



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fusarium graminearum'da RETROTRANSPOZON TEMELLİ
MOLEKÜLER MARKIR TARAMASI

Gizem Gökçen YILMAZ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr.Gülruh ALBAYRAK

Ekim, 2016

İSTANBUL

Bu çalışma 28.10.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

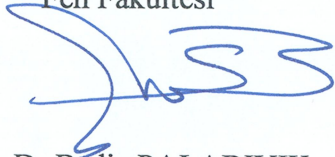
Tez Jürisi:



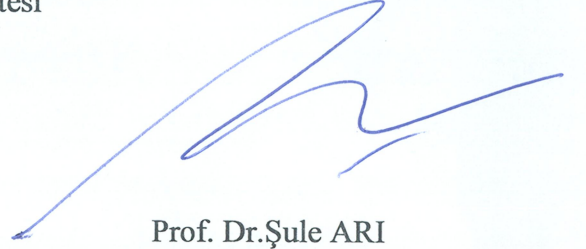
Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



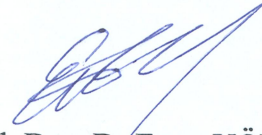
Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Bedia PALABIYIK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Şule ARI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Yrd. Doç. Dr. Emre YÖRÜK
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli resmi gazetede yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 58541 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman bilgi ve tecrübeleriyle ufkumu genişleten, sonsuz sevgi ve saygı duyduğum danışman hocam Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK'a teşekkürü borç bilirim.

Lisans hayatımdan bu yana eğitimimde emeği geçen saygıdeğer tüm İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Her anımda olduğu gibi yüksek lisans eğitimim boyunca da desteğini benden esirgemeyen değerli arkadaşım Uzman Moleküler Biyolog Aylin GAZDAĞLI'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca desteklerini hissettiğim meslektaşlarım Tuğba TEKER ve Derya TOPUZ'a yardımları için teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi sağlayan başta Asiye YILMAZ ve Fatma YILMAZ olmak üzere en güçlüdesteğimaileme, emek ve sabırları için teşekkür ederim.

Ekim 2016

Gizem Gökçen YILMAZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	v
ÖZET.....	vi
SUMMARY	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	2
2.1. TRANSPOZONLAR.....	2
2.2. TRANSPOZONLARIN SINIFLANDIRILMASI.....	3
2.2.1. Sınıf I Elementleri (Retrotranspozonlar).....	3
2.2.1.1. <i>LTR</i> 'li Retrotranspozonlar	4
2.2.1.2. <i>LTR</i> Taşımayan Retrotranspozonlar	8
2.2.2. Sınıf II Elementleri (DNA Transpozonları).....	9
2.3. TRANSPOZONLARIN HORIZONTAL TRANSFERİ	10
2.4. RETROTRANSPOZON TEMELLİ MOLEKÜLER MARKIRLAR	11
2.4.1. Retrotranspozonlar Arası Çoğaltım Polimorfizmi	13
2.4.2. Kullanılan Diğer Markır Yöntemleri	15
2.5. MANTARLARDA TRANSPOZONLAR.....	16
2.5.1. <i>Fusarium graminearum</i> 'da Transpozonlar	18
3. MALZEME VE YÖNTEM	20
3.1. MANTAR MATERYALİ	20
3.2. KULLANILAN BESİ ORTAMLARI	20
3.3. PATOJENLERİN KÜLTÜRLENMESİ.....	21
3.4. IRAP ANALİZİ	21
3.4.1. gDNA İzolasyonu	21
3.4.2. gDNA Miktar ve Safılık Tayini	22
3.4.3. Biyoinformatik Analiz ve Primer Seçimi.....	23

3.4.4. PZR Bileşenleri ve Koşulları	25
3.4.5. Çoğaltım Ürünlerinin Analizi	26
3.4.6. İstatistiksel Analiz.....	26
4. BULGULAR	27
4.1. PATOJEN ÜRETİMİ	27
4.2. gDNA ANALİZ SONUÇLARI.....	28
4.3. PRİMER SEÇİMİ.....	28
4.4. IRAP ANALİZİ BULGULARI VE İSTATİSTİKSEL ANALİZ VERİLERİ.....	29
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	33
KAYNAKLAR	40
EKLER.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	50

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** LTR'li retrotranspozonların transpozisyon mekanizması (Sabot ve Schulman (2006)'dan alınarak düzenlenmiştir).....6
- Şekil 2.2:** Genomda; (a) kuyruk-baş, (b) kuyruk-kuyruk, (c) baş-baş oryantasyonunda yakın olarak konumlanmış iki retrotranspozon arasındaki bölgenin IRAP yöntemi ile çoğaltılma stratejileri. Nükleotid dizilimleri farklı olan LTR'ler yeşil ve mavi renkle gösterilirken, kırmızı renkli oklar tasarlanan primer moleküllerini ve PZR reaksiyonunun kataliz yönünü göstermektedir.....14
- Şekil 4.1:** 47 *F. graminearum* izolatına ait PDA besi ortamında gelişen farklı pigmentasyona sahip miselyum üreten 6 günlük *in vitro* kültürleri. (Bar: 3 cm).....27
- Şekil 4.2:** Sorgu ekranında LTR6149 primerinin *F. graminearum* genomu ile uyum sağlayan nükleotid sayıları ve hizalama sonuçları.....28
- Şekil 4.3:** Arpa genomuna özgün tasarlanmış LTR6150/3'LTR (A), LTR6149/LTR6150 (B), doğrudan pBARE-1/ters pBARE-1 (C), LTR6149/3'LTR (D) primer çiftleri ile 47 *F. graminearum* izolatının gDNA'sında gerçekleştirilen retrotranspozonlar arası bölge çoğaltım ürünleri agaroz jel elektroforez görüntüleri.....30
- Şekil 4. 4:** 47 *F. graminearum* izolatına ait Nei ve Li Benzerlik katsayısına göre oluşturulan dendrogram ve izolatların elde edildikleri bölgeler.....32

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1: Tez çalışmasında kullanılan <i>Fusarium graminearum</i> izolatları	20
Tablo 3.2: <i>Fusarium</i> kültürlerinin kurulduğu besi ortamları	21
Tablo 3.3: gDNA izolasyonunda kullanılan TNES tamponu.....	22
Tablo 3.4: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar	23
Tablo 3.5: Arpa genomunda transpozon hareketliliğinin belirlenmesi için geliştirilmiş <i>F. graminearum</i> genomunda homolojisi taranan evrensel IRAP primerleri.....	25

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fusarium graminearum'da RETROTRANSPOZON TEMELLİ MOLEKÜLER MARKIR TARAMASI

Gizem Gökçen YILMAZ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr.Gülruh ALBAYRAK

Yüksek lisans tez çalışmasında; *BARE-1* retrotranspozonuna ait LTR benzeri dizilerin *Fusarium graminearum* genomundaki varlığı ilk defa IRAP (ing., Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) yöntemi kullanılarak gösterildi. Aynı zamanda, izolatlar arasındaki ilişki retrotranspozon hareketliliğine göre değerlendirildi. Öncelikle, arpa (*Hordeum vulgare*L.) retrotranspozonunun uzun uç tekrarları (ing., long terminal repeat-LTR) veri bankalarında kayıtlı *F. graminearum*'un kromozomlarından elde edilen kontiglerde biyoinformatik araçlar kullanılarak belirlendi. Retroelementlerin LTR'leri arasındaki bölgelerin varlığı iki referans ırk (88-1 ve H-11) ile birlikte Türkiye ve İran'da hastalıklara yol açan 45 *F. graminearum* izolatının genomik DNA'sında IRAP analizi ile araştırıldı. 47 izolat arasındaki benzerlik oranı Nei ve Li katsayısına göre hesaplandı ve izolatların genetik ilişkisi dendrogramla gösterildi.

Arpa genomu için geliştirilen beş oligonukleotid primer,mantar genomuna yerleşen LTR'lerin ara dizilerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltımında dört farklı kombinasyonda (LTR6150/3'LTR, LTR6149/LTR6150, doğrudan p*BARE-1*/ters p*BARE-1*,LTR6149/3'LTR) kullanıldı. Çalışmada boyutları 100-5000 bp arasında değişen toplam 43 IRAP markırı skorlandı. T2 ve T3 izolatları arasındaki benzerlik

%100 olarak hesaplandı. Bu iki izolatın aynı retroelement hareketprofiline sahip olduğu belirlendi. Aynı zamanda, Fg18/Fg56, Sh14/Sh15 ve Sh5/Fg4 izolat çiftleri arasındaki benzerlik oranı %96,6 olarak bulundu. Bulgular aynı benzerlik yüzdesini paylaşan bu izolat çiftlerinin farklı IRAP markır profillerini sergilediğini gösterdi. Birbirine en az benzeyen (çeşitlilik oranı= % 90,5) Fg4 ve Sh15 izolatlarıydı. Ek olarak iki referans ırk arasındaki benzerliğin %80 olduğu bulundu.

Dendrogramda 45 dallanma noktası yer aldı. İzolatlar iki ana gruba ayrıldıktan sonra fenon ve alt fenonlara bölündü. Fg170 izolatu, diğer izolatlardan farklı retrotranspozon hareket profiline sahip olduğu için bu iki grubun dışında kaldı. Beşi (4F, 1F, F5, F6, F7) hariç yurdumuz orjinli izolatlar birbirleri ile ilişkili kümeler halinde ancak coğrafik bölgelerinden bağımsız olarak yer aldı. Aynı zamanda, bu kümeler İran izolatları arasında dağıldı. Ek olarak, iki referans aynı alt grup içinde yurdumuz izolatlarıyla bir arada bulundu.

Bu çalışmada, türüçi retrotranspozon hareketi *F. graminearum*'da IRAP analizi yöntemi ile ilk kez araştırılmıştır. Genetik ilişki genomik benzerlik ve/veya çeşitlilik yerine retrotranspozonun genomda yerleştiği pozisyonlar arasındaki bölgelerin benzerliği temeline göre ortaya konmuştur. Aktif olarak hareket eden retroelementler *F. graminearum* izolatları arasındaki çeşitlilikten sorumludur. *BARE-1*'e ait LTR'ler arasındaki bölgelerin *F. graminearum* genomunda belirlenmesi bu dizilerin evrimsel süreçte bitki-patojen etkileşiminin bir sonucu olarak arpadan mantar genomuna aktarılmış olabileceğini düşündürmektedir.

Ekim 2016, 60 sayfa.

Anahtar kelimeler: Retrotranspozonlar arası çoğaltım polimorfizmi, retrotranspozon, *Fusarium graminearum*

SUMMARY

M.Sc. THESIS

RETROTRANSPOSON-BASED MOLECULAR MARKER MONITORING IN

Fusarium graminearum

Gizem Gökçen YILMAZ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr.Gülruh ALBAYRAK

In this master thesis, presence of LTR like sequences belong to retrotransposon *BARE-1* on *Fusarium graminearum* genome was demonstrated by using inter retrotransposon amplified polymorphism (IRAP) for the first time. Also, relationship among isolates was evaluated according to retrotransposon mobility. At first, long terminal repeats (LTRs) of barley (*Hordeum vulgare* L.) retrotransposon was detected on contigs obtained from all chromosomes of *F.graminearum*, registered on databases, via bioinformatic tools. Presence of the regions between LTRs of retroelements were examined on genomic DNAs of 45 *F. graminearum* isolates, causing diseases in Turkey and Iran, together with two reference strains (88-1 and H-11) with IRAP analysis. Similarities among 47 isolates were calculated according to Nei and Li coefficient, and genetic relationship among them was shown with a dendrogram.

Five oligonucleotide primers, which were developed for barley genome, were used at four different combinations (LTR6150/3'LTR, LTR6149/LTR6150, direct p*BARE-1*/reverse p*BARE-1*, LTR6149/3'LTR) in the amplification of inter regions of LTRs, integrated on the fungal genome, by polymerase chain reaction (PCR). Totally 43 IRAP markers, ranged from 100 to 5000 bp were scored, in this study. Similarity between T2 and T3 isolates were calculated as 100%. It was demonstrated that they had same retroelement mobility profile. In addition, similarity ratio between Fg18/Fg56,

Sh14/Sh15 and Sh5/Fg4 isolate pairs were found as 96,6%. Findings revealed that these isolate couples which were sharing the same similarity percentage displayed different IRAP marker profiles. The most distant (diversity= 90,5%) isolates were Fg4 and Sh15. Moreover, similarity between two reference strains was 80%.

Totally 45 nodes were present in the dendrogram. After isolates were separated into two main groups, they were divided into phenons and subphenons. Isolate Fg170 stayed out of the two groups since it had different retrotransposon mobility profiles from another isolates. All isolates originated from Turkey, except five (4F, 1F, F5, F6, F7), located as related clusters, but independently found from their geographical regions. Also, these clusters dispersed among Iranian isolates. Moreover, two references were found within the same subgroup together with Turkish isolates.

In this study, interspecific retrotransposon mobility was investigated in *F. graminearum* with IRAP, for the first time. Genetic relationship was revealed based on similarity of inter retrotransposons regions within the genome instead of whole genomic similarity and/or diversity. Actively moving retroelements are responsible for the diversity among *F. graminearum* isolates. Detection of inter regions of LTRs belongs to *BARE-1* on *F. graminearum* genome is thought that these sequences should be transferred to fungal genome from barley as a result of plant-pathogen interaction in evolutionary process.

October 2016, 60 pages.

Keywords: Inter retrotransposon amplification polymorphism, retrotransposons, *F.graminearum*

1. GİRİŞ

Retrotranspozonlar; özgün bölgeyi hedeflemeksizin bir hücrenin genomuna yerleşen, aynı yönlü tekrar dizilerini korunmuş olarak her iki sınır bölgesinde tekrarlı olmayan DNA dizilerinin arasına yayılmış olarak farklı sayıda taşıyan, sentezledikleri RNA molekülleri aracılığıyla kopya sayılarını arttıran hareketli elementlerdir. Retrotranspozonun mesajcı RNA (ing., messenger RNA- mRNA) transkriptinden sentezlenen komplementer DNA (ing., complementary DNA-cDNA) genoma yerleşirken delesyon ve insersiyon gibi değişimlere yol açarak hücreler arasındaki polimorfizmden sorumlu olurlar. Bu nedenle retrotranspozonlar genomik varyasyonların belirlenmesinde moleküler markır olarak etkin biçimde kullanılırlar. Retrotranspozonların varlığı ve genomdaki hareketinin belirlenmesinde izlenen yaklaşımlardan biri, iki retroelement arasındaki DNA bölgesinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltımına dayanan, retrotranspozonlar arası çoğaltım polimorfizmidir (ing., Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism-IRAP).

Yüksek lisans tez çalışmasında arpa retrotranspozonlarından *BARE-1*'in bitki patojenlerinden *Fusariumgraminearum* türüne ait 47 izolatın genomundaki varlığı ve hareketliliği IRAP yöntemi ile araştırılmıştır. Bu kapsamda *BARE-1*'in aynı yönlü tekrar dizileri *F. graminearum*'a ait dört kromozomda biyoinformatik araçlar kullanılarak taranmıştır. *F. graminearum*'da ilk defa varlığı belirlenen potansiyel iki retrotranspozon arasındaki bölge 47 izolatın genomik DNA (gDNA)'sından PZR ile çoğaltılmıştır. Elde edilen bulgular arpa retrotranspozonuna ait uç sınır bölgelerinin *F. graminearum* genomunda bulunduğunu, bu dizilerin izolatlar arasındaki varyasyonu belirlemede kullanışlı olduğunu göstermiştir. Bulgular retroelemente ait uç tekrar bölgelerinin bitki patojen etkileşimi sonucunda horizontal transfer ile *F. graminearum* genomuna aktararak yerleşmiş olabileceğini düşündürmesi bakımından büyük önem taşımaktadır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. TRANSPOZONLAR

Transpozonlar, büyük bir kısmı kodlama yapmayan dizilerden oluşan, az sayıda gen içeren, özgün bir bölgeyi hedeflemeksizin genomu rastgele yerleşen ve/veya kopya sayısını arttıran hareketli elementlerdir (Feschotte, 2002).

Günümüze kadar bakterilerden ökaryotlara kadar birçok organizmanın genomunda bulunan transpozonlar ilk olarak Barbara McClintock tarafından mutant mısır tanelerinde farklı pigment oluşumunu tetikleyen elementler olarak keşfedilmiştir (McClintock, 1950). Keşfedildikleri ilk yıllarda genomda bir yerden çıkıp başka bir yere yerleşen tekrarlı diziler olma özelliklerinden dolayı sıçrayan genler (ing; jumping genes) olarak ifade edilmişlerdir (Finnegan,1989).

Bitki ve hayvan genomunda oldukça yaygın olan hareketli elementler insan ve fare gibi memeli genomlarının neredeyse yarısını oluştururken mısır ve arpa gibi bazı bitki türlerinde genomun yaklaşık %90'ını işgal edebilmektedir (Kazazian, 2004; SanMiguel ve ark., 1996).

Transpozonlar genomda iki farklı mekanizmayı kullanarak yer değiştirmektedir (transpozisyon). Transpozisyon süreci, (1) kesip çıkarma mekanizması ile bir transpozonun bulunduğu yerden çıkarılıp bir başka konuma yerleştirilmesi şeklinde gerçekleşebildiği gibi, (2) transpozonun primer transkript kopyasından sentezlenen cDNA moleküllerinin genomda yeni konumlara yerleşmesi ile kopya sayısının arttırılması yoluyla da olabilmektedir (Finnegan,1989). Bu iki yeteneği sayesinde transpozonlar organizma genomlarının şekillenmesinde önemli bir role sahiptir (Wicker ve ark., 2007). Transpozonun hareketi sırasında insersiyon delesyon gibi mutasyonlar meydana gelebilmekte, kopya sayısı artışı da organizma genom boyutunun artışına yol açabilmektedir. Sonuçta bu iki mekanizma organizma genomlarının yeniden düzenlenmesinde neredeyse mayotik rekombinasyon kadar etkili olabilmektedir (Lodish ve ark., 2013). Transpozonlar genomda kodlama yapan bölgelere yerleştiğinde gen anlatımını değiştirebildikleri gibi hareketleri sırasında neden oldukları mutasyon

birikimi ile zamanla genomda yeni allellerin oluşumuna da yol açabilirler. Bu nedenle hareketli elementlerin organizma genomlarının evriminde önemli bir rol üstlendikleri, evrimsel süreçte özellikle yeni türlerin ortaya çıkışında önemli mekanizmalar oldukları da düşünülmektedir (Sabot ve Shulman, 2006).

2.2. TRANSPOZONLARIN SINIFLANDIRILMASI

Transpozonlar, yerleştikleri genomdan ve konaktan bağımsız olarak, sadece hareket mekanizmasına göre sınıflandırılırlar. Sınıf I (retrotranspozonlar) ve sınıf II elementleri (DNA transpozonlar) olarak iki grupta incelenirler (Finnegen,1989). Daha sonraları Wicker ve ark. (2007)'nin sınıflandırmada hareketli elementin yapısal organizasyonunun da ölçüt olması gerektiğini vurgulaması üzerine, transpozonlar, mevcut sınıflar içerisinde taşınan tekrarlı diziler ve şifrelenen yapısal genlere göre de alt gruplara ayrılmışlardır.

2.2.1.Sınıf I Elementleri (Retrotranspozonlar)

Retrotranspozonlar olarak da bilinen sınıf I elementleri genomda RNA aracılı kopyala-yapıştır mekanizması ile yer değiştiren ve bu süreçte kopya sayısını arttıran transpozonlardır. Genomda birbirine yakın konumlanan tekrar dizileri (ing; repeat seas) adı verilen bölgelerde kümelenme eğilimde olan retrotranspozonlar kimi zaman iç içe geçmiş halde de konumlanabilirler (Kalendar ve Schulman, 2007).

Retrotranspozonlar hareketlerinde rol oynayan aspartik proteinaz, ters transkriptaz, RNazH, integras enzimlerini ve GAG proteinini kodlayan *pol* ve *gag* genlerini taşırlar. Retroelementte taşınan zarf geni (ing., envelope-*env*)i, retrovirüslerin zarf proteinini (ENV) kodlayan genle homoloji göstermektedir. Ancak kalıntı şeklinde varlığını sürdüren *env* gen bir ürünün sentezlenmesinden sorumlu değildir. Bazı retrotranspozonlarda ise bu temel proteinlerin analoglarını kodlayan açık okuma çerçeveleri (ing; open reading frame- ORF) bulunmaktadır. Retroelement transkripsiyon için konak hücrenin RNA polimeraz II'sine gereksinim duymaktadır. Sitosolde gerçekleşen paketlenme, cDNA çevrimi, cDNA kopyasının genomda yeni bir bölgeye yerleşimi tamamen retrotranspozon genomundan şifrelenen gen ürünleri tarafından sağlanmaktadır (Loodish ve ark., 2013).

Kopyala-yapıştır mekanizmasını kendi kodladığı ürünleri kullanarak gerçekleştiren retroelementler otonom retrotranspozonlar, genomda yer değiştirmek için bir başka elementin sentezlediği proteinlere ihtiyaç duyanlar ise otonom olmayan retrotranspozonlar olarak da bilinmektedir (Havecker ve ark., 2004). Ayrıca retrotranspozonlar sınır bölgelerinde uzun uç tekrar dizilerini (ing; long terminal repeats-LTR) taşımalarına göre LTR'li ve LTR taşımayan retrotranspozonlar olmak üzere de iki alt gruba ayrılırlar (Wicker ve ark., 2007).

2.2.1.1. LTR'li Retrotranspozonlar

Bu retrotranspozon grubunda, LTR'ler içerisindeki aynı yönlü korunmuş tekrar dizileri kodlama yapmayan nukleotidler arasına yayılmış halde bulunmaktadır. LTR'ler çoğunlukla retroelementin her iki ucunda da taşınmaktadır. Ancak bazı retroelementler tek bir LTR bölgesine de sahip olabilmektedir. Bu tipteki retroelementler solo LTR'li retrotranspozonlar olarak da bilinmektedir. Solo LTR'li retrotranspozonların homolog olmayan rekombinasyon mekanizması sonucunda bir retroelementin tek bir LTR bölgesini kaybetmesi ile meydana gelmiş olabileceği düşünülmektedir (Loodish ve ark., 2013).

LTR'li retrotranspozonları aynı zamanda iki LTR arasındaki bölgede hareket mekanizmasından sorumlu en az iki farklı proteini kodlayan geni (*gag* ve *pol*) ve/veya ORF'yi taşıdıklarından otonom retrotranspozon grubunu da temsil ederler. Kodlama bölgelerinde ve primer transkriptlerinde nadiren intron taşırlar (Sabot ve Shulman, 2006). Aynı zamanda LTR bölgeleri transkripsiyon başlangıç sinyalini ve transkripsiyonun sonlanması için poliadenilasyon sinyalini de sağlamaktan sorumludur. Bir anlamda taşıdıkları genlerin anlatımı için gerekli olan promotör ve terminatör bölge işlevini üstlenirler (Besansky, 1990; Suck and Traut, 2000).

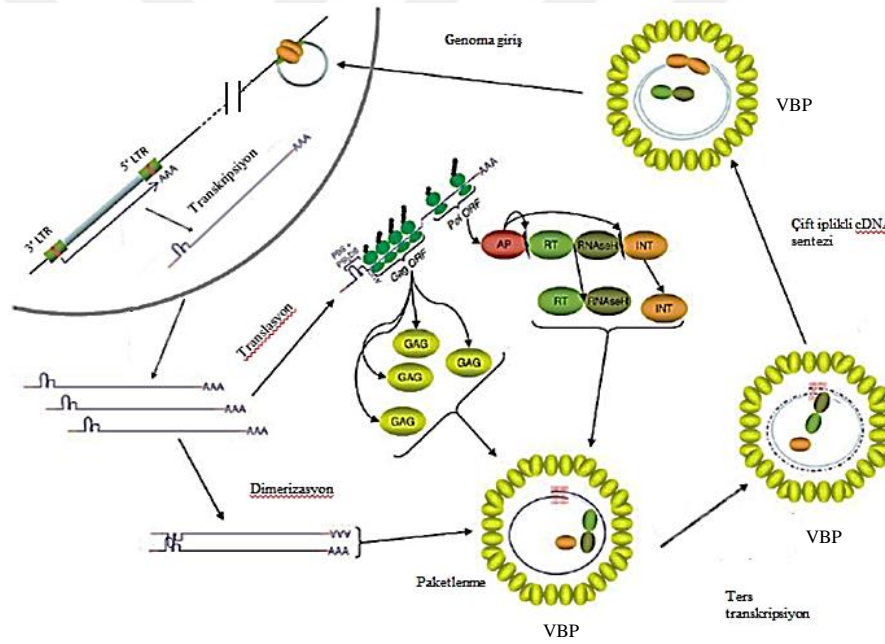
LTR'li retrotranspozonlar insan retrovirüslerine çok benzerdir. Ancak retrovirüslerdeki RNA moleküllerinin paketlenip serbest kalmasını sağlayan proteini (ENV) şifreleyen *env* geni retrotranspozonlarda taşınmaz. Bazı retroelement çeşitleri retrovirüslerdeki *env* geninin pozisyonuyla aynı lokasyonda farklı bir ORF bölgesi içermektedir (Wicker ve ark., 2007). Bu ORF, aminoasit dizilimi farklı olan, işlevi henüz net olarak açıklanamamış, transmembran domeni olduğu tahmin edilen, ENV benzeri bir proteini şifreler (Havecker ve ark., 2004). Bu üçüncü ORF bölgesinin varlığı, retroelementlerin

atalarının enfeksiyon sonrasında konak genomuna yerleşen retrovirüsler olduğu ancak evrim sürecinde *env* geninin inaktif hale geldiği ya da bu geni kaybetmiş olduğu hipotezini desteklemektedir (Sabot ve Schulman,2006). Bir hipotez ise retrovirüslerin retrotranspozonlardan kökenlendiğini, retroelementlerin evrim sürecinde kazandıkları gen (*env*), diziler ve ek protein setleri ile viral yaşam döngüsüne adapte olduklarını savunmaktadır (Frankel ve Young 1998; Seelamgari ve ark., 2004).

LTR'li retrotranspozonların yer değiştirme mekanizması maya retrotranspozonlarındaki çalışmalarla aydınlatılmıştır (Sandmeyer ve ark., 2002; Voytas ve Boeke, 2002). Bu elementlerin farklı konaklardaki yer değiştirme mekanizmalarının mayadaki ile analog olduğu düşünülmektedir (Havecker ve ark., 2004).

Retroelementlerin yapısal organizasyonları gibi hareket mekanizmaları da retrovirüslerin yaşam döngüleri ile benzerlik göstermektedir. Otonom retrotranspozonlarda hareket sırasıyla; transkripsiyon, translasyon, dimerizasyon, paketlenme, ters transkripsiyon ve integrasyon süreçleri ile gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.1). Transkripsiyon, retrotranspozonun 5' LTR'sinde konumlanan promotörden hücrenin RNA pol II enzimi tarafından başlatılır. 3' LTR'sindeki poliadenilasyon sinyalinin bulunduğu terminatör bölgesinde mRNA sentezi sonlandırılır. Gen anlatımı için gerekli olan faktörler de hücre tarafından sağlanır. Primer transkript nüklear por kompleksinden sitoplazmaya taşınır (Havecker ve ark., 2004). *Pol* ORF'si; aspartik proteinaz (AP), integraz (INT), ters transkriptaz (RT) ve RNazH (RH) olmak üzere dört domeni içeren polipeptidin kodlanmasından sorumludur. Polisistronik olan mRNA'nın sitoplazmada translasyonu sonucu sentezlenen polipeptitten AP otokataliz ile serbest hale geçtikten sonra INT domeninin kesilerek ayrılması sağlanır. Hücrede RT ve RNazH domenleri ise bir arada kalır. Retroelementte kodlanan *gag* geninin ORF'si ise nukleokapsid yapısını oluşturan işlevsel bir proteinin (GAG) sentezinden sorumludur. GAG proteinleri sitosolde retrotranspozona ait simetrik iki mRNA molekülünün kovalent olmayan etkileşimi (dimerizasyon) ile meydana getirilen kararlı ikili yapı ile birlikte, RT/RNazH domenleri ve INT'in etrafında polimerleşerek virüs benzeri partikülü (VBP) yapısı oluşturulur. VBP'nün içinde herhangi bir transfer RNA (tRNA), primer molekülü gibi davranarak primer transkriptin 5' LTR bölgesine yakın konumlanarak özgün bölgeye bağlanır. Bu noktada RT domeninin ters transkripsiyon

aktivitesi ile cDNA oluşturulur. Tek iplikli cDNA sentezi tamamlandıktan sonra mRNA molekülü RNazH aktivitesi ile yıkıma uğratılır. Bu RNA oligonukleotidleri sentezlenen tek iplikli cDNA moleküllerinin kalıp olarak kullanıldığı yeni bir sentez reaksiyonu için primer molekülü görevi üstlenmektedir. RT domeninin DNA polimeraz aktivitesi ile çift iplikli cDNA sentezi tamamlanır. INT proteinleri çift iplikli cDNA'nın LTR dizilerine, sınır motiflerini tanıyarak bağlanır ve bu yapı nukleusa transfer edilir. Nukleusta INT hücrenin gDNA'sının iki ipliğinde kesime yol açarak boyutu 2-16 baz çifti arasında değişen çıkıntılı yapışkan uçlu yapıların oluşumunu sağlar. gDNA'da kesimle oluşturulan alanlar arasına yerleşen çift iplikli cDNA kopyaları arasındaki boşluklar hücre içi DNA onarım mekanizması ile tamamlanır. Böylece retrotranspozonun cDNA kopyası genomda yeni bir konuma kararlı olarak yerleştirilir ve aynı zamanda bu şekilde retrotranspozonun kopya sayısı da artırılmış olur. Otonom olmayan



Şekil 2.1: LTR'li retrotranspozonların transpozisyon mekanizması (Sabot ve Schulman (2006)'dan alınarak düzenlenmiştir).

retrotranspozonlar için gerçekleşen süreçte de mRNA molekülünün sitoplazmaya geçişinden sonraki aşamalarda hücresel protein ve faktörler görev alır (Sabot ve Schulman, 2006).

Retrotranspozonlar genellikle genomda bir heterokromatin bölgesine veya daha önce bir retrotranspozonun yerleşmiş olduğu bölgeye girme eğilimindedir. Mısır, buğday, arpa

gibi büyük boyutlu genoma sahip organizmalarda ise LTR'li retrotranspozonların gen dışı bölgelere yerleştikleri gösterilmiştir (Sabot ve Schulman,2006).

Retrotranspozonlara ait cDNA kopyaları genomda hedef bölgeye retrotranspozonun ilk pozisyonundaki oryantasyonda girebilecekleri gibi oryantasyon değiştirerek de yerleşebilirler. Böylece genomda birbirine yakın konumlardaki retrotranspozonlar baş-kuyruk, kuyruk-kuyruk ve baş-baş konumlarında bulunabilirler (Kalendar ve ark., 1999).

LTR'li retrotranspozonlar aynı yapıya sahip olmaları ve benzer genleri sentezlemelerine rağmen genom organizasyonları ve dağılımları farklılık gösterir. Ökaryotik organizmaların genom dizi bilgilerinin ortaya konması ile farklı kökenlerden gelen LTR'li retrotranspozonların varlığı belirlenmiştir (Havecker ve ark., 2004). Retrotranspozonun sahip olduğu ORF'lerin organizasyonlarından veya ORF'lerdeki nükleik asit dizilimlerinden faydalanarak retrotranspozon çeşitlerinin tanımlanması sağlanmıştır. *Pol* ORF'sinden şifrelenen domenlerin pozisyonları ve nükleotid dizilimleri farklılık gösterebilir. LTR'li retrotranspozonlar, INT proteinini kodlayan dizilimin *Pol* ORF'sindeki konumuna göre *gypsy* ve *copia* olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar. *gypsy* elementlerinde INT domeni *pol* ORF'sinin sonundayken, *copia* elementlerinde AP ve RT domenlerinin arasında yer alır (Sabot ve Schulman, 2006). *Pol* ORF'sinin şifrelediği RT proteininin aminoasit dizilimi gibi korunmuş diziler de LTR'li retrotranspozon çeşitlerinin belirlenmesinde kullanılabilirler. Ayrıca LTR'li retrotranspozonlar RT aminoasit dizilimine göre *Pseudoviridae* ve *Metaviridae* olmak üzere iki ana sınıfa ayrılabilir. *Pseudoviridae* sınıfı da; pseudovirus, hemivirus ve sirevirus olarak 3 alt sınıfa ayrılabiliriz. Sirevirüsler bitki konaklarından türeler ve RT aminoasit dizilerine göre farklı bir soy oluştururlar. Pseudovirüsler ve hemivirüsler ters transkripsiyonda kullandıkları primerlere göre ayırt edilebilirler. *Metaviridae* sınıfı da RT aminoasit dizilimlerine göre metavirüsler, errantivirüs ve semotivirüsler olarak 3 farklı gruba ayrılırlar (Havecker ve ark., 2004).

LTR'li retrotranspozonlarda polistronik mRNA sentezi gerçekleştirildiğinden gen anlatımının düzenlenmesinde *Pol* ve *Gag* açık okuma çerçeveleri, çerçeve kayması ve/veya bir dur kodonu ile kontrol edilir. Retrotranspozon hareketi için fazla miktarda GAG ve POL protein gereksinimi olduğunda ise ikinci dur kodonu devreye girer. *Pol* ve *Gag* genlerinin anlatım stratejilerini öngörmek adına *Caenorhabditis elegans*,

Schizosaccharomyces pombe, *Drosophila melanogaster*, *Candida albicans* ve *Arabidopsis thaliana*'da *Pol* ve *Gag* açık okuma çerçevelerinin dizilimleri ve sınır bölgelerindeki nukleotid dizilimleri araştırılmış *Pol* anlatım mekanizmasının retrotranspozon orjini ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Gao ve ark., 2003).

2.2.1.2. LTR Taşımayan Retrotranspozonlar

Bu hareketli elementler kodlama yapmayan diziler arasına yerleşmiş, uzun tekrar dizileri içermeyen en fazla bir ya da iki ORF taşıyan retrotranspozon sınıfıdır. LTR taşımayan retrotranspozonlar non-LTR, polyA retrotranspozon gibi isimlerle de bilinirler (Han, 2010).

Otonom olmayan LTR taşımayan retrotranspozonlar yapılarında hiç ORF taşımazlar ve hareketlerini otonom retrotranspozonların sentezledikleri proteinlerin aracılığı ile gerçekleştirirler. LTR taşımayan retrotranspozonların yer değiştirme mekanizması da ters transkripsiyon temelli olarak gerçekleştirilir. Bütün otonom non-LTR elementleri ters transkriptaz aktivitesi için RT domeni ve ters transkripsiyona primer sağlayan endonukleaz domenini (endo) yapısında taşır. Evrimin erken evrelerine genom diziliminde bulunduğu düşünülen ikinci açık okuma çerçevesi ORF1; RNA bağlanma aktivitesi ve nukleik asit şaperonu aktivitesine sahip olup retrovirüslerdeki GAG proteini ile aynı göreve sahip proteinlerin sentezinden sorumludur (Han, 2010).

LTR taşımayan retrotranspozonların translasyona uğramayan 5' ve 3' dizileri çok fazla değişkendir. Bir kısmında 5' translasyona uğratılmayan bölge internal promotör içerirken 3' bölgesinin ters transkriptaz tarafından tanınan özgün dizi bilgisini taşıdığı ortaya konmuştur (Wicker ve ark., 2007).

LTR taşımayan retrotranspozona ait mRNA molekülü RNA pol II tarafından sentezlendikten sonra sitoplazmaya taşınır. Burada retrotranspozonun sahip olduğu açık okuma çerçeveleri ribonükleoprotein formunu oluşturacak proteinlerin sentezi için genetik kodu sağlar. Ribonükleoprotein formu LTR'li retrotranspozonlardaki VBP formuna benzer stoplazmik bir granül oluşturarak ters transkripsiyon aktivitesinin gerçekleşmesi için ortam sağlar. Ribonükleoprotein partikülü nukleus içine taşınır. Genomdaki hedef dizi retrotranspozonun endonukleazları tarafından tanınarak kesilir. Serbest kalan 3' uç primer görevi görür ve mRNA molekülü kalıp olarak kullanılarak “-” DNA ipliği sentezlenir. Bu aşamada retrotranspozon endonukleazları hedef dizinin

karşı ipliğinde ikinci bir kesim gerçekleştirir. Bu kesilen bölgeden “+” iplik sentezi başlatılır. mRNA molekülünden DNA molekülün bu şekilde sentezlendiği enzimatik reaksiyona “target primed reverse transcription” adı verilir. Çift ipliğin sentezinin ardından kesim bölgeleri ligasyon ile birleştirilir ve transpozisyon sonlanır. Eğer ters transkripsiyon için primer görevi görecektir serbest 3' ucu retrotranspozon endonukleazlarının yer almadığı başka bir mekanizma ile sağlanmışsa, transpozisyon endo domeninden bağımsız olarak ilerleyebilir. Bu nedenle non-LTR retrotranspozonların endonukleaz aktivitesine sahip olmaları gerekli değildir (Han, 2010).

2.2.2. Sınıf II Elementleri (DNA Transpozonları)

DNA transpozonları olarak da bilinen sınıf II elementleri ters tekrarlı uç dizileri (ing., inverted terminal repeats-ITR) ve hareketten sorumlu transpozaz enzimini kodlayan geni içeren ve genomda DNA aracılı hareket eden transpozon sınıfıdır. Yapılarında transpozaz geni ve ITR dizileri arasında kodlamadan sorumlu olmayan nukleotid dizilerini de taşır.

DNA transpozonları sentezledikleri transpozaz enziminin ters tekrarlı dizileri tanıması ve uç bölgeden kesmesi sonucunda genomda buldukları bölgeden ayrılarak başka bir hedef bölgeye yerleşirler. Genomda kes-yapıştır mekanizması olarak isimlendirilen bu yolla hareket ederler. DNA transpozonları bu yolla genomda yalnızca yer değiştirirler kopya sayılarını arttıramazlar (Wicker ve ark., 2007). Eğer DNA transpozonlarının hareketi hücre döngüsünün sentez (S) fazında gerçekleşirse, yeni sentezlenen iplikte DNA transpozonunun birden fazla kopyası taşınabilmektedir. Ancak bu yolla hücre bölünmesi sonrası yeni nesillere aktarılan iplikte DNA transpozonunun kopya sayısı arttırılmış olur (Lodish ve ark., 2013).

DNA transpozonları ökaryotlarda olduğu gibi prokaryotlarda, özellikle de bakterilerde bulunur. Bakterilerde bulunan DNA transpozonları insersiyon dizileri (ing; Insertion Sequences-IS) olarak bilinmektedir. IS elementleri, iki ucunda aynı yönlü tekrar dizileri ve transpozisyonun gerçekleşmesinde rol oynayan transpozaz enzimini kodlayan en az iki gen taşımaktadır. Bazı IS elementleri antibiyotik direnç genlerini de taşıyabilmektedir. Bakterilerdeki IS elementleri DNA transpozonlarının hareket mekanizmalarının araştırılmasında yardımcı olmuştur (Weaver, 2012).

Sınıf II transpozonları tek veya çift iplikli DNA molekülleri olarak genomda hareket edebilmektedir (Craig ve ark., 2002). Ökaryotlarda DNA transpozonları 3 alt sınıfa ayrılırlar. (i) Çift iplikli DNA'nın genomdaki yerinden kesilip çıktığı ve yeni yerine entegre olduğu transpozonlar yani klasik kes yapıştır mekanizması ile hareket eden DNA transpozonları (Craig ve ark., 2002); (ii) yuvarlanan halka modeli ile hareket eden Helitron olarak da bilinen DNA transpozonları (Kapitonov ve Jurka, 2001) ve (iii) Maverick olarak da bilinen transpozisyon mekanizması henüz tam anlaşılmamış, ancak kendi kodladığı DNA polimeraz enzimini kullanarak replike oldukları bilinen transpozonlar (Pritham ve ark., 2007). Helitron ve Maverick transpozonları genomda konumlandığı bölgeden sadece tek iplikli DNA'nın ayrıldıktan ve replikasyonla çift iplikli formu kazandıktan sonra yeni konumuna yerleşmesi ile hareket ederler. Bu mekanizma replikatif kopyala-yapıştır mekanizması olarak da bilinmektedir.

2.3. TRANSPOZONLARIN HORIZONTAL TRANSFERİ

Transpozonların evrimsel süreçte seleksiyon baskısından kaçarak günümüze kadar gelebilmeleri onları ilgi odağı haline getirmiştir. Transpozonların hareket yeteneği genomda yeni bölgelere yerleşmelerini sağladığı gibi hücreler arasında ya da farklı türler arasında da aktarılma şanslarını arttırmıştır. Bir transpozonun bir hücreden ve/veya organizmadan diğerine hücre bölünmesi dışında homolog rekombinasyon mekanizmaları gibi farklı yollarla aktarımı horizontal transfer (HT) olarak bilinmektedir. Virüs ve parazit gibi aracı organizmalarda transpozonların farklı alem üyelerine ait türler arasında bile bağımsız olarak geçişlerini kolaylaştırmıştır (Schaack ve ark., 2010).

Hücresel organizmalarda, aktif bir transpozon, mutasyonla hareket yeteneğini kaybettiğinde ya da genetik drift ve/veya seleksiyon gibi mekanizmalara maruz kaldığında yeni nesillere aktarılamayıp popülasyondan elendiği gibi horizontal gen kaçıışı ile yeni bir organizma genomuna girdiğinde de orijinal konak soylarından silinebilir. Meydana gelen HT, bu şekilde aktif olan transpozonun çok çeşitli organizmalara ait popülasyonlarda varlığını korumasını sağlayabilmiştir (Hartl, 1997; Robertson, 2002). Transpozonların aktarılan yeni hücre ve/veya organizma genomlarında oluşturdukları varyasyonlarla, hareketleri ve/veya birikimleri sırasında meydana getirdikleri epigenetik modifikasyonlarla birlikte HT, organizma genomlarının evrimsel sürecine kalıcı etkili ve hızlı bir kaynak sağlar (Oliver ve Greene, 2009). HT ile

transpozonların yeni konak genomunda yol açtığı varyasyonlar yapısal değişimler olabildiği gibi yeni düzenlenme bölgeleri oluşturarak gen anlatımını etkileyen işlevsel değişimler şeklinde de olabilir. Yeni gen ailelerinin oluşumunda etkili olan HT'in türleşmede de önemli bir role sahip olduğu da öngörülmektedir (Shaack ve ark., 2010).

Transpozonların HT eğilimleri transpozisyon mekanizmalarına göre değişiklik gösterir. Çift iplikli DNA kopyası ile hareket eden DNA transpozonları ve LTR'li retrotranspozonların HT mekanizmaları ile aktarılma olasılıkları RNA aracılığı ile genomu giriş yapan non-LTR retroelementlerinkine göre daha yüksektir (Shaack ve ark., 2010). Diğer yandan LTR'li retrotranspozonların HT ile ENV proteinini kodlayan gen ile birlikte enfeksiyon yeteneği de kazanabileceği, bu durumun da HT yeteneğini arttırabileceği düşünülmektedir (deSetta ve ark., 2009).

2.4. RETROTRANSPOZON TEMELLİ MOLEKÜLER MARKIRLAR

Moleküler markırlar genomdaki nukleotid dizi varyasyonlarını temsil eden bölgelerdir (Kalendar ve ark., 2010). Bu varyasyonların belirlenmesinde kullanılan yöntemler farklı temellere göre sınıflandırılmıştır (Cooke ve ark., 2006).

İlk grupta yer alan yöntemler gDNA'nın restriksiyon endonukleazları (RE) ile kesimine, ardından tasarlanmış özgün problarla hibridizasyonu temeline göre geliştirilmiştir. Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi (ing; Restriction Fragment Length Polymorphisms- RFLP) Botstein ve ark. (1980) tarafından DNA polimorfizmlerini belirlemede kullanılan ilk moleküler markır tekniği olarak rapor edilmiştir. Bu yaklaşım ile genomda RE tanıma bölgesinde meydana gelen mutasyonlar saptanabilmiştir (Torres ve ark., 1993).

İkinci grup moleküler markır teknikleri ise PZR temeline dayandırılmıştır. Bu tekniklerle genomda rastgele veya hedefli bölgelerden çoğaltılan ürünler analiz edilmektedir. Polimorfizmler primer bağlanma bölgelerindeki mutasyonlar ve çoğaltım ürün boyut farklılıkları ile ortaya konmuştur (Barnet ve Blanchard, 2001; Williams ve ark., 1991).

Birbirinden farklı temellendirilen bu iki strateji bir arada da uygulanabilmektedir. Bu yaklaşımlarda hedef bölgenin çoğaltımının ardından RE ile kesimi (ing.; Cleavage Amplified Polymorphisms- CAPS) ya da genomun önce RE ile kesiminin ardından hedef bölgenin çoğaltımı gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca RE ile kesime uğratılan

gDNA'dan elde edilen fragment uçlarına eklenen adaptör dizilerinin primer bağlanma bölgesi olarak kullanıldığı PZR çoğaltımı ve ürün analizi ile de çoğaltılmış uzunluk polimorfizmi (ing., amplified fragment length polymorphisms- AFLP) ortaya konmaktadır (Konieczny ve Ausubel, 1993; Narayanasamy, 2008).

Bir diğer grup ise dizi analizi temelli moleküler markırları kapsamaktadır. Bu yaklaşımlarda, küçük genoma sahip organizmalarda dizilime tüm genom düzeyinde, kısa sürede yapılabilmektedir. Tek seferde analiz edilemeyecek büyüklükteki bölgeler için ise genom küçük parçalara ayrıldıktan sonra plazmit vektöre klonlanmakta ve ardından dizilim bilgileri elde edilmektedir (Goff ve ark., 2002; The Arabidopsis Genome Initiative 2000; Yu ve ark., 2002).

Sonuç olarak uygulanan yaklaşımla elde edilen DNA parçasının moleküler markır olarak değerlendirilebilmesi organizma genomlarının farklılığını temsil etme potansiyeline bağlıdır. Bu nedenle çalışmanın amacına göre seçilen uygun yöntem elde edilen markırın güvenilirliği bakımından büyük önem taşımaktadır (Agarwal ve ark., 2008).

Ökaryotik organizmalarda nuklear genomun büyük bir kısmı kodlama yapmayan nukleotid dizilimlerini taşımaktadır. Genomda tekrarlı diziler nispeten kodlama bölgelerinde bulunmakla birlikte daha çok kodlama yapmayan bölgelerde dağılmış halde yer almakta, sentromer ve telomer bölgelerinde ise kümelenme eğilimi göstermektedir. Tekrarlı dizilerin kopya sayıları mayotik ve mitotik rekombinasyon mekanizmaları nedeniyle aynı türün bireyleri arasında bile farklılık göstermektedir. Bu nedenle tekrarlı diziler kullanışlı moleküler markırları temsil edebilmektedir. Ökaryotik organizmalarda genomun büyük bir kısmında hareketli elementlerin oluşturduğu tekrarlı diziler taşınmaktadır (Kalendar ve Schulman, 2007). Genom boyunca yayıldıkları, çok kopya sayılı oldukları ve genomda yerleştikleri yerlerde polimorfizme sebep oldukları için retrotranspozonlar uygun moleküler markırlar olarak tercih edilmektedir (Schulman ve ark., 2004).

Kalendar ve Schulman (2007) tarafından geliştirilen retrotranspozon markırlarının belirlenmesinde kullanılan yöntemler PZR ile çoğaltım temeline dayandırılmıştır. Bu yaklaşımlarda retroelementin sınır bölgelerinde bulunan korunmuş tekrarlı diziler primer tasarımında kullanılan hedef bölgelerdir. Tekrarların taşındığı LTR bölgeleri

retroelement ailesi içinde korunurken diğer ailelerde farklılık gösterdiğinden güvenilir markır eldesini sağlamaktadır (Kalendar ve ark., 2011).

Retrotranspozonlar genomda farklı oryantasyonlarda (kuyruk-baş, baş-baş, kuyruk-kuyruk) konumlanırlar. Bu nedenle, doğru primer molekülünün tasarımı retrotranspozon temelli moleküler markırların geliştirilmesinde kullanılacak strateji için büyük önem taşımaktadır. Retrotranspozon temelli yöntemler primer çiftlerinin tasarlandıkları hedef bölgelere göre geliştirilmiştir. Bu yaklaşımlarda daha çok retrotranspozonların genoma girdikleri bölgelerin analizi tercih edilmektedir. Bu şekilde heterozigot bireyler de seçilebilmektedir (Kalendar ve ark., 1999). Organizmaların DNA parmak izi profillerinin çıkarılması, filogenetik ilişkilerin belirlenmesi, biyoçeşitliliğin araştırılması ve epigenetik faktörlerin incelenmesi gibi çalışma alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Pasquali ve ark., 2007; Arabi ve Jawhar, 2010).

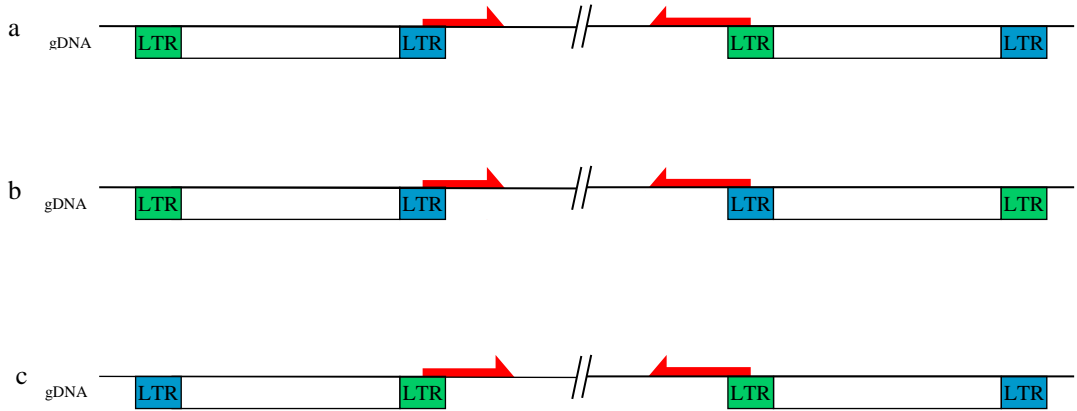
Genomda yalnızca hedef bölgedeki tek nukleotid değişimlerini (ing; single nukleotid polimorfizmleri- SNP) belirlemeye olanak sağlayan RFLP, AFLP gibi yöntemlerden farklı olarak retrotranspozon temelli moleküler markırlar- retrotranspozonların sebep olduğu insersiyon ve delesyonların genomun tamamına yayılmış olmasından dolayı tüm genom düzeyindeki varyasyonların ortaya konmasında etkilidir (Kalendar ve Schulman, 2007).

2.4.1. Retrotranspozonlar Arası Çoğaltım Polimorfizmi

Genomda birbirine yakın konumlanmış iki retrotranspozon arasındaki bölgenin analizi ile retrotranspozon hareketi hakkında bilgi sağlayan, insersiyon veya delesyonlarla oluşan nukleotid değişimlerinin belirlenmesine olanak tanıyan bir yöntem olan retrotranspozonlar arası çoğaltım polimorfizmi (ing., Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism-IRAP) ilk olarak arpa genomunun gen haritalama çalışmalarında uygulanmak üzere geliştirilmiştir (Kalendar ve ark., 1999). Buğday, mısır ve soyada kullanımı yaygınlaştıktan sonra birçok organizma genomunda transpozon taramasında da uygulanmaya başlamıştır (Kalendar ve ark., 2011). Retrotranspozonlar genomda kümelenmiş halde buldukları için iki retrotranspozon arası bölge PZR ile çoğaltılabilmektedir. Hareket eden retrotranspozon süreçte mutasyona yol açtıklarından bireyler arasında farklılık göstermekte ve retrotranspozon temelli DNA parmak izi analizine olanak sağlamaktadır (Kalendar ve ark., 2011). Çalışılmak istenilen organizma

genomu için tanımlanmış retrotranspozon bulunmadığında ise yakın ve/veya uzak ilişkili türler için tanımlanmış bir retrotranspozon dizilimi referans alınarak IRAP analizi gerçekleştirilebilmektedir (Du ve ark., 2013).

IRAP yöntemi uygulama bakımından yalnızca PZR ve ardından agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezi ile ürünlerin analizini gerektiren basit bir yöntemdir. Herhangi bir RE kesimi ya da adaptör molekül ligasyonu gerektirmez (Schulman ve ark., 2004). Araştırılmak istenilen retrotranspozonun dizilim bilgileri veri tabanlarından elde edilir. İki retrotranspozon arasındaki bölgenin çoğaltılabilmesi için retrotranspozona ait korunmuş LTR dizilerinin 3' ya da 5' uç bölgeleri primer bağlanma bölgeleri olarak kullanılır. IRAP için primer molekülleri tasarımı bu bölgelerin dizilimine göre ve yönleri retrotranspozondan dışa dönük olacak şekilde gerçekleştirilir. Primer molekülleri yalnızca LTR dizilerinin uç bölgelerine tamamlayıcı olarak tasarlanacağı gibi, LTR bölgesi ile birlikte komşu diziye tamamlayıcı birkaç nükleotid de içerebilir. Transpozonlar genoma farklı organizasyonlarda yerleşebildiklerinden oligonükleotid primerler yakın konumlanmış retrotranspozonların LTR bölgelerinin farklı organizasyonları da göz önünde bulundurularak tasarlanmalıdır. Retrotranspozonların genomda yerleştikleri baş-kuyruk, kuyruk-kuyruk ve baş-baş oryantasyonlarına göre 3 farklı strateji ile IRAP yöntemi uygulanabilir (Şekil 2.2). IRAP tek bir oligonükleotid ya da bir çift oligonükleotid primer kullanılarak gerçekleştirilebilir. PZR işlemi sonucunda elde edilen çoklu ürünler DNA parmak izini oluşturur. Ürünlerin analizi ile bireyler arasındaki varyasyonlar belirlenebilirken, retrotranspozonun hareketi de incelenmiş olur (Kalender ve ark., 2011).



Şekil 2.2: Genomda; (a) kuyruk-baş, (b) kuyruk-kuyruk, (c) baş-baş oryantasyonunda yakın olarak konumlanmış iki retrotranspozon arasındaki bölgenin IRAP yöntemi ile çoğaltılma stratejileri. Nükleotid dizilimleri farklı olan LTR'ler yeşil ve mavi renkle gösterilirken, kırmızı renkli oklar tasarlanan primer moleküllerini ve PZR reaksiyonunun kataliz yönünü göstermektedir.

2.4.2. Kullanılan Diğer Markır Yöntemleri

Retrotranspozon markır yöntemleri çoğaltımda kullanılacak oligonukleotid primerlerin tasarımı için seçilecek bölgeye göre, retrotranspozon çeşitliliği ve hareketinin izlenmesini sağlamak üzere geliştirilen teknikleri kapsamaktadır.

Retrotranspozon-mikrosatellit çoğaltım polimorfizmi (ing., Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism-REMAP) yöntemi genom boyunca dağılmış retrotranspozonlar ile mikrosatellit tekrarlar arasındaki bölgelerin analizini sağlayan bir yöntemdir. REMAP ile PZR çoğaltımında kullanılacak primer molekül çiftlerinden biri korunmuş LTR dizisine diğeri ise araştırmacının seçtiği mikrosatellit tekrar motif dizisine bağlanabilecek şekilde tasarlanır. Çoğaltım ürünleri agaroz veya poliakrilamid jel elektroforez sistemlerinde analiz edilmektedir (Kalender ve ark., 2011). Genomda yerleşen mikrosatellit motifleri ve tekrar üniteleri yüksek mutasyon oranına sahiptir. Bu nedenle tür içi çeşitliliğin tarandığı çalışmalarda yüksek varyasyon oranının belirlenmesine olanak sağlamaktadırlar. Ancak REMAP yöntemini sınırlayan en önemli faktör tekrarlı ünitelerde meydana gelen iplik kayması mekanizması ile tetiklenen polimorfizmlerin retrotranspozon polimorfizmlerinden ve/veya retrotranspozon hareketliliğinden ayırt edilememesidir (Kumar ve Hirochika, 2001). Bu sınırlama mikrosatellit motifine göre tasarlanan oligonukleotid primerin 3' ucuna çıpılanmış nükleotidlerin eklenmesi ile giderilebilmektedir. Bu sayede tür içinde hem retrotranspozon varyasyonu hem de mikrosatellit tekrar farklılıkları yakalanabilir (Kalender ve ark., 2011).

Dizi özgün çoğaltım polimorfizmi (ing., Sequence-Specific Amplified Polymorphism-SSAP) ise AFLP'nin *BARE-1* elementi için modifiye edilmesiyle geliştirilmiş yeni bir yöntemdir. SSAP, RE'lerinin gDNA'da kestiği bölgelere eklenen adaptör diziler ile retrotranspozonların LTR dizileri arasındaki bölgenin çoğaltımını hedeflemektedir (Waugh ve ark., 1997). RE tanıma bölgesinin kaybolması ya da tanıma bölgesinin metilasyonu ile sonuçlanan polimorfizmlerin retrotranspozon polimorfizmlerinden ve/veya retrotranspozon hareketliliğinden ayırt edilememesi yöntemin uygulanmasını sınırlandırmaktadır (Kalender ve Schulman, 2007). SSAP'ın modifikasyonu ile geliştirilmiş TRIM (ing., Terminal Repeat Retrotransposon in Miniature)'de ise aynı yaklaşımla kısa LTR'ler ile sınırlanan kodlama yapmayan dizilerden oluşmuş otonom

olmayan retrotranspozonlar belirlenmektedir. Yaklaşımın SSAP'tan farkı, kullanılan RE ve bağlanan adaptör dizisinin farklı olmasıdır (Witte ve ark., 2001).

Geliştirilen bir başka retrotranspozon temelli moleküler markır tekniği retrotranspozon temelli insersiyon polimorfizmi (ing., Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism-RBIP) olarak bilinmektedir. Özgün dizi bilgisine gereksinim duyulması RBIP'i retrotranspozonların tanımlanmasında kullanılan diğer moleküler markırlardan ayıran özelliğidir. Retrotranspozonlar biri bu özgün diziye, diğeri LTR dizisine göre tasarlanan primerler kullanılarak çoğaltılmaktadır (Kumar and Hirochika, 2001).

Retrotranspozonun LTR dizilerini takip eden -gen anlatımında primer bağlanma bölgesi (PBB) olarak işlevsel olan- bölgeleri aminoasitle yüklü bazı tRNA'lara (tRNA^{iMet}, tRNA^{Lys}, tRNA^{Pro}, tRNA^{Trp}, tRNA^{Asn}, tRNA^{Ser}, tRNA^{Arg}, tRNA^{Phe}, tRNA^{Gln}) tamamlayıcı özellikteki dizileri taşırlar. iPBS (ing., Inter Primer Binding Site) olarak isimlendirilen markır yönteminde ise ters transkripsiyonla bu bölgelerden yararlanılarak retrotranspozon dizilimi saptanabilmektedir (Kalender ve ark., 2010).

RAPD-retrotranspozon çoğaltım polimorfizmi (ing., RAPD- Retrotransposon Amplified Polymorphism- R-RAP) tekniğinde ise rastgele seçilmiş 10 bazlık GC oranı %50 ve üzeri olan oligonukleotidler ve IRAP primerleri bir arada kullanılmaktadır (Aalami ve ark., 2012).

2.5. MANTARLARDA TRANSPOZONLAR

Transpozonlar mantarlarda genomun % 3-20'sini kaplayabilmektedir. Mantar türlerinin çoğunda transpozonların varlığının gösterilmesi, bu elementlerin evrimsel sürecin başlangıcından beri mantar genomunun bir parçası olduğunu düşündürmektedir.

Moleküler yaklaşımlarla *Neurospora crassa*'da belirlenmiş *Tad* elementi mantarlarda tanımlanmış ilk transpozondur (Kinsey ve Helber, 1989). İlerleyen yıllarda mantar türlerinde mobil elementlerin varlığının belirlenmesi, moleküler analizleri ve bu elementlerin moleküler çalışmalar için araç olarak kullanımı yaygınlaşmıştır (Daboussi, 1996).

Mantar genomlarında transpozonlar iki strateji kullanılarak tanımlanmaktadır. İlk yaklaşımda, genomda çok kopya sayısı ile temsil edilen mobil elementlerin tekrarlı

dizilerinden faydalanılarak belirlenmeleri hedeflenmiştir. İkinci stratejide ise genomda özgün bölgelere yerleşen transpozonlar için yerleştiği bölgede gen anlatım profillerini değiştirmesi özelliğinden faydalanılmaktadır. *Tad* elementini taşıyan vektörün rekombinant DNA teknolojisi ile aktarılması sonucu glutamat dehidrogenaz sentezinden sorumlu am gen anlatımının *N. crassa*'da değiştiği, 8 farklı mobil elementin aktarılması ile de nitrat redüktaz sentezinden sorumlu *nia* gen anlatımının *Fusarium oxysporum*'da değiştiği ikinci strateji ile gösterilmiştir (Daboussi ve Langin 1994).

Mantarlarda tanımlanan transpozonlar genellikle sınıf I elementleridir. Filamentli mantarlarda sınıf I elementlerine ait LTR'li retrotranspozonlar, LTR'siz otonom retrotranspozonlar ve LTR'siz otonom olmayan retrotranspozonlar olmak üzere 3 farklı transpozon tanımlanmıştır. *Cladosporium fulvum*'da tanımlanan *Cft-I* elementi (McHale ve ark., 1992) ve *F. oxysporum*'da tanımlanan *skippy* elementi (Anaya ve Roncero 1995) LTR'li retrotranspozonlardan *gypsy* grubu üyeleridir. Bu transpozonların konak organizma patojenitesi ilişkili olmadıkları da belirlenmiştir. Ek olarak bu elementlerin tür tanımlamada da kullanışlı genetik markırları temsil ettiği gösterilmiştir (Kempken ve Kück, 1998). Birçok mantar türünde *gypsy* grubuna ait retrotranspozonların bulunması, ortak atada var olan bu elementin lateral transfer ile yeni hücre soylarına aktarıldığı görüşünü desteklemektedir (Daboussi, 1996). *Ascobolus immersus*'un *marsI* elementi (Flavell, 1992), *N. crassa*'nın *Tad* elementi LTR taşımayan retrotranspozonların LINE (ing., long interspersed nuclear elements) sınıfına ait transpozonlarına örnek olarak verilebilir. Aynı zamanda *Nectria haematococca*'daki *NrsI* elementi otonom olmayan SINE (ing., short interspersed nuclear elements) sınıfı retrotranspozonu olarak tanımlanmıştır (Kim ve ark., 1995).

Mantarlarda bulunan sınıf II transpozonları genellikle Fot1/Pogo benzeri ya da Tc1/mariner süper ailesine üye olan elementlerdir. Her iki element sınıfı da kısa ters yönlü uç tekrarları içeren ve farklı tip transpozaz enzimi sentezleyen DNA transpozonlarıdır. *F. oxysporum*'daki *Fot1* ve *Impala* elementleri bu sınıf transpozonlara örnektir (Daboussi ve ark., 1992; Langin ve ark., 1995). *Fot1* elementinin hem *Fusarium* türlerinde hem de bu genusa çok uzak türlerde gözlenmesi, bir vektör aracılığıyla veya farklı mekanizmalarla HT ile türler arasında dağılabileceği görüşünü destekler niteliktedir (Daboussi ve Langin, 1997). Mantarlarda genel olarak Fot1/Pogo benzeri ya

da Tc1/ mariner süper ailesi üyesi elementlerin bulunması bu elementlerin diğer mantar transpozonlarına göre daha aktif ve HT'de daha başarılı olmaları şeklinde açıklanmaktadır. hAT transpozon ve mini transpozon aileleri de mantar genomlarında gözlenen diğer DNA transpozonlarıdır (Kempken ve Kück, 1998).

2.5.1. *Fusarium graminearum*'da Transpozonlar

Filamentli mantarlardan *F. graminearum* başak yanıklığının en başta gelen patojeni olarak rapor edilmiştir. Haploid genoma sahip fitopatojen dört kromozoma sahiptir (Taga ve ark., 2003). Bu mantar türünde 90'lı yılların sonlarında gerçekleştirilen genomik çalışmalarla ortaya konan anlatımı yapılan dizi etiketleri (ing., Expressed Sequence Tag-EST) çevrimiçi veri tabanlarında kayıt altına alınmıştır. Mayıs 2003 yılında *F. graminearum*'a ait NRRL 31084 (PH-1) ırkının tüm genom dizilimi Broad Enstitüsü Genom Araştırma Merkezi tarafından yayınlanmıştır. Tüm genom dizilim bilgisi plazmid, fosmid ve BAC klonları kullanılarak elde edilmiş, *F. graminearum* genom boyutunun 36,1 Mb olduğu rapor edilmiştir (ribozomal RNA tekrarları, telomer bölgelerindeki elementler tüm genom dizilimine dâhil edilmemiştir). Genomda 11.600'den fazla genin kodlandığı öngörülmektedir. Bu da tanımlanmış mantarlar arasından *F. graminearum* genomunun gen sayısı bakımından en zengin genom olarak tanımlanmasını sağlamıştır (Goswami ve ark., 2004). Ek olarak *F. graminearum* genomunun diğer yakın ilişkili türlerden daha az miktarda tekrar dizilerini ve duplikasyonlu genleri taşıdığı da gösterilmiştir (Trail ve ark., 2002; Cuomo ve ark., 2007; Trail, 2009).

Biyoinformatik analizler hareketli elementlerin *F. graminearum* PH-1 suşunun genomunda sınırlı bir alan (% 0,29) kapladığını göstermiştir (King ve ark., 2015). *F. Graminearum* genomunda *F. oxysporum* transpozonlarından *Fot1* ve *Fot5* ile dizi benzerliği gösteren ve Tc1 süper ailesi üyesi iki DNA transpozon ailesi tanımlanmıştır. Tanımlanan bu transpozonların bozulmuş transpozaz genini içerdiği dolayısıyla transpozonların inaktif olduğu rapor edilmiştir (Cuomo ve ark., 2007). Ancak *Fot1* elementi ile dizi benzerliği gösteren DNA transpozon kopyalarının uç ters tekrarlı dizilerle bitişik iki bazlık aynı yönlü tekrarlı dizileri içermesi bu elementlerin transpozon olarak hareket edebileceğini göstermektedir. *F. graminearum*'da bu tekrarların dışında *F. oxysporum* retrotranspozonlarından *skippy* elementi ile kısmen

benzerlik gösteren retrotranspozon dizilimleri de belirlenmiştir. *F. graminearum*'da diğer filamentli mantarlardan daha az sayıda hareketli elementin taşındığı belirlenmiştir. *F. graminearum*'un homotallik bir mantar olması az sayıda transpozona sahip olmasını sağladığı gibi yeni tekrar elementlerini kazanmasını da sınırlamaktadır (Cuomo ve ark., 2007).

F. graminearum genomu bol miktarda kısa tekrar elementleri içermektedir. Genomda gözlenen yaklaşık 141 baz çiftinden oluşan, farklı kromozomlar üzerinde konumlanan bir tekrar ailesinin, 20 baz çifti ters tekrarlı ve 5 baz çifti aynı yönlü tekrarlı dizilerle bitişik olarak konumlanması bu tekrar dizilerinin transpozisyonla ilişkili olabileceği görüşünü ortaya çıkarmıştır. Bu dizilerin *F. graminearum*'a özgün Minyatür Ters Tekrarlı Traspozabl Elementlerini (ing., miniature inverted-repeats transposable elements- MITE) temsil edebileceği rapor edilmiş ancak belirgin ortak uç ters tekrar dizilerine sahip bir aile tanımlanamamıştır (Cuomo ve ark., 2007).

Transpozonların *F. graminearum*'daki varlığı ve hareketi konusunda çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Dufresne ve ark. (2008), *F. oxysporum*'a ait mimp1 elementinin *F. graminearum* genomuna yerleşebileceği potansiyel pozisyonları transpozon mutagenesi ile belirlemişler, bu elementin etkilediği anlatım profillerini göstermişlerdir.

Bu tez çalışmasında, arpa genomunda bulunan *BARE-1* elementinin ve/veya elemente ait LTR dizilerinin bitki patojen etkileşimi ile *F. graminearum* genomuna aktarılması hipotezi kurulmuştur. Bu amaçla *BARE-1* elementine ait LTR dizilerine göre tasarlanan oligonukleotid primerlerin kullanıldığı IRAP analizi ile *F. graminearum* genomunda *gypsy* sınıfı retrotranspozonlarının taraması gerçekleştirilmiştir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MANTAR MATERYALİ

Yüksek lisans tez çalışmasında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü kültür koleksiyonunda saklanan ve moleküler yaklaşımla (Yörük ve Albayrak 2013) *F. graminearum* türüne ait olduğu teyit edilmiş 47 izolat kullanıldı (Tablo 3.1). Geleneksel yöntemlere göre tek spor analizi ile (Booth, 1977; Gerlach ve Nirenberg, 1982) morfolojik olarak tanımlanmış izolatlardan 14'ü Samsun 19 Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Anabilim Dalı'ndan; 31'i İsfahan Teknoloji Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü'nden; iki referans ırk (H-11 ve 88-I) da Lee ve ark. (2009) tarafından sağlandı.

Tablo 3.1: Tez çalışmasında kullanılan *Fusarium graminearum* izolatları.

İzolat	Konak	Bölge	İzolat	Konak	Bölge
F5	Buğday	Sakarya	FgT9	Buğday	Mazandaran
F6	Buğday	Sakarya	FgT10	Buğday	Mazandaran
F7	Buğday	Sakarya	FgT11	Buğday	Mazandaran
F8	Buğday	Sakarya	FgT12	Buğday	Mazandaran
F9	Buğday	Balıkesir	FgT16	Buğday	Mazandaran
15F	Buğday	Sakarya	Sh2Fgsh1	Buğday	Mazandaran
3F	Mısır	Samsun	Fgsh4	Buğday	Mazandaran
5F	Mısır	Samsun	Fgsh5	Buğday	Mazandaran
6F	Mısır	Samsun	Fgsh7	Buğday	Mazandaran
7F	Mısır	Samsun	Fgsh10	Buğday	Mazandaran
14F	Buğday	Kastamonu	Fg4	Buğday	Mazandaran
1F	Buğday	Bolu	Fg18	Buğday	Moghon
2F	Buğday	Çankırı	Fg56	Buğday	Gorgan
4F	Arpa	Bolu	Fg49	Buğday	Moghon
FgM1	Buğday	Mazandaran	Fg170	Buğday	Gorgan
FgM3	Buğday	Mazandaran	Fg174	Buğday	Gorgan
FgM5	Buğday	Mazandaran	Fg5	Buğday	Sari
FgM6	Buğday	Mazandaran	Fg165	Buğday	Kordkooy
FgM7	Buğday	Mazandaran	Sh13	Buğday	Bilinmiyor
FgM9	Buğday	Mazandaran	Fgsh14	Buğday	Bilinmiyor
FgM10	Buğday	Mazandaran	Fgsh15	Buğday	Bilinmiyor
FgT2	Buğday	Mazandaran	H-11	Mısır	Kore
FgT3	Buğday	Mazandaran	88-1	Arpa	Kore
FgT7	Buğday	Mazandaran			

3.2. KULLANILAN BESİ ORTAMLARI

Çalışmada kullanılan *Fusarium* izolatları SNA (ing., Synthetic Nutrient Agar) ve PDA (patates dekstroz agar) besi ortamlarında kültürlendi (Tablo 3.2). Besi ortamlarının

sterilizasyonu 121°C’de 1,2 atm basınç altında 15 dakika süre ile gerçekleştirildikten sonra steril petrilere döküldü.

Tablo 3.2: *Fusarium* kültürlerinin kurulduğu besi ortamları.

Besi ortamı	Bileşenler	Derişim
SNA (pH 5,6)	KH ₂ PO ₄	1 g/l
	KCl	0,5 g/l
	KNO ₃	1 g/l
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g/l
	Glukoz	0,2 g/l
	Sukroz	0,2 g/l
PDA (pH 5,6)	Agar	20 g/l
	Patates dekstroz özütü	15 g/l
	Agar	20 g/l

3.3. PATOJENLERİN KÜLTÜRENMESİ

Mantar kültürleri, içinde miselyumların bulunduğu -70°C’de saklanan gliserol stoğun 600 µl’sinin SNA besi ortamına bırakılması ile kuruldu. Kültürlerde miselyum üremesi iklimlendirme kabininde (WiseCube, Kore) 25°C ve %50 nem değerinde gece gündüz periyodu uygulanarak sağlandı. Steril hava akımlı kabin içerisinde (Biosafety ClassII) sterilkürdan yardımı ile toplanan miselyum örneği petri içerisinde bulunan PDA besi ortamının merkezine yerleştirildi. İzolatlar 6 gün süre ile 25°C ve %50 nem değerinde gece gündüz periyodu koşulları altında iklimlendirme kabininde üretildi.

3.4. IRAP ANALİZİ

Çalışmada 47 izolatta retrotranspozonların oluşturduğu polimorfizm IRAP yöntemi ile analiz edildi. Bu amaçla retrotranspozonlar arası bölgeler izolatların gDNA’larından arpada retrotranspozon taraması için geliştirilen evrensel primerler kullanılarak çoğaltıldı (Kalender ve ark., 1999).

3.4.1. gDNA İzolasyonu

gDNA izolasyonu 6 günlük fungal kültürlerden, Asahahida ve ark. (1996)’nın geliştirdiği SDS temelli protokolün modifiye edilmesi ile gerçekleştirildi. İzolasyona 50 mg ağırlığındaki yaş miselyum örneğinin porselen havan içerisinde toz haline getirilmesiyle başlandı. Parçalama işlemine 500 µl TNES tamponu eklenerek devam edildi (Tablo 3.3). Homojen hale getirilen örnekler 1,5 ml’lik mikrotüplere aktarıldı ve

üzerine 350 µl 8M LiCl eklenerek birkaç kez karıştırıldı. Homojenat üzerine 10 µl RNazA (10 mg/ml) eklendi. Her 5 dakikada bir karıştırılmak suretiyle 37°C’de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası homojenat ile eşit hacimde kloroform:izoamilalkol (24:1) eklendi ve 13000 rpm’de 2 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Yeni bir mikrotüpe aktarılan üst sıvının üzerine eşit hacimde kloroform:izoamilalkol (24:1) eklenerek santrifüj işlemi tekrarlandı ve üst faz yeni bir mikrotüpe aktarıldı. Üst faza 1/10 hacim 3M NaOAc, 2 hacim soğuk etanol eklendi ve -70°C’de 30 dakika inkübasyon gerçekleştirildi.

Süre sonunda 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra üst sıvı uzaklaştırıldı ve örnekler kurumaya bırakıldı. gDNA pelleti 50 µl distile su içinde çözdürüldü.

Tablo 3.3: gDNA izolasyonunda kullanılan TNES tamponu.

Tampon	Bileşenler	Derişim
TNES(pH 7,5)	Tris bazı	50mM
	NaCl	0,4 M
	EDTA (pH 8.0)	100 mM
	SDS	%0,5

3.4.2. gDNA Miktar ve Sıflık Tayini

İzole edilen gDNA’nın nitel ve nicel analizleri agaroz jel elektroforezi ve spektrofotometrik yöntemle yapıldı. DNA’nın nitel analizinde %1’lik agaroz jel kullanıldı. Bunun için 0,4 g agaroz, 40 ml tris asetat (TAE) tamponunda (Tablo 3.4) eritildi. Soğuduktan sonra final konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür (10 mg/ml) eklenen çözelti, önceden hazırlanan kasete dökülerek katılaşmaya bırakıldı. İzole edilen DNA örnekleri yükleme tamponu (Tablo 3.4) ile karıştırılarak polimerize olan jele uygulandı. gDNA’nın agaroz jelde nitel ve göreceli nicel analizinde boyutu bilinen 1 kb’lik standart DNA örnekleri de jele yüklendi. 70 V sabit güçte gerçekleştirilen elektroforez sonrası gDNA’lar jel görüntüleme cihazı kullanılarak görüntüledi ve fotoğraflandı (Avegene, X-lite 2000).

Miktar ve sıflık tayini için izole edilen gDNA’nın 260 ve 280 nm dalga boylarındaki UV ışığımsöğurma değeri (A260 ve A280) ölçüldü. Çift iplikli DNA molekülü için optik densite (OD) değeri 50 µg/ml’ye karşılık geldiği için DNA miktarı; “DNA(µg/ml) = A260 x sulandırım oranı x 50” formülüne göre hesaplandı. Sıflık tayini ise

“A260/A280” oranı kullanılarak gerçekleştirildi. Maniatis ve ark. (1982)’na göre bu oran 1,8-2,0 değer aralığında olduğunda DNA moleküllerinin saf olduğu kabul edilir.

Tablo 3.4: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar.

Tampon	Bileşenler	Derişim
Tris asetat (TAE) tamponu	Tris bazı	2 M
	Glisyal asetik asit	% 0,571
	EDTA (pH 8.0)	0,05 M
Yükleme tamponu (6X)	Tris-HCl (pH 7.6)	10mM
	Bromofenol mavisi	% 0,03
	Xylene siyanol FF	% 0,03
	Gliserol	% 60
	EDTA	60 mM

3.4.3. Biyoinformatik Analiz ve Primer Seçimi

F. graminearum genomunda retrotranspozonlara ait dizilerin varlığı veri bankalarında kayıt altına alınmış olan kontiglerde biyoinformatik araçlar yardımı ile tarandı. Bu amaçla arpa genomuna ait retrotranspozon dizi bilgileri NCBI (ing., National Center of Biotechnology Information) veri bankasında¹ “*Hordeum vulgare* retroelement” anahtar kelimeleri ile “nukleotid” sekmesinde aratıldı. Arpada tanımlanmış retrotranspozonlara ait dizilimler arasından Z17327.1 aksesyon numaralı “*H. vulgare* DNA for *BARE-1 copia*-like retroelement” dizilimi seçildi. 13,271 bç boyutundaki dizilimin *F. graminearum*’un PH-1 referans genomu ile benzerliği çevrim içi hizmet veren CLUSTALW² programı kullanılarak tarandı. Öncelikle Broad Enstitüsü web sitesinde “*Fusarium* Comparative Database”³ veritabanının genom indeksinden PH1 (FG3) referansının yanındaki “durum” sekmesi etkinleştirildi. Açılan sayfada referans genomun işaretli olduğu genom penceresinin yanındaki kromozom penceresinden “kromozom 1” seçildi. Ardından kromozom penceresinin yanındaki süperkontig penceresinden “süperkontig 1” etkinleştirildi. Bu süperkontig için yanında bulunan “kontig 1” seçildikten sonra DNA dizi bilgisi, dizi görüntüleme düğmesine basılarak aşağıdaki pencereden FASTA formatında kopyalandı. Bu işlem dört kromozom, tüm süperkontig ve kontigler için tekrarlandı. Haritalanmamış süperkontigler çalışmaya dahil edilmedi. Çevrimiçi CLUSTALW programının ana sayfasında çıktı biçimi olarak “CLUSTAL” sekmesi etkinleştirildi. İkili hizalama seçeneği olarak da “hızlı/yaklaşık”

¹www.ncbi.com

²http://www.genome.jp/tools/clustalw/

³https://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/MultiHome.html

[Ziyaret Tarihi: 15.09.2015]

[Ziyaret Tarihi: 15.09.2015]

[Ziyaret Tarihi: 15.09.2015]

algoritması seçildi. Retroelemente ve *F. graminearum* kontiğine ait FASTA formatında kopyalanmış dizilim bilgileri satır atlanarak pencereye yapıştırıldıktan sonra “çoklu hizalama” uygulaması etkinleştirildi (Tamura ve ark., 2013). Açılan pencerede görüntülenen ikili hizalama verileri kaydedildi. Homolojinin yüksek olduğu bölgeler *F. graminearum* genomundaki arpa retrotranspozonları ile ilişkili alanlar olarak değerlendirildi.

Çalışmada kullanılacak primer çiftleri, arpada retrotranspozon hareketliliğinin araştırılması için geliştirilmiş, LTR dizilerine göre tasarlanmış evrensel primerler arasından seçildi (Tablo 3.5). Bu amaçla evrensel primer dizilerinin *F. graminearum* genomunda bağlanacağı potansiyel bölgeler araştırıldı. NCBI web sitesindeki BLAST programının kullanıldığı taramada “nukleotid blast”⁴ sekmesi açıldı. Evrensel primerlere ait FASTA formatındaki nukleotid dizisi ilgili pencereye yapıştırıldı. Arama ayarlarından veri tabanı olarak “Reference genomic sequence (ref_seq genomic)”, organizma olarak da “*Fusarium graminearum* PH-1 (taxid:229533)” işaretlendi. Program seçeneklerinden “blastn” algoritması seçildikten sonra “BLAST” sekmesi etkinleştirildi. Açılan pencerede primerin referans genoma bağlandığı bölgelere ait dizilim bilgileri görüntüledi. Çok sayıdaki farklı boyutlu potansiyel primer bağlanma alanları FASTA formatında kaydedildi. Her bir alanda yer alan primer bağlanma bölgeleri işaretlendi. Evrensel primerde yüksek homoloji gösteren ortak kısımların bulunduğu nukleotid dizileri çekirdek bölgeyi oluşturacak şekilde konumlandırıldıktan sonra her bir alan için toplam 68 nukleotidlik bölge çoklu hizalama analizi için kaydedildi (her primer için işlem tekrarlandı). Bu bölgeler retrotranspozonların kontiglerde tarandığı biçimde CLUSTALW kullanılarak çoklu hizalandı. Hizalama seçeneği olarak “hızlı/yaklaşık” algoritması kullanıldı. Çoklu hizalama uygulaması ile elde edilen yeni sonuçlar kaydedildi. *F. graminearum* genomunda primer bağlanma bölgeleri, hizalama sonuçlarına göre evrensel primer molekülleri ile en yüksek homoloji gösteren alanlar olarak değerlendirildi.

Aynı zamanda hizalanan alanlarda *F. graminearum* genomuna özgün primer moleküllerinin de tasarımı hedeflendi. Bu amaçla evrensel primerlerin bağlanma bölgelerini içeren 68 nukleotidlik alanlar kendi aralarında CLUSTALW ile analiz edildi.

⁴http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=b_lashome
[Ziyaret Tarihi: 15.09.2015]

Çakıştırılan dizilimlerde homolojinin yüksek olduğu bölgelerde potansiyel yeni primer bağlanma bölgeleri, *F. graminearum* genomunda retrotranspozon bölgelerinin araştırılmasında kullanılan metodoloji izlenerek tarandı.

Ayrıca retrotranspozonun mantar genomunda varlığı da araştırıldı. Bu amaçla daha önce programında arpa retrotranspozonu olan *BARE-1*'e ait nukleotid diziliminin CLUSTALW ile hizalandığı kontiglerde yüksek homoloji gösteren bölgeler kendi aralarında da çoklu hizalandı. *F. graminearum* genomunda *BARE-1*'e homoloji gösteren bölgenin PZR ile çoğaltılmasında kullanılacak özgün primer çifti tasarımı hedeflendi.

F. graminearum genomunda evrensel primerlerin saç tokası, aynı iplik ve farklı iplik dimerleri oluşturma olasılıkları çevrimiçi hizmet veren OlygoAnalyzer 3.1 programı ile test edildi. Bu amaçla evrensel primer dizileri 5'- 3' yönünde olacak şekilde ana sayfadaki ilgili pencereye yapıştırıldı. Her bir analiz için ekranın sağında bulunan sekmeler etkinleştirildi. Programda her bir oluşum için ΔG değer aralıklarının -6 ile 2 (kcal/mol) arasında olduğu kontrol edildi ve uygun değerlere sahip primerler Elips Sağlık Ürünleri LTD ŞTİ aracılığıyla hizmet alımı ile IDT firmasına sentezletildi.

Tablo 3. 5: Arpa genomunda transpozon hareketliliğinin belirlenmesi için geliştirilmiş *F. graminearum* genomunda homolojisi taranan evrensel IRAP primerleri.

Primer	Dizi 5'-3'	Literatür	T _m (°C)
Doğrudan p <i>BARE-1</i>	CTACATCAACCGCGTTTATT	Schulman ve ark. (2004)	50,7
Ters p <i>BARE-1</i>	GCCTCTAGGGCATAATTCCAAC	Schulman ve ark. (2004)	55,6
LTR6149	CTCGCTCGCCCACTACATCAACCGCGTTTATT	Kalendar ve ark. (1999)	65,9
LTR6150	CTGGTTCGGCCCATGTCTATGTATCCACACATGTA	Kalendar ve ark. (1999)	64,4
3'LTR	TGTTTCCCATGCGACGTTCCCAACA	Kalendar ve ark. (1999)	64,6

3.4.4. PZR Bileşenleri ve Koşulları

IRAP analizinde 47 izolatın gDNAları 25 ng final konsantrasyonda olacak şekilde distile su ile sulandırılarak kullanıldı. Bileşenler son derişimleri; 1 X PZR tamponu, 1,5 mM MgCl₂, 400 µM dNTP karışımı, 0,5 µM ileri ve geri primer, 1 U/µl "Iproof High Fidelity" DNA polimeraz olacak şekilde toplam 25µl içerisinde gDNA ile bir araya getirildi.

Mikrotüplerde PZR BIO-RAD, T-100 Thermal Cyler cihazında gerçekleştirildi. Bu amaçla 94 °C’de 5 dakika ön denatürasyon işleminin ardından çoğaltım; 94 °C’de 1 dakika, primer çiftlerine özgü bağlanma sıcaklıklarında 30 saniye ve 72 °C’de 3 dakika inkübasyonla toplam 30 döngüde gerçekleştirildi. Son uzama aşaması tüplerin 72 °C’de 15 dakika bekletilmesi ile sağlandı. Her bir primer çifti için PZR işlemi iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.4.5. Çoğaltım Ürünlerinin Analizi

Çoğaltım ürünleri %1,5 derişimine sahip agaroz jel kullanılarak elektroforezle analiz edildi. Agaroz jel elektroforezi alt başlık 3.4.2’de bildirilen şekilde gerçekleştirildi. Farklı olarak çoğaltım ürünlerinin karşılaştırılmasında boyutu bilinen 100 bç standart DNA örnekleri de jele yüklendi. Elektroforez 70 V sabit güç altında 1 saat 15 dakika süre ile gerçekleştirildi ve PZRürünleri jel görünüleme sistemi (Avegene) ile görüntülenerek fotoğraflandı.

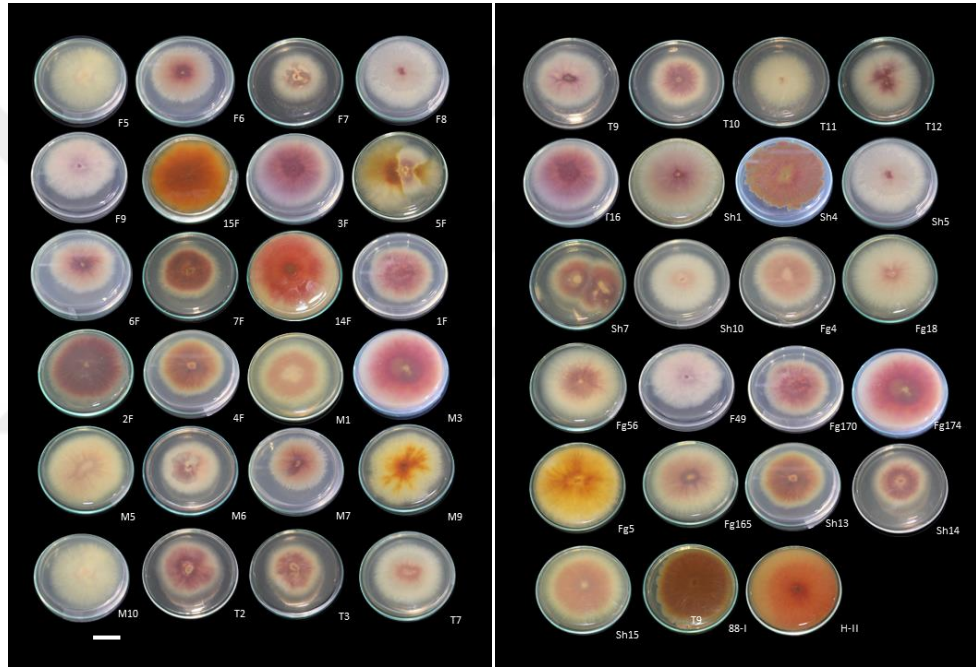
3.4.6. İstatistiksel Analiz

IRAP analizi ile gDNA’dan çoğaltılan fragmentlerden monomorfik ve polimorfik olanlar sayıldı ve her bir primer çifti için polimorfizm frekansı hesaplandı. Ayrıca her bir IRAP analizinden elde edilen çoğaltım ürünlerinde var olan markır için “1”, olmayan için ise “0” değeri atandı. İzolatlar arasındaki retroelement çeşitliliği ve/veya hareketliliği istatistiksel olarak MVSP (ing.,Multi Variate Statistical Package) 3.1 bilgisayar programı kullanılarak analiz edildi ve izolatlar arasındaki yakınlık Nei ve Li benzerlik katsayısına göre hesaplandı (Nei ve Li, 1979). İzolatlara ait dendrogram ise aritmetik ortalamalı ağırlıksız çift-grup yöntemine (ing.,unweighted pair-group method with arithmetical averages-UPGMA) göre oluşturuldu.

4. BULGULAR

4.1. PATOJEN ÜRETİMİ

Toplam 47 *F. graminearum* izolatı PDA besi ortamında üretildiğinde 6. günün sonunda sarıdan kahverengiye, pembeden mora ve tan rengine değişen renklere sahip miselyumların geliştiği gözlemlendi (Şekil4.1).



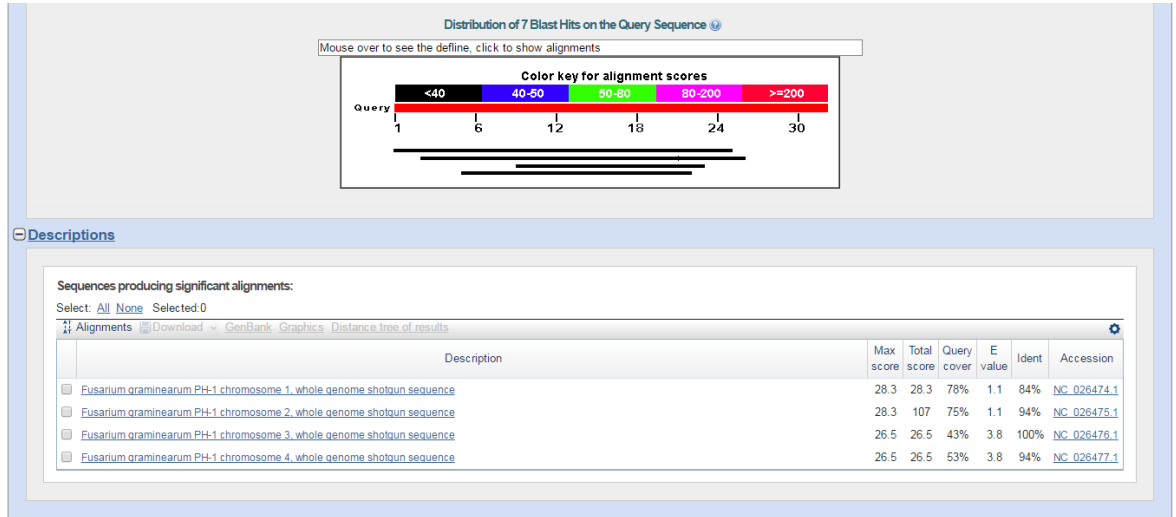
Şekil 4.1: 47 *F. graminearum* izolatına ait PDA besi ortamında gelişen farklı pigmentasyona sahip miselyum üreten 6 günlük *in vitro* kültürleri. Bar: 3 cm

4.2. gDNA ANALİZ SONUÇLARI

47 *F. graminearum* izolatına ait 25 mg ağırlığındaki miselyumlardan izole edilen gDNA'ları agaroz jel elektroforezi sonucunda tek bir bant halinde gözlemlendi. Spektrofotometrede 260 nm dalga boyundaki UV ışığını absorban değerleri 0,21-3,8 arasında ölçüldü. gDNA miktarları ise 108-1900 ng/μl değer aralığında hesaplanırken, saflık değerleri 1,7-1,9 olarak belirlendi.

4.3. PRİMER SEÇİMİ

Arpa retrotranspozonlarının LTR dizilerine göre geliştirilmiş olan evrensel beş primer *F. graminearum* genomu ile karşılaştırıldığında E değeri aralığının 0,9-3,8, maximum skor değeri aralığının 18,3-28,3 olduğu gözlemlendi. Primerler için yapılan dizi sorgusu sonucu uyum gösteren bölgelerin baz sayısı ekranın üst kısmında, E değerleri ve dizilerin lokasyon bilgileri ekranın alt kısmında görüntüldü (Şekil 4.2). En yüksek E değerinin 3,8 ile LTR6149 primerine, en düşük E değerinin (0,9) de 3'LTR primerine ait olduğu belirlendi. Şekil 4.2'de LTR6149'un sorgu ekranı görülmektedir. Bu ekranda en yüksek E değeri dördüncü kromozomdan elde edilmiştir. Aynı zamanda sorgu ekranı sıraları tarandığında LTR6149'un *F. graminearum* gDNA'sı ile en yüksek bağlanma potansiyeline sahip primer olduğu, karşılaştırılan her bölgede 32 nukleotidden 14 bazın tamamlayıcı olduğu da belirlendi.



Şekil 4.2: Sorgu ekranında LTR6149 primerinin *F. graminearum* genomu ile uyum sağlayan nukleotid sayıları ve hizalama sonuçları.

4.4. IRAP ANALİZİ BULGULARI VE İSTATİSTİKSEL ANALİZ VERİLERİ

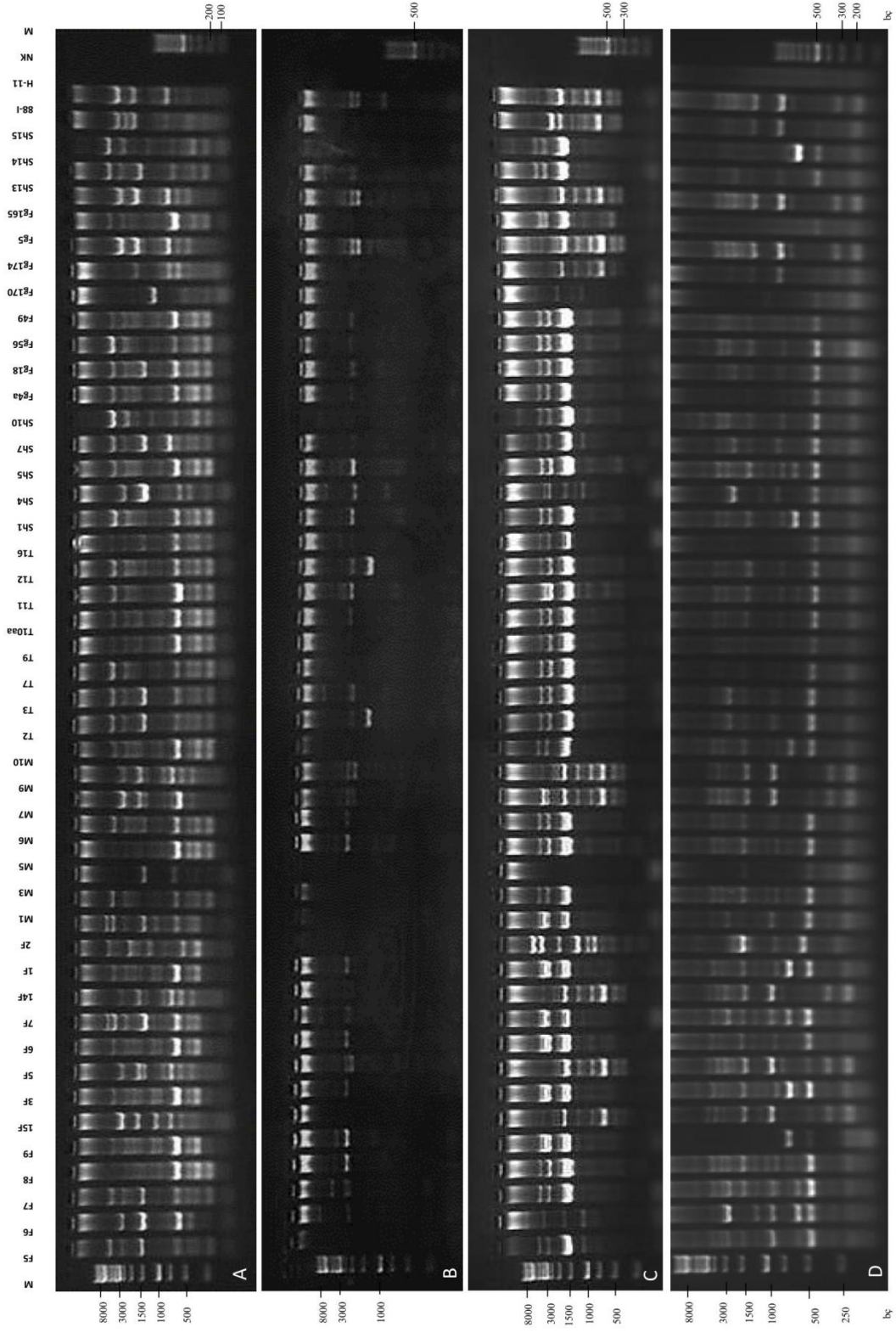
IRAP analizinde beş primerin dört farklı kombinasyonu (LTR6150/3'LTR, LTR6149/LTR6150, doğrudan pBARE-1/ters pBARE-1, LTR6149/3'LTR,) ile gDNA'nın çoğaltımı gerçekleştirildi (Şekil 4.3).

LTR 6150 ve 3'LTR primer çiftleri ile gerçekleştirilen PZR sonucunda jel elektroforezinde boyutları 100-5000 bp arasında değişen, 15 markır görüntülendi. Bu primer çifti ile tüm örnekler için monomorfik markır elde edilemezken, polimorfik bant sayısının yüksek olduğu gözlemlendi. 15F izolatu diğer izolatlarla benzer olmayan bir profile sahip iken, H-11, Sh13, Fg5, Sh10 ve Sh4'ün çok benzer profile sahip olduğu belirlendi. T2, T3 ve Sh14 izolatları da farklı bir profil ile kendi aralarında benzer bantlama örneğini paylaştı (Şekil 4.3A).

LTR 6150 ve LTR6149 primer çifti ile etkin bir PZR reaksiyonu gerçekleştirilemedi. Sayıları 1-6 arasında değişen çoğaltım ürünleri izolatların ilişkilendirilmesinde kullanılan istatistiksel analize dahil edilmedi (Şekil4.3B)

Doğrudan pBARE-1 ve ters pBARE-1 primerleri ile 250-5000 bp arasında değişen 17 farklı markır çoğaltıldı. Polimorfik markır sayısının bu primer çifti için de yüksek olduğu gözlemlendi. 2F izolatu diğer izolatlardan tamamen farklı bantlama örneği gösterirken, ortak markırları taşıyan M7 ve M9 izolatlarının diğer izolatlardan farklı profillere sahip olduğu ortaya kondu. 7 izolatın (F5, F7, F8, F9, M1, M5, M6) birbirleri ile oldukça benzer profile sahip olduğu, ancak diğer 37 izolattan farklı fragmentleri taşıdığı belirlendi (Şekil 4.3C).

LTR6149 ile 3'LTR primer çifti ile gerçekleştirilen PZR sonucunda ise boyutları 1000 bp ile 1kb arasında değişen toplam 11 farklı markır elde edildi. Bu markırlardan yalnızca birinin monomorfik olduğu gözlemlendi. 88-1, H-11, Fg174, Fg5, M7, M9 ve 5F izolatları aynı bantlama örneğine sahip profillerde gözlemlendi. Fg170 izolatının diğer izolatlarla benzerlik göstermeyen bir bantlama paternine sahip olduğu gözlemlendi. En çok polimorfik markır bu primer çifti ile çoğaltıldı (Şekil 4.3D).



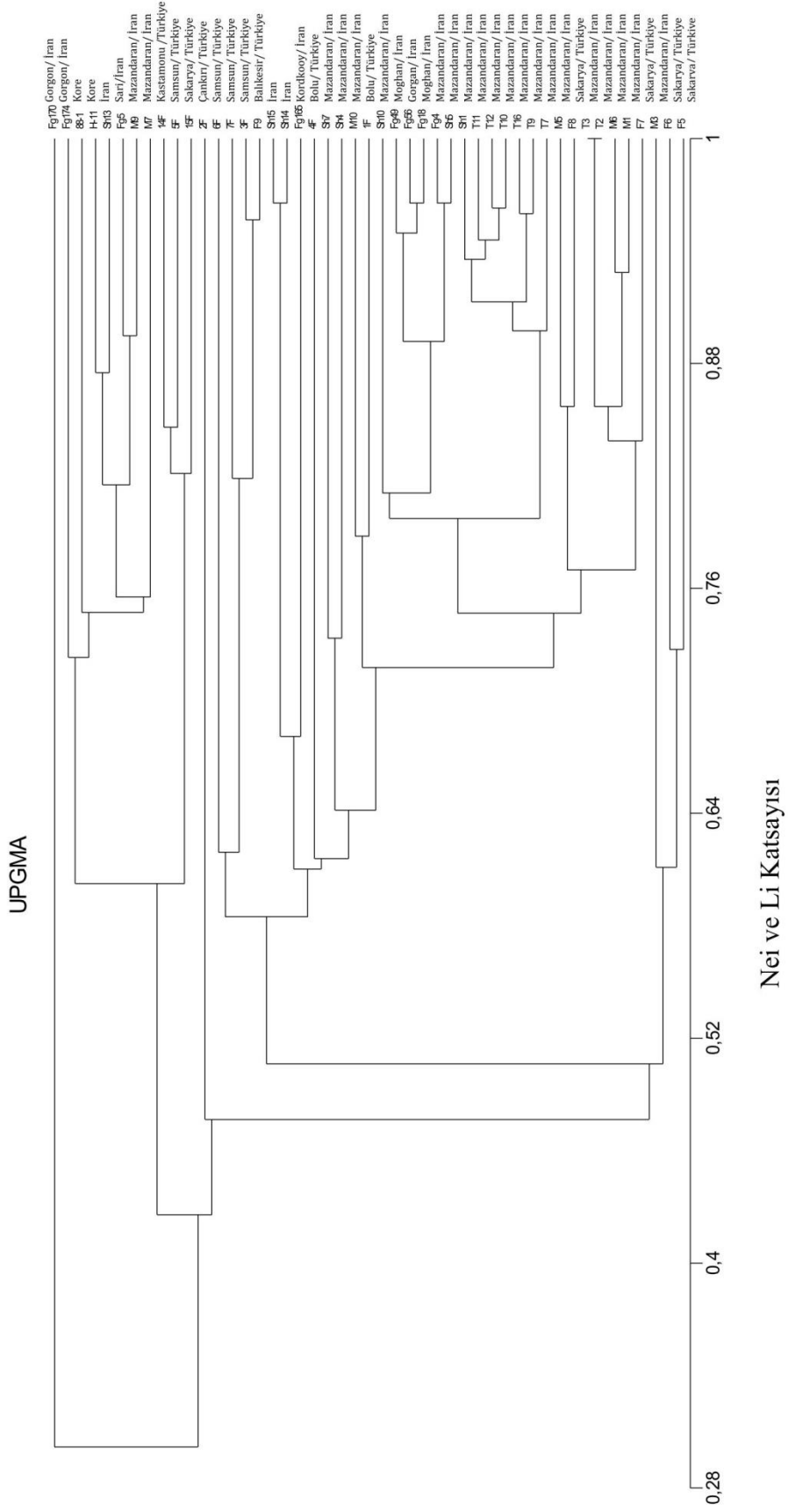
Şekil 4.1: Arpa genomuna özgün tasarlanmış LTR6150/3'LTR (A), LTR6149/LTR6150(B), doğrudan pBARE-1/ters pBARE-1(C), LTR6149/3'LTR(D) primer çiftleri ile 47 *F. graminearum* izolatının gDNA'sında gerçekleştirilen retrotranspozonlar arası bölge çoğaltım ürünleri agaroz jel elektroforez görüntüleri

Dört farklı kombinasyondaki primer çifti ile çoğaltılan toplam 43 farklı markır sayıldı. Bu markırlardan yalnızca biri monoformik olarak bütün izolatlarda paylaşıldı.

İstatistiksel analiz ile elde edilen benzerlik matrisi (Ek 1), T2 ve T3 izolatlarının identik olduğunu (%100 benzer izolatlar) gösterdi. En yüksek çeşitlilik (% 90,5) Fg4 ile Sh15 izolatu arasında bulundu. Fg170'in referans ırkları da içeren diğer 46 örneğe en uzak izolat olduğu gösterildi (benzerlik oranı= % 9,5-40). Fg18 ve Fg56 izolatları arasındaki benzerlik %96,6 olarak hesaplandı. Aynı benzerlik yüzdesinin Sh14 ile Sh15 izolatu ve Sh5 ile Fg4 arasında da olduğu görüldü.

Toplam 47 izolatu birbiri ile ilişkilendirildiği küme analizine göre oluşturulan, fenonların yer aldığı dendrogramda toplam 45 dallanma noktasının (nod) bulunduğu, alt fenon ve fenonların bu nodlar aracılığıyla birbirleri ile ilişkili olduğu Şekil 4.4' te görüldü. Fg170 izolatu dendrogramda birbiri ile ilişkili olan grup I ve grup II' nin dışında yer aldı. Her iki ana grup iki alt gruba ayrıldı. Grup I'e ait alt grup I'de iki referans ırkın da (88-1, H-11) dahil olduğu toplam yedi izolat (Fg174, Sh13, Fg5, M9 ve M7) sıralanırken, üç izolat (14F, 5F, 15F) alt grup II'yi oluşturdu. H-11/Sh13 ve Fg5/M9 çiftlerinin dal 23 aracılığıyla ilişkili olduğu M7 izolatu ile alt fenonda yer aldığı gösterildi. Bu alt fenonun dal 28'den 88-1, dal 29'dan Fg174 ile monofiletik ilişkili olduğu saptandı (İzolatlarda arasındaki benzerlik %'si için bakınız EK1, dallanma noktaları için bakınız EK2).

Grup II, iki alt gruba (alt grup I, alt grup II) ayrıldı. 2F izolatu tek başına alt grup I'i temsil etti. Alt grup II ise iki fenona dallandı. İzolatlar fenon I'de alt fenon I ve –II içersinde gruplandı. Fenon II, F5/F6 çifti ile dal 32'den monofiletik ilişkili M3 izolatından oluştu. Geriye kalan 32 izolat fenon I' de iki alt fenona ayrıldı. Alt fenon I'de 3F/F9 sırasıyla dal 7'den 7F, dal 22'den 6F ile monofiletik ilişki gösterdi. Alt fenon II'de Sh15/Sh14 çifti dal 4'ten Fg165 ile monofiletik ilişki göstererek alt fenon Ila'yı oluşturdu. Alf fenon Iib, monofiletik ve polifiletik ilişkili olan 24 izolatu yer aldığı fenonlar ile 4F izolatu tek başına bulunduğu iki gruba ayrıldı. 24 izolat arasında Sh7/Sh4, M10/1F, Fg18/Fg56, Fg4/Sh5, T10/T12, T16/T9, M5/F8, T3/T2, M6/M1 çiftleri birbirleri ve diğer altı izolatla monofiletik ve polifiletik olarak ilişkilendi (İzolatlarda arasındaki benzerlik %'si için bakınız EK1, dallanma noktaları için bakınız EK2).



Şekil 4.4: 47 *F. graminearum* izolatına ait Nei ve Li Benzerlik katsayısına göre oluşturulan dendrogram ve izolatların elde edildikleri bölgeler

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitkiler için geliştirilen retrotranspozon temelli markırlar, mantarlardan *Pyrenophora* türleri, *Alternaria alternata* ve *Phytophthora parasitica*'nın taksonomisinde ayırt edici belirteçler olarak kullanılmıştır (Taylor ve ark., 2004; Kaneko ve ark., 2000; Liou ve ark., 2002). Arabi ve Jawhar (2010) bitkilerde *Sikkula*, *Nikita* ve *BARE-1* elementleri için geliştirilen markırları ilk defa *Fusarium* türlerinde (8 *F. culmorum*, 4 *F. solani*, 9 *F. verticillioides* ve 3 *F. equiseti*) IRAP analizini kullanarak taramışlar, türler arası çeşitliliği ve filogenetik ilişkiyi bu yaklaşımla ortaya koymuşlardır. *Fusarium* türlerine ait izolatların gruplandırılması ve bu gruplar arasındaki genetik ilişkinin kurulmasında IRAP yöntemi etkin olarak kullanılmış, bu yaklaşımın uygun ve hızlı sonuç verebilen moleküler markır kaynağını sunduğu rapor edilmiştir.

Bu tez çalışmasında arpaya ait *BARE-1* elementinin LTR dizileri öncelikle *F. graminearum*'un veritabanında kayıtlı dört kromozomuna ait kontiglerinde biyoinformatik araçlarla taranmıştır. Homoloji gösteren potansiyel bölgelerin saptanmasının ardından *F. graminearum* genomunda retroelement ve/veya retroelementle ilişkili dizilerin varlığı IRAP yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Çoğaltım ürünlerinin temsil ettiği parmakizi profilleri izolatların birbirleri ile ilişkilendirilmesinde kullanılmıştır. İki referans ırkın da aralarında bulunduğu 47 izolat arasındaki benzerlik oranları da istatistiksel olarak değerlendirilerek izolatlar fenonlar halinde gruplandırılmıştır. Biyoinformatik araçlarla kontiglerde retrotranspozonla ilişkili olduğu belirlenen bu bölgelerin varlığı laboratuvar koşullarında deneysel olarak da gösterilmiştir.

Retrotranspozonlar her iki sınır bölgesinde 3' LTR ve 5' LTR olarak isimlendirilen uzun uç tekrar dizilerini taşımaktadır. Retroelement hareket ederken genoma farklı oryantasyonda giriş yapabildiğinden LTR dizilerinin birbirlerine göre pozisyonları da farklılık göstermektedir. Bu temelden hareketle çalışmada *BARE-1*'in LTR dizilerine göre tasarlanmış beş farklı primer moleküllü retrotranspozonun *Fusarium* genomundaki varlığının IRAP analizi ile taranmasında kullanılmıştır. Ek olarak, *F. graminearum*

genomuna özgün yeni oligonukleotid primerler tasarlanmış, ancak yeni primer dizimleri evrensel olanlarla büyük oranda benzerlik taşıdığından sentezletilmemiştir. Çalışmada seçilen evrensel oligonukleotid primerlerin dört farklı kombinasyonu denenmiştir. Elde edilen çoğaltım ürünleri LTR dizilerinin *Fusarium* genomunda hem baş-kuyruk hem de baş-baş oryantasyonunda konumlandığını göstermiştir. Bu çalışma ile LTR dizilerinin *F. graminearum* genomundaki oryantasyonları ve konumları hakkında kullanışlı veriler elde edilerek literatüre katkı sağlamıştır. Ek olarak, tam boydaki *BARE-1* elementinin *F. graminearum* genomundaki varlığı da PZR ile araştırılmıştır. Bu retroelementin tam boy kopyalarının *F. graminearum* genomunda bulunmadığı saptanmıştır (Bulgu teze dahil edilmemiştir). Bulgular fitopatojenin genomunda *BARE-1* elementinin değil, retroelemente ait LTR dizi kalıntılarının taşındığını düşündürmektedir.

Arpa genomunun yaklaşık % 5,6'sını *BARE-1* elementinin kapladığı bilinmektedir (Oliver ve Greene, 2009). Eğer bu element tüm genoma dağılmış olsaydı her 46 kb arasında bu elemente rastlanması gerekirdi. Ancak gerçekleştirilen IRAP analizleri ile boyutları farklı olan (100 bp-10 kb) çok sayıda çoğaltım ürünleri elde edilmiştir. Bu bulgular retrotranspozonların genomda homojen olarak dağılmadığını, tekrar denizleri içinde birlikte kümelenme eğiliminde olup bu kümelerin genoma yayıldıklarını göstermiştir (Kumar ve Hirochika, 2001; Kalendar ve Schulman, 2007). Bu tez çalışmasında da PZR ile boyutları 250-5000 bp arasında değişen çok sayıda markır çoğaltılarak LTR dizilerinin *F. graminearum* genomunda da benzer şekilde homojen olmayan bir biçimde genoma yayıldığı ortaya konmuştur.

IRAP analizi ile çoğaltılan bu markırlar izolatlar arası benzerliği değerlendirmede uygun veriler sağlamıştır. İran'ın Mazandaran bölgesinden izole edilen T2 ve T3 izolatlarının identik bantlama profillerine (benzerlik oranı= %100) sahip olduğu belirlenmiş, retrotranspozonun genomda yerleştiği pozisyonlar arasındaki bölgelerin benzer olduğu ve/veya benzer hareket profiline sahip oldukları gösterilmiştir. Altı *F. graminearum* izolatında benzerlik oranı %96,6 olarak hesaplanmıştır. Ancak agaroz jel elektroforezi analizi bu izolatların farklı bantlama profillerine sahip olduklarını göstermiştir. Bu bulgu IRAP analizinin retrotranspozonun genomdaki pozisyonu ile ilişkili benzerliği belirlemede etkili olduğunu ve hareketleri sırasında yerleştikleri bölgeler arasındaki mesafenin benzerliğini yansıttığını göstermesi bakımından büyük

önem taşımaktadır. Küme analizi ile elde edilen dendrogramda izolatlar iki büyük gruba ve bu gruplar da kendi içlerinde monofiletik ve polifiletik fenonlara ayrılmışlardır. Benzerlik yüzdeleri aynı olan izolatlardan Sh14 ve Sh15'in alt fenonIIa'da yer aldığı, Fg18 ve Fg56 ile Sh5 ve Fg4'ün ise alt fenonIIb'nin alt kümesinde monofiletik dallanma ile ilişkili oldukları belirlenmiştir. Benzerlik matris değerleri aynı olan bu izolatların bantlama profillerinin farklı olduğu, IRAP yönteminin bu izolatları birbirlerinden etkin olarak ayırabildiği gösterilmiştir. Bu bulgu; IRAP yönteminin genomik benzerliği değil, retrotranspozonun genomdaki hareketi sırasında retrotranspozonun genomda yerleştiği pozisyonlar arasındaki bölgelerin benzerliğini belirlemede etkili olduğunu doğrulamaktadır.

Retrotranspozonların yerleştikleri bölgeler arası uzunluk polimorfizmi, bir başka deyişle retrotranspozon hareketliliğine göre benzerlik oranı en düşük (% 9,5) izolatlar Fg170, 4F ve Sh13'tür. Benzerlik matris değerleri aynı olan bu izolatların küme analizinde birbirinden uzak gruplarda yer aldığı EK.1'de görülmektedir. Referans ırklar dahil bütün izolatlarla en düşük benzerliğe sahip Fg170 izolatı küme analizinde ayrılan iki grubun dışında tek başına yer almaktadır. Bunun nedeninin Fg170'in genomunda yer alan retrotranspozonla ilişkili bölgeler arasındaki mesafenin PZR çoğaltımı için etkin olan değer üstünde olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

IRAP ile daha fazla markırın çoğaltıldığı izolatların daha fazla retrotranspozon insersiyon bölgesini taşıdığı, bu nedenle de bu genomlarda retrotranspozonun daha aktif olduğu Kalendar ve ark. (1999) tarafından rapor edilmiştir. Bu çalışmada aralarındaki benzerlik oranı %80 olarak hesaplanan 88-1 ve H-11 referans ırklarının küme analizinde aynı alt grup içinde yer aldığı belirlenmiştir. H-11'in alt grup içerisinde % 87,5 oranında benzediği Sh13 ile birlikte bulunduğu görülmektedir. Bu bulgu H-11 genomunda retrotranspozon hareketinin evrimsel süreçte 88-1'e göre daha aktif olduğunu düşündürmüştür. Retrotranspozon aktivitesi genomda inserisyon bölgelerindeki polimorfizmle sonuçlandığından, IRAP yöntemi ile ortaya konan varyasyon tek nükleotid polimorfizmlerini değil retrotranspozon hareketine bağlı inserisyon polimorfizmlerini yansıtmaktadır (Kalendar ve ark.,1999).

Retrotranspozon hareketleri sebep oldukları genomik varyasyonların yanı sıra epigenetik etkileşimlerle organizma genomları üzerinde etkilidir. Arpa doku

kültürlerinde *BARE-1*, *BAGGY2*, *Nikita* ve *Sukkula* elementlerinin hareketleri ile somoklonal varyasyonların ilişkilendirilmesine yönelik çalışmalarda IRAP yöntemi kullanılarak, retrotranspozon hareketlerinin genetik ve epigenetik mekanizmalar üzerine etkileri gösterilmiştir (Yılmaz ve Gözükırmızı, 2013; Yılmaz ve ark., 2014). Bu çalışmalar ile retrotranspozon hareketlerinin aynı türe ait bireyler arasında farklılık gösterirken, bireye ait doku ve gelişim evrelerinde de farklılık gösterebileceği kanıtlanmış olup kallus oluşumu ve rejenerasyon gibi önemli gelişimsel süreçlerde retrotranspozon hareketlerinin önemi vurgulanmıştır (Gözükırmızı, 2014).

IRAP analizi sonuçları, aynı izolatlarla gerçekleştirilen diğer moleküler markır çalışmalarına ait bulgular ile de karşılaştırılmıştır. Tüm bu çalışmalarda birbirleri ile yüksek benzerlik gösteren izolatların aynı kümelerde yer aldığı, varyasyonu yüksek izolatların ise birbirlerinden uzak gruplandıkları belirlenmiştir. Örneğin *F. graminearum*'da mitokondriyal DNA varyasyonunun araştırıldığı yüksek lisans tez çalışmasında Gazdağlı (2015), 6F ile M9 izolatlarının *-atp9* gen dizilimine göre-filogenetik ağaçta farklı iç dallarda yer aldığını göstermiştir. Benzer şekilde bu iki izolat IRAP analizinde de birbirinden uzak alt kümelerde konumlanmıştır (varyasyon oranı = %80). Ek.1'de verilen benzerlik matrisi incelendiğinde Fg170 ile 4F arasındaki varyasyonun yüksek olduğu görülmektedir (%90,5). CAPS markır analizine dayalı yüksek lisans tez çalışmasında da bu iki izolatın farklı restriksiyon profillerini verdiği Kaya (2014) tarafından gösterilmiştir. İstanbul Üniversitesi Bitki Patolojisi Laboratuvarında yürütülen, aynı izolatların kullanıldığı diğer çalışmalarda izolatların coğrafik bölgelerinden bağımsız olarak kümelendiği bildirilmiştir (Yörük ve ark., 2014; Kaya, 2014; Gazdağlı, 2015; Albayrak ve ark., 2016). Yurdumuzun ve İran'ın farklı bölgelerindeki hastalıklı bitkilerden tek spor analizi ile üretilen 45 izolatın iki referans ırkla birlikte analiz edildiği bu çalışmada da izolatlar dendrogramda beklendiği gibi coğrafik bölgelerden bağımsız olarak gruplanmışlardır. Ancak izolatların kümeler içerisinde rastgele dağılmadığı, beş izolat dışında yurdumuz orjinli diğer tüm izolatların birbirleriyle ilişkili kümelerde yer aldığı, bu kümelerin de İran izolatları arasına dağıldığı gösterilmiştir. Bu çalışma ile IRAP yönteminin izolatları gruplamada kullanışlı, uygun ve hızlı bir yöntem olduğunu destekler bulgular elde edilmiştir. Benzer şekilde Arabi ve Jawhar (2010) da IRAP yönteminin *Fusarium* izolatlarını gruplamada güçlü moleküler markır kaynağını sunduğunu, ancak bu yöntemle gruplandırılan farklı

Fusarium türlerine ait izolatların, orjinleri veya koloni rengi gibi morfolojik özellikleri ile ilişkilendirilemeyeceğini savunmuşlardır.

Retrotranspozonlar evrimsel süreçte genomda herhangi bir faktörden bağımsız olarak hareket ederler. Retrotranspozon temelli moleküler markır yöntemleri retrotranspozonların hareketinin belirlenmesinde etkili olmakta ve ayrıca bu hareket sonucu yerleştikleri konuma göre çoğaltılan markırlar bireylerin ilişkilendirilmesinde kullanılabilir. Ancak IRAP yöntemi; çoğaltılan markırın izolatların morfolojik karakterleri ve patojeniteleri gibi özellikleri ya da fitopatojenin etkili olduğu coğrafik bölgesi ile ilişkilendirilmesinde sınırlı kalmaktadır. Sonuç olarak bu yöntemin markır aracılı seleksiyonda etkinliğinin düşük olacağı görülmektedir.

IRAP, uygulaması kolay bir yöntem olduğu gibi hızlı sonuç alınmasını da sağlamaktadır. Bu nedenle IRAP analizi farklı bitkilerin genomlarında bulunan retrotranspozonların analizinde diğer retrotranspozon temelli yöntemler arasından daha çok tercih edilen olmuştur (Queen ve ark., 2004). Arabi ve Jawhar (2010) *Fusarium* türlerinde retrotranspozon analizinde de bu yaklaşımı kullanmışlardır. Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında *F. graminearum* genomu için daha fazla dizi bilgisi (mikrosatellit, retrotranspozona komşu özgün bölgeler vb.) gerektirmeyen sadece retrotranspozona özgün LTR dizilim bilgilerinin yeterli olduğu IRAP analizi tercih edilmiştir. BARE-1 elementinin LTR dizilerine özgün oligonukleotidleri tasarlayan Kalendar ve ark. (1999), geliştirdiği moleküler markır yönteminde (IRAP) bu primerleri kullanarak arpa genomunu retrotranspozon temelli olarak haritalamıştır. Teo ve ark. (2005) ise bu oligonukleotid primerlerin 13 farklı bitki türünde retrotranspozonları belirlemede etkin olduğunu göstermişlerdir. Daha sonra bu primerlerin evrensel olarak kullanılabileceği Arabi ve Jawhar (2010) tarafından dört farklı *Fusarium* türünde kanıtlanmıştır.

Genom projesinden elde edilen veriler *F. graminearum* genomunda Tc1 süper ailesine ait iki DNA transpozon ailesinin ve bir tane de retrotranspozonun bulunduğu gösterilmiştir (Cuomo ve ark., 2007). Belirlenen DNA transpozon ailelerinin *F. oxysporum* transpozonlarından *Fot1* ve *Fot5* ile dizi benzerliğine sahip olduğu ancak farklı olarak *F. graminearum* genomunda inaktif oldukları belirlenmiştir. Retrotranspozonun ise *F. oxysporum*'da bulunan *skippy* elementine benzediği rapor

edilmiş, ancak tam boyda bir retrotranspozon dizilimi tanımlanamamıştır. Tez projesi kapsamında elde edilen bulgular tam boydaki *BARE-1* elementinin *F. graminearum* genomunda bulunmamasına karşın LTR dizilerinin genomdaki varlığını göstermiştir. Aynı zamanda genom projesi *F. graminearum*'da 20 bç ters tekrar dizileri ve komşu 5 bç aynı yönlü tekrarlı dizileri ile birlikte yer alan kısa tekrar elementlerinin genomda yüksek miktarda ve dağılmış olarak bulunduğunu göstermiştir. Cuomo ve ark., (2007) bu dizilimlerin retrotranspozonla ilişkili olabileceği öne sürülmüşlerdir. Ancak literatürde bu konu ile ilgili deneysel bir çalışmaya rastlanmamıştır. Gerçekleştirilen bu tez çalışmasından elde edilen bulgularla LTR dizileri ile homoloji gösteren bu tekrarlı elementlerin *BARE-1* elementinin uç sınır dizilerine ait olabileceği deneysel olarak desteklenmiştir.

Retrotranspozonlar hücre bölünmesi ile nesiller boyunca aktarılabildiği gibi tek hücreli organizmalar arasında da transfer edilebilirler. Mantar genomu hareketli olan retrotransponu (*BARE-1*) evrimsel düzeyde kazanmış olabilir. Ancak *F. graminearum* genomunda tam boydaki bir *BARE-1* elementinin bulunmaması evrimsel süreçte meydana gelen rekombinasyon mekanizmaları sonucu sadece bu retrotranspozona ait uç tekrar dizilerinin varlığını devam ettirebildiğini düşündürmüştür. *F. graminearum* genom projesinde de tam boyutlu bir retrotranspozonun tanımlanamamış olması, arpa genomundan retrotranspozonun bütün bir dizilimin değil, kalıntılarının bulunduğu hipotezimizi desteklemektedir. *F. graminearum*'da varlığı gösterilen bu diziler evrimsel süreçte farklı olarak bitki-patojen etkileşimi sırasında aktarılmış olma olasılığı da bulunmaktadır. Çok hücreli organizmalarda bir retrotranspozonun HT'si aracı diğer organizmalarla gerçekleşebildiği, HT'de etkin olan aracılardan daha çok patojenik, parazitik hatta simbiyotik ilişkili organizmalar olduğu Schaack ve ark. (2010) tarafından vurgulanmıştır. Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular bitki-patojen etkileşimi sırasında HT ile arpa genomundan *F. graminearum* genomuna aktarılmış olabileceği görüşünün, organizma genomlarından mantar genomuna aktarılan bütün bir retrotranspozon dizilimin rekombinasyon ile bozulmuş olabileceği görüşünden daha olası olduğunu düşündürmektedir.

Biyoinformatik olarak *F. graminearum* genomunda taranan *copia* benzeri arpa retrotranspozonu olan *BARE-1* elementine ait LTR dizilerinin *F. graminearum*

genomunda varlığının deneysel bulgularla desteklenmesi yüksek lisans tez çalışmasının amacına ulaştığını göstermektedir. Bu tez çalışması, *F. graminearum* genomunda ilk kez retrotranspozon taraması yapılması ve izolatların ilk kez retrotranspozon hareketlerine göre gruplandırılması bakımından yüksek özgün değere sahiptir. Aynı zamanda tez çalışması *F. graminearum* genomuna özgü yeni retrotranspozonlar tanımlanması için yapılacak çalışmalara öncülük etmesi bakımından da önemlidir.



KAYNAKLAR

- Aalami A., Safiyar S., Mandoulakani B. A., 2012, R-RAP: a retrotransposon-based DNA fingerprinting technique in plant, *Plant Omics*, 5, 359-364.
- Agarwal M., Shrivastava N., Padh H., 2008, Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences, *Plant Cell Reports*, 27, 617- 631.
- Albayrak G., Yörük E., Gazdağlı A. ve Sharifnabi B., 2016, Genetic Diversity Among *Fusariumgraminearum* and *F. culmorum* Isolates Based on ISSR Markers, *Arch Biol Sci.*, 68 (2), 333-343.
- Anaya N. ve Roncero M. I. G., 1995, *Skippy* a retrotransposon from the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*, *Molecular and General Genetics*, 249, 637-647.
- Arabi M. I. E., Jawhar M., 2010, Heterogeneity in *Fusarium* species as revealed by Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP) analysis, *Journal of Plant Pathology*, 92 (3) , 753-757.
- Asahida, T., Kobayashi, T., Saitoh, K., ve Nakayarma, I., 1996, Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing of urea. *Fisheries Science*, 62, 727-730.
- Besansky N.J.,1990, A retrotransposable element from the mosquito *Anopheles gambiae*, *Molecular and Cellular Biology*, 10, 863–871.
- Booth, C., 1977, *Fusarium* laboratory guide to the identification of the major species, *Common wealth Mycological Institute*, Ferry Lane, Kew Surrey, pp.58.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W., 1980, Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *American Journal of Human Genetics*, 32, 314–333.
- Cooke, B. M., Jones, D. G., Kaye, B., 2006, The epidemiology of plant diseases, *Springer*, Hollanda, 9781402045806.
- Craig, N.L., Craigie, R., Gellert, M., Lambowitz, A.M., 2002, *Mobile DNA II*, Washington, DC: *American Society for Microbioly Press*.
- Cuomo, C.A., Guldener, U., XU, J.R., Trail, F., Turgeon, B.G., Pietro, A.D., Walton, J.D., MA, L.J., Baker, S.E., Rep, M., Adam, G., Antoniw, J., Baldwin, T., Calvo, S., Chang, Y.L., Decaprio, D., Gale, L.R., Gnerre, S., Goswami, R.S., Kosack, K.H., Harris, L.J., Hilbrun, K., Kennell, J.C., Kroken, S., Magnuson, J.K., Mannhaupt, G., Mauceli, E., Mewes, H.W., Mitterbauer, R., Muehlbauer, G., munsterkotter, M., Nelson, D., O., Donnell, K., Quellet, T., QI, W., Quesneville, H., Roncero, M.I.G., Seong, K.Y., Tetko, I.V., Urban, M., Waalwijk, C., Ward,

- T.J., Yao, J., Birren, B.W., Kistler, H.C., 2007, The *Fusariumgraminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization, *Science*, 317, 1400-140.
- Daboussi M. J. ve Langin T., 1994, Transposable elements in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*, *Genetica*, 93, 49-59.
- Daboussi M. J., 1996, Fungal transposable elements: generators of diversity and genetic tools. *Journal of Genetics*, 75, 325-329.
- Daboussi M. J., Langin T. ve Brygoo Y., 1992, *Fot1* a new family of fungal transposable elements, *Molecular and General Genetics*, 232, 12-16.
- Daboussi M. J., Langin T., 1997, Evidence for horizontal transmission of the *Fot1* element between *Fusarium* species and discovery of a RIP-like process. In *Abstracts of the Nineteenth Fungal Genetic Conference*, Asilomar.
- de Setta N., Van Sluys M. A., Capi P. ve Carareto C. M. A., 2009, Multiple invasions of *Gypsy* and *Micropia* retroelements in genus *Zaprionus* and melanogaster subgroup of the genus *Drosophila*, *BMC Evol. Biol.*, 9, 279.
- Du X.Y., Hu Q.N., Zhang Q.L, Wang Y.B. ve Luo Z.R., 2013, Transferability of retrotransposon primers, *Genetics and Molecular Research*, 12 (2), 1781-1795.
- Dufresne M., Waalwijk C., Zhang W., Kema G. 2008, Transposon-tagging identifies novel pathogenicity genes in *Fusariumgraminearum*, *Fungal Genetics and Biology*, 45, 1552–1561.
- Feschotte, C., Jiang, N. ve Wessler, S.R., 2002, Plant transposable elements: Where genetic meets genomics, *Nature*, 3, 329-341.
- Finnegan, D. J., 1989, Eukaryotic transposable elements and genome evolution, *Trends Genet.* 5, 103–107.
- Flavell A. J., 1992, *Ty1-copia* group retrotransposons and evolution of retroelements in eukaryotes. *Genetica*, 86, 203-214.
- Frankel, A. D. ve Young, J. A., 1998, HIV-1: fifteen proteins and an RNA, *Annual Review of Biochemistry*, 67, 1–25.
- Gao X., Havecker E.R., Baranov P.V., Atkins J.F., Voytas D.F., 2003, Translational recoding signals between *gag* and *pol* in diverse LTR retrotransposons, *RNA*, 9, 1422-1430.
- Gazdağlı A., 2015, *Fusariumgraminearum* izolatlarının mitokondriyal DNA varyasyon analizi, Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Gerlach W., Nirenberg H., 1982, *The Genus Fusarium*, A Pictorial Atlas, *Kommissionsverlag Paul Parey*, Berlin-Hamburg pp: 406.

- Goff S. A., Ricke D., Lan T. H., Presting G., Wang R., Dunn M., Glazebrook J., Sessions A., Oeller P., Varma H., 2002, A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica)., *Science*, 296, 92–100.
- Goswami, R., S., Kistler, C., 2004, Heading for disaster: *Fusarium graminearum* in cereal crops, *Molecular Plant Pathology*, 5 (6), 515-525.
- Gozükırmızı N., Retrotransposon based markers and their applications in barley (*Hordeum Vulgare* L.Cvs.) tissue culture, 2014, The 5th International Symposium on Sustainable Development.
- Han J. S., 2010, Non-long terminal repeat (non-LTR) retrotransposons: mechanisms, recent developments, and unanswered questions. *Mobile DNA*, 1, 15.
- Hartl, D.L., 1997, Modern thoughts on an ancient mariner: function, evolution, regulation. *Annual Review of Genetics*, 31, 337–358.
- Havecker E.R., Gao X. ve Voytas D. F., 2004, The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biology*, 5, 25.
- Kalendar R. ve Schulman A. H., 2007, IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting, *Nature Protocols*, 1 (5), 2478-2484.
- Kalendar R., Antonius K., Smykal P., Schulman A.H., 2010, iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theor Appl Genet*, 121, 1419–1430.
- Kalendar R., Flavell A.J. , Ellis T. H. N., Sjakste T., Moisy C ve Schulman A. H., 2011, Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers, *Heredity*, 106, 520-530.
- Kalendar R., Grob T., Regina M., Suoniemi A., Schulman A., 1999, IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques, *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 704-711.
- Kaneko I., Tanaka A., Tsuge T., 2000, REAL, an LTR retrotransposon from the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*, *Molecular and General Genetics*, 263, 625-634.
- Kapitonov V.V. ve Jurka J., 2001, Rolling-circle transposons in eukaryotes, *Proceedings of National Academy of Science USA*; 98, 8714–8719.
- Kaya F., 2014, *Fusariumgraminearum* İzolatlarının CAPS Markırlarıyla Genotiplendirmesi, Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kazazian H. H., 2004, Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution., *Science*, 303, 1626-1632.

- Kempken F. ve Kück U. 1998, Transposons in filamentous fungi—facts and perspectives. *BioEssays*, 20, 652–659.
- Kim H. G., Meinhart L. W., Benny U. Ve Kistler H. C., 1995, *NrsI*, a repetitive element linked to pisatin demethylase genes on an dispensable chromosome *Netrica haematococca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 4, 524-531.
- Kinsey J. A. ve Helber J., 1989, Isolation of transposable element from *Neurospora crassa*, , *Proceedings of National Academy of Science USA*, 86, 1929-1933.
- Konieczny A., Ausubel F.M., 1993, Procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers, *The Plant Journal*, 4, 403–410.
- Kumar A. ve Hirochika H., 2001, Applications of retrotransposons as genetic tools in plant biology, *Trends in Plant Science*, 6 (3), 127- 134.
- Langin T., Capy P. Ve Daboussi M. J., 1995, the transposable element *impala*, a fungal member of the *Tc1-mariner superfamily*. *Molecular and General Genetics*, 246, 19-28.
- Lee, J., Chang, I., Y., Kim, H., Yun, S., H., Leslie, J., F., Lee1, Y., W., 2009, Genetic Diversity and Fitness of *Fusarium graminearum* Populations from Rice in Korea, *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (10), 3289–3295.
- Liou R.F., Lee J.T., Lee H.C., Ann P.J., 2002, Analysis of *Phytophthora parasitica* by retrotransposon-derived DNA fingerprinting., *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 43, 21-29.
- Loodish H., Berk A., Kaiser C. A., Krieger M., Bretscheger A., Ploegh H., Amon A., 2003, *Molecular Cell Biology: Mobile DNA*, Freeman, W. H. & Company, 978-0716743668, 5th Edition.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1982, *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold spring harbor laboratory press, NY.
- McClintock, B., 1950, The origin and behavior of mutable loci in maize, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 36 (6), 344-355.
- McHale M. T., Roberts I. N., Noble S. M., Beaumont C., Whitehead M. P., Seth D. Ve Oliver R. P., 1992, *CfT-1*: an LTR-retrotransposon in *Cladosporium fulvum*, a fungal pathogen of tomato. *Molecular and General Genetics*, 233, 337-347.
- Narayanasamy P., 2008, *Molecular biology in plant pathogenesis and disease management*, Springer, Coimbatore-India, 978-1-4020-8242-9

- Nei, M., Li, W.H., 1979, Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 5269-5273.
- Oliver, K.R. ve Greene, W.K., 2009, Transposable elements: powerful facilitators of evolution, *BioEssays*, 31, 703–714.
- Pasquali M., Dematheis F., Gullino M.L., Garibaldi A., 2007, Identification of *race 1* of *Fusarium oxysporum* F. sp. Lactucae on lettuce by Inter-Retrotransposon Sequence-Characterized Amplified Region Technique. *Phytopathology*, 97, 987-996.
- Pritham E. J., Putliwala T., Feschotte C., 2007, *Mavericks*, a novel class of giant transposable elements widespread in eukaryotes and related to DNA viruses, *Gene*, 390, 3–17.
- Queen R. A., Gribbon B. M., James C., Jack P., Flavell A. J., 2004, Retrotransposon-based molecular markers for linkage and genetic diversity analysis in wheat, *Molecular Genetics and Genomics*, 271: 91–97.
- Roberston, H. M., 2002, Evolution of DNA transposons in eukaryotes. In *Mobile DNA II*, American Society for Microbiology (Craig, N.L. et al., eds), pp. 1093–1110.
- Sabot, F. ve Schulman, A. H., 2006, Parasitism and the retrotransposon life cycle in plants: A hitchhiker's guide to the genome, *Heredity*, 97, 381-388.
- Sandmeyer S.B., Aye M., Menees T., 2002, *Ty3*, a position-specific, *gypsy* like element in *Saccharomyces cerevisiae*., In *Mobile DNA II*, American Society for Microbiology Edited by Craig NL, Craigie R, Gellert M, Lambowitz AL. Washington, DC: 663-683.
- SanMiguel P., Tikhonov A., Jin Y. K., Motchoulskaia N., Zakharov D., Melake-Berhan A., Springer S. P., Edwards K. J., Lee M., Avramova, Z., Bennetzen J. L., 1996, Nested Retrotransposons in the Intergenic Regions of the Maize Genome, *Science* 274, 765.
- Schaack S., Gilbert C. ve Feschotte C., 2010, Promiscuous DNA: horizontal transfer of transposable elements and why it matters for eukaryotic evolution, *Trends in Ecology and Evolution*, 25, 9.
- Schulman A. H., Flavell A. J. ve Ellis N. T. H., 2004, The Application of LTR Retrotransposons as Molecular Markers in Plants, *Methods in Molecular Biology*, vol. 260: *Mobile Genetic Elements*, Edited by: W. J. Miller and P. Capy, Humana Press, Totowa, NJ, 145-173.
- Seelamgari, A., 2004, Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication, *Frontiers in Bioscience*, 9, 2388–2413.
- Suck G. ve Traut W., 2000, TROMB, a new retrotransposon of the *gypsy-Ty3* group from the fly *Megaselia scalaris*, *Gene*, 255: 51–57.

- Taga, M., Waalwijk, C., Flier, W. G. ve Kema, G. H. J., 2003, Cytological karyotyping of somatic chromosomes from *Phytophthora infestans*, *Mycosphaerellagramminicola* and *Fusarium* spp. *Fungal Genetics and Biology Newsletter*, 468.
- Taylor E. J. A., Konstantinova P., Leigh F., Bates J. A., Lee D., 2004, Gypsy-like retrotransposons in *Pyrenophora* species: an abundant and informative class of molecular markers. *Genome*, 47, 519-525.
- Teo C. H., Tan S. H., Ho C. L., Faridah Q. Z., 2005, Genome constitution and classification using retrotransposon-based markers in the orphan crop banana, *Journal of Plant Biology*, 48, 96-105.
- The Arabidopsis Genome Initiative, 2000, Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*, *Nature*, 408, 796–815.
- Torress A. M., Weeden N. F., Martin A., 1993, Linkage among isozyme, RFLP, and RAPD markers, *Plant Physiology*, 101, 394–452.
- Trail, F., 2009, For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era. *Plant Physiology*, 149, 103–110.
- Trail F., Xu H., Loranger R., Gadoury D., 2002, Physiological and environmental aspects of ascospore discharge in *Gibberella zeae*. *Mycologia*, 94: 181–189
- Voytas D.F., Boeke J.D., 2002, Ty1 and Ty5 of *Saccharomyces cerevisiae*, In *Mobile DNA II*, Edited by Craig NL, Craigie R, Gellert M, Lambowitz AL. Washington, DC: *American Society for Microbiology Press*, 631-662.
- Waugh R., McLean K., Flavell A.J., Pearce S.R., Kumar A., Thomas B.B.T., 1997, Genetic distribution of *BARE-1*- like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP), *Molecular and General Genetics*, 253: 687–694.
- Weaver R., 2012, *Molecular Biology: Transposition*, Quad/Graphics, 978-0-07-352532-7, 5th Edition.
- Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A., Leroy, P., Morgante, M., Panaud, O., Paux, E., Sanmiguel, P. ve Schulman, A. H. A., 2007, Unified Classification System for Eukaryotic Transposable Elements, *Nature Genetics*, 8, 973-982.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V., 1991, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are usefull as genetic markers, *Nucleic Acids Research*, 18, 6531–6535.
- Witte C.P., Le Q.H., Bureau T., Kumar A., 2001, Terminal-repeat retrotransposons in miniature (TRIM) are involved in restructuring plant genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences Unites States America* 98: 13778-13783.

- Yörük, E., Albayrak, G., 2013, Genetic characterization of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* isolates from Turkey by using random-amplified polymorphic DNA, *Genetics and Molecular Research*, 12 (2), 1360-1372.
- Yilmaz, S., Gözükırmızı, N., 2013, Variation of retrotransposon movement in callus culture and regenerated shoots of barley, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 27, 4227-4230.
- Yilmaz, S., Marakli, S., Gözükırmızı, N., 2014, BAGY2 retrotransposon analyses in barley calli cultures and regenerated plantlets. *Biochemical Genetics*, 52, DOI 10.1007/s10528-014-9643-z.
- Yörük, E., Gazdaglı, A., Albayrak, G., 2014, Class B trichothecene chemotyping in *Fusarium* species by PCR assay, *Genetika*, 46 (3), 661-669.
- Yu J., Hu S., Wang J., Wong G.K., Li S., Liu B., Deng Y., Dai L., Zhou Y., Zhang X., 2002, A draft sequence of the rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica), *Science*, 296, 79-92.

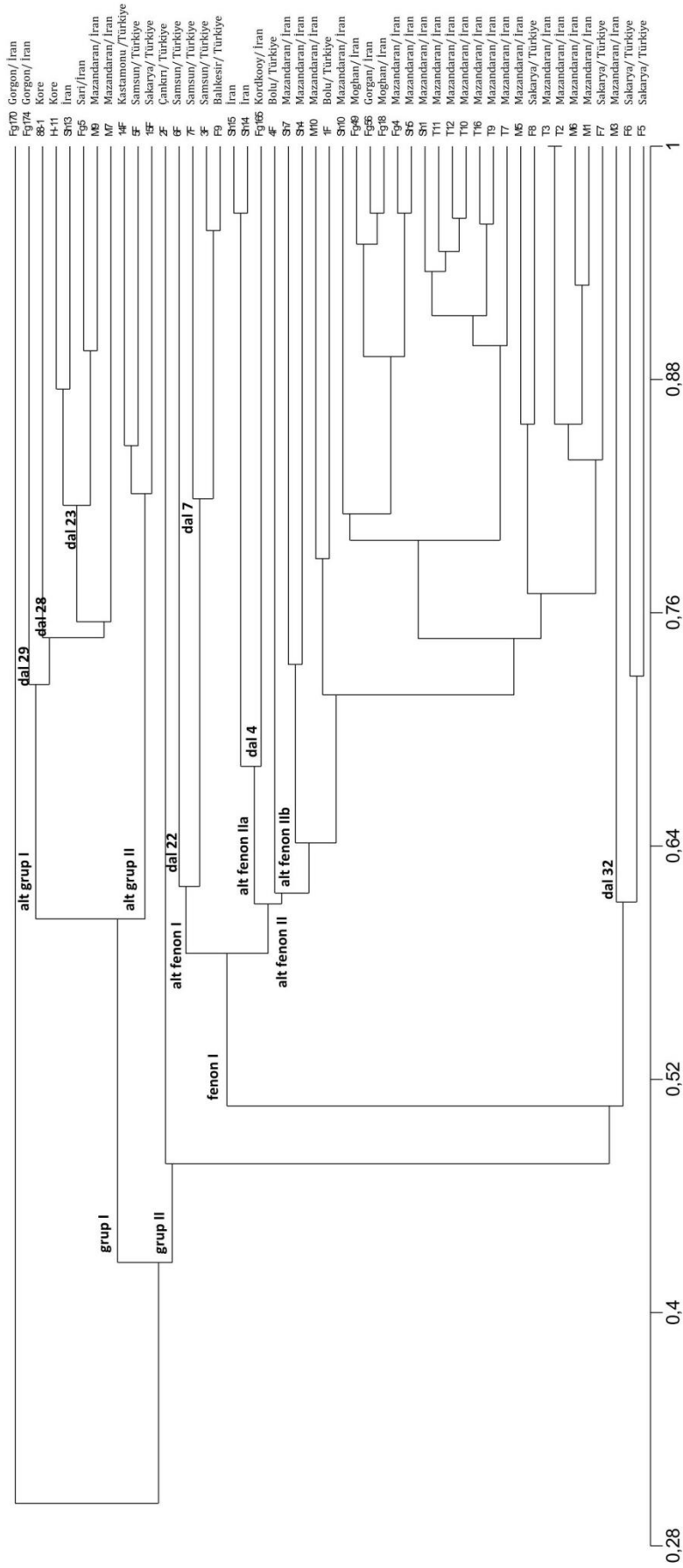
EKLER

EK 1. 47 *F. graminearum* izolatına ait Nei ve Li benzerlik katsayısı ile elde edilmiş benzerlik matrisi.

EK 2. 47 *F. graminearum* izolatına ait Nei ve Li Benzerlik katsayısına göre oluşturulan dendrogramda dallanma noktaları ve izolatların elde edildikleri bölgeler.



UPGMA



Nei ve Li benzerlik katsayısı

Ek 2.47 *F. graminearum* izolatına ait Nei ve Li Benzerlik katsayısına göre oluşturulan dendrogram, dallanma noktaları ve izolatların elde edildikleri bölgeler

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Gizem Gökçen YILMAZ
Doğum Yeri	Kayseri
Doğum Tarihi	08.08.1990
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	05392428587
E-Posta Adresi	yilmazgizemgokcen@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	01.01.2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı
Mezuniyet Tarihi	28.10.2016