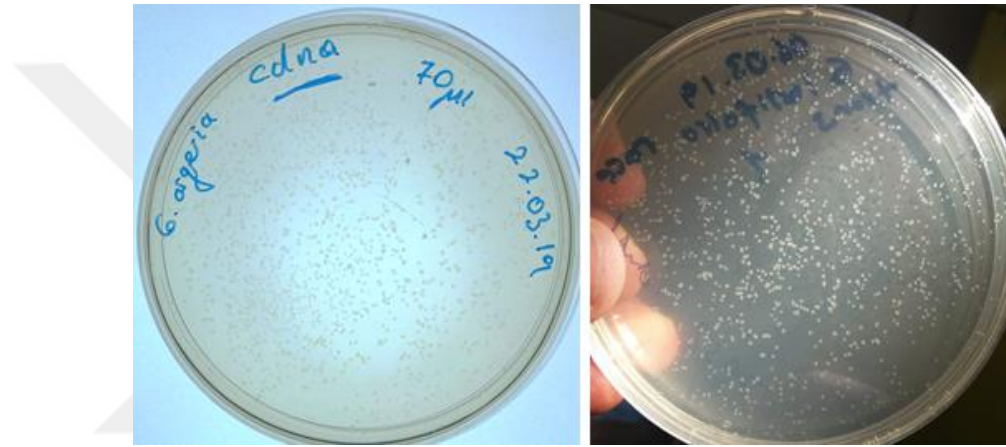


**Şekil 4.5.** Yabani soya türlerinde farklı sıcaklıklarda PCR optimizasyonu sonucu agaroz jel görüntüsü. a) *G. argyrea*, *G. clandestina* ve *G. latrobeana* PCR optimizasyonu. b) *G. soja*, *G. falcata*, *G. canencens* ve *G. latifolia* PCR optimizasyonu. c) *G. crytolaba*, *G. curvata*, *G. peratosa*, *G. pescadrensis*, *G. dolichocarpa* ve *G. tomentella* PCR optimizasyonu.

Soya ve yabancı türlerinde türlerinde gradient PCR sonrası denenen tüm farklı sıcaklıklarda başarıyla sentezleme gerçekleştirilmiştir elde edilmiştir. Ligasyon için 65 °C’de elde edilen PCR ürünü tercih edilmiştir (Şekil 4.5.)

#### 4.6 Bakteriyel Transformasyon

pGEM-T Easy vektörü ile kurulan ligasyon sonrası yapılan transformasyon işleminden tek koloni elde etmek için LB tabağına yayma ekim yapılmıştır. Bütün türlerde yapılan ekimler başarıyla gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.6.).

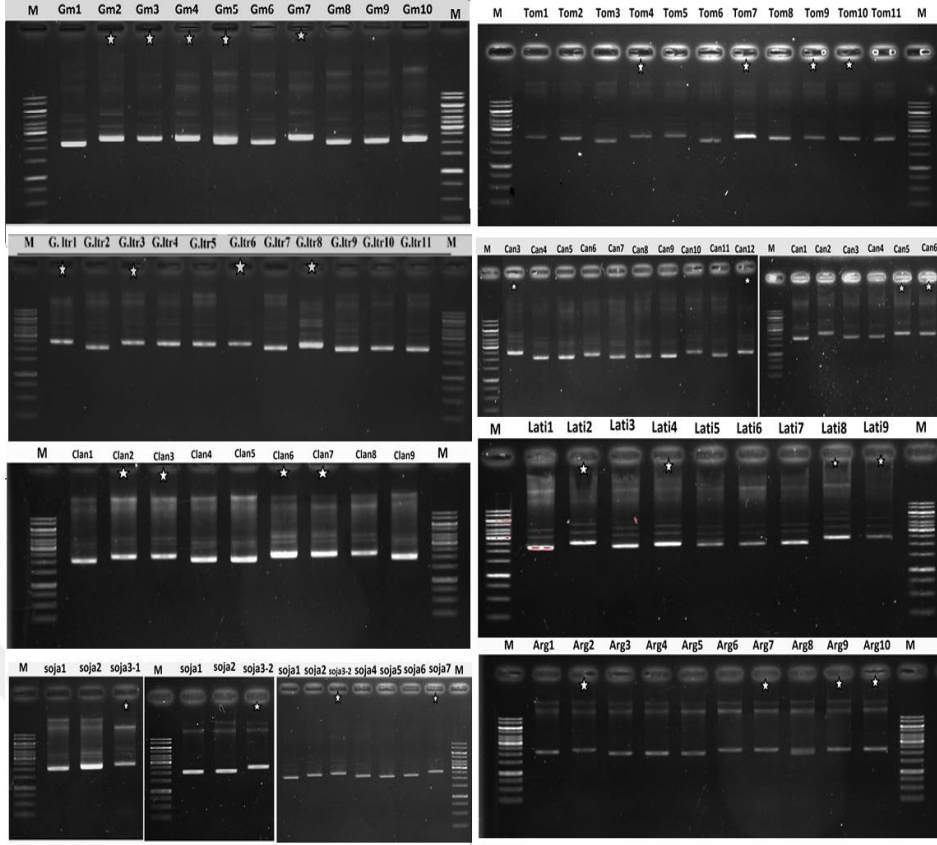


Şekil 4.6. Transformasyon ürününden tek koloni eldesi

#### 4.7 CenH3 cDNA Fragmentlerini İçeren Plazmitlerin Seçimi

Transformasyon işleminden elde edilen tek kolonilerden mini kültürler hazırlanarak plazmit DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmit DNA içeriğinde insert DNA varlığını teyit etmek amacıyla %0.8’lik agaroz jel kullanarak 100 V’da 25 dk yürütme işlemi yapılmıştır.

Farklı soya yabancı türlerinin plazmit DNA örneklerinin ayırt edilmesi için her yapılan izolasyon ürünü bitki ismine uygun kısaltma ile kodlanmıştır. *G. argyrea* (arg), *G. clandestina* (clan), *G. latrobeana* (ltr), *G. soja* (soja), *G. falcata* (fal), *G. canencens* (can), *G. latifolia* (lati), *G. crytolaba* (cry), *G. curvata* (cur), *G. peratosa* (per), *G. pescadrensis* (pes), *G. dolichocarpa* (doli) *G. tomentella* (tom) olarak adlandırılmıştır (Çizelge 4.2.).



**Şekil 4.7.** Agaroz jel elektroforezi kullanılarak cDNA içeren süpersarmal plazmitlerin görüntülenmesi. Dizilemeye gönderilecek plazmit DNA örnekleri yıldız ile işaretlenmiştir. (M:Markör=1kb)

Soya ve 13 farklı yabancı türünde yapılan plazmit izolasyonları sonucu her bir türden dizilemeye gönderilmek üzere 4 farklı insert içeren DNA örneği başarıyla elde edilmiştir (Şekil 4.7.). Seçilen plazmitlerin CenH3 genini içerip içermediğini teyit etmek için koloni PCR ile çoğaltma sağlanmıştır.

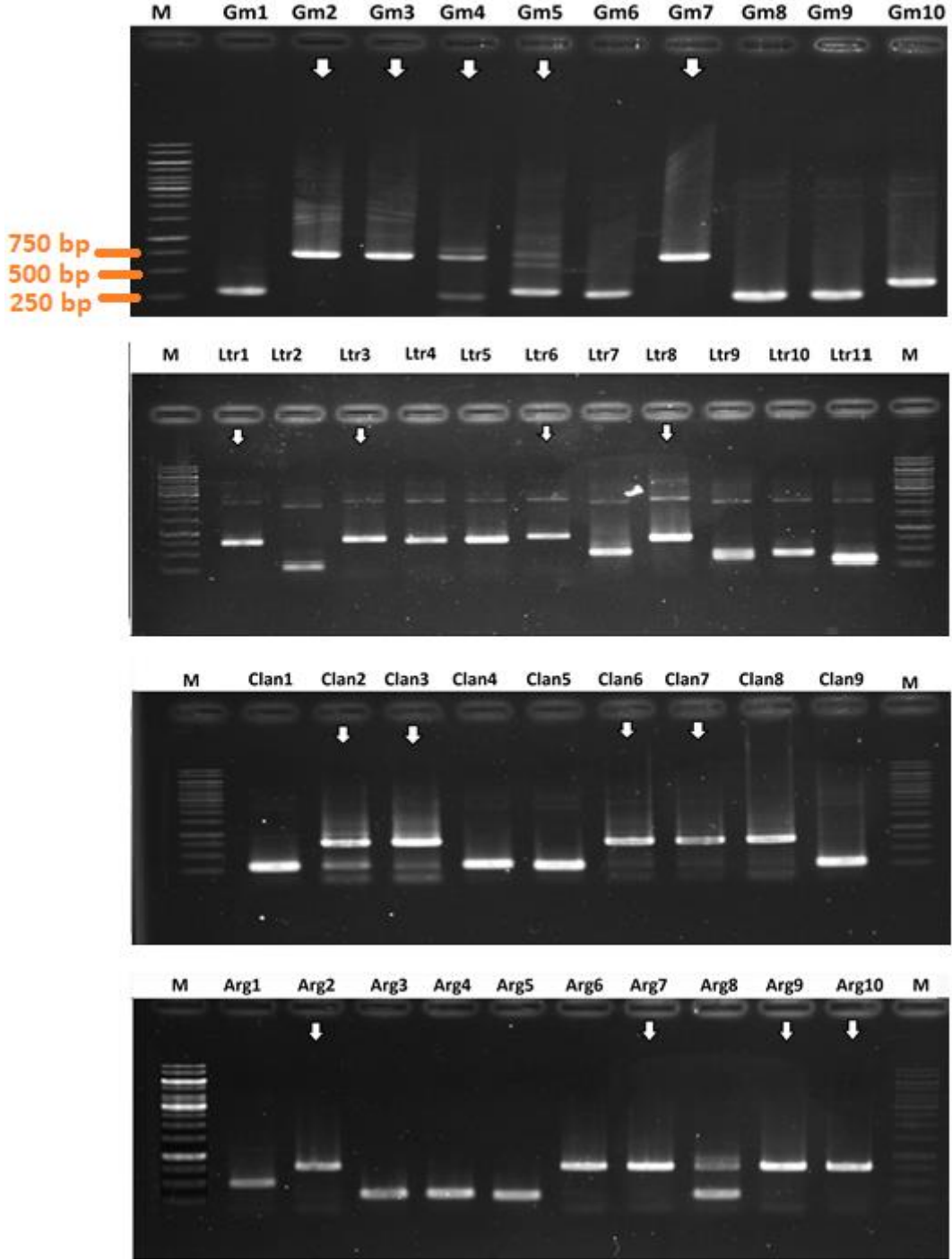
#### 4.8 Koloni PCR İle Pozitif CenH3 Kolonilerinin Seçimi

Plazmit DNA izolasyonu sonucu agaroz jelde insert DNA'lar tam olarak tespit edilemediği için koloni PCR yapılarak klon seçimine gidilmiştir. GmCENH3 cDNA'sı yaklaşık olarak 500 bp olduğu için diğer yabancı türlerde de 500 bp olması beklenilmiştir. Koloni PCR'da M13 primerlerinin bağlanması ile toplamda 750 bp bant büyüklüğüne sahip bir PCR ürünü elde edilmiştir. Her bir tür için 4 farklı olmak üzere toplamda 55 örnek dizileme için seçilmiştir (Çizelge 4.8, Çizelge 4.9, Çizelge 4.10, Çizelge 4.11). Her bir klondan 10 µl hazırlanarak dizilemeye gönderilmiştir.

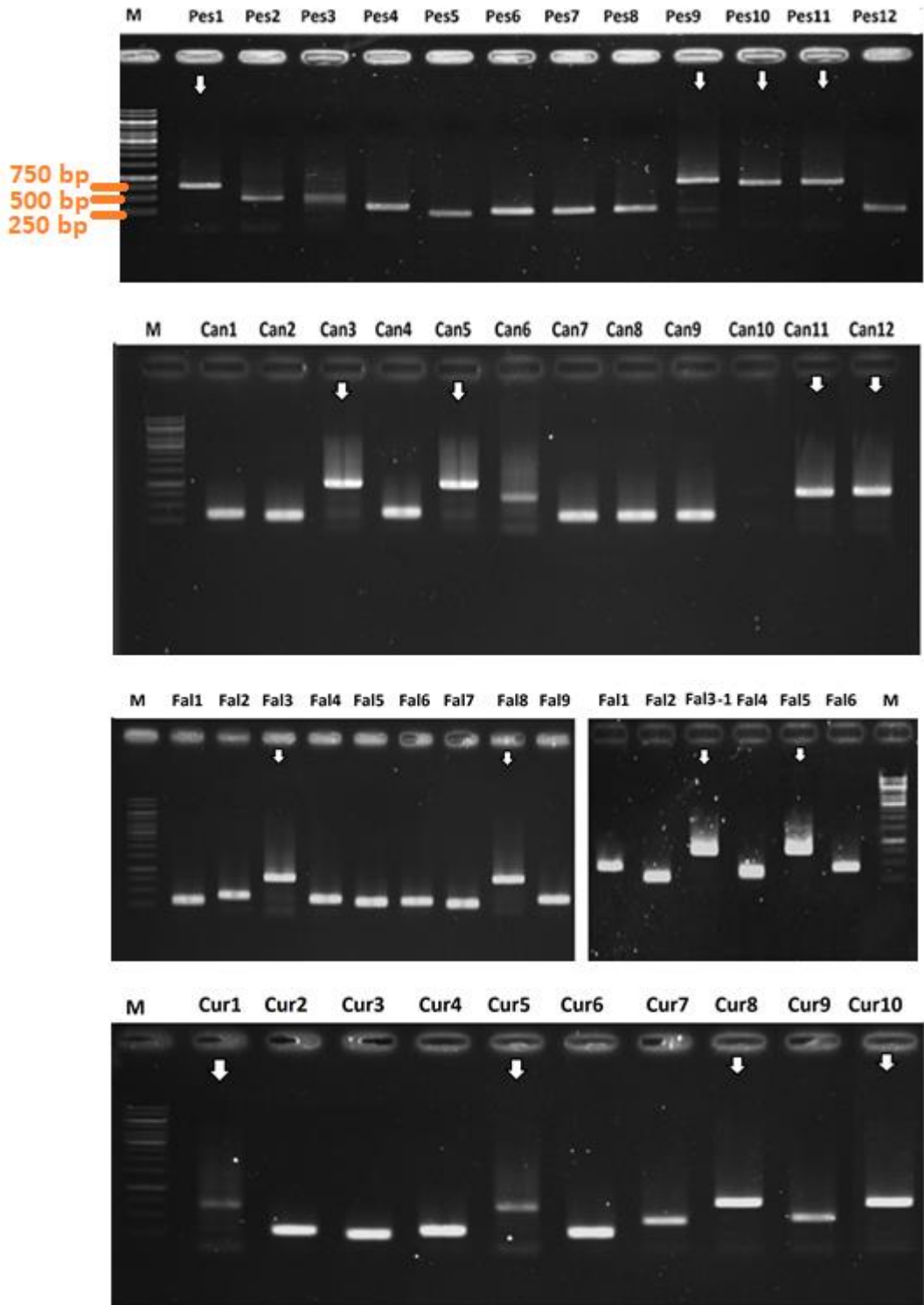
**Çizelge 4.2.** Dizilemeye gönderilen pozitif kolonilerinin adlandırılması

	<b>Türler</b>	<b>Dizilemeye giden örnek adı</b>			
<b>1</b>	<i>Glycine max</i>	Gm2	Gm3	Gm5	Gm7
<b>2</b>	<i>Glycine soja</i>	Soja3-1	Soja3-2	Soja3-3	Soja7
<b>3</b>	<i>Glycine canescens</i>	Can3	Can5	Can11	Can12
<b>4</b>	<i>Glycine clandestina</i>	Clan2	Clan3	Clan6	Clan7
<b>5</b>	<i>Glycine curvata</i>	Cur1	Cur5	Cur8	Cur10
<b>6</b>	<i>Glycine dolichocarpa</i>	Doli8	Doli9	Doli10	Doli12
<b>7</b>	<i>Glycine falcate</i>	Fal3	Fal8	Fal3-1	Fal5
<b>8</b>	<i>Glycine latifolia</i>	Lati2	Lati4	Lati8	Lati9
<b>9</b>	<i>Glycine latrobeana</i>	Ltr1	Ltr3	Ltr6	Ltr8
<b>10</b>	<i>Glycine peratosa</i>	Per1	Per4	Per8	Per9
<b>11</b>	<i>Glycine pescadrensis</i>	Pes1	Pes9	Pes10	Pes11
<b>12</b>	<i>Glycine tomentella</i>	Tom4	Tom7	Tom9	Tom10
<b>13</b>	<i>Glycine crytolaba</i>	Cry5	Cry6	Cry12	Cry12-1
<b>14</b>	<i>Glycine argyrea</i>	Arg2	Arg7	Arg9	Arg10

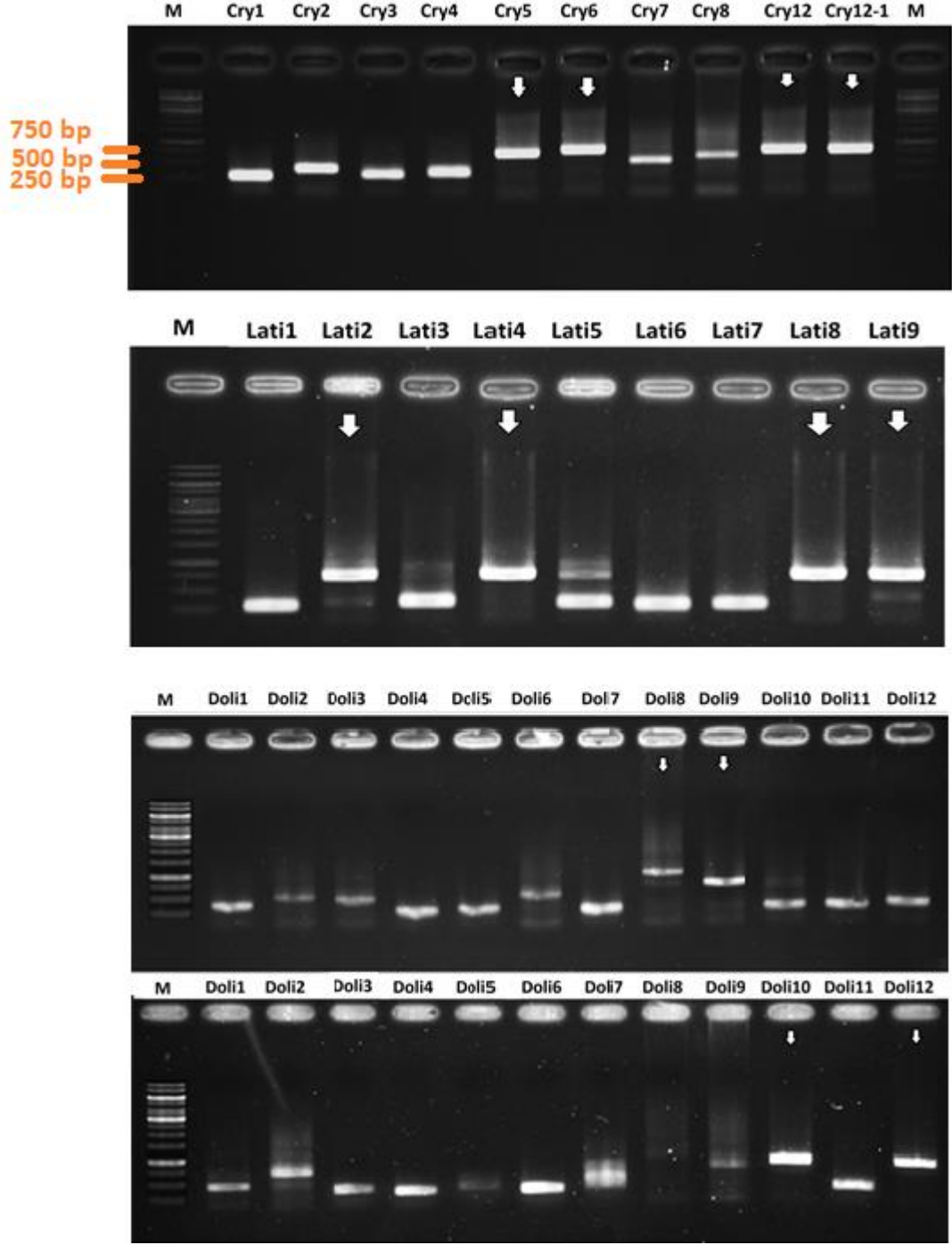




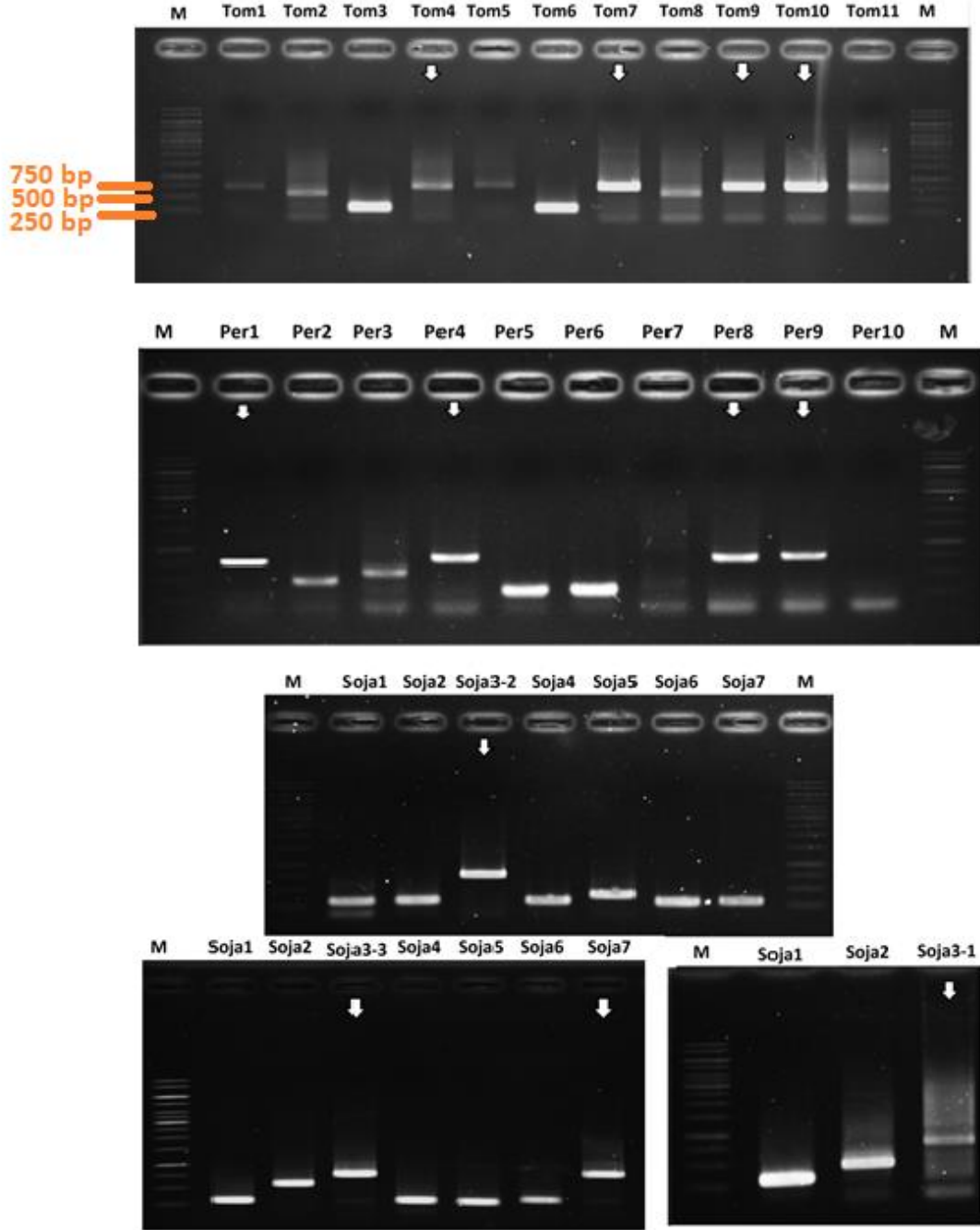
**Şekil 4.8.** Yabani soya türlerinde pozitif klon seçimi. Gm2-Gm3-Gm4-Gm5-Gm7-Ltr1-Ltr3- Ltr6- Ltr8-Clan2- Clan3- Clan6- Clan7-Arg2- Arg7- Arg9- Arg10 dizileme için gönderilmiştir. (M:Markör 1kb)



**Şekil 4.9.** Yabani soya türlerinde pozitif klon seçimi. Pes1-Pes9-Pes10-Pes11-Can3-Can5-Can11-Can12-Fal3-Fal8-Fal3-1-Fal5-Cur1-Cur5-Cur8-Cur10 dizileme için gönderilmiştir. (M:Markör 1kb)



**Şekil 4.10.** Yabani soya türlerinde pozitif klon seçimi. Cry5-Cry6-Cry12-Cry12-1-Lati2-Lati4-Lati8-Lati9-Doli8-Doli9-Doli10-Doli12 dizileme için gönderilmiştir. (M:Markör 1kb)



**Şekil 4.11.**Yabani soya türlerinde pozitif klon seçimi. Tom4-Tom7-Tom9-Tom10-Per1-Per4-Per8-Per9-Soja3-1-Soja3-2-Soja3-3-Soja7 dizileme için gönderilmiştir. (M:Markör 1kb)

#### 4.9 Pozitif Klonların Biyoinformatik Analizi

Dizi analizi sonucunda elde edilen diziler UGENE programı kullanılarak pGEM-T easy vektör dizileri üzerinde bulunan M13 R/M13 F primer dizileri uzaklaştırılmıştır. CENH3 proteininin 5' uç kısmı başa gelecek şekilde tüm diziler düzenlenmiştir. Her

bir dizi NCBI Blast programı kullanılarak analiz edilmiştir. Yapılan biyoinformatik analiz sonucunda tüm yabancı türlerin GmCENH3 protein dizisi benzerlik oranı tespit edilmiştir.

Gm2-Gm3-Gm4-Gm5-Gm7-Ltr1-Ltr3-Ltr6-Ltr8-Clan2-Clan3-Clan6-Clan7-Arg2-Arg7-Arg9-Arg10-Pes1-Pes9-Pes10-Pes11-Can3-Can5-Can11-Can12-Fal3-Fal8-Fal3-1-Fal5-Cur1-Cur5-Cur8-Cur10-Cry5-Cry6-Cry12-Cry12-1-Lati2-Lati4-Lati8-Lati9-Doli8-Doli9-Doli10-Doli12-Tom4-Tom7-Tom9-Tom10-Per1-Per4-Per8-Per9-Soja3-1-Soja3-2-Soja3-3-Soja7 örneklerinden Gm5-Ltr6-Clan2-Pes9-Cur1-Cur5-Cur10-Lati2-Lati4-Tom4- Soja3-1 örnekleri referans dizi ile uyumsuz olduğu için biyoinformatik analize dahil edilmemiştir (Çizelge 4.2.).

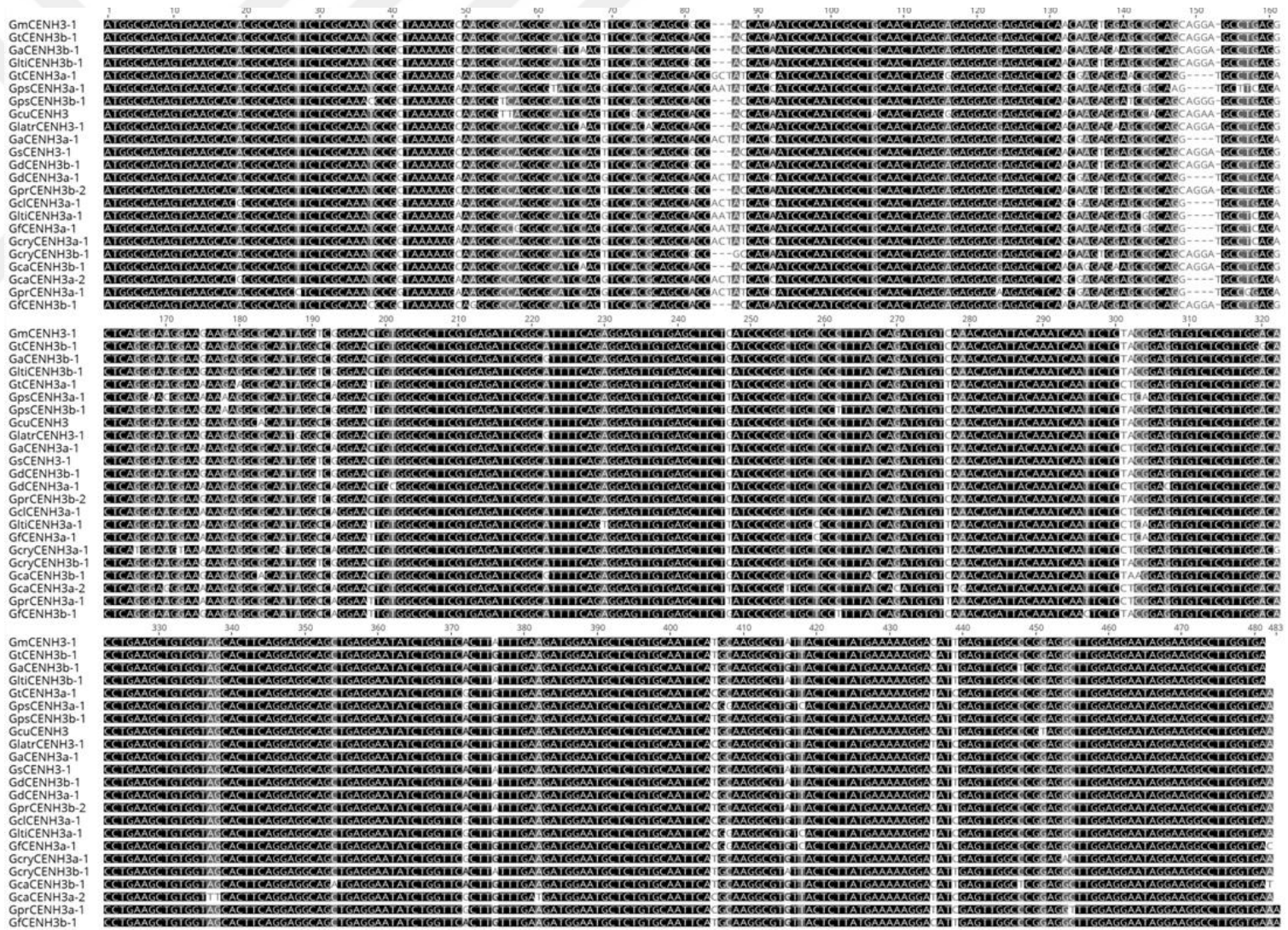
Çoklu protein ve nükleotid hizalaması sonucu bazı yabancı türlerde 2 farklı CENH3 formu olduğu tespit edilmiştir. Yeni keşfedilen CENH3 formları bitki isimlerine uygun olarak kodlanmıştır (Çizelge 4.3.). Bu türlerden *G. argyrea*, *G. canescens*, *G. dolichocarpa*, *G. peratosa*, *G. tomentella*, *G. crytolaba*, *G. pescadrensis* ve *G. latifolia*'da CENH3a ve CENH3b formu bulunmuştur. *Glycine max*, *Glycine soja*, *G. curvata*, *G. falcata* ve *G. latrobeana* türlerinde tek bir CENH3 formu tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.3.** Soya ve yabancı türlerinde CENH3 formlarının isimlendirilmesi

	<b>Türler</b>	<b>CENH3a</b>	<b>CENH3b</b>
<b>1</b>	<i>Glycine max</i>		GmCENH3
<b>2</b>	<i>Glycine soja</i>		GsCENH3
<b>3</b>	<i>Glycine canescens</i>	GcaCENH3a	GcaCENH3b
<b>4</b>	<i>Glycine clandestine</i>	GclCENH3	
<b>5</b>	<i>Glycine curvata</i>		GcuCENH3
<b>6</b>	<i>Glycine dolichocarpa</i>	GdCENH3a	GdCENH3b
<b>7</b>	<i>Glycine falcata</i>	GfCENH3a	
<b>8</b>	<i>Glycine latifolia</i>	GltiCENH3a	GltiCENH3b
<b>9</b>	<i>Glycine latrobeana</i>		GlatrCENH3
<b>10</b>	<i>Glycine peratosa</i>	GprCENH3a	GprCENH3b
<b>11</b>	<i>Glycine pescadrensis</i>	GpsCENH3a	GpsCENH3b
<b>12</b>	<i>Glycine tomentella</i>	GtCENH3a	GtCENH3b
<b>13</b>	<i>Glycine crytolaba</i>	GeryCENH3a	GeryCENH3b
<b>14</b>	<i>Glycine argyrea</i>	GaCENH3a	GaCENH3b

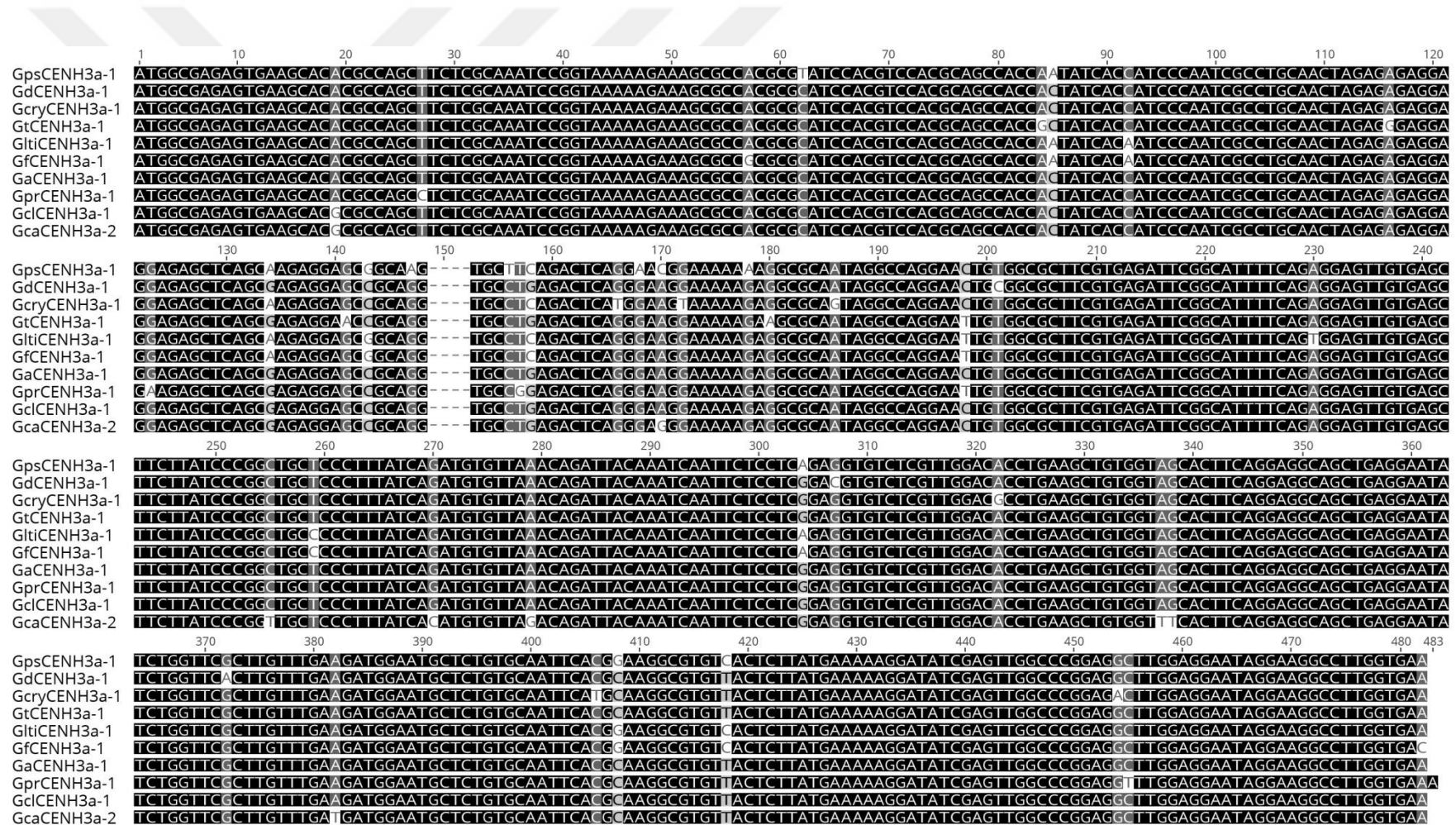
Dizilemeden gelen her bir tür öncelikle kendisi içerisinde 4 farklı örneğinin protein ve nükleotid kıyaslaması yapılmıştır. GmCENH3 referans alınarak tüm yabancı soya türlerinin çoklu protein ve nükleotid hizalaması yapılmıştır. Analiz için Geneious Pro v. 4 ClustalW biyoinformatik yazılımı kullanılmıştır. Soya ve yabancı türlerinde tespit edilen CENH3a ve CENH3b formlarının protein hizalaması sonucu benzerlik oranları belirlenmiştir. Elde edilen protein hizalamaları ile MEGA7 Neighbour-Joining algoritması, 1000 tekrarlı bootstap değeri kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur. (Tamura vd., 2004). Soya ve yabancı türlerinde daha önce yapılan ITS, kloroplast DNA ve kanonikal histon H3 bölgelerine göre yapılmış filogenetik ağaçlar ile kıyaslama yapılmıştır.



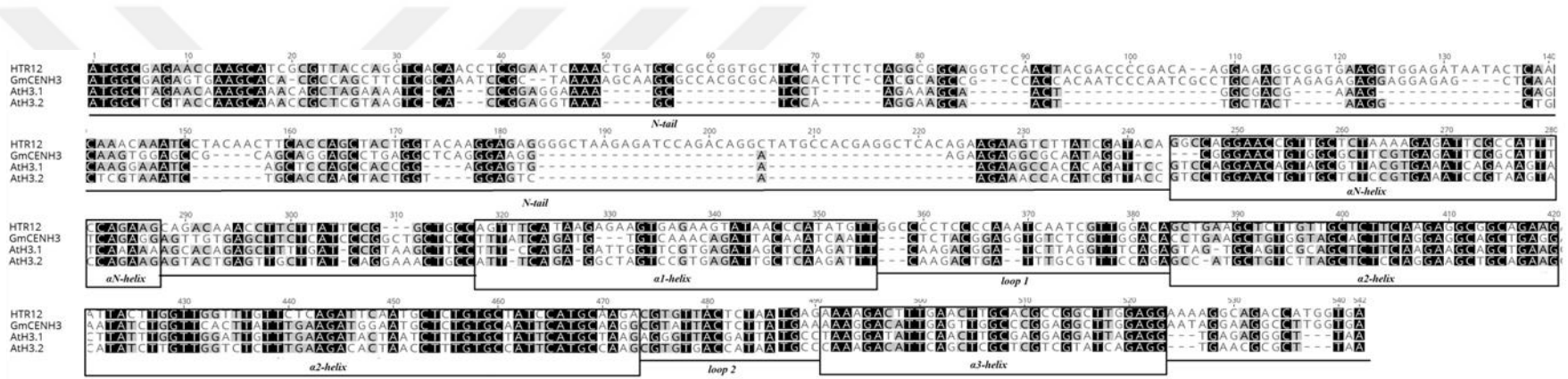




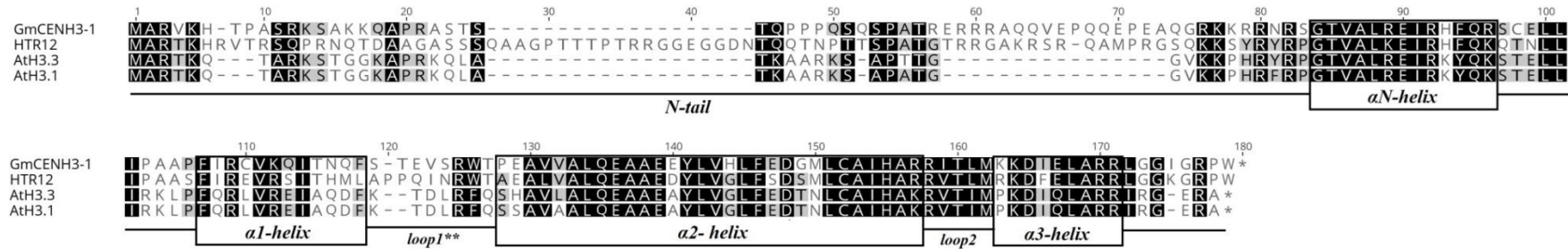




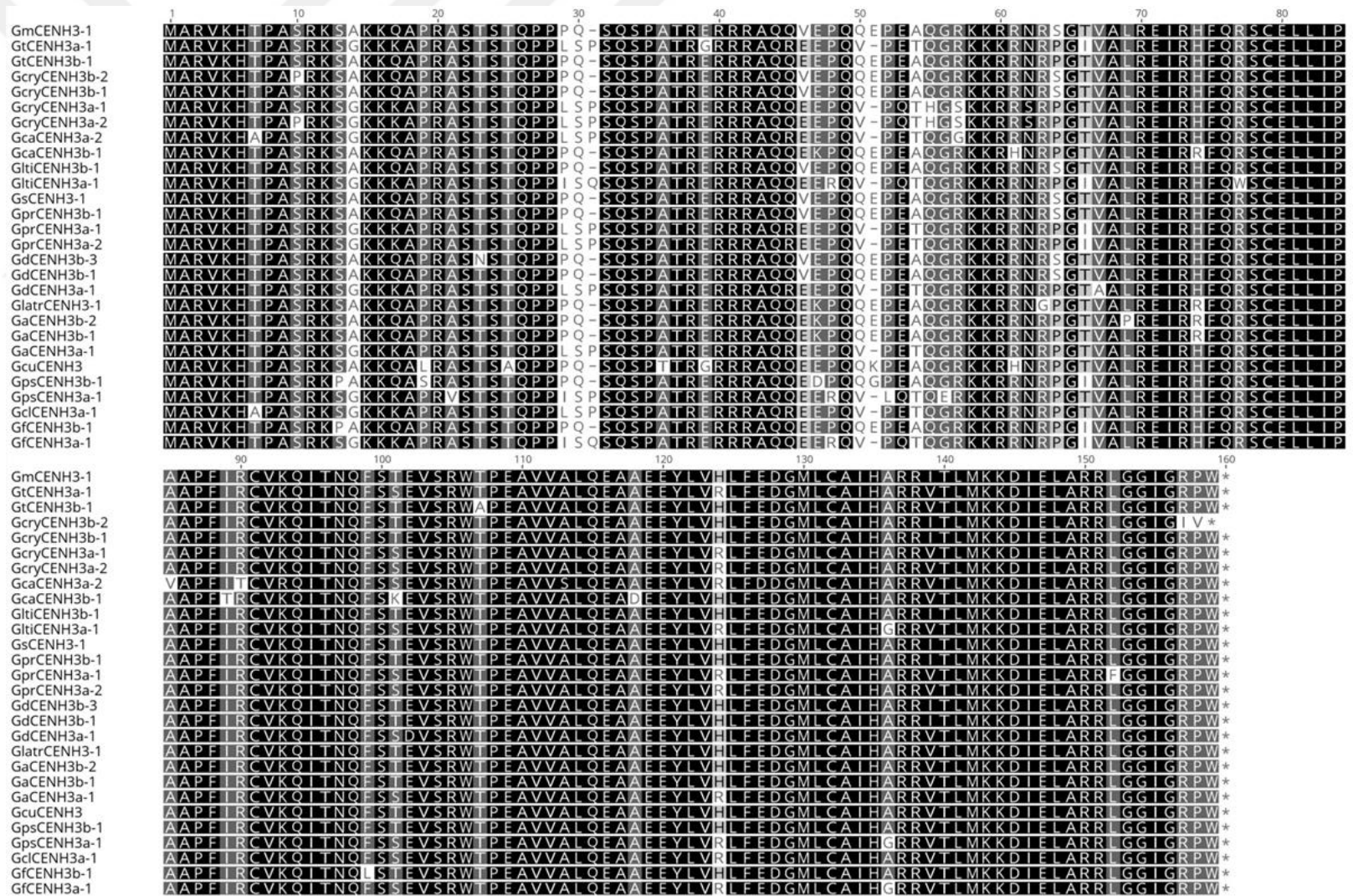
Şekil 4.14. Soya ve yabancı türlerinde CenH3a formu çoklu nükleotid dizi kıyaslaması



Şekil 4.15. *Glycine max*, *Arabidopsis thaliana* CenH3 ve kanonik histon H3 nükleotid kıyaslaması. AtH3.1 (NM\_113651), AtH3.2 (NM\_001085048), HTR12 (AF465800), GmCENH3 (FK014964)



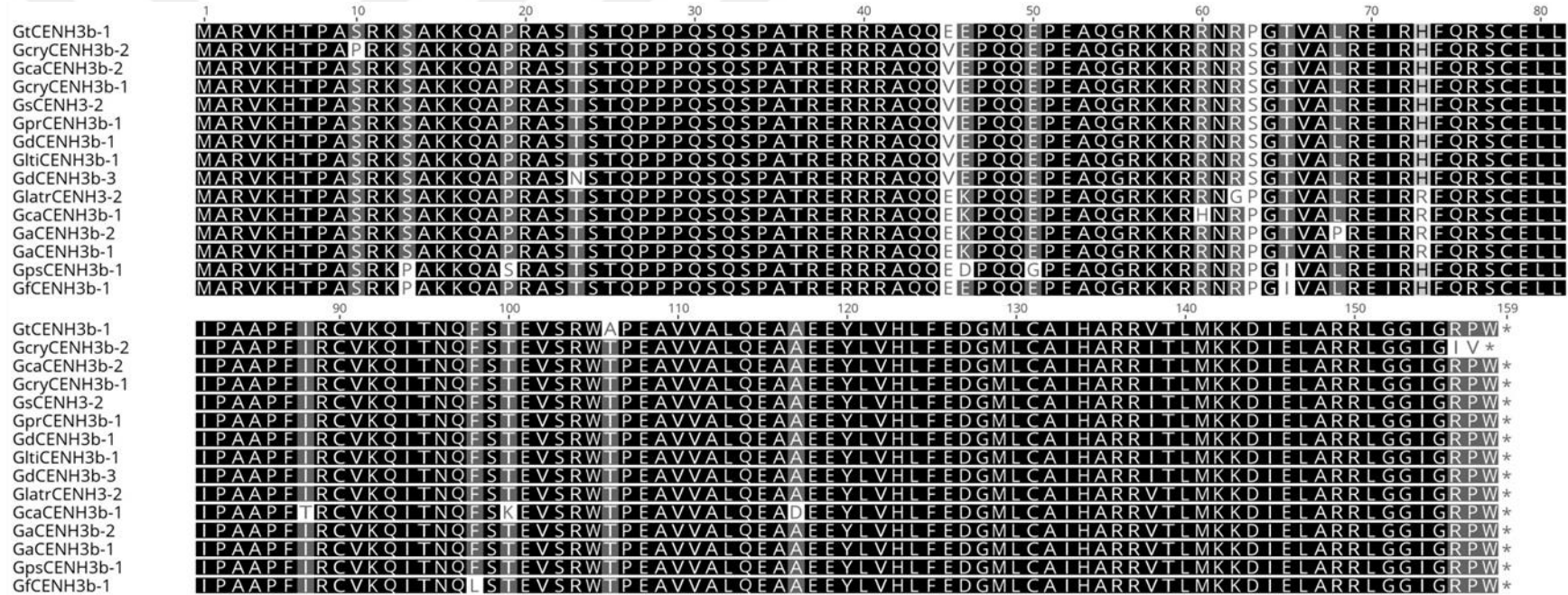
Şekil 4.16. *Glycine max*, *Arabidopsis thaliana* CENH3 ve kanonik histon H3 protein kıyaslaması AtH3.1 (NM\_113651), AtH3.2 (NM\_001085048), HTR12 (AF465800), GmCENH3 (FK014964)



Şekil 4.17. Soya ve yabancı türlerinde CENH3 toplu protein kıyaslaması

1 10 20 30 40 50 60 70 80  
 GprCENH3a-2 MARVKHTPASRKSGKKKAPRASTSTOPPLSPSSOSPATREERRRAQREEPQVPETQGRKKRRNRPGI VALREIRHFORSCELL  
 GprCENH3a-1 MARVKHTPASRKSGKKKAPRASTSTOPPLSPSSOSPATREERRRAQREEPQVPETQGRKKRRNRPGI VALREIRHFORSCELL  
 GtCENH3a-1 MARVKHTPASRKSGKKKAPRASTSTOPPLSPSSOSPATREERRRAQREEPQVPETQGRKKRRNRPGI VALREIRHFORSCELL  
 GaCENH3a-1 MARVKHTPASRKSGKKKAPRASTSTOPPLSPSSOSPATREERRRAQREEPQVPETQGRKKRRNRPGI VALREIRHFORSCELL  
 GdCENH3a-1 MARVKHTPASRKSGKKKAPRASTSTOPPLSPSSOSPATREERRRAQREEPQVPETQGRKKRRNRPGI VALREIRHFORSCELL  
 GclCENH3a-1 MARVKHTPASRKSGKKKAPRASTSTOPPLSPSSOSPATREERRRAQREEPQVPETQGRKKRRNRPGI VALREIRHFORSCELL  
 GcaCENH3a-2 MARVKHTPASRKSGKKKAPRASTSTOPPLSPSSOSPATREERRRAQREEPQVPETQGRKKRRNRPGI VALREIRHFORSCELL  
 GcryCENH3a-1 MARVKHTPASRKSGKKKAPRASTSTOPPLSPSSOSPATREERRRAQREEPQVPETQGRKKRRNRPGI VALREIRHFORSCELL  
 GltiCENH3a-1 MARVKHTPASRKSGKKKAPRASTSTOPPLSPSSOSPATREERRRAQREEPQVPETQGRKKRRNRPGI VALREIRHFORSCELL  
 GfCENH3a-2 MARVKHTPASRKSGKKKAPRASTSTOPPLSPSSOSPATREERRRAQREEPQVPETQGRKKRRNRPGI VALREIRHFORSCELL  
 GfCENH3a-1 MARVKHTPASRKSGKKKAPRASTSTOPPLSPSSOSPATREERRRAQREEPQVPETQGRKKRRNRPGI VALREIRHFORSCELL  
 GpsCENH3a-1 MARVKHTPASRKSGKKKAPRASTSTOPPLSPSSOSPATREERRRAQREEPQVPETQGRKKRRNRPGI VALREIRHFORSCELL  
 90 100 110 120 130 140 150 159  
 GprCENH3a-2 I PAAPFIRCVKQITNQFSSEVSRWTPEAVVALQEAEEFYLVRLFEDGMLCAIHARRVTLMKKDIELARRLGGI GRPW \*  
 GprCENH3a-1 I PAAPFIRCVKQITNQFSSEVSRWTPEAVVALQEAEEFYLVRLFEDGMLCAIHARRVTLMKKDIELARRLGGI GRPW \*  
 GtCENH3a-1 I PAAPFIRCVKQITNQFSSEVSRWTPEAVVALQEAEEFYLVRLFEDGMLCAIHARRVTLMKKDIELARRLGGI GRPW \*  
 GaCENH3a-1 I PAAPFIRCVKQITNQFSSEVSRWTPEAVVALQEAEEFYLVRLFEDGMLCAIHARRVTLMKKDIELARRLGGI GRPW \*  
 GdCENH3a-1 I PAAPFIRCVKQITNQFSSEVSRWTPEAVVALQEAEEFYLVRLFEDGMLCAIHARRVTLMKKDIELARRLGGI GRPW \*  
 GclCENH3a-1 I PAAPFIRCVKQITNQFSSEVSRWTPEAVVALQEAEEFYLVRLFEDGMLCAIHARRVTLMKKDIELARRLGGI GRPW \*  
 GcaCENH3a-2 I PIVAPFITCVRQITNQFSSEVSRWTPEAVVSLQEAEEFYLVRLFDDGMLCAIHARRVTLMKKDIELARRLGGI GRPW \*  
 GcryCENH3a-1 I PAAPFIRCVKQITNQFSSEVSRWTPEAVVALQEAEEFYLVRLFEDGMLCAIHARRVTLMKKDIELARRLGGI GRPW \*  
 GltiCENH3a-1 I PAAPFIRCVKQITNQFSSEVSRWTPEAVVALQEAEEFYLVRLFEDGMLCAIHARRVTLMKKDIELARRLGGI GRPW \*  
 GfCENH3a-2 I PAAPFIRCVKQITNQFSSEVSRWTPEAVVALQEAEEFYLVRLFEDGMLCAIHARRVTLMKKDIELARRLGGI GRPW \*  
 GfCENH3a-1 I PAAPFIRCVKQITNQFSSEVSRWTPEAVVALQEAEEFYLVRLFEDGMLCAIHARRVTLMKKDIELARRLGGI GRPW \*  
 GpsCENH3a-1 I PAAPFIRCVKQITNQFSSEVSRWTPEAVVALQEAEEFYLVRLFEDGMLCAIHARRVTLMKKDIELARRLGGI GRPW \*

Şekil 4.18. Yabani soya türlerinde CENH3a formu çoklu protein kıyaslaması



Şekil 4.19. Yabani soya türlerinde CENH3b formu çoklu protein kıyaslaması

Dizileme sonucu elde edilen dizilerin her bir tür içerisinde nükleotid ve protein hizalaması yapılmıştır. Yapılan bu hizalamalar sonucu CENH3a ve CENH3b formları tespit edilmiştir. EK-B kısmından her bir tür içerisinde yapılan nükleotid kıyaslaması verilmiştir. EK-C kısmında her bir tür içerisinde yapılan protein kıyaslaması verilmiştir.

Geneious yazılımı kullanılarak soya ve yabancı türlerinde nükleotid ve protein çoklu hizalaması yapılmıştır. Hizalama N terminal uç, HFD bölgesi ve tüm gen uzunluğu olmak üzere 3 parametreye göre yapılmıştır.

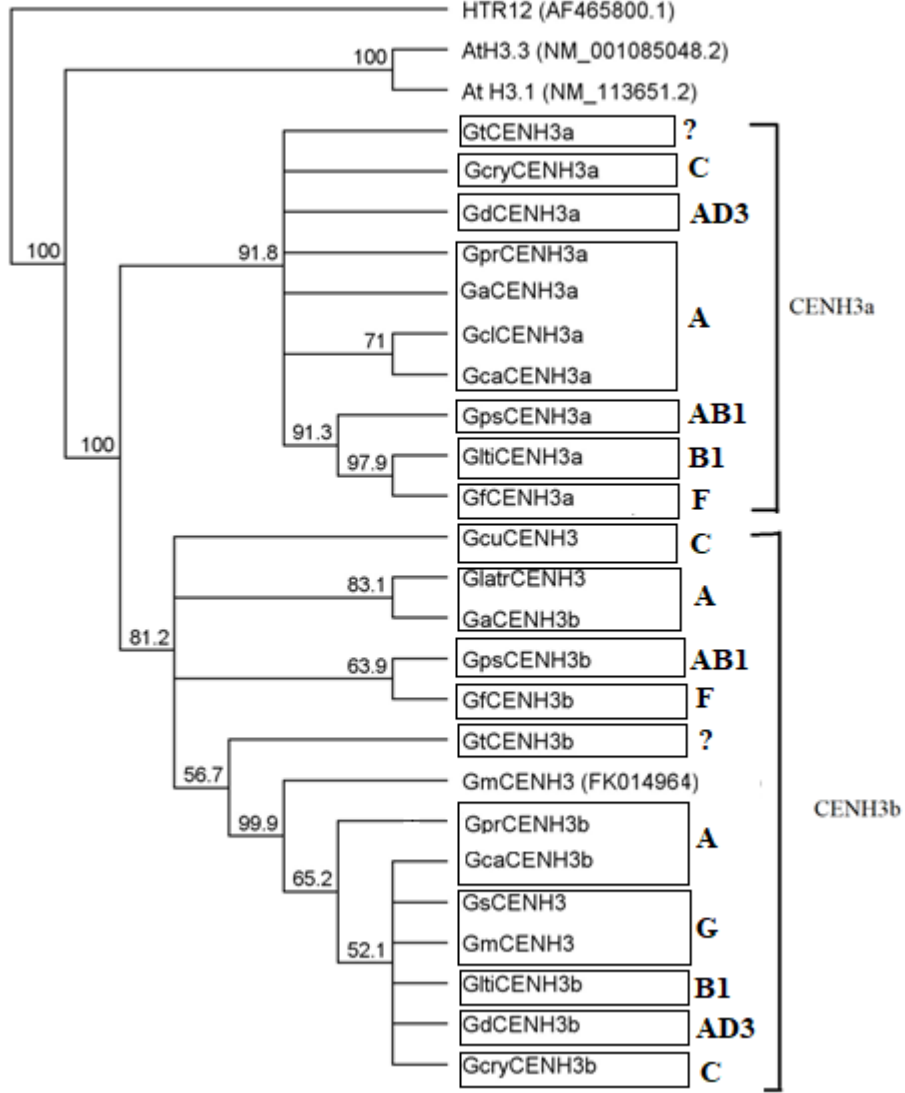
**Çizelge 4.4.** Soya ve yabancı türlerinde tüm gen uzunluğu, N terminal ve HFD bölgesi için yapılan nükleotid hizamasına göre benzerlik oranları

	CenH3a	CenH3b	CenH3a-CenH3b
Tüm gen uzunluğu	%98.1	%97.6	%95
HFD bölgesi	%97.4	%98.8	%96.9
N terminal bölgesi	%93.5	%96.4	%87.5

**Çizelge 4.5.** Soya ve yabancı türlerinde tüm gen uzunluğu, N terminal ve HFD bölgesi için yapılan protein hizamasına göre benzerlik oranları

	CenH3a	CenH3b	CenH3a-CenH3b
Tüm gen uzunluğu	%95.6	%96.8	%92.7
HFD bölgesi	%97.7	%97.8	%96.5
N terminal bölgesi	%93.8	%96	%89.4

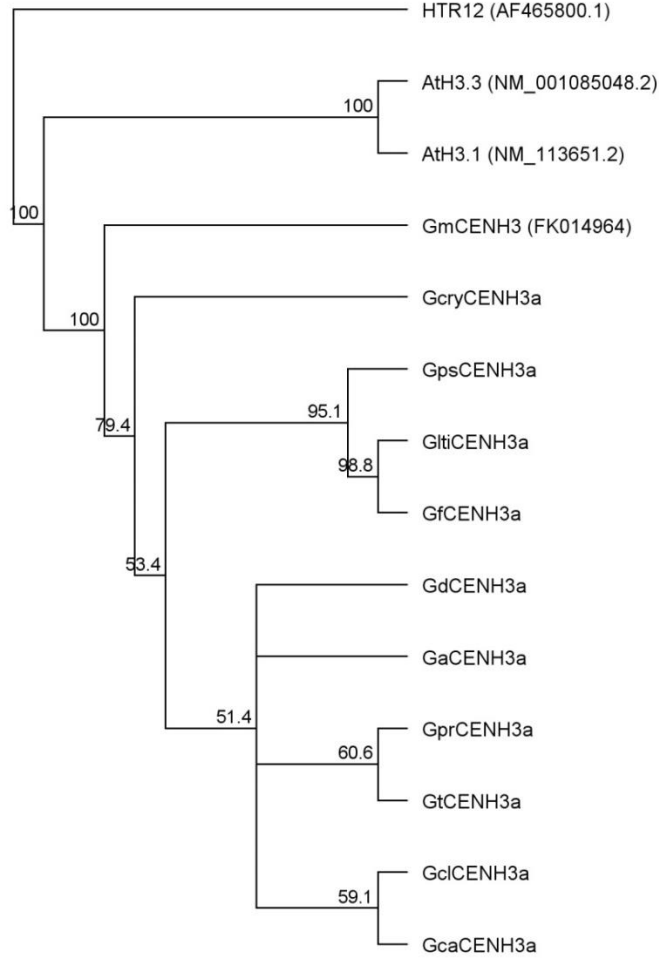
Soya ve yabancı türlerinde yapılan protein ve nükleotid hizalaması sonucu genin HFD bölgesinin N terminal uç bölgesine oranla daha fazla korunduğu tespit edilmiştir. HTR12, GmCENH3, AtH3.1, AtH3.3 protein ve nükleotid hizalaması yapılarak HFD bölgesi ve N terminal uç bölgesi gösterilmiştir.



**Şekil 4.20.** Soya ve yabancı türlerinde toplu CENH3a, CENH3b formu filogenetik analizi. GmCENH3 (FK014964), AtH3.3 (NM\_001085048.2), AtH3.1 (NM\_113651.2), HTR12 (AF465800.1) referans olarak kullanılan dış gruplardır. MEGA7 yazılımı Neighbour-Joining algoritması ile oluşturuldu.

Soya ve yabancı türlerinde MEGA yazılımı kullanılarak filogenetik analiz yapılmıştır. CENH3a ve CENH3b formlarının toplu analizi sonucu a ve b formlarının iki farklı dala ayrıldığı tespit edilmiştir. AtH3.3 (NM\_001085048.2), AtH3.1 (NM\_113651.2), HTR12 (AF465800.1) dış gruplarının filogenetik ağaçta farklı bir dal oluşturduğu görülmüştür. Referans dizimiz GmCENH3 (FK014964) yabancı türlerin CENH3b formlarıyla akrabalık ilişkisinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yabancı soya türlerinde daha önce yapılan H3-D, ITS ve kloroplast DNA dizilerine göre yapılan filogenetik analizler ile kıyaslandığında türler arasında benzer şekilde akrabalık ilişkisi gözlenmiştir. Kültür form *G. max*'a en yakın yabancı tür *G. soja* olarak tespit edilmiştir. *G. crytolaba*, *G.*

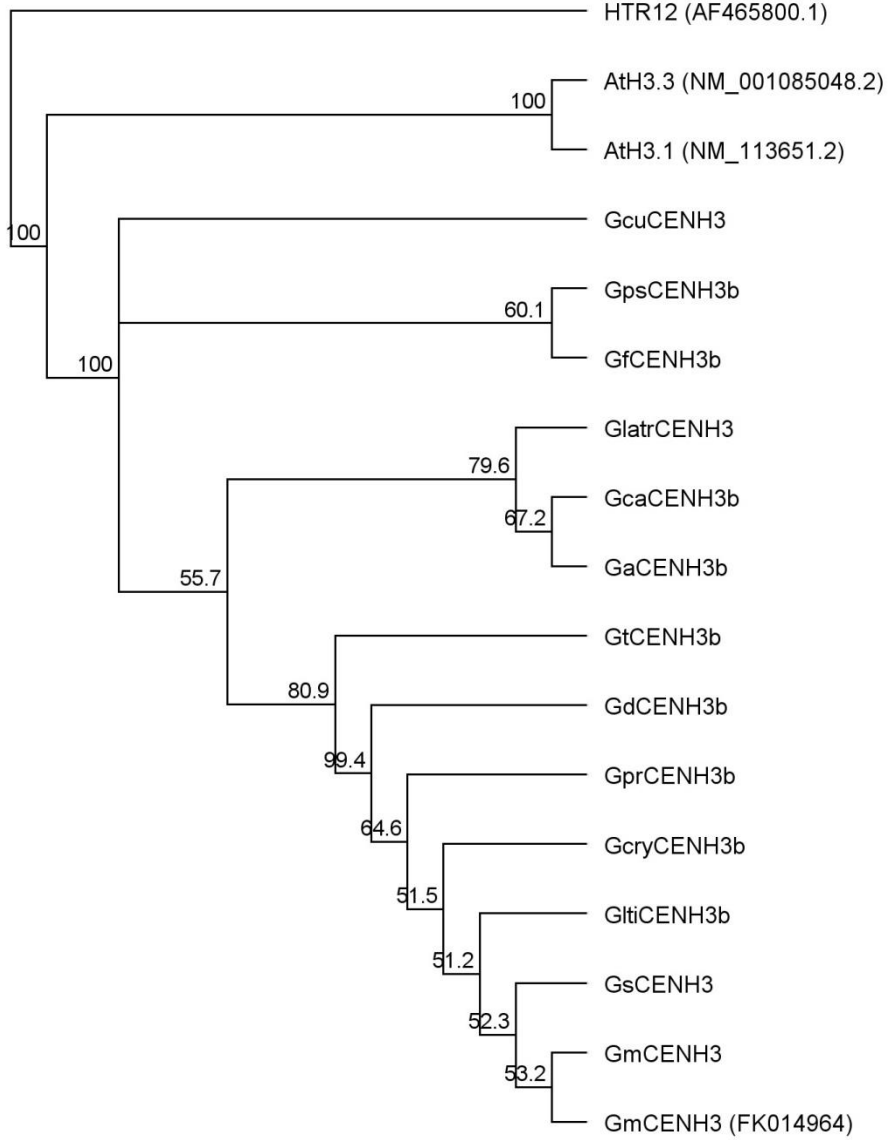
*curvata*, *G. canencens* gibi bazı türler daha önceden yapılan filogenetik analizlere kıyasla farklı akrabalık ilişkileri göstermiştir. CENH3b formu içeren türler arasında *G. max*'a en uzak tür *G. curvata* olarak belirlenmiştir. Ardından *G. falcata*, *G. pescadrensis*, *G. tomentella*, *G. argyrea* ve *G. latrobeana* gelmektedir.



**Şekil 4.21.** Soya ve yabancı türlerinde CENH3a formlarının filogenetik analizi. GmCENH3 (FK014964), AtH3.3 (NM\_001085048.2), AtH3.1 (NM\_113651.2), HTR12 (AF465800.1) referans olarak kullanılan dış gruplardır. MEGA7 yazılımı Neighbour-Joining algoritması ile oluşturuldu.

Referans dizimiz GmCENH3 (FK014964), yabancı soya türlerin CENH3a formları ile uzak akrabalık ilişkisi göstermiştir. On farklı yabancı türde bulunan CENH3a formları 3 farklı gruba ayrılmıştır.





**Şekil 4.22.** Soya ve yabancı türlerinde CENH3a formlarının filogenetik analizi. GmCENH3 (FK014964), AtH3.3 (NM\_001085048.2), AtH3.1 (NM\_113651.2), HTR12 (AF465800.1) referans olarak kullanılan dış gruplardır. MEGA7 yazılımı Neighbour-Joining algoritması ile oluşturuldu.

Yapılan filogenetik analizler sonucu en fazla akrabalık ilişkisi referans dizi GmCENH3 (FK014964) ile GmCENH3 dizisi arasında tespit edilmiştir. *G. max*, *G. soja*, *G. latifolia*, *G. crytolaba*, *G. peratosa*, *G. dolichocarpa* ve *G. tomentella* CENH3b formlarının aynı dala ayrılarak benzer akrabalık ilişkisi gösterdiği görülmüştür. *G. latrobeana*, *G. canencens* ve *G. argyrea* farklı bir dala ayrılmıştır ve birbiri ile akrabalık ilişkisi göstermiştir. *G. pescadrensis*, *G. falcata* ve *G. curvata* diğer türlere kıyasla en uzak akraba olarak tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.6.** Soya ve yabancı türlerinde CENH3b protein formlarının Ka/Ks(w) oranı, DnaSP kullanılarak McDonald-Kreitman22 testi ile analiz edilmiştir. \* ile gösterilen rezidüler pozitif seleksiyonun etkisi altındadır.

	GcryCENH3b	GtCENH3b	GsCENH3	GprCENH3b	GdCENH3b	GltiCENH3b	GdCENH3b	GltrCENH3	GcaCENH3b	GaCENH3b	GaCENH3b	GpsCENH3b	GfCENH3b
GmCENH3	-	0,42	-	-	-	-	0,31	0,23	0,46	0,26	0,26	0,50	0,31
GcryCENH3b		1,05*	-	-	-	-	2,21*	0,46	0,77	0,53	0,57	0,88	0,62
GtCENH3b			0,42	0,42	0,42	0,42	0,39	0,25	0,73	0,31	0,31	0,94	0,42
GsCENH3				-	-	-	0,31	0,23	0,46	0,26	0,26	0,50	0,31
GprCENH3b					-	-	0,31	0,23	0,46	0,26	0,26	0,50	0,31
GdCENH3b						-	0,31	0,23	0,46	0,26	0,26	0,50	0,31
GltiCENH3b							0,31	0,23	0,46	0,26	0,26	0,50	0,31
GdCENH3b								0,24	0,43	0,27	0,26	0,46	0,31
GltrCENH3									0,26	0,09	0,05	0,35	0,23
GcaCENH3b										0,52	0,63	0,68	0,46
GaCENH3b											0,32	0,41	0,26
GaCENH3b												0,44	0,26
GpsCENH3b													0,42
GfCENH3b													

**Çizelge 4.7.** Soya ve yabancı türlerinde CENH3a protein formlarının Ka/Ks(w) oranı, DnaSP kullanılarak McDonald-Kreitman22 testi ile analiz edilmiştir. \* ile gösterilen rezidüler pozitif seleksiyonun etkisi altındadır.

	GdCENH3a	GcryCENH3a	GtCENH3a	GltiCENH3a	GfCENH3a	GaCENH3a	GprCENH3a	GclCENH3a	GcaCENH3a
GpsCENH3a	0,52	0,87	0,39	0,47	0,31	0,71	0,49	0,79	0,74
GdCENH3a		0,84	0,10	0,79	0,56	0,16	0,19	0,32	0,55
GcryCENH3a			0,5	1,58*	1,03*	2,44*	0,71	2,56*	1,37*
GtCENH3a				0,79	0,56	0,08	0,19	0,16	0,36
GltiCENH3a					0,31	1,44*	1,18*	1,60	1,19*
GfCENH3a						0,84	0,79	0,95	0,88
GaCENH3a							0,21	0,00	0,95
GprCENH3a								0,32	0,50
GclCENH3a									0,79
GcaCENH3a									

Türler arasındaki CenH3 dizilerinin sinonim ( $K_s$ ) ve sinonim olmayan ( $K_a$ ) nükleotid değişimleri tespit edilerek oluşturulan  $K_a/K_s$  oranı aralarındaki seleksiyon baskısı belirler ve bu oran  $\omega$  ( $K_a/K_s$ ) ile gösterilmektedir.  $K_a/K_s > 1$  ise pozitif seleksiyon,  $K_a/K_s < 1$  ise negatif seleksiyon,  $K_a/K_s = 1$  ise nötr seleksiyon söz konusudur. Sinonim nükleotid değişimleri A ya da G gibi pürin adı verilen bazların, T ya da C gibi pirimidin adı verilen bazların yer değiştirmesiyle oluşan yüksek sıklıkta transversiyonların meydana gelmesiyle oluşur ve sessiz değişimler olarak bilinmektedir. Adaptif evrim birkaç bölgede konumlanması, kısa sürede evrimleşme periyodu olması ve negatif seleksiyon tarafından elimine edilmesinden dolayı tespit edilmesi zordur.

Soya ve yabancı türlerinde tespit edilen CENH3a ve CENH3b protein formlarının evrimsel analizi DnaSP kullanılarak McDonald-Kreitman22 testi ile yapılmıştır. CENH3a ve CENH3b formlarının tüm gen uzunluğu, N terminal ve HFD bölgelerinin çoklu nükleotid hizalarına göre evrimsel özellikleri belirlenmiştir.

CENH3b tüm gen uzunluğuna göre yapılan  $K_a/K_s$  oranına göre 2 farklı noktada pozitif seleksiyon tespit edilmiştir. Bu pozitif seleksiyonlar *G. crytolaba*, *G. tomentella* ve *G. crytolaba*, *G. dolichocarpa* türleri arasında görülmektedir. Geri kalan 61 farklı noktada ise türler arasında negatif seleksiyon tespit edilmiştir.

EK-C kısmında verilen CENH3b HFD bölgesi  $K_a/K_s$  oranına göre *G. canencens* ve *G. tomentella* arasında pozitif seleksiyon diğer türler arasında ise negatif seleksiyon tespit edilmiştir. CENH3a N terminal bölgesi  $K_a/K_s$  oranına göre sadece *G. canencens* ve *G. falcata* arasında pozitif seleksiyon diğer türler arasında ise negatif seleksiyon tespit edilmiştir.

CENH3a tüm gen uzunluğuna göre yapılan  $K_a/K_s$  oranına göre 9 farklı noktada pozitif seleksiyon görülmüştür. *G. crytolaba* ve *G. latifolia* en fazla seleksiyon gösteren türlerdir. 63 farklı noktada negatif seleksiyon tespit edilmiştir.

EK-C kısmında verilen CENH3a HFD bölgesi  $K_a/K_s$  oranına göre *G. canencens* ve farklı 5 tür arasında pozitif seleksiyon diğer türler arasında ise negatif seleksiyon tespit edilmiştir. CENH3a N terminal bölgesi  $K_a/K_s$  oranına göre 9 farklı noktada pozitif seleksiyon görülmüştür. En fazla pozitif seleksiyon *G. crytolaba*, *G. latifolia*, *G.*

*clandestina* ve *G. argyrea* türlerinde tespit edilmiştir. Diğer türler arasında ise negatif seleksiyon tespit edilmiştir.

Elde edilen bulgular sonucu CENH3a formu CENH3b formuna göre daha fazla pozitif seleksiyon göstermiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda görüldüğü gibi N terminal uç bölgesi en fazla seleksiyon gösteren bölge olarak teyit edilmiştir.



## BÖLÜM V

### SONUÇ

Tüm ökaryotlarda yapısal ve işlevsel olarak korunmuş bulunan sentromer, kromozomun doğru bir şekilde ayrılması açısından öneme sahiptir. Sentromerlerin yapısı, boyutu ve dağılımı, korunmuş fonksiyonuna rağmen türlere göre farklılık göstermektedir. Sentromerik histon H3 (CENH3) proteini ökaryotik sentromerlerde bu işlevsel özelliği ve farklılığı sağlamada önemli bir işaret olarak kabul edilmektedir. Birçok farklı organizma da ayrıntılı olarak tanımlanan CenH3 geninin türe özgünlüğü, yüksek derecede değişken özellikleri ve formları ön plana çıkmıştır. CENH3 proteininde NH2 ve C terminal bölgelerinde bulunan amino asit farklılıkları sonucu türe özgü farklı formlar oluşmuştur. Bu da organizmalar arasında özgünlüğü oluşturur. Son zamanlarda yapılan araştırmalar sonucunda elde edilen veriler, formlar arasındaki bu farklılığın altında yatan sebeplerin seleksiyon baskısından kaynaklandığına işaret etmektedir. CENH3'nin sentromer üzerindeki önemi düşünüldüğünde, kültüre alınmış ve yabancı *Glycine* soya türlerinin CenH3 geninin moleküler yapısının ayrıntılı olarak incelenmeye ihtiyacı vardır. Bu hedefe ulaşmak amacıyla farklı yabancı soya türlerinde CenH3 geni cDNA moleküler klonlanması yapılmıştır. Soya ve yabancı türlerinden elde edilen pozitif klonlar dizilerek çoklu nükleotid ve protein hizalaması yapılmıştır. Elde edilen genler arasındaki filogenetik ilişki belirlenerek ne oranda pozitif seleksiyona uğradığı ortaya koyulmuştur.

Tek vd. (2010), soyada CenH3 geninin cDNA klonlamasını yaparak DNA ve protein dizi analizi yapılmıştır. Sentromerik çalışmalar ile sentromerde iki farklı satellit tekrar dizisi ve bir retrotranspozon tespit edilmiştir. Bu çalışmanın devamı niteliğinde bu tez çalışması yürütülmüştür. On üç farklı yabancı soya türünde CenH3 geni klonlanarak dizilenmiştir ve varlığı karakterize edilmiştir. Dizilemeden gelen her bir tür için öncelikle kendisi içerisinde 4 pozitif klonun protein ve nükleotid kıyaslaması yapılmıştır. Ardından GmCENH3 (FK014964) referans alınarak tüm yabancı soya türleri arasında çoklu protein ve nükleotid hizalaması yapılmıştır. Çoklu hizalama sonucu bazı yabancı türlerde 2 farklı form olduğu tespit edilmiştir. Yeni keşfedilen CENH3 formları bitki isimlerine uygun olarak kodlanmıştır. Bu türlerden *G. argyrea* (GaCENH3a-GaCENH3b), *G. canencens* (GcaCENH3a-GcaCENH3b), *G. dolichocarpa*

(GdCENH3a-GdCENH3b), *G. peratosa* (GprCENH3a-GprCENH3b), *G. tomentella* (GtCENH3a-GtCENH3b), *G. crytolaba* (GcryCENH3a-GcryCENH3b), *G. pescadrensis* (GpsCENH3a-GpsCENH3b), *G. latifolia* (GltiCENH3a-GltiCENH3b) olarak adlandırılmıştır. Geri kalan türlerde tek bir form bulunmuştur. Bu türler, *G. soja* (GsCENH3), *G. latrobeana* (GlatrCENH3), *G. clandestina* (GclCENH3), *G. curvata* (GcuCENH3) ve *G. falcata* (GfCENH3a) olarak adlandırılmıştır (Çizelge 4.3.). Bu 5 türde ikinci bir CENH3 formu varsa bile her bir bitki türünden sınırlı sayıda klon dizilendiği için tespit edilememiştir. Daha fazla klonun dizilenmesi sonucu farklı formlar elde edilerek farklı bir filogenetik ağaç eldesi olasıdır. *G. curvata* gibi bazı türlerde 4 pozitif klondan sadece 1 klonda başarılı dizi eldesi genetik ağacın oluşmasını sınırlayan bir faktör olabilmektedir. Elde edilen tüm formlar Genious yazılımı kullanılarak hizalanmıştır. CENH3a ve CENH3b formlarının toplu protein hizalaması sonucu benzerlik oranı %92.7 bulunmuştur. Yabani türlerde CENH3a formları benzerlik oranı %95.3, CENH3b formları benzerlik oranı %98.1 olarak tespit edilmiştir. Diğer bazı bitki türlerinde yapılan CENH3 cDNA moleküler klonlaması sonucu farklı formlar keşfedilmiştir. Örneğin *Secale cereale* ve alt sınıflarında CenH3 geninin karakterize edilmiştir. Sonuç olarak genomunda CenH3 geninin 2 farklı formunun bulunduğunu rapor edilmiştir. *Hordeum*, *Triticum* gibi yakından ilişkili türler ve *Secale* arasında %81-83 oranında nükleotid benzerliği bulunan  $\alpha$ CENH3 ve  $\beta$ CENH3 formlarının intron ve ekson yapısında farklılıklar vardır. Bu farklılık özellikle N terminal ucunda meydana gelen delesyon ve insersiyondan kaynaklanmaktadır. *Secale* türleri ve altsınıfları arasında  $\alpha$ CENH3 ve  $\beta$ CENH3 dizilerinin %98-100 oranında özdeş olduğu belirlenmiştir (Evtushenko 2017). Baklagil türlerinde CenH3 geni dizisinin ortak atanın duplikasyonundan kaynaklı CenH3-1 ve CenH3-2 olmak üzere iki paralog çeşidi ortaya çıkartılmıştır. *Pisum* ve *Lathyrus*'da her iki paralogta korunurken, CenH3-1 geni sonradan *Vicia* ve *Lens* altsınıflarında kaybolmuştur ya da susturulmuştur. Fakat fonksiyonel CenH3 proteini üretilmeye devam etmiştir ve dinamik sentromer yapının korunduğu belirlenmiştir (Neumann, 2015).

Soya ve yabani türlerinden elde edilen hizalamalar ile MEGA yazılımı kullanılarak filogenetik analiz yapılmıştır. Daha önce yapılan ITS (Kollipara vd., 1997), kloroplast DNA (Asaf vd., 2017) ve H3-D (González-Orozco vd., 2012) bölgelerine göre yapılmış filogenetik ağaçlar ile kıyaslama yapılmıştır. Kıyaslama sonucu CENH3a ve CENH3b formlarının toplu analizi sonucu a ve b formlarının iki farklı dala ayrıldığı tespit

edilmiştir. AtH3.3 (NM\_001085048.2), AtH3.1 (NM\_113651.2), HTR12 (AF465800.1) dış gruplarının filogenetik ağaçta farklı bir dal oluşturduğu görülmüştür. Referans dizimiz GmCENH3 (FK014964) yabancı türlerin CENH3b formlarıyla akrabalık ilişkisinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Kültür form *G. max*'a en yakın yabancı tür *G. soja* olarak tespit edilmiştir. *G. crytolaba*, *G. curvata*, *G. canencens* gibi bazı türler daha önceden yapılan filogenetik analizlere kıyasla farklı akrabalık ilişkileri göstermiştir.

CENH3a ve CENH3b formlarının çoklu protein hizalaması sonucuna göre DnaSP yazılımı McDonald-Kreitman testi ile Ka/Ks oranları belirlenmiştir. Ka/Ks oranı 1'in üstünde olduğunda pozitif seleksiyon göstermektedir. Ka/Ks oranı 1'in altında olması negatif seleksiyonun etkisinde olduğunu göstermektedir. CENH3a ve CENH3b formlarının tüm gen uzunluğu, N terminal ve HFD bölgelerinin çoklu nükleotid hizalarına göre seleksiyon baskısı belirlenmiştir. Bu pozitif seleksiyonlar *G. crytolaba*, *G. tomentella* ve *G. crytolaba*, *G. dolichocarpa* türleri arasında görülmektedir. Geri kalan 61 farklı noktada ise türler arasında negatif tespit edilmiştir. CENH3a tüm gen uzunluğuna göre yapılan Ka/Ks oranına göre 9 farklı noktada pozitif seleksiyon görülmüştür. *G. crytolaba* ve *G. latifolia* en fazla seleksiyon gösteren türlerdir. 63 farklı noktada negatif seleksiyon tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular sonucu CENH3a formu CENH3b formuna göre daha fazla pozitif seleksiyon tespit edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda görüldüğü gibi N terminal uç bölgesi en fazla seleksiyon gösteren bölge olarak teyit edilmiştir.

Soya ve yabancı türlerinde keşfedilen CenH3 geni dizisi gelecekte yapılabilecek sitogenetik ve moleküler genetik çalışmalara temel niteliğindedir. Sitolojik olarak CenH3 genine uygun antikor tasarlanarak FISH ve CHIP gibi teknikler ile mikroskop altında kromozomların metafaz görünümü elde edilebilecektir ve sentromerin yeri teyit edilebilecektir. Ayrıca ilgili genimizin hangi kromozom üzerinde olduğu ve sentromer üzerinde bulunan retrotranspozon ve satellit tekrarlar tespit edilebilecektir. CenH3 geninin genomik DNA lokusunun moleküler klonlaması yapılarak elde edilen cDNA ürünleri ile kıyaslanması mümkündür. Bunun sonucunda gende bulunan intron-ekzon sayısı ve uzunluğu tespit edilebilecektir. Bu kıyaslamalar sonucu gen üzerinde oluşan alternatif kırılmalar belirlenebilecektir.

## KAYNAKLAR

Ahmad, K., ve Henikoff, S., “The histone variant H3. 3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly”, *Molecular Cell* 9(6), 1191-1200, 2000.

Anonim, FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, 2017.

Anonim, TÜİK., Türkiye İstatistik Kurumu resmi internet sayfası USDA., united states department of agriculture <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?locale=tr>, 2018.

Anonim, Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/cukurovataem/Menu/33/Soya-Cesitleri>, 2019a.

Anonim, <http://lifemap-ncbi.univ-lyon1.fr/?tid=45690>, 2019b.

Arıoğlu, H. H., “Soya Yetiştirme Tekniği”, *Adana Teknik Ziraî Müdürlüğü Eğitim Semineri*, Adana, 9 s, 1983.

Arıoğlu, H. H., Sögüt, T., Çubukçu, P., “Farklı Olgunlaşma Grubuna Giren Bazı Soya Çeşitlerinin İkinci Ürün Koşullarında Önemli Tarımsal Özellikleri İle Bu Özellikler Arasındaki İlişkilerin Belirlenmesi”, *Soya Üretimi Ve Sorunları Semineri Bildirisi*, Hatay, 23 Mayıs 1982, 2001.

Arıoğlu, H. H., “Yağ Bitkileri Yetiştirme ve Islahı Ders Kitabı”, *Genel Yayın*, (220), 2007.

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



Asaf, S., Khan, A. L., Khan, M. A., Imran, Q. M., Kang, S. M., Al-Hosni, K., ve Lee, I. J. “Comparative analysis of complete plastid genomes from wild soybean (*Glycine soja*) and nine other *Glycine* species”, *PloS One* 12(8), e018228, 2017.

Badole, S. L., Patil, K. Y., ve Rangari, V. D., “Antihyperglycemic Activity of Bioactive Compounds from Soybeans”, *In Glucose Intake and Utilization in Pre-Diabetes and Diabetes* pp. 225-227, 2014.

Blakeslee, A. F., Belling, J., Farnham, M. E., ve Bergner, A. D. (1922). A haploid mutant in the jimson weed, "Datura stramonium". *Science*, 55(1433), 646-647.

Black, B. E., Foltz, D. R., Chakravarthy, S., Luger, K., Woods Jr, V. L., ve Cleveland, D. W., “Structural determinants for generating centromeric chromatin”, *Nature* 430(6999), 578, 2004.

Black, B. E., ve Cleveland, D. W., “Epigenetic centromere propagation and the nature of CENP-a nucleosomes”, *Cell* 144(4), 471-479, 2011.

Buchwitz, B. J., Ahmad, K., Moore, L. L., Roth, M. B., ve Henikoff, S., “Cell division: a histone-H3-like protein in *C. elegans*”, *Nature* 401(6753), 547, 1999.

Carter, T. E., Nelson, R. L., Sneller, C. H., ve Cui, Z., “Genetic diversity in soybean”, *Soybeans: Improvement, Production, and Uses, (Soybeansimprove)* 303-416, 2004.

Dower, W. J., Miller, J. F., ve Ragsdale, C. W., “High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic acids research*, 16(13), 6127-6145. morphological and crossing groups”, *Evolution* 44(2), 371-389, 1988.

Doyle, J. J., Doyle, J. L., ve Brown, A. H. D., “A chloroplast-DNA phylogeny of the wild perennial relatives of soybean (*Glycine* subgenus *Glycine*): congruence with morphological and crossing groups”, *Evolution* 44(2), 371-389, 1990.

Doyle, J. J., Doyle, J. L., ve Brown, A. H., “Incongruence in the diploid B-genome species complex of *Glycine* (Leguminosae) revisited: histone H3-D alleles versus chloroplast haplotypes.” *Molecular Biology and Evolution* 16(3), 354-362, 1999.

Dunwell, J. M., “Haploids in flowering plants: origins and exploitation”, *Plant Biotechnology J* 8: 377–424, 2010.

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

Forster, B. P., Heberle-Bors, E., Kasha, K. J., ve Touraev, A., “The resurgence of haploids in higher plants”, *Trends In Plant Science* 12(8), 368-375, 2007.

Fukuda, Y., “Cytogenetical studies on the wild and cultivated Manchurian soybeans (*Glycine L.*)”, *Jpn. J. Bot.* 6, 489-506, 1933.

Gent, J. I., Schneider, K. L., Topp, C. N., Rodriguez, C., Presting, G. G., ve Dawe, R. K., “Distinct influences of tandem repeats and retrotransposons on CENH3 nucleosome positioning”, *Epigenetics and Chromatin* 4(1), 3, 2011.

Geneious Pro v. 4, Created by the Biomatters development team, Copyright (C) 2005-2018.

Gong, Z., Wu, Y., Koblížková, A., Torres, G. A., Wang, K., Iovene, M., ve Macas, J., “Repeatless and repeat-based centromeres in potato: implications for centromere evolution”, *The Plant Cell* 24(9), 3559-3574, 2012.

González-Orozco, C. E., Brown, A. H., Knerr, N., Miller, J. T., ve Doyle, J. J., “Hotspots of diversity of wild Australian soybean relatives and their conservation in situ”, *Conservation Genetics* 13(5), 1269-1281, 2012.

Guha, S., ve Maheshwari, S. C., “In vitro production of embryos from anthers of *Datura*”, *Nature* 204(4957), 497, 1964.

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

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

Hirsch, C. D., Wu, Y., Yan, H., ve Jiang, J., “Lineage-specific adaptive evolution of the centromeric protein CENH3 in diploid and allotetraploid *Oryza* species”, *Molecular Biology and Evolution* 26(12), 2877-2885, 2009.

Hirsch, C. D., ve Jiang, J., “Centromeres: sequences, structure, and biology”, In Plant Genome Diversity Volume 1, *Springer* pp. 59-70, 2012.

Hwang, E. Y., Wei, H., Schroeder, S., Fickus, E., Quigley, C., Elia, P., ve Song, Q., “Genetic Diversity and Phylogenetic Relationships of Annual and Perennial *Glycine* Species”, *BioRxiv* 557439, 2019.

Hymowitz, T., Collins, F. I., Panczner, J., ve Walker, W. M., “Relationship between the content of oil, protein, and sugar in soybean seed”, *1. Agronomy Journal* 64(5), 613-616, 1972.

Hymowitz, T., Singh, R. J., ve, “The genomic relationships among six wild perennial species of the genus *Glycine* subgenus *Glycine* Willd”, *Theoretical and Applied Genetics* 71(2), 221-230, 1985.

Hymowitz, T., Singh, R. J., ve Kollipara, K. P., “The genomes of the Glycine”, *Plant Breeding Reviews* 16, 289-318, 1998.

Iwata, A., Tek, A. L., Richard, M. M., Abernathy, B., Fonsêca, A., Schmutz, J., ve Murata, M., “Identification and characterization of functional centromeres of the common bean”, *The Plant Journal* 76(1), 47-60, 2013.

Jansen, A., ve Verstrepen, K. J., “Nucleosome positioning in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 75(2), 301-320, 2011.

Jenuwein, T., ve Allis, C. D., “Translating the histone code”, *Science* 293(5532), 1074-1080, 2001.

Jiao, Y., Wickett, N. J., Ayyampalayam, S., Chanderbali, A. S., Landherr, L., Ralph, P. E., ve Soltis, D. E., “Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms”, *Nature* 473(7345), 97, 2011.

Kawabe, A., Nasuda, S., ve Charlesworth, D., “Duplication of centromeric histone H3 (HTR12) gene in *Arabidopsis halleri* and *A. lyrata*, plant species with multiple centromeric satellite sequences”, *Genetics* 174(4), 2021-2032, 2006.

Kelliher, T., Starr, D., Wang, W., McCuiston, J., Zhong, H., Nuccio, M. L., ve Martin, B., “Maternal haploids are preferentially induced by CENH3-tailswap transgenic complementation in maize”, *Frontiers In Plant Science* 7, 414, 2016.

Kim, M. Y., Lee, S., Van, K., Kim, T. H., Jeong, S. C., Choi, I. Y., ve Kim, W. Y., “Whole-genome sequencing and intensive analysis of the undomesticated soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) genome”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(51), 22032-22037, 2010.

Kollipara, K. P., Singh, R. J., ve Hymowitz, T., “Phylogenetic and genomic relationships in the genus *Glycine* Willd. based on sequences from the ITS region of nuclear rDNA” *Genome* 40(1), 57-68, 1997.

Lackey, J. A., “Neonotonia, a new generic name to include *Glycine wightii* (Arnott) Verdcourt (Leguminosae, Papilionoideae)”, *Phytologi*, 37(3), 209-212, 1977.

Li, J. F., Li, L., ve 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), 1, 2010.

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

Luger, K., ve Richmond, T. J., "DNA binding within the nucleosome core", *Current Opinion In Structural Biology* 8(1), 33-40, 1998.

Maeshima, K., Imai, R., Tamura, S. ve Nozaki, T., "Chromatin as dynamic 10-nm fibers", *Chromosoma* 123 (3), 225-237, 2014.

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

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

Malik, H. S., and Henikoff, S., "Major evolutionary transitions in centromere complexity", *Cell* 138, 1067–1082, 2009.

Masonbrink, R. E., Gallagher, J. P., Jareczek, J. J., Renny-Byfield, S., Grover, C. E., Gong, L., ve Wendel, J. F., "CENH3 evolution in diploids and polyploids of three angiosperm genera", *BMC plant biology* 14(1), 38, 2014.

McDonald, J. H., ve Kreitman, M., "Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*", *Nature* 351(6328), 652, 1991.

McGinty, R. K., & Tan, S., "Nucleosome structure and function", *Chemical Reviews* 115(6), 2255-2273, 2014.

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

Monen, J., Maddox, P. S., Hyndman, F., Oegema, K., ve Desai, A., “Differential role of CENP-A in the segregation of holocentric *C. elegans* chromosomes during meiosis and mitosis”, *Nature Cell Biology* 7(12), 1248, 2005.

Moraes, I., Yuan, Z. F., Liu, S., Souza, G. M., Garcia, B. A., ve Casas-Mollano, J. A., “Analysis of histones H3 and H4 reveals novel and conserved post-translational modifications in sugarcane”, *PloS One* 10(7), e0134586, 2015.

Morey, L., Barnes, K., Chen, Y., Fitzgerald-hayes, M., ve Baker, R. E., “The Histone Fold Domain of Cse4 Is Sufficient for”, *Microbiology* 3(6), 1533–1543, 2004.

Muiruri, K. S., Britt, A., Amugune, N. O., Nguu, E. K., Chan, S., ve Tripathi, L., “Expressed Centromere Specific Histone 3 (CENH3) Variants in Cultivated Triploid and Wild Diploid Bananas (*Musa spp.*)”, *Frontiers In Plant Science* 8, 1034, 2017.

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

Nagaki, K., Kashihara, K., ve Murata, M., “Visualization of diffuse centromeres with centromere-specific histone H3 in the holocentric plant *Luzula Nivea*”, *The Plant Cell* 17(7), 1886-1893, 2005.

Neumann, P., Pavlíková, Z., Koblížková, A., Fuková, I., Jedličková, V., Novák, P., ve Macas, J., “Centromeres off the hook: massive changes in centromere size and structure following duplication of CENH3 gene in *Fabeae* species”, *Molecular Biology and Evolution* 32(7), 1862-1879, 2015.

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

Palmer, D. K., O'Day, K., Wener, M. H., Andrews, B. S., ve Margolis, R. L., “A 17-kD centromere protein (CENP-A) copurifies with nucleosome core particles and with histones”, *The Journal of Cell Biology* 104(4), 805-815, 1987.

Ratnaparkhe, M. B., Singh, R. J., ve Doyle, J. J., “Wild crop relatives: genomic and breeding resources, legume crops and forage”, *Springer* 2011.

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

Rozas, J. P., Librado, J. C., Sánchez-DelBarrio, X., ve Rozas, R., “DnaSP version 5.10.1 (Selfextracting file of 4.6 Mb). Universitat de Barcelona, 2010.

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

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

Takahashi, K., Chen, E. S., ve Yanagida, M., “Requirement of Mis6 centromere connector for localizing a CENP-A-like protein in fission yeast”, *Science* 288(5474), 2215-2219, 2000.

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

Talbert, P. B., Bryson, T. D., ve Henikoff, S., “Adaptive evolution of centromere proteins in plants and animals”, *Journal of Biology* 3(4), 18, 2004.

Tamura, K., Nei, M., ve Kumar, S., “Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(30), 11030-11035, 2004.

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

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

Tek, A. L., Kashihara, K., Murata, M., ve Nagaki, K., “Identification of the centromere-specific histone H3 variant in *Lotus japonicus*”, *Gene* 538(1), 8-11, 2014.

Tek, A. L., Stupar, R. M., ve Nagaki, K., “Modification of centromere structure: a promising approach for haploid line production in plant breeding”, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 39(4), 557-562, 2015.

Thomas, R. J., ve SPRENT, J. I. “The Effects of Temperature on Vegetative and Early Reproductive Growth of a Cold-Tolerant and, a Cold-Sensitive Line of *Phaseolus vulgaris* L. 1. Nodulation, Growth and Partitioning of Dry Matter, Carbon and Nitrogen”, *Annals of Botany* 53(4), 579-588, 1984.

USDA, A., “National Genetic Resources Program”, *Germplasm Resources Information Network-(GRIN)* 2010.

Verdaasdonk, J. S., ve Bloom, K., “Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12(5), 320, 2011.

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



Wędzony, M., Forster, B.P., Żur, I., Golemic, E., Szechyńska-Hebda, M., Dubas, E. and Gotębiowska, G., “Progress in doubled haploid technology in higher plants. In: Advances in Haploid Production in Higher Plants”, *Springer-Verlag* pp. 1–34, 2009.

Wilson, R. F., “Soybean: market driven research needs”, *Springer* (pp. 3-15), 2008.

Wolf, W. J., “Soybean proteins. Their functional, chemical, and physical properties”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 18(6), 969-976, 1970.

Woodman, M. E., “Direct PCR of intact bacteria (colony PCR)”, *Current Protocols in Microbiology* 9(1), A-3D, 2008.

Yılmaz, H. A. ve Efe, L., “Bazı Soya (*Glycine max* (L.) Merrill) Çeşitlerinin Kahramanmaraş Koşullarında II. Ürün Olarak Yetiştirilebilme Olanakları”, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* (22): 135-142s, 1998.

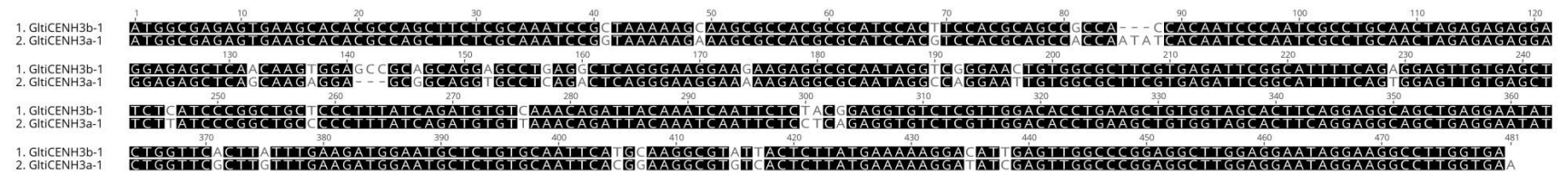
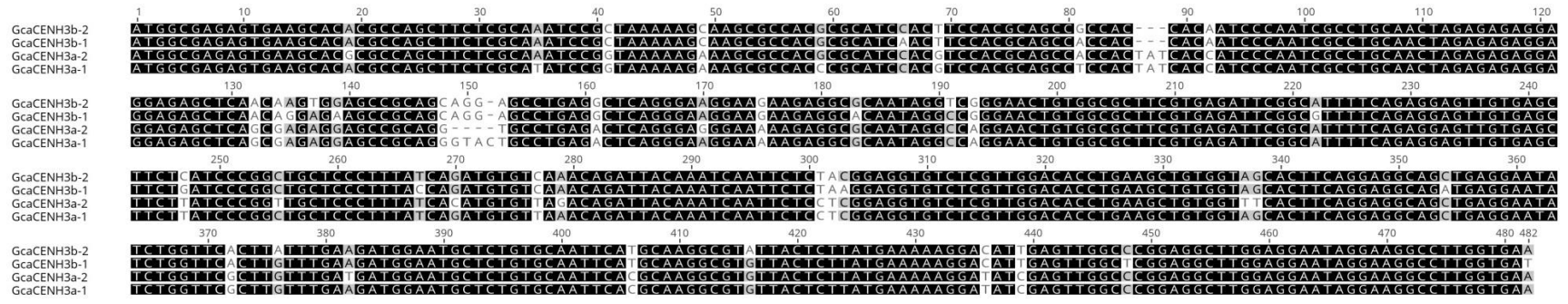
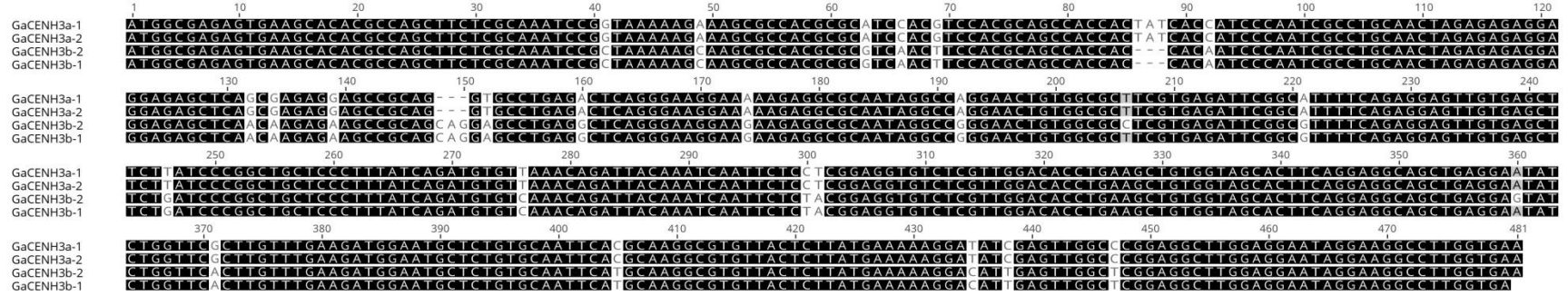
Yuan, J., Guo, X., Hu, J., Lv, Z., ve Han, F., “Characterization of two CENH3 genes and their roles in wheat evolution”, *New Phytologist* 206(2), 839-851, 2015.

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

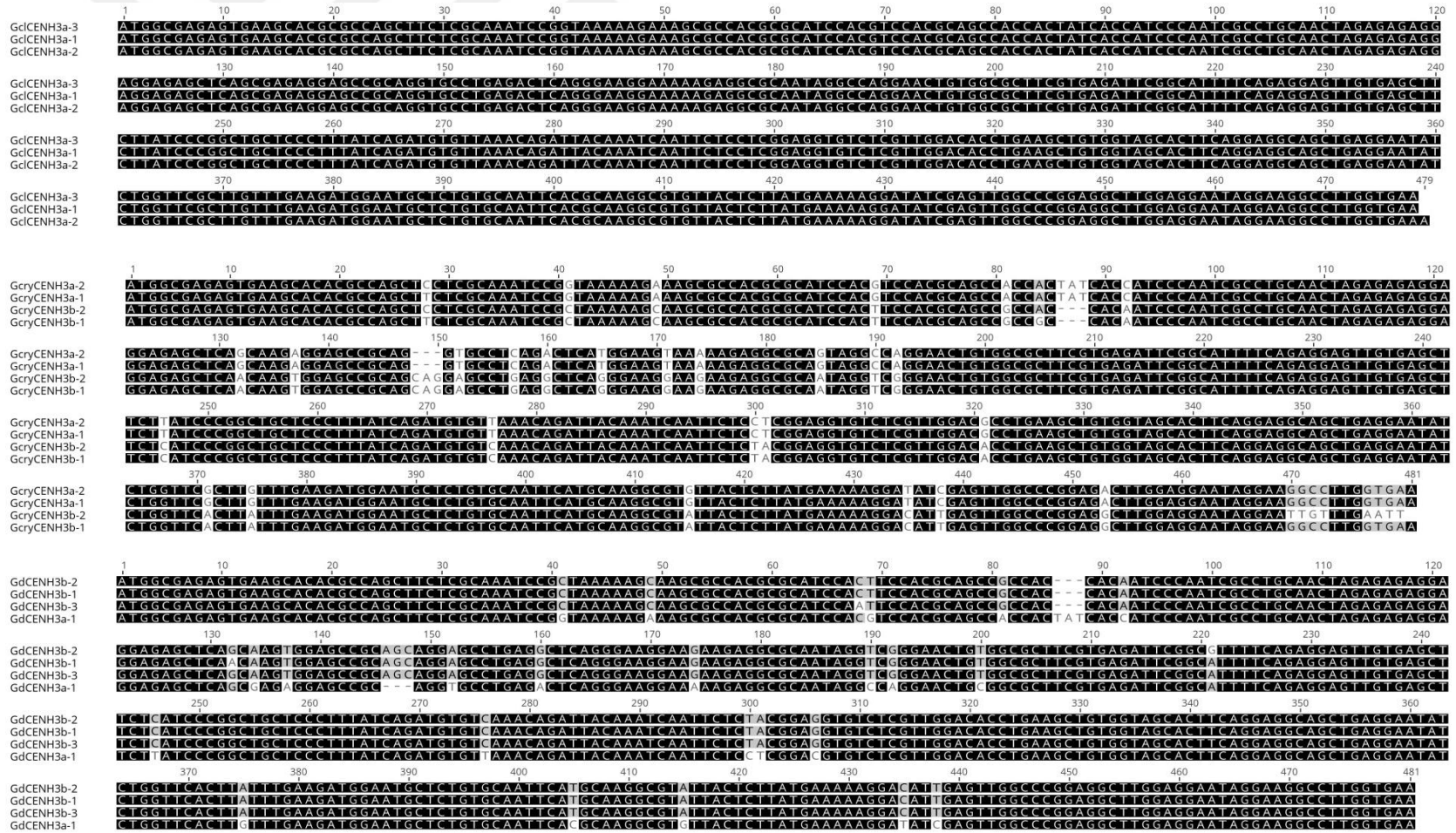
Zhu, B., Sun, Y., Qi, L., Zhong, R., ve Miao, X., “Dietary legume consumption reduces risk of colorectal cancer: evidence from a meta-analysis of cohort studies”, *Scientific reports* 5, 8797, 2015.

# EKLER

**EK-A** Soya ve yabancı türlerinde tür içerisinde yapılan çoklu nükleotid dizi kıyaslamaları. (*G. argyrea*, *G. canencens*, *G. latifolia* CenH3 çoklu nükleotid kıyaslaması)



**EK-A (Devam) Soya ve yabani türlerinde tür içerisinde yapılan çoklu nükleotid dizi kıyaslamaları. (*G. clandestina*, *G. cryobaba*, *G. dolichocarpa* CenH3 çoklu nükleotid kıyaslaması.)**



**EK-A (Devam) Soya ve yabancı türlerinde tür içerisinde yapılan çoklu nükleotid dizi kıyaslamaları. (*G. falcata*, *G. latrobeana*, *G. pescadrensis* CenH3 çoklu nükleotid kıyaslaması.)**

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120

GfCENH3a-3  
GfCENH3a-1  
GfCENH3a-2  
GfCENH3b-1

130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240

GfCENH3a-3  
GfCENH3a-1  
GfCENH3a-2  
GfCENH3b-1

250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360

GfCENH3a-3  
GfCENH3a-1  
GfCENH3a-2  
GfCENH3b-1

370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 482

GfCENH3a-3  
GfCENH3a-1  
GfCENH3a-2  
GfCENH3b-1

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120

GfCENH3a-3  
GfCENH3a-1  
GfCENH3a-2  
GfCENH3b-1

130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240

GfCENH3a-3  
GfCENH3a-1  
GfCENH3a-2  
GfCENH3b-1

250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360

GfCENH3a-3  
GfCENH3a-1  
GfCENH3a-2  
GfCENH3b-1

370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 482

GfCENH3a-3  
GfCENH3a-1  
GfCENH3a-2  
GfCENH3b-1

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120

GlatrCENH3-3  
GlatrCENH3-2  
GlatrCENH3-1

130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240

GlatrCENH3-3  
GlatrCENH3-2  
GlatrCENH3-1

250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360

GlatrCENH3-3  
GlatrCENH3-2  
GlatrCENH3-1

370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 479

GlatrCENH3-3  
GlatrCENH3-2  
GlatrCENH3-1

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160

GpSCENH3b-2  
GpSCENH3b-1  
GpSCENH3a-1

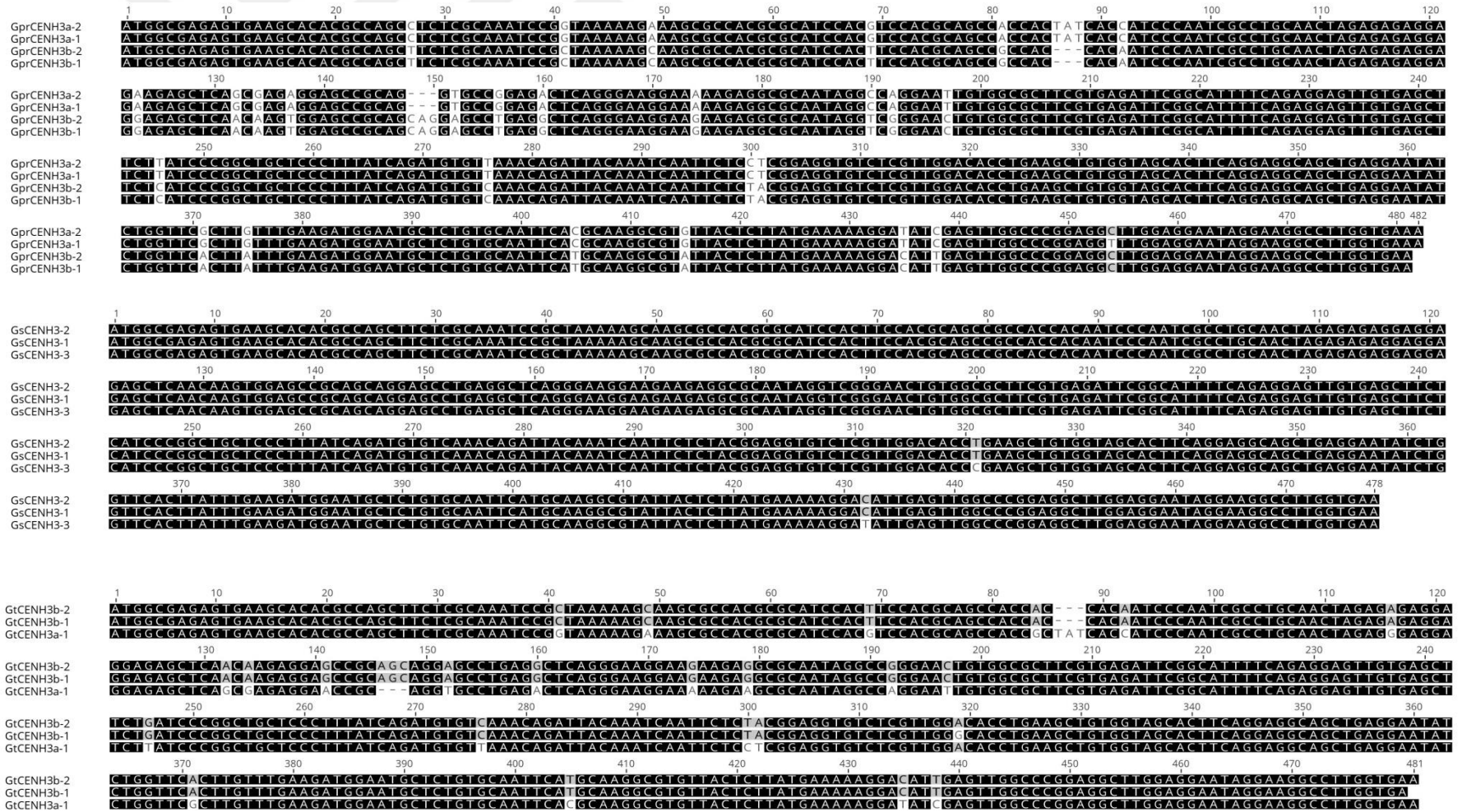
170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320

GpSCENH3b-2  
GpSCENH3b-1  
GpSCENH3a-1

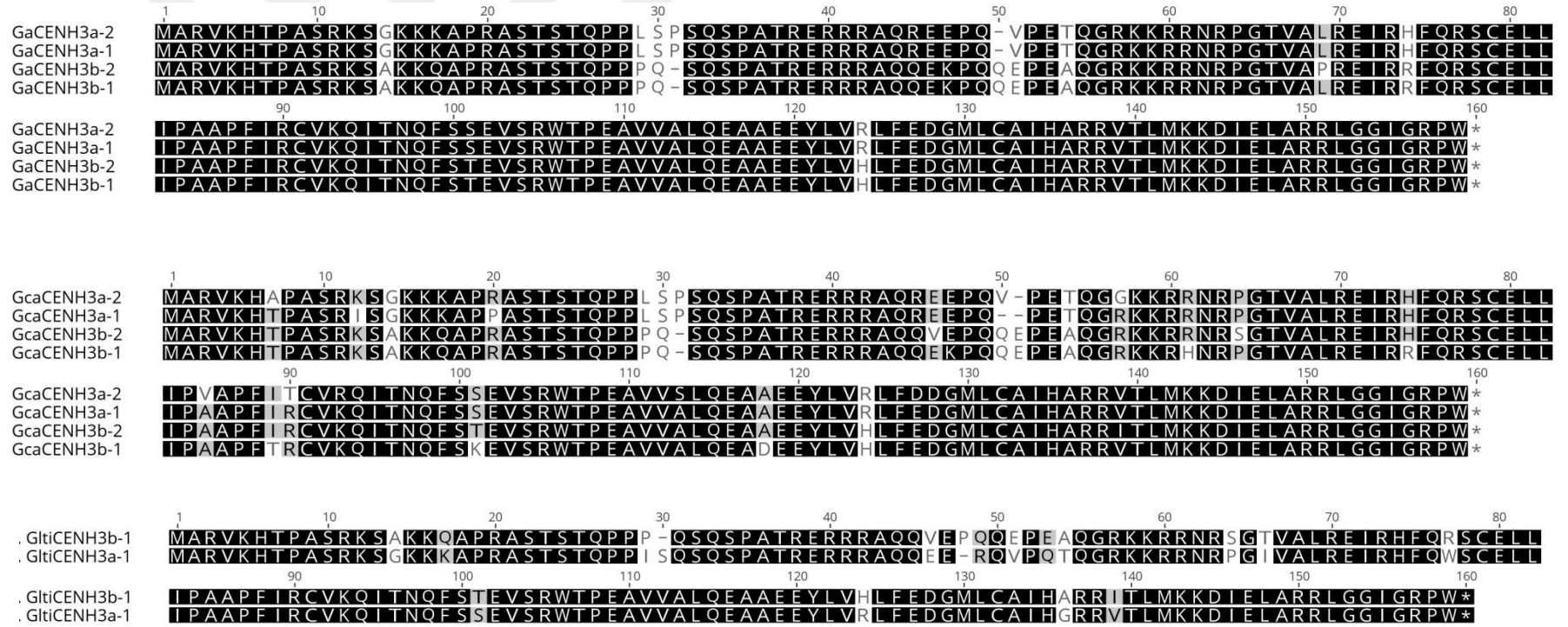
330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 481

GpSCENH3b-2  
GpSCENH3b-1  
GpSCENH3a-1

**EK-A (Devam)** Soya ve yabancı türlerinde tür içerisinde yapılan çoklu nükleotid dizi kıyaslamaları. (*G. peratosa*, *G. soja*, *G. tomentella* CenH3 çoklu nükleotid kıyaslaması)



**EK-B** Soya ve yabani türlerinde tür içerisinde yapılan çoklu protein kıyaslamaları.(*G. argyrea*, *G. canencens*, *G. latifolia* CENH3 çoklu protein kıyaslaması.)



**EK-B (Devam)** Soya ve yabancı türlerinde tür içerisinde yapılan çoklu protein kıyaslamaları. (*G. clandestina*, *G. cryobaba*, *G. dolichocarpa* CenH3 çoklu nükleotid kıyaslaması.)

1 10 20 30 40 50 60 70 80  
 GclCENH3a-3 **MARVKHAPASRKSGKKKAPRASTSTOPPLSPSQSPATRERRRAQREEPQVPETQGRKKRRNRPGTVALREIRHFORSCCELL**  
 GclCENH3a-1 **MARVKHAPASRKSGKKKAPRASTSTOPPLSPSQSPATRERRRAQREEPQVPETQGRKKRRNRPGTVALREIRHFORSCCELL**  
 GclCENH3a-2 **MARVKHAPASRKSGKKKAPRASTSTOPPLSPSQSPATRERRRAQREEPQVPETQGRKKRRNRPGTVALREIRHFORSCCELL**  
 90 100 110 120 130 140 150 159  
 GclCENH3a-3 **I PAAPFIRCVKQITNQFSSEVSRWTPEAVVALQEAAEYLVRLFEDGMLCAIHARRVTLMKKDIELARRLGGIGRPW\***  
 GclCENH3a-1 **I PAAPFIRCVKQITNQFSSEVSRWTPEAVVALQEAAEYLVRLFEDGMLCAIHARRVTLMKKDIELARRLGGIGRPW\***  
 GclCENH3a-2 **I PAAPFIRCVKQITNQFSSEVSRWTPEAVVALQEAAEYLVRLFEDGMLCAIHARRVTLMKKDIELARRLGGIGRPW\***

1 10 20 30 40 50 60 70 80  
 GcryCENH3a-2 **MARVKHTPAPRKSGKKKAPRASTSTOPPLSPSQSPATRERRRAQQVEPQ-VPQTHGSKKRRSRPGTVALREIRHFORSCCELL**  
 GcryCENH3a-1 **MARVKHTPAPRKSGKKKAPRASTSTOPPLSPSQSPATRERRRAQQVEPQ-VPQTHGSKKRRSRPGTVALREIRHFORSCCELL**  
 GcryCENH3b-2 **MARVKHTPAPRKSAKKQAPRASTSTOPPPQ-SQSPATRERRRAQQVEPQQEPEAQGRKKRRNRSGTVALREIRHFORSCCELL**  
 GcryCENH3b-1 **MARVKHTPAPRKSAKKQAPRASTSTOPPPQ-SQSPATRERRRAQQVEPQQEPEAQGRKKRRNRSGTVALREIRHFORSCCELL**  
 90 100 110 120 130 140 150 160  
 GcryCENH3a-2 **I PAAPFIRCVKQITNQFSSEVSRWTPEAVVALQEAAEYLVRLFEDGMLCAIHARRVTLMKKDIELARRLGGIGRPW\***  
 GcryCENH3a-1 **I PAAPFIRCVKQITNQFSSEVSRWTPEAVVALQEAAEYLVRLFEDGMLCAIHARRVTLMKKDIELARRLGGIGRPW\***  
 GcryCENH3b-2 **I PAAPFIRCVKQITNQFSTEVSRTPEAVVALQEAAEYLVHLFEDGMLCAIHARRITLMKKDIELARRLGGIGI V\***  
 GcryCENH3b-1 **I PAAPFIRCVKQITNQFSTEVSRTPEAVVALQEAAEYLVHLFEDGMLCAIHARRITLMKKDIELARRLGGIGRPW\***

1 10 20 30 40 50 60 70 80  
 GdCENH3b-2 **MARVKHTPASRKSAKKQAPRASTSTOPPPQ-SQSPATRERRRAQQVEPQQEPEAQGRKKRRNRSGTVALREIRHFORSCCELL**  
 GdCENH3b-1 **MARVKHTPASRKSAKKQAPRASTSTOPPPQ-SQSPATRERRRAQQVEPQQEPEAQGRKKRRNRSGTVALREIRHFORSCCELL**  
 GdCENH3b-3 **MARVKHTPASRKSAKKQAPRASNSTOPPPQ-SQSPATRERRRAQQVEPQQEPEAQGRKKRRNRSGTVALREIRHFORSCCELL**  
 GdCENH3a-1 **MARVKHTPASRKSGKKKAPRASTSTOPPLSPSQSPATRERRRAQREEPQ-VPETQGRKKRRNRPGTVALREIRHFORSCCELL**  
 90 100 110 120 130 140 150 160  
 GdCENH3b-2 **I PAAPFIRCVKQITNQFSTEVSRTPEAVVALQEAAEYLVHLFEDGMLCAIHARRITLMKKDIELARRLGGIGRPW\***  
 GdCENH3b-1 **I PAAPFIRCVKQITNQFSTEVSRTPEAVVALQEAAEYLVHLFEDGMLCAIHARRITLMKKDIELARRLGGIGRPW\***  
 GdCENH3b-3 **I PAAPFIRCVKQITNQFSTEVSRTPEAVVALQEAAEYLVHLFEDGMLCAIHARRITLMKKDIELARRLGGIGRPW\***  
 GdCENH3a-1 **I PAAPFIRCVKQITNQFSSDVSRTPEAVVALQEAAEYLVHLFEDGMLCAIHARRVTLMKKDIELARRLGGIGRPW\***

**EK-B (Devam)** Soya ve yabancı türlerinde tür içerisinde yapılan çoklu protein kıyaslamaları. (*G. falcata*, *G. latrobeana*, *G. pescadrensis* CENH3 çoklu protein kıyaslaması)

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
GfCENH3a-3	MARVKHTPASRESGKKKAPRASTSTOPPI S OSQSPATRERRRAQQEE - RQVPQTQGRKKRRNRPGIVALREIRHFORSCELL								
GfCENH3a-1	MARVKHTPASRKS GKKKAPRASTSTOPPI S OSQSPATRERRRAQQEE - RQVPQTQGRKKRRNRPGIVALREIRHFORSCELL								
GfCENH3a-2	MARVKHTPASRKS GKKKAPRASTSTOPPI S OSQSPATRERRRAQQEE - RQVPQTQGRKKRRNRPGIVALREIRHFORSCELL								
GfCENH3b-1	MARVKHTPASRKP AKKQAPRASTSTOPPI P - OSQSPATRERRRAQQEE PQQEPEAQGRKKRRNRPGIVALREIRHFORSCELL								
	90	100	110	120	130	140	150	160	
GfCENH3a-3	I PAAPF IRCVKQITNQF SSEVSRWTPEAVVALQEAAEEYLVRL FEDGMLCAIHARRVTLMKKDI ELARRLGGIGRPW*								
GfCENH3a-1	I PAAPF IRCVKQITNQF SSEVSRWTPEAVVALQEAAEEYLVRL FEDGMLCAIHARRVTLMKKDI ELARRLGGIGRPW*								
GfCENH3a-2	I PAAPF IRCVKQITNQF SSEVSRWTPEAVVALQEAAEEYLVRL FEDGMLCAIHARRVTLMKKDI ELARRLGGIGRPW*								
GfCENH3b-1	I PAAPF IRCVKQITNQF STEVSRWTPEAVVALQEAAEEYLVH L FEDGMLCAIHARRVTLMKKDI ELARRLGGIGRPW*								

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
GlatrCENH3-3	MARVKHTPASRKS AKKQAPRASTSTOPPP OSQSPATRERRRAQQEKPQQEPEAQGRKKRRNRPGTVALREIRRFORSCELL								
GlatrCENH3-1	MARVKHTPASRKS AKKQAPRASTSTOPPP OSQSPATRERRRAQQEKPQQEPEAQGRKKRRNRPGTVALREIRRFORSCELL								
GlatrCENH3-2	MARVKHTPASRKS AKKQAPRASTSTOPPP OSQSPATRERRRAQQEKPQQEPEAQGRKKRRNRPGTVALREIRRFORSCELL								
	90	100	110	120	130	140	150	159	
GlatrCENH3-3	I PAAPF IRCVKQITNQF STEVSRWTPEAVVALQEAAEEYLVH L FEDGMLCAIHARRVTLMKKDI ELARRLGGIGRPW*								
GlatrCENH3-1	I PAAPF IRCVKQITNQF STEVSRWTPEAVVALQEAAEEYLVH L FEDGMLCAIHARRVTLMKKDI ELARRLGGIGRPW*								
GlatrCENH3-2	I PAAPF IRCVKQITNQF STEVSRWTPEAVVALQEAAEEYLVH L FEDGMLCAIHARRVTLMKKDI ELARRLGGIGRPW*								

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
GpsCENH3b-2	MARVKHTPASRKP AKKQASRASTSTOPPPQ - OSQSPATRERRRAQQEDPQQGPEAQGRKKRRNRPGIVALREIRHFORSCELL								
GpsCENH3b-1	MARVKHTPASRKP AKKQASRASTSTOPPPQ - OSQSPATRERRRAQQEDPQQGPEAQGRKKRRNRPGIVALREIRHFORSCELL								
GpsCENH3a-1	MARVKHTPASRKS GKKKAPRVSTSTOPPI S P OSQSPATRERRRAQQEE - RQVLQITQERKKRRNRPGTVALREIRHFORSCELL								
	90	100	110	120	130	140	150	160	
GpsCENH3b-2	I PAAPF IRCVKQITNQF STEVSRWTPEAVVALQEAAEEYLVH L FEDGMLCAIHARRVTLMKKDI ELARRLGGIGRPW*								
GpsCENH3b-1	I PAAPF IRCVKQITNQF STEVSRWTPEAVVALQEAAEEYLVH L FEDGMLCAIHARRVTLMKKDI ELARRLGGIGRPW*								
GpsCENH3a-1	I PAAPF IRCVKQITNQF SSEVSRWTPEAVVALQEAAEEYLVRL FEDGMLCAIHARRVTLMKKDI ELARRLGGIGRPW*								



**EK-B (Devam)** Soya ve yabancı türlerinde tür içerisinde yapılan çoklu protein kıyaslamaları. (*G. peratoso*, *G. soja* *G. tomentella* CENH3 çoklu protein kıyaslaması)

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
GprCENH3a-2	MARVKHTPASRKS GKKKAPRASTSTOPPL S P SOSPATRERRRAQR EEPQ - VPET OGRKKRRNR PG I VALREIRHFORSCELL								
GprCENH3a-1	MARVKHTPASRKS GKKKAPRASTSTOPPL S P SOSPATRERRRAQR EEPQ - VPET OGRKKRRNR PG I VALREIRHFORSCELL								
GprCENH3b-2	MARVKHTPASRKS AKKQAPRASTSTOPP P Q - SOSPATRERRRAQQV EEPQ EPEA OGRKKRRNR SGTVALREIRHFORSCELL								
GprCENH3b-1	MARVKHTPASRKS AKKQAPRASTSTOPP P Q - SOSPATRERRRAQQV EEPQ EPEA OGRKKRRNR SGTVALREIRHFORSCELL								
	90	100	110	120	130	140	150	160	
GprCENH3a-2	I PAAPF IRCVKQ ITNQFSSEVSRWTPEAVVALQEAAE EYLVRL LFEDGMLCAIHARRVTLMKKDI ELARRLGGIGRPW*								
GprCENH3a-1	I PAAPF IRCVKQ ITNQFSSEVSRWTPEAVVALQEAAE EYLVRL LFEDGMLCAIHARRVTLMKKDI ELARRLGGIGRPW*								
GprCENH3b-2	I PAAPF IRCVKQ ITNQFSTEVSRTPEAVVALQEAAE EYLVHLLFEDGMLCAIHARRITLMKKDI ELARRLGGIGRPW*								
GprCENH3b-1	I PAAPF IRCVKQ ITNQFSTEVSRTPEAVVALQEAAE EYLVHLLFEDGMLCAIHARRITLMKKDI ELARRLGGIGRPW*								

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
GsCENH3-3	MARVKHTPASRKS AKKQAPRASTSTOPPPQSOSPATRERRRAQQVEPQQEPEAQGRKKRRNRSGTVALREIRHFORSCELL								
GsCENH3-1	MARVKHTPASRKS AKKQAPRASTSTOPPPQSOSPATRERRRAQQVEPQQEPEAQGRKKRRNRSGTVALREIRHFORSCELL								
GsCENH3-2	MARVKHTPASRKS AKKQAPRASTSTOPPPQSOSPATRERRRAQQVEPQQEPEAQGRKKRRNRSGTVALREIRHFORSCELL								
	90	100	110	120	130	140	150	159	
GsCENH3-3	I PAAPF IRCVKQ ITNQFSTEVSRTPEAVVALQEAAE EYLVHLLFEDGMLCAIHARRITLMKKDI ELARRLGGIGRPW*								
GsCENH3-1	I PAAPF IRCVKQ ITNQFSTEVSRTPEAVVALQEAAE EYLVHLLFEDGMLCAIHARRITLMKKDI ELARRLGGIGRPW*								
GsCENH3-2	I PAAPF IRCVKQ ITNQFSTEVSRTPEAVVALQEAAE EYLVHLLFEDGMLCAIHARRITLMKKDI ELARRLGGIGRPW*								

	1	10	20	30	40	50	60	70	80
GtCENH3b-2	MARVKHTPASRKS AKKQAPRASTSTOPPPQ - SOSPATRERRRAQQE EEPQ EPEAQGRKKRRNRPG I VALREIRHFORSCELL								
GtCENH3b-1	MARVKHTPASRKS AKKQAPRASTSTOPPPQ - SOSPATRERRRAQQE EEPQ EPEAQGRKKRRNRPG I VALREIRHFORSCELL								
GtCENH3a-1	MARVKHTPASRKS GKKKAPRASTSTOPPL S P SOSPATRERRRAQQE EEPQ - VPET OGRKKRRNRPG I VALREIRHFORSCELL								
	90	100	110	120	130	140	150	160	
GtCENH3b-2	I PAAPF IRCVKQ ITNQFSTEVSRTPEAVVALQEAAE EYLVHLLFEDGMLCAIHARRVTLMKKDI ELARRLGGIGRPW*								
GtCENH3b-1	I PAAPF IRCVKQ ITNQFSTEVSRTPEAVVALQEAAE EYLVHLLFEDGMLCAIHARRVTLMKKDI ELARRLGGIGRPW*								
GtCENH3a-1	I PAAPF IRCVKQ ITNQFSSEVSRWTPEAVVALQEAAE EYLVRL LFEDGMLCAIHARRVTLMKKDI ELARRLGGIGRPW*								

**EK-C CENH3b HFD bölgesi Ka/Ks evrimsel analiz oranı**

	GcryCENH3b	GltiCENH3b	GtCENH3b	GaCENH3b	GsCENH3	GprCENH3b	GdCENH3b	GlatrCENH3	GcaCENH3b	GpsCENH3b	GfCENH3b
GmCENH3	-	-	0,60	0,15	-	-	-	0,07	0,59	0,30	0,61
GcryCENH3b		-	0,60	0,15	-	-	-	0,07	0,59	0,30	0,61
GltiCENH3b			0,60	0,15	-	-	-	0,07	0,59	0,30	0,61
GtCENH3b				0,30	0,60	0,60	0,60	0,10	1,20	-	-
GaCENH3b					0,15	0,15	0,15	0,00	-	0,00	0,30
GsCENH3						-	-	0,07	0,59	0,30	0,61
GprCENH3b							-	0,07	0,59	0,30	0,61
GdCENH3b								0,07	0,59	0,30	0,61
GlatrCENH3									0,21	0,00	0,10
GcaCENH3b										0,90	1,21
GpsCENH3b											-
GfCENH3b											-

**EK-C (Devam) CENH3b N terminal bölgesi Ka/Ks evrimsel analiz oranı**

	GcryCENH3b	GltiCENH3b	GtCENH3b	GaCENH3b	GsCENH3	GprCENH3b	GdCENH3b	GlatrCENH3	GcaCENH3b	GpsCENH3b	GfCENH3b
GmCENH3	0,00	-	0,32	0,32	-	-	-	0,40	0,40	0,56	0,25
GcryCENH3b		0,00	0,21	0,25	0,00	0,00	0,00	0,32	0,31	0,44	0,21
GltiCENH3b			0,32	0,32	-	-	-	0,40	0,40	0,56	0,25
GtCENH3b				0,32	0,32	0,32	0,32	0,49	0,48	0,81	0,21
GaCENH3b					0,32	0,32	0,32	0,16	0,16	0,56	0,25
GsCENH3						-	-	0,40	0,40	0,56	0,25
GprCENH3b							-	0,40	0,40	0,56	0,25
GdCENH3b								0,40	0,40	0,56	0,25
GlatrCENH3									0,33	0,65	0,32
GcaCENH3b										0,64	0,31
GpsCENH3b											0,32
GfCENH3b											

**EK-C(Devam)** CENH3a HFD bölgesi Ka/Ks evrimsel analiz oranı

	GdCENH3a	GcryCENH3a	GtCENH3a	GltiCENH3a	GfCENH3a	GaCENH3a	GprCENH3a	GclCENH3a	GcaCENH3a
GpsCENH3a	0,45	0,06	0,15	-	-	0,15	0,30	0,15	0,51
GdCENH3a		0,20	-	0,45	0,45	-	-	-	1,87*
GcryCENH3a			0,00	0,06	0,06	0,00	0,10	0,00	0,30
GtCENH3a				0,15	0,15	-	-	-	1,25*
GltiCENH3a					-	0,15	0,30	0,15	0,51
GfCENH3a						0,15	0,30	0,15	0,51
GaCENH3a							-	-	1,25*
GprCENH3a								-	1,55*
GclCENH3a									1,25*
GcaCENH3a									

**EK-C(Devam)** CENH3a N terminal bölgesi Ka/Ks evrimsel analiz oranı

	GdCENH3a	GcryCENH3a	GtCENH3a	GltiCENH3a	GfCENH3a	GaCENH3a	GprCENH3a	GclCENH3a	GcaCENH3a
GpsCENH3a	0,55	0,54	0,35	0,47	0,31	0,75	0,42	0,86	0,64
GdCENH3a		0,63	0,06	1,12*	0,63	0,00	0,08	0,32	0,32
GcryCENH3a			0,31	1,10*	0,62	1,27*	0,39	1,59*	0,95
GtCENH3a				0,86	0,55	0,08	0,13	0,16	0,19
GltiCENH3a					0,32	2,26*	1,30	2,60	1,46*
GfCENH3a						0,95	0,74	1,11*	0,84
GaCENH3a							0,11	-	0,64
GprCENH3a								0,21	0,24
GclCENH3a									0,32
GcaCENH3a									

## EK-D İş akış tablosu

PI Numarası	Türler	Yaprak stoğu	Tohum	Rna izolasyonu	Cdna eldesi	Extaq ile pcr	Plazmit izolasyonu	Koloni pcr	Dizilemeye giden+ örnek sayısı	SONUÇ
	<i>Glycine max</i>	✓	✓	✓	✓	✓	10 örnek 5 pozitif (Gm2-Gm3- Gm4- Gm5- Gm7)	10 örnek 5 pozitif (Gm2- Gm3- Gm4- Gm5- Gm7)	5	Gm2=476 nükleotid. 3' uçta 4 aa uyumsuz.
100060	<i>Glycine soja</i>	✓	✓	✓	✓	✓	22 örnek 4 pozitif (Soja31-soja32-soja33-soja7)	22 örnek 4 pozitif (Soja31-soja32-soja33-soja7)	4	soja32-soja33-soja7 uyumlu
96904	<i>Glycine soja</i>	✓	-	-	✓	✓			4	
PI 583946	<i>Glycine canescens</i>	✓	-	✓	✓	✓	25 örnek 4 pozitif (can3-can5-can11-can12)	25 örnek 4 pozitif (can3-can5-can11-can12)	4	can3-can5-can11-can12 uyumlu
PI 378870	<i>Glycine clandestina</i>	✓	✓	✓	✓	✓	19 örnek 6 pozitif( clan2-clan3- clan6- clan7)	19 örnek 6 pozitif (clan2- clan3- clan6- clan7)	4	clan3- clan6- clan7 uyumlu
PI 505166	<i>Glycine curvata</i>	-	-	✓	✓	✓	34 örnek 4 pozitif (cur1-cur5-cur8-cur10)	34 örnek 4 pozitif (cur1-cur5-cur8-cur10)	4	cur8 uyumlu
PI 440962	<i>Glycine dolichocarpa</i>	✓	✓	✓	✓	✓	32 örnek 4 pozitif (doli8-doli9-doli10-doli12)	32 örnek 4 pozitif (doli8-doli9-doli10-doli12)	4	doli8-doli9-doli10-doli12 uyumlu
PI 612234	<i>Glycine falcata</i>	✓	✓	✓	✓	✓	22 örnek 2 pozitif (fal3-fal8-fal31-fal5)	22 örnek 2 pozitif (fal3-fal8-fal31-fal5)	4	fal3-fal8-fal31-fal5 uyumlu
PI 378709	<i>Glycine latifolia</i>	✓	✓	✓	✓	✓	16 örnek 4 pozitif (lati-lati4-lati8-lati9)	16 örnek 4 pozitif (lati-lati4-lati8-lati9)	4	lati8-lati9 uyumlu
PI 583966	<i>Glycine peratosa</i>	✓	✓	✓	✓	✓	45 örnek 4 pozitif (per1-per4-per8-per9)	32 örnek 4 pozitif (doli8-doli9-doli10-doli12)	4	per1-per4-per8-per9 uyumlu
PI 505195	<i>Glycine pescadrensis</i>	✓	-	✓	✓	✓	12 örnek 4 pozitif (pes1-pes9-pes10-pes11)	12 örnek 4 pozitif (pes1-pes9-pes10-pes11)	4	pes1-pes10-pes11 uyumlu

## EK-D (Devam) İş akış tablosu

PI Numarası	Türler	Yaprak stoğu	Tohum	Rna izolasyonu	Cdna eldesi	Extaq ile pcr	Plazmit izolasyonu	Koloni pcr	Dizilemeye giden + örnek sayısı	SONUÇ
PI 505184	<i>Glycine latrobeana</i>	✓	-	✓	✓	✓	11 örnek 6 pozitif (ltr1-ltr3- ltr6- ltr8)	11 örnek 6 pozitif (ltr1-ltr3- ltr6- ltr8)	4	ltr1- ltr3- ltr8 uyumlu
PI 505188	<i>Glycine microphylla</i>	✓	-	✓	-	-			4	
PI 653470	<i>Glycine pindanica</i>	-	-	-	-	-			4	
PI 604468	<i>Glycine rubiginosa</i>	-	-	-	-	-			4	
PI 653508	<i>Glycine stenophita</i>	✓	-	✓	-	-			4	
PI 505272	<i>Glycine syndetika</i>	-	-	-	-	-			4	
PI 483204	<i>Glycine tabacina</i>	✓	-	✓	-	-			4	
PI 373988	<i>Glycine tomantella</i>	✓	✓	✓	✓	✓	11 örnek 4 pozitif (tom4-tom7-tom9-tom10)	11 örnek 4 pozitif (tom4-tom7-tom9-tom10)	4	tom7-tom9-tom10 uyumlu
PI 505296	<i>Glycine arenaria</i>	-	-	-	-	-			4	
PI 505151	<i>Glycine argyrea</i>	✓	-	✓	✓	✓	10 örnek 5 pozitif (arg2-arg7-arg9-arg10)	10 örnek 5 pozitif (arg2-arg7-arg9-arg10)	4	arg2-arg7-arg9-arg10 uyumlu
PI 440962	<i>Glycine crytolaba</i>	✓	-	✓	✓	✓	52 örnek 4 pozitif (cry5-cry6-cry12-cry121)	52 örnek 4 pozitif (cry5-cry6-cry12-cry121)	4	cry5-cry6-cry121 uyumlu

## ÖZ GEÇMİŞ

13.05.1996 tarihinde Niğde’de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimine Niğde’de tamamladı. 2013 yılında İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümüne başlayıp, 2017 yılında mezun oldu. 2017 yılında Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Genetik Mühendisliği bölümünde Yüksek Lisansa başladı.



## TEZ ÇALIŞMASINDAN ÜRETİLEN ESERLER

Bu tez çalışmasından, 1 (adet) adet ulusal poster bildirisi ve 1 (adet) uluslararası sözlü sunum üretilmiştir. Bu üretilen çalışma aşağıda sunulmuştur.

Yıldız, H., Yıldırım, B.Ş., Tek, A.L., “Glycine Soya Türlerinde Sentromerik Histon H3 (CenH3) Geninin Biyoinformatik Analizi ”, *I. Bitki Islahı ve Genetiği Öğrenci Kongresi*, Niğde, Türkiye, s. 1, 25-26 Nisan, 2018.

Yıldız, H., Yıldırım, B.Ş., Tek, A.L., “Soya ve yabancı türlerinde CenH3 geninin moleküler klonlanması”, *Uluslararası Türk Dünyası Fen ve Mühendislik Kongresi*, Niğde, Türkiye, 17-18 Haziran, 2019